

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PERIPLÁSMICAS Y
CITOPLÁSMICAS EN *Escherichia coli* MARCADAS CON LAS PROTEÍNAS
DE UNIÓN A METALES SmbP Y CusF3H+ Y CONSTRUCCIÓN DE UN
PLÁSMIDO PARA LA EDICIÓN GENÓMICA DE *Synechocystis* sp. PCC
6803 CON CRISPR/Cpf1**

Por

BRYAN DANIEL SANTOS RODRÍGUEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS con Orientación en Microbiología Aplicada**

Junio, 2021

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS PERIPLÁSMICAS Y CITOPLÁSMICAS
EN *ESCHERICHIA COLI* CON LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A METALES
SMBP Y CUSF3H+ Y CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO PARA LA
EDICIÓN GENÓMICA DE *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803 CON
CRISPR/CPF1**

Aprobación de la Tesis:

DR. XRISTO ZÁRATE KALFÓPULOS
Presidente

DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO
Secretario

DRA. PILAR DEL CARMEN MORALES SAN CLAUDIO
Vocal

DRA. DIANA RESÉNDEZ PÉREZ
Vocal

DR. NÉSTOR GUADALUPE CASILLAS VEGA
Vocal

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Sub-Directora de Posgrado

**PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS PERIPLÁSMICAS Y CITOPLÁSMICAS
EN *ESCHERICHIA COLI* CON LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A METALES
SMBP Y CUSF3H+ Y CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO PARA LA
EDICIÓN GENÓMICA DE *SYNECHOCYSTIS* SP. PCC 6803 CON
CRISPR/CPF1**

Revisión de la Tesis:

DR. JOSÉ RUBÉN MORONES RAMÍREZ
Co-Asesor (a)

DRA. PILAR DEL CARMEN MORALES SAN CLAUDIO
Comité Tutorial

DR. JESÚS ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO
Comité Tutorial

DR. JUAN FRANCISCO VILLARREAL CHIU
Comité Tutorial

DRA. MARÍA ELENA CANTÚ CÁRDENAS
Sub-Directora de Posgrado

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis Padres, **Julio César Santos Guerra** y **Laura Ofelia Rodríguez Núñez** a quienes les debo la vida y también les agradezco por guiarme para ser quien soy el día de hoy.

Dedico este trabajo a mis hermanos que siempre he recibido su apoyo y disposición en lo que hago y en lo que necesito, gracias por todo.

A mi amada y adorable Esposa, por toda tu confianza, bondad, paciencia, comprensión, apoyo y consejos que me motivaron a no desistir en lograr las metas que me propuse. Por sostenerme cuando tropezaba y por levantarme cuando caía, a Ti muchas gracias por estar a mi lado.

Anahí

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas e instituciones que estuvieron presentes durante la realización de este proyecto y durante mi desarrollo profesional.

A la Facultad de Ciencias Químicas y CONACyT por las becas y ayuda económica que me brindaron para llevar a cabo este proyecto. A la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL por las instalaciones prestadas, así como materiales y reactivos brindados.

Agradezco a mi asesor el Dr. Xristo Zárate Kalfópulos por todo lo que aprendí de él y por todo al apoyo brindado durante la elaboración del proyecto, gracias por la paciencia y por los consejos.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio, el Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño y el Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu, por todas sus observaciones, correcciones, consejos y tiempo durante la elaboración de este trabajo.

También agradezco a la Sub-directora de estudios de posgrado, la Dra. María Elena Cantú, por toda su atención, consejos y apoyo.

A todos los profesores del posgrado que compartieron todos sus conocimientos en las aulas de clase, para la mejora de nuestros proyectos.

A todos mis compañeros de posgrado quienes estuvieron siempre apoyándome y haciéndome pasar momentos muy agradables.

A mis amigos de la licenciatura, por todos los consejos brindados y por estar ahí siempre que los necesité.

Gracias por todo

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
CAPÍTULO 1	21
1. INTRODUCCIÓN	21
CAPÍTULO 2	27
2. ANTECEDENTES	27
2.1 Sistemas de expresión con proteínas de fusión	27
2.2 Producción de la lunasina	28
2.3 Producción de enteroquinasa	29
2.4 Edición genética con el sistema CRISPR	30
CAPÍTULO 3	32
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	32
3.1 Hipótesis	32
3.2 Objetivo General	32
3.3 Objetivos Específicos	32
CAPÍTULO 4	34
4. METODOLOGÍA	34
4.1 Obtención del inserto TorAps-SmbP	34
4.2 Amplificación del inserto Lunasina	35
4.3 Obtención del inserto Lunasinax2	36
4.4 Construcción de plásmidos	36
4.4.1 Construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP	36
4.4.2 Construcción de pET30a-TorAps-SmbP-GFP	39
4.4.3 Construcción del plásmido pET30a-SmbP_c-Lun, pET30a-CusF3H_c-Lun y pET30a-SmbP_c-Lunx2	43
4.4.4 Construcción de los plásmidos pET30a-SmbP_{TEV}-Lun y pET30a-CusF3H_{TEV}-Lun	46
4.5 Expresión de proteínas	49
4.5.1 Transformación de <i>E. coli</i> BL21(DE3)	49
4.5.2 Expresión a pequeña escala de proteínas	50
4.5.3 Obtención de la fracción soluble e insoluble	50
4.5.4 Análisis de las fracciones soluble e insoluble por SDS-PAGE	51
4.5.5 Expresión para la extracción de proteínas periplásmicas	51

4.5.6	Extracción de proteínas periplásmicas por el método de lisozima/choque osmótico.....	51
4.5.7	Escalamiento de la expresión a 1 L	52
4.6	Purificación de proteínas	54
4.6.1	Cromatografía IMAC empleando el sistema ÄKTA prime plus	54
4.6.2	Diálisis para la remoción de imidazol.....	54
4.7	Cuantificación de proteínas por el método Bradford	55
4.8	Remoción de la proteína de fusión	55
4.9	Evaluación de la actividad antioxidante de la lunasina por el método de captación de radicales ABTS	57
4.10	Microscopía de fluorescencia	57
4.11	Cuantificación de RFP por fluorescencia	58
4.12	Espectro de fluorescencia de GFP	58
4.13	Construcción del plásmido de edición CRISPR/Cpf1 para la edición de <i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	59
4.13.1	Diseño del crRNA.....	59
4.13.2	Digestión de los plásmidos pSL2680 y pCpf1b para la inserción del crRNA	59
4.13.3	Alineamiento de oligos para obtener el crRNA.....	60
4.13.4	Ligación de los plásmidos pSL2680 y pCpf1b con el crRNA_N	60
4.13.5	Transformación de pSL2680_crR y pCpf1b_crR en <i>E. coli</i> DH5α	61
4.13.6	Selección de colonias y extracción de ADN plasmídico	61
4.13.7	Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas	62
4.13.8	Amplificación de los fragmentos para el molde reparador que contiene el gen de la enzima FAP	62
4.13.9	Digestión de los plásmidos pSL2680_crR y pCpf1b_crR para el ensamble del molde de reparación.....	66
4.13.10	Purificación de los plásmidos pSL2680_crR y pCpf1b_crR digeridos...67	67
4.13.11	Ensamble de pCpf1b con brazos de homología y el gen de la enzima FAP.	67
4.13.12	Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas del ensamble del molde reparador	68
4.13.13	Amplificación de los fragmentos del molde reparador de pCpf1b_crRM y secuenciación	69
CAPÍTULO 5		71
5 RESULTADOS		71

5.1	Obtención de las construcciones pET30a-TorAps-SmbP-RFP, pET30a-TorAps-SmbP-GFP.	71
5.2	Obtención de las construcciones con lunasina	74
5.3	Expresión a pequeña escala de TorAps-SmbP-RFP y análisis por SDS-PAGE.	81
5.4	Extracción periplásmica de TorAps-SmbP-RFP y TorAps-SmbP-GFP por el método de lisozima/choque osmótico y análisis por SDS-PAGE.	82
5.5	Expresión a pequeña escala de las construcciones de lunasina	85
5.6	Purificación de TorAps-SmbP-RFP y TorAps-SmbP-GFP por cromatografía IMAC.....	88
5.7	Microscopía de fluorescencia.....	91
5.8	Cuantificación de RFP por espectrofotometría de fluorescencia.....	92
5.9	Obtención del espectro de fluorescencia de GFP.	93
5.10	Purificación de lunasina con las diferentes proteínas de fusión empleando cromatografía IMAC	94
5.11	Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	102
5.12	Digestión y remoción de la proteína de fusión de la lunasina empleando enteroquinasa, hidroxilamina y TEV y análisis por SDS-PAGE.	103
5.13	Capacidad de captación de radicales ABTS.....	110
5.14	Diseño del crRNA.....	111
5.15	Construcción de pSL2680 y pCpf1b con crRNA _{nblA}	114
5.16	Amplificación de fragmentos para la construcción del molde reparador 117	
5.17	Obtención de la construcción pCpf1b_crRNA _{nblA} y secuenciación	121
CAPÍTULO 6.....		131
6	DISCUSIONES.....	131
CAPÍTULO 7.....		145
7	CONCLUSIONES	145
CAPÍTULO 8.....		148
8	PERSPECTIVAS.....	148
CAPÍTULO 9.....		149
9	SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPOSICIÓN DE RESIDUOS	149
10	REFERENCIAS.....	150

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de Lun.	35
Tabla 2. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de TorAps-SmbP. En negrita se resalta la secuencia del péptido señal TorA y en cursiva la secuencia de SmbP. 71	
Tabla 3. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la lunasina. En negritas se observa la secuencia de la cola poliaspartil que interacciona con las argininas de las histonas.	74
Tabla 4. Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de Lunx2. En negritas se encuentran los aminoácidos para el corte con hidroxilamina y en cursiva las secuencias de lunasina.	77
Tabla 5. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de SmbP_{TEV}-Lun. En itálicas se encuentra la secuencia de SmbP, en negritas la secuencia de aminoácidos reconocido por la proteasa TEV y subrayado se encuentra la secuencia de lunasina.	79
Tabla 6. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de CusF3H₊TEV-Lun. En itálicas se encuentra la secuencia de CusF3H₊, en negritas la secuencia de aminoácidos reconocido por la proteasa TEV y subrayado se encuentra la secuencia de lunasina.	79
Tabla 7. Pesos del sedimento celular para la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-RFP.	82
Tabla 8. Pesos del sedimento celular para la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-GFP.	84
Tabla 9. Peso del sedimento celular para la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-RFP.	88
Tabla 10. Peso del sedimento celular para la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-GFP.	90
Tabla 11. Datos de la curva de calibración para la cuantificación por espectrofotometría de fluorescencia.	93
Tabla 12. Datos de la curva de calibración para el método de Bradford.	102
Tabla 13. Secuencia nucleotídica del gen nblA de Synechocystis sp. PCC 6803. En negritas se muestra las secuencias codificantes para la proteína de degradación de ficobilisoma y en itálicas la región no codificante.	112
Tabla 14. Secuencias de crRNA obtenidas con la herramienta Cas-Designer que tienen como blanco el gen nblA.	113
Tabla 15. Secuencia de oligos utilizados como crRNA. Las secuencias son complementarias entre sí para poder alinearlas y clonarlas en los plásmidos de edición.	114
Tabla 16. Iniciadores utilizados para la amplificación de la región de CRISPR de los plásmidos pSL2680 y pCpf1b.	115
Tabla 17. Secuencia nucleotídica de la enzima FAP.	117
Tabla 18. Iniciadores utilizados para la amplificación de la enzima FAP y adicionar la etiqueta de 6 histidinas	118
Tabla 19. Iniciadores utilizados para la amplificación de los fragmentos para el ensamble del molde reparador.	119
Tabla 20. Secuencia de los brazos homólogos para el molde reparador	119

Tabla 21. Disposición de los residuos generados.....149

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la amplificación con extremos complementarios para el ensamblaje en los plásmidos de edición.....	63
Figura 2. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP.....	72
Figura 3. PCR de confirmación de la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP. En el carril 1 se muestra el marcador de peso. En el carril 2 al 4 se muestra la amplificación de TorAps-SmbP-RFP con los iniciadores T7 delantero y reverso. Peso esperado: 1283 pb.....	73
Figura 4. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP.....	73
Figura 5. PCR de confirmación de la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP. En el carril 1 se muestra el marcador de peso GeneRuler 1kb DNA Ladder. En el carril 2 al 4 se muestra la amplificación de TorAps-SmbP-RFP con los iniciadores T7 delantero y reverso. Peso esperado: 1325 pb.....	74
Figura 6. Producto de amplificación en gel de agarosa al 0.7% de la PCR para el inserto del péptido Lunasina contenido en el plásmido pUC57. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder, Carril 2: Lunasina, Carril 3: Control negativo. Peso esperado: 129 pb.....	75
Figura 7. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-SmbP_c-Lun.....	76
Figura 8. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-CusF3H_c-Lun.....	76
Figura 9. PCR de confirmación de la construcción de pET30a-SmbP_c-RFP. En el carril 1 se muestra el marcador de peso. En el carril 2 al 4 se muestra la amplificación de SmbP_c-RFP y en el carril 5 al 7 se muestra la amplificación de CusF3H_c-Lun. Para ambas construcciones se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso.....	77
Figura 10. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-CusF3H₊-Lunx2.....	78
Figura 11. PCR de confirmación de la construcción de pET30a-CusF3H₊-Lunx2. En el carril 1 se muestra el marcador de peso. En el carril 2 al 4 se muestra la amplificación de CusF3H₊-Lunx2 con los iniciadores T7 delantero y reverso. Peso esperado: 785 pb.....	78
Figura 12. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-SmbP_{TEV}-Lun.....	80
Figura 13. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-CusF3H₊TEV-Lun.....	80
Figura 14. PCR de confirmación de la construcción de pET30a-SmbP_{TEV}-Lun y pET30a-CusF3H₊TEV-Lun. En el carril 1 se muestra el marcador de peso. En el carril 2 al 4 se muestra la amplificación de SmbP_{TEV}-Lun y en el carril 5 al 7 se muestra la amplificación de CusF3H₊TEV-Lun. Para ambas construcciones se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso. Peso esperado: 627 pb.....	81

Figura 15. SDS-PAGE 12% de la expresión a pequeña escala de TorAps-SmbP-RFP. FS= fracción soluble, FI= fracción insoluble. Como control negativo se utilizó E. coli BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Peso molecular calculado: 36.1 kDa.....	82
Figura 16. SDS-PAGE 12% de la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-RFP. FHiper= fracción hipertónica, FHipo= fracción hipotónica. Como control negativo se utilizó E. coli BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.	83
Figura 17. SDS-PAGE 12% de la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-GFP. FHiper= fracción hipertónica, FHipo= fracción hipotónica. Como control negativo se utilizó E. coli BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.	84
Figura 18. SDS-PAGE 15% de la microexpresión de SmbP_c-Lun. FS= fracción soluble, FI= fracción insoluble. Como control negativo se utilizó E. coli BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Peso molecular calculado 16.1 kDa.....	85
Figura 19. SDS-PAGE 15% de la microexpresión de CusF3H_c-Lun. FS= fracción soluble, FI= fracción insoluble. Como control negativo se utilizó E. coli BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Peso molecular calculado: 16.5 kDa.	86
Figura 20. SDS-PAGE 15% de la microexpresión de CusF3H_c-Lunx2. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: control negativo E. coli BL21(DE3) sin transformar; Carril 3-5: CusF3H_c-Lunx2 producida con 3 colonias distintas.....	86
Figura 21. SDS-PAGE 15% de la expresión a pequeña escala de SmbP_{TEV}-Lun. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: control negativo E. coli BL21(DE3) sin transformar; Carril 3-5: expresión a 25 °C de SmbP_{TEV}-Lun; Carril 6-8: expresión a 25 °C de SmbP_{TEV}-Lun. Peso molecular calculado: 16 kDa.	87
Figura 22. SDS-PAGE 15% de la microexpresión de CusF3H_{TEV}-Lun. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: control negativo E. coli BL21(DE3) sin transformar; Carril 3-5: expresión a 25 °C de CusF3H_{TEV}-Lun; Carril 6-8: expresión a 37 °C de CusF3H_{TEV}-Lun.	88
Figura 23. SDS-PAGE 12% de la purificación de TorAps-SmbP-RFP. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: fracción periplásmica. Carril 3: fracción no unida. Carril 4-15: fracciones obtenidas en la elución.	89
Figura 24. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para TorAps-SmbP-RFP.	90
Figura 25. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para TorAps-SmbP-GFP.	91
Figura 26. Análisis de la expresión de TorAps-SmbP-RFP por microscopia de fluorescencia. Campo claro: A) E. coli BL21(DE3). Fluorescencia: B) SmbP_c-RFP, C) TorAps-SmbP-RFP.	92
Figura 27. Gráfica de la curva de calibración de RFP a 585 nm de longitud de onda de emisión. Las proteínas fueron excitadas a 530 nm.....	93

Figura 28. Espectro de fluorescencia de GFP. La proteína fue excitada a 488 nm.	94
Figura 29. SDS-PAGE 15% de la purificación de SmbP_c-Lun de 1 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: lisado. Carril 3: fracción no unida. Carril 4-10: fracciones obtenidas en la elución.	94
Figura 30. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbP_c-Lun de 1 L de cultivo.	95
Figura 31. SDS-PAGE 15% de la purificación de SmbP_c-Lun de 3 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: lisado. Carril 3: fracción no unida. Carril 4-10: fracciones obtenidas en la elución.	96
Figura 32. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbP_c-Lun de 3 L de cultivo.	96
Figura 33. SDS-PAGE 15% de la purificación de SmbP_c-Lun de 2 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: lisado. Carril 3: fracción no unida. Carril 4-15, 17-30: fracciones obtenidas en la elución.	97
Figura 34. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbP_c-Lun de 2 L de cultivo.	98
Figura 35. SDS-PAGE 15% de la purificación de CusF3H_{+c}-Lun de 2 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: lisado. Carril 3: fracción no unida. Carril 5-15, 17-30: fracciones obtenidas en la elución.	98
Figura 36. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para CusF3H_{+c}-Lun de 2 L de cultivo.	99
Figura 37. SDS-PAGE 15% de la purificación de CusF3H_{+c}-Lunx2 de 1 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: lisado; Carril 3: fracción no unida. Carril 4-15 y 17-30: fracciones obtenidas en la elución por gradiente.	99
Figura 38. SDS-PAGE 15% de la purificación de SmbP_{TEV}-Lun de 1 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: lisado; Carril 3: fracción no unida; Carril 4-10: fracciones obtenidas en la elución.	100
Figura 39. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbP_{TEV}-Lun de 1 L de cultivo.	100
Figura 40. SDS-PAGE 15% de la purificación de CusF3H_{+c}-Lun de 1 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: lisado; Carril 3: fracción no unida; Carril 4-10: fracciones obtenidas en la elución.	101
Figura 41. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbP_{TEV}-Lun de 1 L de cultivo.	102
Figura 42. Gráfica de la curva de calibración del método de Bradford a 595 nm.	103
Figura 43. SDS-PAGE 16.5% de la remoción de la proteína SmbP_c de Lun después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se purificó con la resina ProfinityTM IMAC cargada con iones níquel. Se realizó la digestión de 200 µg.	

Carril 1: SmbP_c-Lun. Carril 2: Digestión de SmbP_c-Lun. Carril 3: Marcador de peso molecular. Carril 4: Sobrenadante. Carril 5: Lavado de la resina. Carril 6: Elución de SmbP.	104
Figura 44. SDS-PAGE 16.5 % de la remoción de la proteína CusF3H+c de Lun después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se purificó con la resina ProfinityTM IMAC cargada con iones níquel. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: CusF3H+c-Lun. Carril 2: Digestión de CusF3H+c-Lun. Carril 3: Marcador de peso molecular. Carril 4: Sobrenadante (Lunasina). Carril 5: Lavado de la resina. Carril 6: Elución de CusF3H+.	105
Figura 45 Tricina-SDS-PAGE 15% de la remoción de la proteína CusF3H+c de Lun después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se purificó con la resina ProfinityTM IMAC cargada con iones níquel. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: CusF3H+c-Lun. Carril 2: Digestión de CusF3H+c-Lun. Carril 3: Marcador de peso molecular. Carril 4: Sobrenadante (Lunasina). Carril 5-7: Lavado de la resina. Carril 8 y 9: Elución de CusF3H+.	105
Figura 46. SDS-PAGE al 16.5% de la digestión de CusF3H+c-Lunx2 con hidroxilamina. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: CusF3+c-Lunx2 antes de la digestión; Carril 3-6: digestión de CusF3H+c-Lunx2 con hidroxilamina a las 2, 19, 20 y 21 h respectivamente.	106
Figura 47. Tricine-SDS-PAGE 15 % de la remoción de la proteína CusF3H+c de Lunx2 después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se purificó con la resina ProfinityTM IMAC cargada con iones níquel. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: CusF3H+c-Lunx2. Carril 2: Digestión de CusF3H+c-Lunx2. Carril 3: Marcador de peso molecular. Carril 4: Sobrenadante (Lunx2). Carril 5: Lavado de la resina. Carril 6: Elución de CusF3H+.	107
Figura 48. SDS-PAGE al 16% de las digestiones con TEV a 4 y 30 °C. Carril 3 y 6: digestión a 4 °C; Carril 4 y 7: digestión a 30 °C. Carril 1: Marcador de peso molecular Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard; Carril 2: CusF3H+_{TEV}-Lun sin digerir; Carril 3 y 4: digestiones de CusF3H+_{TEV}-Lun; Carril 5: SmbP_{TEV}-Lun; Carril 6 y 7: digestiones de SmbP_{TEV}-Lun.	108
Figura 49. SDS-PAGE al 15% de la remoción de la proteína de fusión SmbP de Lun después de la incubación con TEV durante 16 h a 4 °C. Se purificó con la resina PROTEINDEXTM HiBondTM Ni-NTA Agarose. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: SmbP_{TEV}-Lun. Carril 2: Digestión de SmbP_{TEV}-Lun. Carril 3: Marcador de peso molecular Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard. Carril 4: Sobrenadante que contiene la lunasina. Carril 5: Lavado de la resina. Carril 6: Elución de SmbP.	109
Figura 50. SDS-PAGE al 15% de la remoción de la proteína de fusión SmbP de Lun después de la incubación con TEV durante 16 h a 4 °C. Se purificó con la resina PROTEINDEXTM HiBondTM Ni-NTA Agarose. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: SmbP_{TEV}-Lun. Carril 2: Digestión de SmbP_{TEV}-Lun. Carril 3: Marcador de peso molecular Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard. Carril 4: Sobrenadante que contiene la lunasina. Carril 5: Lavado de la resina. Carril 6: Elución de SmbP.	110

Figura 51. Efecto de lunasina, lunasina en tándem, CusF3H+-Lun, CusF3H+-Lunx2 y CusF3H+ en la capacidad de captación de radicales ABTS. Las barras de error muestran la desviación estándar.	111
Figura 52. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pSL_crRNA _{nblA}	114
Figura 53. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pCpf1b_crRNA _{nblA}	115
Figura 54. PCR de confirmación de la construcción de pSL_crRNA _{nblA} . En el carril 1 se muestra el marcador de peso GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carril 2 y 3: amplificación de la región CRISPR sin modificar del plásmido pSL2680; Carril 4-6: amplificación de la región CRISPR modificado con crRNA _{nblA} del plásmido pSL_crRNA _{nblA} . Peso esperado: 330 pb.....	116
Figura 55. PCR de confirmación de la construcción de pCpf1b_crRNA _{nblA} . En el carril 1 se muestra el marcador de peso GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carril 2: amplificación de la región CRISPR sin modificar del plásmido pCpf1b; Carril 4-6: amplificación de la región CRISPR modificado con crRNA _{nblA} del plásmido pCpf1b_crRNA _{nblA} . Peso esperado: 330 pb.....	116
Figura 56. Amplificación de la enzima FAP para la adición de la etiqueta de 6 histidinas. Carril 1: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carril 2 y 3: FAP _{Hisx6} ; Carril 4: control negativo. Peso esperado: 1806 pb.	118
Figura 57. Amplificación de los brazos homólogos para el molde reparador. Carril 1 y 5: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 2 y 3: Brazo homólogo 1; Carril 4 y 8: control negativo; Carril 6 y 7: Brazo homólogo 2.	120
Figura 58. Amplificación de la enzima FAP _{Hisx6} para el molde reparador. Carril 1: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carril 2 y 3: FAP _{Hisx6} ; Carril 4: control negativo.	121
Figura 59. PCR de confirmación de la construcción de pCpf1b_crRM En el carril 1 se muestra el marcador de peso GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carriles 2-7: plásmidos de 3 colonias diferentes, Carriles 8 y 9: pCpf1b sin modificar, Carriles 10 y 11: controles negativos. Carril 2, 4 y 6: amplificación con crRNA _{nblA} F y BH1 _{FAPR} , peso esperado: 950; Carril 3, 5 y 7: amplificación con los iniciadores, peso esperado: 1800 pb.....	122
Figura 60. PCR de confirmación del molde de pCpf1b_crRM. En el carril 1 se muestra el marcador de peso GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carriles 2: amplificación de BH1 + FAP, peso esperado: 2400 pb, Carril 3: amplificación de FAP + BH2, peso esperado: 2400 pb, Carril 4: BH1 + FAP + BH2, peso esperado: 3000 pb, Carril 5: FAP, peso esperado: 1800 pb, Carril 6: BH1, peso esperado: 600 pb, Carril 7: BH 2, peso esperado: 600 pb.....	123
Figura 61. Secuenciación obtenida de crRNA _{nblA} de la amplificación con los iniciadores crRNA _{nblA} F y crRNA _{nblA} R.	124
Figura 62. Alineamiento de la secuenciación obtenida con la secuencia del crRNA _{nblA}	124
Figura 63. Secuenciación obtenida de BH1 de la amplificación con los iniciadores pCpf1BH1F y pCpf1BH2R.	125

Figura 64. Alineamiento de la secuenciación obtenida con la secuencia del BH1.	126
Figura 65. Secuenciación obtenida de la primera parte de FAP de la amplificación con los iniciadores pCpf1BH1F y pCpf1BH2R.	127
Figura 66. Secuenciación obtenida de la segunda parte de FAP de la amplificación con los iniciadores pCpf1BH1F y pCpf1BH2R.	127
Figura 67. Alineamiento de la secuenciación de la primera parte de FAP obtenida.	128
Figura 68. Alineamiento de la secuenciación de la segunda parte de FAP obtenida	128
Figura 69. Secuenciación obtenida de BH1 de la amplificación con los iniciadores pCpf1BH1F y pCpf1BH2R.	129
Figura 70. Alineamiento de la secuenciación obtenida con la secuencia del BH1	130

NOMENCLATURA

°C	Grado Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitros
µM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ala	Alanina
Arg	Arginina
BL21(DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> , para expresión de proteínas
bp	Pares de bases
BSA	Albumina de suero bovino (Bovine serum albumin)
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
DH5α	Cepa de <i>E. coli</i> , para producción y mantenimiento de ADN recombinante
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Ent	Enteroquinasa
g	Gramos
GFP	Proteína verde fluorescente
HCl	Ácido clorhídrico
His	Histidina
Ile	Isoleucina
IMAC	Cromatografía de afinidad a iones metálicos
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
Kbp	Kilopares de bases
kDa	Kilodaltones
L	Litro
LB	Luria Bertani
Leu	Leucina
M	Molar
MalE	Proteína de unión a maltosa
mAu	Miliunidades de absorbancia
Met	Metionina
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPa	Megapascales
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
nM	Nanomolar
nm	Nanometros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PeIB	Pectato liasa B
Phe	Fenilalanina
pmoles	Picomoles
ps	Peptido señal

RFP	Proteína roja fluorescente
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SmbP	Proteína pequeña de unión a metales (Small metal binding Protein)
SmbPc	SmbP citoplásmica
SmbPp	SmbP periplásmica
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TorA	Trimetilamina-N-oxido reductasa
Trp	Triptofano
U.V.	Luz ultravioleta

RESUMEN

Bryan Daniel Santos Rodríguez

Fecha de Graduación: Junio, 2021

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES PERIPLÁSMICAS Y CITOPLÁSMICAS EN *Escherichia coli* MARCADAS CON LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A METALES SmbP Y CusF3H+ Y CONSTRUCCIÓN DE UN PLÁSMIDO PARA LA EDICIÓN GENÓMICA DE *Synechocystis* sp. PCC 6803 CON CRISPR/Cpf1

Número de páginas: 155

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de Estudio: Ingeniería Genética

Propósito y Método de Estudio: CusF3H+ y SmbP son dos proteínas de fusión descubiertas recientemente que han demostrado un gran potencial para la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Estas proteínas pueden ser expresadas en el periplasma de *E. coli* por la vía Sec si cuentan con su péptido señal nativo; en este trabajo se intercambió esta secuencia señal en la proteína SmbP para el transporte de proteínas por medio de la vía Tat al periplasma de la célula. Las proteínas roja y verde fluorescentes fueron transportadas por esta vía al ser marcadas con TorA-SmbP. La lunasina es un péptido de 43 aminoácidos aislado de la semilla de la soya con actividad anticancerígena, quimiopreventiva, antioxidante, antiinflamatoria e inmunomodulador. Sin embargo, los métodos de obtención son muy costosos, por ello este péptido se expresó y purificó en *Escherichia coli* marcado con las proteínas de unión a metales SmbP y CusF3H+. *Synechocystis* sp. PCC 6803 es una cianobacteria que tiene la cualidad de utilizar el CO₂ como fuente de carbono. Este potencial la vuelve interesante para la producción de enzimas recombinantes. La fotodescarboxilasa de ácidos grasos es una enzima que cataliza la descarboxilación de ácidos grasos convirtiéndolos en hidrocarburos utilizando luz los cuáles pueden tener potencial uso como biocombustibles. La metodología consistió en lo siguiente: para la expresión de GFP y RFP con TorA-SmbP y lunasina con SmbP y CusF3H+ 1) se construyeron los plásmidos, 2) Transformación de *E. coli* DH5 α , 3) Extracción del ADN plasmídico, 4) Análisis confirmatorio por PCR, 5) Transformación de *E. coli* BL21(DE3), 6) Expresión de proteínas, 7) Purificación por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados, 8) Cuantificación de GFP y RFP por fluorescencia y lunasina por método Bradford, 9) Medición de la actividad antioxidante de la lunasina; para generar el plásmido para la inserción de la enzima FAP en *Synechocystis* sp. PCC 6803 con CRISPR/Cpf1 1) diseño del crRNA, 2) construcción del plásmido CRISPR/Cpf1 con crRNA, 3) transformación de *E. coli* DH5 α , 4) diseño del molde reparador e inserción en el plásmido de edición mediante la técnica del ensamble de Gibson. 5) Secuenciar el plásmido obtenido para confirmar el ensamble y el crRNA.

Contribuciones y conclusiones: en este estudio se obtuvieron diferentes construcciones que contienen la proteína SmbP como proteína de fusión junto con el péptido señal de TorA para la expresión y transporte de las proteínas roja y verde fluorescentes en el periplasma de *Escherichia coli*. Los resultados mostraron que SmbP es una proteína de fusión capaz de producir proteínas activas y transportadas al periplasma de la célula por medio de la vía Tat; por lo tanto, SmbP es una proteína de fusión versátil que permite expresión de proteínas ya sea por la vía Sec o la vía Tat. También se realizó la producción del péptido lunasina en el citoplasma de *E. coli*. Se purificó mediante cromatografía IMAC y se cuantificaron los niveles de la quimera pura obteniendo una mayor producción en las construcciones de SmbP_{TEV}-Lun y CusF3H_{TEV}-Lun. Así mismo, se logró la producción de la lunasina en repeticiones tándem siendo la primera vez que se realizó con este péptido en *E. coli*. Se evaluó la actividad antioxidante de la lunasina y la lunasina en tándem obteniendo 30% y 16% de inhibición, mientras que para las quimeras CusF3H_c-Lun, CusF3H_c-Lunx2 y CusF3H_c fue de 9%, 6% y 6% respectivamente. Así mismo, se generó el plásmido pCpf1b_crRM utilizando el ensamble de Gibson para la inserción de la fotoenzima sustituyendo el gen *nblA* del genoma de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803.

FIRMA DEL ASESOR:

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

Desde la llegada de la producción de proteínas recombinantes, la aplicación de proteínas terapéuticas como productos biofarmacéuticos ha evolucionado notablemente¹. Una gran variedad de productos farmacéuticos hoy en día son producidos de manera recombinante². Las proteínas y los péptidos son de gran interés en el sector biofarmacéutico encontrándose una gran cantidad como fármacos en el mercado y actualmente otra gran variedad se encuentran en pruebas preclínicas y clínicas^{3,4}.

De manera natural han sido identificados un gran número de péptidos que juegan un rol crucial en la fisiología humana como neurotransmisores, hormonas, factores de crecimiento y ligandos de canales iónicos. Esto los convierte en potenciales candidatos a ser utilizados como péptidos terapéuticos^{4,5}.

La lunasina es un péptido de 43 aminoácidos aislado de la soya y de otras semillas y cereales^{6,7} que posee efectos quimiopreventivos y anticancerígenos. Se compone de 4 regiones: los residuos del 1-22 tienen una función desconocida, los residuos del 23-31 dirigen la lunasina a la cromatina, los residuos 32-34 internalizan a la lunasina dentro del núcleo, los residuos 35-43 es una cola

poliaspártica la cual es la responsable de una unión directa al centro de las histonas dentro de la cromatina⁸⁻¹⁰. Además, ha demostrado tener un gran potencial como antioxidante y anti-inflamatorio¹¹.

Actualmente, la lunasina puede ser obtenida por dos diferentes medios: purificarla de fuentes naturales o producirla mediante síntesis química. El primero de ellos parece ser muy laborioso mientras que el segundo puede ser rápido y efectivo, pero con un costo de manufactura muy alto, además, de no ser amigable con el medio ambiente¹². En comparación con estos métodos, la tecnología del ADN recombinante ofrece el medio más rentable para la producción de péptidos a gran escala mediante el uso de sustratos de bajo costo.

La producción de combustibles de fuentes renovables continúa siendo una de las alternativas a la reducción de la dependencia del petróleo. Los alcanos y alquenos de diferentes longitudes de cadena son blancos importantes debido a que son el mayor componente de la gasolina (C5-C9 hidrocarburos), combustibles para aviones (C5-C16) y diésel (C12-C20). Algunas especies de microalgas como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella variabilis* han demostrado producir hidrocarburos a partir de ácidos grasos utilizando una ruta dependiente de luz¹³.

La fotodexcarboxilasa de ácidos grasos (FAP por sus siglas en inglés fatty acid photodecarboxylase) es una fotoenzima aislada de la microalga *Chlorella variabilis* NC64A la cual tiene la capacidad de convertir ácidos grasos en alcanos o alquenos utilizando luz azul. Este tipo de enzimas son dependientes de luz, ya que necesitan de un flujo de fotones para permanecer catalíticamente activas¹⁴.

Este tipo de enzimas son de gran interés debido a que pueden ser una alternativa a la producción de biocombustibles de fuentes renovables.

Para la producción de proteínas recombinantes existe una gran cantidad de hospederos que son utilizados. Las principales plataformas utilizadas van desde bacterias, levaduras y hongos hasta organismos superiores. Los sistemas bacterianos son ampliamente utilizados para la producción de proteínas recombinantes. Estos ofrecen ciertas ventajas: i) tienen altos niveles de expresión de proteínas recombinantes, ii) rápida multiplicación celular, iii) medios de cultivos con requerimientos simples^{3,15}.

Las cianobacterias son un grupo de microorganismos fotosintéticos que son de gran interés debido a que pueden ser utilizadas como biofábricas aprovechando su facilidad de utilizar CO₂ y luz para crecer. *Synechocystis* sp. PCC 6803 es un ejemplo de este tipo de microorganismo demostrando tener un metabolismo del carbono muy versátil creciendo bajo condiciones fotoautotróficas, mixotróficas y heterotróficas¹⁶. Sin embargo, el mayor obstáculo en la modificación de este grupo de bacterias para utilizarlos como biofábricas es la carencia de herramientas genéticas modernas y precisas como las que ya existen en otros microorganismos procariontes que han sido extensivamente estudiados como *Escherichia coli*^{17,18}.

E. coli sigue siendo uno de los más atractivos sistemas de expresión bacteriana y productor de proteínas recombinantes debido a que es uno de los sistemas más fáciles, rápidos y baratos de utilizar. Además, se encuentra bien caracterizado metabólicamente y fisiológicamente, tiene una tasa de crecimiento

rápida, se tiene bien caracterizada su genética y existen numerosas herramientas para manipularla genéticamente. Sin embargo, existen ciertas desventajas al utilizar los sistemas bacterianos como *E. coli*: i) se puede obtener una incorrecta plegación de la proteína, ii) formación de cuerpos de inclusión iii) la carencia de modificaciones postranscripcionales, iv) degradación por proteasas del hospedero^{3,15,19}.

Una de las estrategias para afrontar estos problemas es adicionando una proteína de fusión la cual le conferirá ciertas características como: el incremento en los rendimientos de expresión, obtener proteínas más solubles y activas, disminuir la formación de cuerpos de inclusión y muchas de estas tienen la característica de ser afines a un ligando facilitando los procesos de purificación^{1,20}.

Así mismo, existen proteínas que necesitan ciertas modificaciones, como la formación de enlaces disulfuro, para su correcto plegamiento. En este caso es necesario que contengan una secuencia señal para secretarlas en el espacio periplásmico²¹. La secuencia señal Tat (Twin Arginine Translocase), a pesar de no ser tan utilizados como los del sistema Sec, son atractivos por su capacidad de transportar proteínas completamente plegadas al periplasma o proteínas que requieren cofactores para su completa actividad. Además esto puede ser una ventaja debido a que se pueden extraer las proteínas recombinantes del periplasma conteniendo menos contaminantes y proteasas del hospedero²².

En muchos de los casos es necesario remover la proteína de fusión de la proteína de interés debido a que podría afectar la estructura y la funcionalidad de

la misma²³. La enteroquinasa es una peptidasa que reconoce la secuencia (Asp)4-Lis y corta en el extremo C-terminal de esta secuencia. Esta proteasa es una de las más utilizadas y la convierte en un reactivo esencial en la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* ya que colocando esta secuencia entre una proteína de fusión y la proteína de interés permitirá la separación de ambas²⁴. Sin embargo, los precios de esta proteasa pueden ser elevados, 2560 unidades de enteroquinasa tienen un costo aproximado de \$424.00 dólares (New England Biolabs).

El término Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) y las proteínas asociadas (Cas) se han llegado a convertir en una herramienta útil para la edición genética. CRISPR constituye un sistema inmune adaptativo en una gran variedad de bacterias y arqueas en contra de ADN extraño. El descubrimiento y caracterización de CRISPR y los genes Cas ha permitido a los investigadores aplicar este sistema en microorganismos para mantener su integridad genómica para disminuir los efectos de ADN extraño, así como modificar y manipular ADN genómico por la introducción de rupturas de doble cadena dando lugar a la alteración de secuencias por rutas de reparación endógenas^{25,26}.

La herramienta CRISPR ha sido utilizada para editar o regular genes de diversos microorganismos como *Escherichia coli*²⁷⁻²⁹, *Bacillus subtilis*³⁰, *Lactobacillus reuteri*³¹ y *Synechococcus elongatus*¹⁸. Por esto CRISPR es una técnica muy útil para la edición genómica de microorganismos, como las cianobacterias, que son difíciles de modificar.

Debido a todo esto, se utilizará el péptido señal TorA de la ruta tat para producir proteínas periplásmicas con la pequeña proteína de unión a metales SmbP, se producirá el péptido lunasina en el citoplasma de *Escherichia coli* utilizando CusF3H+ y SmbP y se construirá un plásmido utilizando el ensamble de Gibson para la integración del gen de la enzima FAP con CRISPR/Cpf1 en *Synechocystis* sp PCC 6803.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

2.1 Sistemas de expresión con proteínas de fusión

Yu-Dong Li et al. (2009) probaron el potencial del péptido señal Tat de la proteína DagA de *Streptomyces coelicolor* para mejorar el transporte de proteínas al periplasma. En este estudio se utilizó *E. coli* BL21(DE3) para expresar la proteína verde fluorescente (GFP) utilizando este péptido y promover la expresión al periplasma. Estos resultados muestran que GFP fue transportada en su forma activa debido a que mostró la fluorescencia característica³².

Heli I. Alanen et al. (2015) realizaron la expresión de diferentes proteínas de interés farmacéutico que contienen enlaces disulfuro para su correcto plegamiento (interferón $\alpha 2b$, hormona del crecimiento humana (hGH) y dos fragmentos de anticuerpos). En este estudio se realizó la expresión de estas proteínas en *E. coli* CyDisCo conteniendo el péptido señal de la proteína TorA²².

Vargas-Cortez et al. (2016) utilizaron la proteína pequeña de unión a metales (SmbP) del periplasma de *Nitrosomonas europaea* como proteína de fusión para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Esta proteína tiene la capacidad de unirse a una gran variedad de metales divalentes como el Ni(II). Se

expresó la proteína verde fluorescente (GFP) marcada con SmbP mostrando altos niveles de proteína soluble comparado con la proteína de unión a la maltosa (MBP) y la enzima glutatión S transferasa (GST). Para purificarla se utilizó una resina IMAC cargada con Ni(II) obteniendo altos niveles de pureza³³.

Por otra parte, Cantú-Bustos et al. (2016) utilizaron la proteína CusF del periplasma de *E. coli* como proteína de fusión para la expresión de proteínas recombinantes. Esta proteína juega un rol importante en la resistencia de *E. coli* a elevados niveles de cobre y plata. Se expresó GFP marcada con CusF mostrando altos niveles de fluorescencia comparado con las proteínas de fusión MBP y GST. Así mismo, CusF produjo grandes cantidades de proteína soluble con bajos niveles de cuerpos de inclusión³⁴.

No obstante, Vargas-Cortez et al. (2017) realizaron una modificación a la proteína de fusión CusF adicionando 3 histidinas extras por mutagénesis dirigida para aumentar su afinidad al Ni(II). Esta mejora permite que esta proteína de fusión, denominada CusF3H+, mejore la pureza utilizando cromatografía IMAC. Además, la expresión y purificación de GFP marcado con esta proteína de fusión no afectó su capacidad de incrementar la expresión proteica y la pureza se mejoró considerablemente después de ser sometida a cromatografía IMAC con Ni(II)³⁵.

2.2 Producción de la lunasina

Rihards Alexis et al. (2016) analizaron las propiedades de la lunasina oxidada y reducida encontrando que las secuencias de las regiones Trp3-Lys12 y Pro21 Ile30 tienen una alta tendencia a formar alfa hélices, mientras que la cola

poliaspártica tiene una tendencia a formar una lámina beta. Para realizar estas pruebas se expresó la lunasina con la proteína de fusión MBP con una etiqueta de histidina obteniendo un 90% de pureza y un rendimiento de 3 mg de lunasina por 1 litro de cultivo expresado³⁶.

Qinghua Tian et al. (2017) obtuvieron de manera recombinante la lunasina utilizando el Hirudin como nueva proteína de fusión. En este estudio se obtuvo un rendimiento de 86 mg/L de la lunasina con una pureza mayor al 95%. Así mismo se probó la actividad apoptótica contra las líneas celulares de cáncer de colon humano (HCT-116), cáncer de mama humano estrógeno-independiente (MDA-MB-231), hepatoma humano (HepG2) y en células epiteliales humanas normales (SRA01/04) demostrando tener la actividad en las primeras dos líneas celulares mencionadas³⁷.

2.3 Producción de enteroquinasa

Haarin Chun et al. (2012) produjeron la enteroquinasa de cadena ligera bovina en el citoplasma de *E. coli* utilizando la proteína disulfuro isomerasa (PDI) como proteína de fusión la cual tiene la capacidad de catalizar la formación de enlaces disulfuro. Con la finalidad de mejorar la afinidad al sitio de reconocimiento de la enteroquinasa (DDDDK), se realizaron sustituciones en Tyr174 por un aminoácido básico y en Lys99 por con una metionina o una glutamina. Estos resultados mostraron tener mayor afinidad DDDDK que la versión wild type de la enteroquinasa²⁴.

Wolfgang Skala et al. (2013) desarrollaron una metodología para la producción de la enteroquinasa de cadena ligera bovina. Sin embargo, esta metodología

implica la expresión de la enteroquinasa como cuerpos de inclusión, solubilizarlos, realizar el plegamiento *in vitro*, realizar la concentración de la proteína y finalmente purificarla. Este proceso puede volverse costoso y laborioso debido a que es necesario solubilizar y replegar la enteroquinasa para obtenerla en su forma activa reportando hasta 8 días de proceso de producción. Los rendimientos obtenidos con este proceso son de 1.7 mg/L de cultivo³⁸.

2.4 Edición genética con el sistema CRISPR

Kristen E. Wendt et al. (2016) determinaron que la enzima Cas9 era tóxica en cianobacterias por lo cual se cambió a un vector que permitió la expresión del gen Cas9 obteniendo un 100% de edición. En este trabajo se eliminó el gen *nblA* el cual es un elemento esencial para la degradación del ficobilisoma de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. Cuando esta cepa crece en medio carente de nitrato exhibe un blanqueamiento de verde a amarillo mientras que las mutantes carentes del gen *nblA* en las mismas condiciones permanecían en color verde lo cual era un indicio de que este gen fue eliminado satisfactoriamente¹⁸.

Justin Ungerer et al. (2016) demostraron que empelando el Cpf1 de *Francisella novicida*, una nueva nucleasa del sistema CRISPR, no era tóxica en cianobacteria comparado con la nucleasa Cas9. En este trabajo se realizaron mutaciones puntuales, eliminación e inserción de genes en tres cianobacterias: *Synechococcus* UTEX 2973, *Synechocystis* 6803 y *Anabaena* 7120. El desarrollo de este sistema de edición genómica es un acercamiento para la modificación genética de diversas especies de cianobacteria¹⁷.

Hong Zhang et al. (2017) desarrollan una optimización del sistema CRISPR/Cas9 empleando una innovadora estrategia de dos pasos para la edición genómica eficiente de cualquier sitio el cual no depende de la disponibilidad de secuencias PAM (protospacer adjacent motif) utilizando *E. coli* como microorganismo a modificar. En este trabajo se desarrolla en un primer paso la adición de un casete de resistencia a antibióticos cerca de los sitios blanco para posteriormente realizar la selección de las transformantes en placas que contienen el antibiótico seleccionado. Subsecuentemente la secuencia del casete de resistencia a antibióticos es empleada como blanco de corte por Cas9 para finalmente ser remplazado por cualquier secuencia de ADN por HDR (homology-directed repair)²⁷.

CAPÍTULO 3

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

Las proteínas recombinantes marcadas con TorA-SmbP son transportadas al periplasma de *Escherichia coli* por medio de la vía Tat plegadas y activas. Las proteínas de unión a metales SmbP y CusF3H⁺ mejoran la producción del péptido lunasina en *E. coli*.

Utilizando el método de Gibson es posible construir un plásmido para la edición genómica de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con el gen *nblA* como sitio blanco y la inserción del gen de la fotoenzima descarboxilasa de ácidos grasos.

3.2 Objetivo General

Producir proteínas recombinantes en el periplasma de *Escherichia coli* marcadas con SmbP por medio de la vía Tat; expresar y purificar la lunasina recombinante en la misma bacteria y construir un plásmido para la edición genómica de *Synechocystis* sp. PCC 6803 con CRISPR/Cpf1.

3.3 Objetivos Específicos

- Expresar, purificar y cuantificar las proteínas verde y roja fluorescentes en el periplasma de *Escherichia coli* marcadas con TorA-SmbP.

- Construir vectores de expresión que contengan las proteínas de fusión SmbP, CusF3H+ y el gen de la lunasina.
- Expresar y purificar la lunasina recombinante utilizando el sistema de expresión de proteínas de fusión CusF3H+ y SmbP en *Escherichia coli*.
- Evaluar actividad antioxidante de la lunasina mediante la capacidad de captación de radicales ABTS.
- Diseñar el crRNA que tenga como blanco el gen NblA y los brazos de homología para el molde reparador que contenga el gen de la enzima FAP.
- Ensamblar el molde reparador y el crRNA en el plásmido Cpf1b para obtener el plásmido de edición con CRISPR/Cpf1b y confirmarlo por secuenciación.

CAPÍTULO 4

4. METODOLOGÍA

4.1 Obtención del inserto TorAps-SmbP

El inserto de TorAps-SmbP se encontraba contenido en el plásmido pUC57 por lo cual se realizó una digestión para su obtención. Para la digestión se utilizaron las enzimas de restricción NdeI (New England Biolabs, NEB) y KpnI (New England Biolabs, NEB) ya que el inserto de TorAps-SmbP contenía el sitio de corte para estas enzimas. La reacción se llevó a un volumen final de 50 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 2 μ L (1 μ g) de ADN plasmídico (pUC57-TorAps-SmbP), 5 μ L de solución amortiguadora 1.1 10x (NEB), 41 μ L de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1 μ L de la enzima NdeI y 1 μ L de la enzima KpnI, se dejó incubar durante 2 horas a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.2 Amplificación del inserto Lunasina

Para la amplificación de Lunasina (Lun) se diseñaron iniciadores específicos conteniendo el sitio de corte para las enzimas de restricción NcoI para el iniciador delantero y XhoI para el iniciador reverso (ver Tabla 1).

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la amplificación de Lun.

Iniciador	Secuencia de nucleótidos
Lun iniciador delantero	5' – ATGCATGCACCATGGCTAGCAAATGGCAGCATCAGC – 3'
Lun iniciador reverso	5' – ATGCATGCACTCGAGTTAATTATCGTCATCGTCATC – 3'

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L en microtubos para PCR de 200 μ L. La reacción contenía los siguientes reactivos: 1 μ L (aproximadamente 10 ng) de ADN del inserto Lun, 5 μ L de solución amortiguadora de reacción, 3 μ L de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μ L de iniciador reverso (60 pmoles), 1.5 μ L (10nM) de dNTPs, 0.5 μ L de *Vent* polimerasa y se completó la reacción con 36 μ L de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 58 °C y elongación por 45 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones y se purificaron utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION de Qiagen.

4.3 Obtención del inserto Lunasinax2

El inserto de Lunasinax2 (Lunx2) es la secuencia de la lunasina en tándem de 2 repeticiones separado por el sitio de corte de la hidroxilamina. Este se encontraba contenido en el plásmido pUC57 por lo cual se realizó una digestión para su obtención. Para la digestión se utilizaron las enzimas de restricción NcoI (New England Biolabs, NEB) y XhoI (New England Biolabs, NEB) ya que el inserto de Lunx2 contenía el sitio de corte para estas enzimas. La reacción se llevó a un volumen final de 10 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 5.5 μ L (2 μ g) de ADN plasmídico (pUC57_Lunx2), 1 μ L de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 1.5 μ L de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1 μ L de la enzima NcoI y 1 μ L de la enzima XhoI, se dejó incubar durante 2 horas a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.4 Construcción de plásmidos

4.4.1 Construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP

Se emplearon técnicas convencionales de clonación (digestión, ligación y transformación) para la construcción de este plásmido.

4.4.1.1 Digestión del plásmido pET30a-PelBps-SmbP-RFP e inserto TorAps-SmbP

Se realizó la digestión del inserto TorAps-SmbP y del plásmido pET30a-PelBps-SmbP-RFP. Cabe destacar que ya se contaba con este plásmido que contiene el gen de RFP al cual mediante la digestión se le sustrajo la proteína de

fusión PelBps-SmbP. La digestión se llevó a cabo con las enzimas de restricción NdeI (New England Biolabs, NEB) y KpnI (New England Biolabs, NEB). Para la digestión del plásmido pET30a-PelBps-SmbP-RFP, la reacción se llevó a un volumen final de 50 μ L y consistió en los siguientes reactivos: 12.1 μ L (1000 μ g) del plásmido pET30a-PelBps-SmbP-RFP, 5 μ L de solución amortiguadora 1.1 10x (New England Biolabs, NEB) y 29.9 μ L de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1 μ L de la enzima NdeI (NEB) y 1 μ L de la enzima KpnI (NEB), se dejó incubar durante 2 horas a 37 °C y por último se agregó 1 μ L de SAP (NEB) dejando incubar por 1 hora más a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

La digestión del inserto TorAps-SmbP se llevó a cabo en el punto 4.1.

4.4.1.2 Ligación del plásmido pET30a-RFP e inserto TorAps-SmbP

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L y consistió en los siguientes reactivos: 3 μ L de pET30-RFP previamente digerido, 4 μ L de inserto (CusFps-SmbP, PelBps-SmbP y CusF3H+), 2 μ L de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic), 10 μ L de agua mQ y 1 μ L de T4 DNA ligasa. Como control negativo se llevó a cabo una reacción con 0 μ L de inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción solo que se completó el volumen final con 14 μ L de agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche (16 horas). Finalmente, la T4 DNA ligasa fue inactivada a 65 °C durante 10 minutos como sugiere el fabricante (BioBasic).

4.4.1.3 Transformación de pET30a-TorAps-SmbP-RFP en *E. coli* DH5 α

La transformación se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* DH5 α la cual es especial para la propagación de ADN plasmídico. Se emplearon 5 μ L del producto de ligación inactivado previamente en 50 μ L de células de *E. coli* DH5 α rubidio-competentes en un microtubo eppendorf de 1.5 ml en hielo y se incubó de 20 a 30 minutos. Posteriormente se procedió a realizar el choque térmico a 44 °C durante 45 segundos y se llevó de nuevo a incubación en hielo durante dos minutos, después de esto se le adicionaron 800 μ L de caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 hora a 37 °C con agitación a 200 rpm. Después del tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 10000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 50 μ L del caldo LB. Las células fueron resuspendidas en dicho volumen y se transfirieron a placas de agar LB suplementadas con Kanamicina (30 μ g/mL) esparciéndolo por toda la placa por extensión con varilla. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

4.4.1.4 Extracción de ADN plasmídico

Basado en las colonias obtenidas en las placas con producto de reacción de ligación y en el control negativo, se realizó la selección de varias colonias. Estas, fueron inoculadas en 6 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina (30 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm. Mediante centrifugación a 10000 rpm por 2 minutos se recolectó el sedimento celular de los 6 mL del cultivo, una vez obtenidas las células se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.4.1.5 Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

A partir del ADN plasmídico obtenido de las colonias seleccionadas se procedió a realizar un análisis confirmatorio para ratificar la presencia del plásmido. Para esto se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores T7 delanteros y reversos que flanquean el sitio de clonación múltiple en el cual se encuentra insertado el inserto TorAps-SmbP y RFP. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 1 μ L (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico (pET30-TorAps-SmbP-RFP), 5 μ L de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 μ L de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μ L de iniciador reverso (60 pmoles), 1.5 μ L (15nM) de dNTPs, 0.5 μ L de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36 μ L de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 58 °C y elongación por 1 minuto y 20 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.4.2 Construcción de pET30a-TorAps-SmbP-GFP

Se emplearon técnicas convencionales de clonación (digestión, ligación y transformación) para la construcción de este plásmido.

4.4.2.1 Digestión del plásmido pET30a-CusF3H+c-GFP e inserto TorAps-SmbP

Se realizó la digestión del plásmido pET30a-CusF3H+c-GFP. Cabe destacar que ya se contaba con este plásmido que contiene el gen de GFP al cual mediante la digestión se le sustrajo la proteína de fusión CusF3H+c. La digestión se llevó a cabo con las enzimas de restricción NdeI (New England Biolabs, NEB) y KpnI (New England Biolabs, NEB). Para la digestión del plásmido pET30a-CusF3H+-GFP, la reacción se llevó a un volumen final de 30 μ L y consistió en los siguientes reactivos: 17 μ L (2 μ g) del plásmido pET30a-CusF3H+c-GFP, 3 μ L de solución amortiguadora 1.1 10x (New England Biolabs, NEB) y 6 μ L de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1.5 μ L de la enzima NdeI (NEB) y 1.5 μ L de la enzima KpnI (NEB), se dejó incubar durante 2 horas a 37 °C y por último se agregó 1 μ L de SAP (NEB) dejando incubar por 1 hora más a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.4.2.2 Ligación del plásmido pET30a-GFP e inserto TorAps-SmbP

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L y consistió en los siguientes reactivos: 4 μ L de pET30-GFP previamente digerido, 5 μ L de inserto (TorAps-SmbP), 2 μ L de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic), 8.5 μ L de agua mQ y 0.5 μ L de T4 DNA ligasa. Como control negativo se llevó a cabo una reacción con 0 μ L de inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción solo que se completó el volumen final con 13.5 μ L de

agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa fue inactivada a 65 °C durante 10 minutos como sugiere el fabricante (BioBasic).

4.4.2.3 Transformación de pET30a-TorAps-SmbP-GFP en *E. coli* DH5α

La transformación se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* DH5α la cual es especial para la propagación de ADN plasmídico. Se emplearon 5 µL del producto de ligación inactivado previamente en 50 µL de células de *E. coli* DH5α rubidio-competentes en un microtubo eppendorf de 1.5 ml en hielo y se incubó de 20 a 30 minutos. Posteriormente se procedió a realizar el choque térmico a 44 °C durante 45 segundos y se llevó de nuevo a incubación en hielo durante dos minutos, después de esto se le adicionaron 800 µL de caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 hora a 37 °C con agitación a 200 rpm. Después del tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 10000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 50 µL del caldo LB. Las células fueron resuspendidas en dicho volumen y se transfirieron a placas de agar LB suplementadas con Kanamicina (30 µg/mL) esparciéndolo por toda la placa por extensión con varilla. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

4.4.2.4 Extracción de ADN plasmídico

Basado en las colonias obtenidas en las placas con producto de reacción de ligación y en el control negativo, se realizó la selección de varias colonias. Estas, fueron inoculadas en 6 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina (30 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 16 horas en agitación a 200 rpm. Mediante

centrifugación a 10000 rpm por 2 minutos se recolectó el sedimento celular de los 6 mL del cultivo, una vez obtenidas las células se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.4.2.5 Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

A partir del ADN plasmídico obtenido de las colonias seleccionadas se procedió a realizar un análisis confirmatorio para ratificar la presencia del plásmido. Para esto se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores T7 delanteros y reversos que flanquean el sitio de clonación múltiple en el cual se encuentra insertado el inserto TorAps-SmbP y GFP. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 1 μ L (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico (pET30-TorAps-SmbP-GFP), 5 μ L de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 μ L de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μ L de iniciador reverso (60 pmoles), 1.5 μ L (15nM) de dNTPs, 0.5 μ L de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36 μ L de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 58 °C y elongación por 1 minuto y 20 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.4.3 Construcción del plásmido pET30a-SmbP_c-Lun, pET30a-CusF3H_{+c}-Lun y pET30a-SmbP_c-Lunx2

Se realizó la construcción de los plásmidos pET30-SmbP_c-Lun, pET30a-CusF3H_{+c}-Lun y pET30a-SmbP_c-Lunx2 utilizando técnicas convencionales de clonación.

4.4.3.1 Digestión de lunasina y los plásmidos pET30a-SmbP_c y pET30a-cusF3H_{+c}.

La digestión se llevó a cabo con las enzimas de restricción NcoI (New England Biolabs, NEB) y XhoI (New England Biolabs, NEB). Para la digestión del plásmido pET30a-SmbP_c la reacción se llevó a un volumen final de 40 µL conteniendo los siguientes reactivos: 30 µL (1.2 µg) de ADN, 2 µL de solución amortiguadora CutSmart 10x (NEB), 3 µL de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1.5 µL de la enzima NcoI y 1.5 µL de la enzima XhoI, se dejó incubar durante 2 horas a 37 °C. Para la digestión del plásmido pET30a-CusF3H_{+c} la reacción se llevó a un volumen final de 30 µL conteniendo los siguientes reactivos: 15.9 µL (2 µg) de ADN plasmídico, 3 µL de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 7.1 µL de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1.5 µL de la enzima NcoI y 1.5 µL de la enzima XhoI, se dejó incubar durante 2 horas a 37 °C y por último se agregó 1 µL de SAP (NEB) dejando incubar por 1 hora más a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

La digestión del inserto Lunasina se llevó a cabo en un volumen final de 40 μL y consistió en los siguientes reactivos: 30 μL (1.2 μg) del inserto Lunasina, 4 μL de solución amortiguadora 3.1 10x (NEB), 3 μL de agua mQ, 1.5 μL de la enzima NcoI (NEB) y 1.5 μL de la enzima XhoI (NEB), se dejó incubar durante 2 horas a 37 °C. Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.4.3.2 Ligación de los plásmidos pET30a-SmbP_c y pET30a-CusF3H_c con los insertos Lun y Lunx2

La reacción de ligación para Lun se realizó en un volumen final de 10 μL y consistió en los siguientes reactivos: 3 μL del plásmido a utilizar (pET30a-SmbP_c o pET30a-CusF3H_c) previamente digerido, 1 μL de inserto (Lun), 1 μL de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic), 4.5 μL de agua mQ y 0.5 μL de T4 DNA ligasa. Como control negativo se llevó a cabo una reacción con 0 μL de inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción solo que se completó el volumen final con 5.5 μL de agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa fue inactivada a 65 °C durante 10 minutos como sugiere el fabricante.

La reacción de ligación para Lunx2 se realizó en un volumen final de 10 μL y consistió en los siguientes reactivos: 3 μL del plásmido a utilizar (pET30a-CusF3H_c) previamente digerido, 1 μL de inserto (Lunx2), 1 μL de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic), 4.5 μL de agua mQ y 0.5 μL de T4 DNA ligasa. Como control negativo se llevó a cabo una reacción con 0 μL de inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción solo que se completó el volumen

final con 5.5 μL de agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa fue inactivada a 65 °C durante 10 minutos como sugiere el fabricante.

4.4.3.3 Transformación de pET30a-SmbP_c-Lun y pET30a-CusF3H₊_c-Lun en *E. coli* DH5 α

Una vez inactivada la T4 DNA ligasa se procedió a realizar la transformación con la reacción de ligación en *E. coli* DH5 α utilizando el protocolo que se describe en el punto 4.4.1.3.

4.4.3.4 Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo según el protocolo descrito en el punto 4.3.1.4 empleando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.4.3.5 Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

A partir del ADN plasmídico pET30a-SmbP_c-Lun y pET30a-CusF3H₊_c-Lun obtenido de las colonias seleccionadas realizó un análisis confirmatorio para ratificar su presencia. Para esto se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores delanteros y reversos T7. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL conteniendo los siguientes reactivos: 1 μL (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico (pET30a-SmbP_c-Lun y pET30a-CusF3H₊_c-Lun), 5 μL de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 μL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μL de iniciador reverso (60 pmoles), 1.5 μL (10 nM) de dNTPs, 0.5 μL de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36 μL de agua mQ. La amplificación se realizó

en un termociclador marca Techme (modelo ³Prime) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 1 minuto a 95 °C, alineamiento por 1 minuto a 58 °C y elongación por 1 minuto a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.4.4 Construcción de los plásmidos pET30a-SmbP_{TEV}-Lun y pET30a-CusF3H₊TEV-Lun

Se realizó la construcción de los plásmidos pET30-SmbP_{TEV}-Lun y pET30a-CusF3H₊TEV-Lun que contienen el sitio de reconocimiento de corte de la proteasa del Virus Etch del Tabaco (por sus siglas en inglés TEV) entre la proteína de fusión (SmbP y CusF3H+) y la lunasina. Se utilizaron técnicas convencionales de clonación. Las secuencias de SmbP_{TEV}-Lun y CusF3H₊TEV-Lun fueron sintetizadas por la empresa GenScript y se enviaron dentro del plásmido pUC57.

4.4.4.1 Digestión del inserto SmbP_{TEV}-Lun, CusF3H₊TEV-Lun y el plásmido pET30a

La digestión se llevó a cabo con las enzimas de restricción NdeI (New England Biolabs, NEB) y XhoI (New England Biolabs, NEB). Para la digestión del plásmido pET30a la reacción se llevó a un volumen final de 20 µL conteniendo los siguientes reactivos: 13 µL (2 µg) de ADN, 2 µL de solución amortiguadora CutSmart 10x (NEB), 1 µL de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1.5 µL de la enzima NdeI y 1.5 µL de la enzima XhoI, se

dejó incubar durante 2 horas a 37 °C y por último se agregó 1 µL de SAP (NEB) dejando incubar por 1 hora más a 37 °C.

SmbP_{TEV}-Lun y CusF3H+_{TEV}-Lun, fueron sintetizados por la empresa GenScript Corporation y enviados en el plásmido pUC57. La reacción de digestión se realizó en un volumen final de 20 µL conteniendo los siguientes reactivos: 5 µL (2 µg) de ADN, 2 µL de solución amortiguadora CutSmart 10x (NEB), 10 µL de agua mQ. La digestión se llevó de manera simultánea adicionando 1.5 µL de la enzima NdeI y 1.5 µL de la enzima XhoI, se dejó incubar durante 2 horas a 37 °C. Las digestiones se llevaron a cabo en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.4.4.2 Ligación de los plásmidos pET30a con SmbP_{TEV}-Lun y CusF3H+_{TEV}-Lun

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 20 µL y consistió en los siguientes reactivos: 5 µL del plásmido a utilizar (pET30a) previamente digerido, 1 µL de inserto (SmbP_{TEV}-Lun o CusF3H+_{TEV}-Lun), 2 µL de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic), 11.5 µL de agua mQ y 0.5 µL de T4 DNA ligasa. Como control negativo se llevó a cabo una reacción con 0 µL de inserto conteniendo los mismos reactivos de la reacción solo que se completó el volumen final con 12 µL de agua mQ. La reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa fue inactivada a 65 °C durante 10 minutos como sugiere el fabricante.

4.4.4.3 Transformación de pET30a-SmbP_c-Lun y pET30a-CusF3H_{+c}-Lun en *E. coli* DH5α

Una vez inactivada la T4 DNA ligasa se realizó la transformación con la reacción de ligación en *E. coli* DH5α utilizando el protocolo que se describe en el punto 4.3.1.3.

4.4.4.4 Extracción de ADN plasmídico

El procedimiento para la extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo según el protocolo descrito en el punto 4.3.1.4 empleando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.4.4.5 Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

A partir del ADN plasmídico pET30a-SmbP_{TEV}-Lun y pET30a-CusF3H_{+TEV}-Lun obtenido de las colonias seleccionadas realizó un análisis confirmatorio para ratificar su presencia. Para esto se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores delanteros y reversos T7. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo los siguientes reactivos: 1 µL (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico (pET30a-SmbP_{TEV}-Lun y pET30a-CusF3H_{+TEV}-Lun), 5 µL de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 µL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 µL de iniciador reverso (60 pmoles), 1 µL (10 nM) de dNTPs, 0.5 µL de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36.5 µL de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca ThermoFisher Scientific (modelo SimpliAmp) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 3 minutos a 94 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94 °C, alineamiento por

30 segundos a 56 °C y elongación por 45 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 7 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.5 Expresión de proteínas

Se describe a continuación el protocolo utilizado para la expresión de proteínas de las diferentes construcciones realizadas.

4.5.1 Transformación de *E. coli* BL21(DE3)

La transformación se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), la cual es especial para la expresión de proteínas, utilizando las diferentes construcciones realizadas. Se empleó 1 µL (~10 ng) del ADN plasmídico a probar en 20 µL de células de *E. coli* BL21(DE3) rubidio-competentes en un microtubo eppendorf de 1.5 ml en hielo y se incubó de 20 a 30 minutos. Posteriormente se realizó el choque térmico a 44 °C durante 45 segundos y se llevó de nuevo a incubación en hielo durante dos minutos, después de esto se le adicionaron 800 µL de caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 hora a 37 °C con agitación a 200 rpm. Después del tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 10000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 50 µL del caldo LB. Las células fueron resuspendidas en dicho volumen y se transfirieron a placas de agar LB suplementadas con Kanamicina (30 mg/mL) esparciéndolo por toda la placa por extensión con varilla. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

4.5.2 Expresión a pequeña escala de proteínas

Se llevó a cabo una microexpresión de proteínas de las colonias que se obtuvieron de la transformación de las construcciones en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con la finalidad de observar la expresión de la proteína deseada. Se realiza la selección de varias colonias y utilizando un aplicador se transfiere una colonia en un tubo conteniendo 2 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina (30 µg/mL). Se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6. Alcanzada esta D.O.₆₀₀ la incubación se detuvo, se atemperaron los cultivos y se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se llevaron a incubación de 25 °C a 200 rpm de agitación por 16 horas. Posterior a la incubación se recolectaron los sedimentos celulares centrifugando a 10000 rpm durante 2 minutos.

4.5.3 Obtención de la fracción soluble e insoluble

Para obtener la fracción soluble a partir del sedimento celular se resuspende el sedimento en 100 µL de agua mQ, después se agregan 20 µL de solución amortiguadora de carga para SDS-PAGE 6x y se mezcla suavemente, se hierve durante 10 minutos y se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos. Se separa el sobrenadante como fracción soluble, al sedimento restante se le agregan 120 µL de solución de urea 8 M y se hierve de nuevo durante otros 10 minutos de esta manera los cuerpos de inclusión se solubilizan en la solución de urea, finalmente se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos obteniendo así la fracción insoluble en el sobrenadante la cual es posteriormente visualizado mediante el SDS-PAGE al igual que la fracción soluble.

4.5.4 Análisis de las fracciones soluble e insoluble por SDS-PAGE

Una vez obtenidas las fracciones se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando un gel de resolución al 12% y un gel apilador al 4%. Una vez terminada la electroforesis se realiza la tinción con Azul Brillante de Coomassie para observar las bandas correspondientes de las proteínas.

4.5.5 Expresión para la extracción de proteínas periplásmicas

Se llevó a cabo una expresión de proteínas de las colonias que se obtuvieron de la transformación en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con las construcciones de pET30a-TorAps-SmbP-RFP y pET30a-TorAps-SmbP-GFP con la finalidad de observar la expresión de la proteína periplásmica deseada. Se hizo la selección de las colonias y se sembraron en un tubo conteniendo 2 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina (30 mg/mL) incubándose a 37 °C a 200 rpm de agitación por 16 horas para obtener el inóculo correspondiente. A 30 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina (30 mg/mL) se le inocularon 30 µL del inóculo previamente preparado y se incubó a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6. Una vez alcanzado el D.O.₆₀₀ la incubación se detuvo, se atemperaron los cultivos y se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se llevaron a incubación de 25 °C a 200 rpm de agitación por 16 horas.

4.5.6 Extracción de proteínas periplásmicas por el método de lisozima/choque osmótico

Para la extracción de proteínas periplásmicas se siguió el método lisozima/choque osmótico con modificaciones^{39,40}. De la microexpresión

realizada en el punto 4.5.5, se tomaron los 30 mL del cultivo y se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada a 4 °C para obtener los sedimentos celulares a los cuales se les tomó el peso húmedo. Después se resuspendieron los sedimentos a una concentración celular de 0.1 g/mL en solución hipertónica conteniendo 200 mM de Tris-HCl pH 8.0, 20 % de sacarosa, 2 mM de EDTA y 0.5 mg/mL de lisozima. Se incubaron a 4 °C durante 30 minutos, se centrifugaron nuevamente los sedimentos, se recolectó el sobrenadante y se guardó como fracción hipertónica. Posteriormente, se resuspendieron los sedimentos celulares a una concentración de 0.1 g/mL en solución hipotónica que contenía solo agua mQ. Se incubaron a 4 °C durante 30 minutos, se centrifugaron nuevamente los sedimentos, se recolectó el sobrenadante y se guardó como fracción hipotónica. Las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE como en el punto 4.4.4.

4.5.7 Escalamiento de la expresión a 1 L

Se realizó un escalamiento de la expresión de las diferentes proteínas. Se hizo la selección de las colonias que presentaron la mejor expresión. Para esto las expresiones se llevaron a cabo en matraces de 500 mL obteniendo un volumen final de 1 L. Los matraces fueron inoculados con un cultivo previamente preparado de la colonia seleccionada y se incubaron a 37 °C con 200 rpm de agitación hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ entre 0.4 – 0.6. Una vez alcanzado el D.O.₆₀₀ la incubación se detuvo, se atemperaron los cultivos y se llevó a cabo la inducción utilizando IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Los cultivos se llevaron a incubación de 25 °C a 200 rpm de agitación por 16 horas. Los sedimentos

celulares se recolectaron en una centrifuga refrigerada a 4 °C por 15 minutos a 10000 rpm. Para la extracción de proteínas totales se utilizó un Bead Beater marca utilizando perlas de vidrio de un diámetro de 0.1 mm. El sedimento celular se resuspendió en 30 mL de una solución amortiguadora de lisis que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol. Se transfirió en una cámara de 50 mL que contenía 25 mL de perlas de vidrio. Se aplicaron 8 ciclos de 15 segundos de homogenización y 45 segundos de reposo. Se dejó sedimentar el lisado y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 50 mL y se centrifugó a 12000 rpm en una centrifuga refrigerada a 4 °C por 15 minutos para obtener el clarificado con las proteínas. Se implementó un segundo método para la lisis con perlas empleando el protocolo de Ramanan et al. 2008⁴¹. El sedimento celular se resuspendió en 45 mL de una solución amortiguadora de lisis que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM imidazol. La suspensión celular se dividió en volúmenes de 15 mL en tubos falcon de 50 mL. Se añadió perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro a una razón de 1.5 g por mL de suspensión celular. Los tubos se colocaron en hielo y se llevaron a agitación por 1 h a 300 rpm en una incubadora marca LabTech (modelo LSI-3016A). Se dejó sedimentar el lisado y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 50 mL y se centrifugó a 12000 rpm en una centrifuga refrigerada a 4 °C por 15 minutos para obtener el clarificado con las proteínas.

Para la extracción de proteínas periplásmicas se empleó el método de lisozima/choque osmótico como en el punto 4.4.6.

4.6 Purificación de proteínas

Se describirá a continuación la metodología empleada para la purificación de las fracciones periplásmicas.

4.6.1 Cromatografía IMAC empleando el sistema ÄKTA prime plus

Se utilizó una columna HiTrap FF de 1 mL (GE Healthcare) la cual fue cargado con iones níquel previamente. La columna fue equilibrada con 5 volúmenes de solución amortiguadora de equilibrio que contenía Tris-HCl 50 mM, 500 mM NaCl y 5 mM imidazol pH 8.0 utilizando un flujo de 0.5 ml/min y una presión máxima de seguridad de 0.5 MPa según recomienda el fabricante. Se cargó la muestra en la columna utilizando un flujo de 0.5 mL/min y una presión máxima de 0.5 MPa recolectando la fase no unida. Posterior a esto la columna se lavó con solución amortiguadora de lavado conteniendo Tris-HCl 50 mM, 500 mM NaCl y 5 mM imidazol pH 8.0 hasta que la señal U.V. descendiera y se mantuviera constante. Finalmente se llevó a cabo la elución en gradiente utilizando 2 soluciones amortiguadoras una que contenía Tris-HCl 50 mM, 500 mM NaCl pH 8.0 y la otra a 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl y 200 mM imidazol pH 8.0 (solución amortiguadora de elución). El flujo fue mantenido a 0.5 mL/min y una presión máxima de 0.5 MPa recolectando fracciones de 0.5 mL las cuales fueron conservadas para su posterior análisis mediante SDS-PAGE como en el punto 4.4.4.

4.6.2 Diálisis para la remoción de imidazol

De las fracciones obtenidas por cromatografía de afinidad con el sistema ÄKTA prime plus, se seleccionaron las que mostraron una cantidad considerable

de la proteína por SDS-PAGE. Estas fracciones fueron colectadas en una membrana de diálisis SnakeSkin Pleated (10K MWCO) y fue dializado para retirar el exceso de imidazol utilizando una solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl y 500 mM NaCl pH 8.0. Se realizaron 2 diálisis de una hora cada una y una de 16 horas. Una vez que la muestra fue dializada, se conservó en congelación a -20 °C.

4.7 Cuantificación de proteínas por el método Bradford

Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones del estándar de BSA (1 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.4 mg/mL y 0.2 mg/mL). En una placa de 96 pocillos se adicionaron 5 μ L, tanto del estándar como de las muestras a analizar, en diferentes pocillos. Posteriormente se adicionaron 250 μ L del reactivo de Bradford dejando incubar durante 5 minutos con agitación en un lector de microplacas marca Thermo Scientific (Modelo MultiSkan GO) para finalmente realizar la medición de la absorbancia a 595 nm en el mismo lector. Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.8 Remoción de la proteína de fusión

Para la remoción de la proteína de fusión se realizó mediante las proteasas enteroquinasa de cadena ligera (NEB), TEV y el reactivo químico hidroxilamina.

Para la digestión con enteroquinasa se tomaron 100 μ g de proteína dializada previamente y se le adicionó 1 μ L de la enzima. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 16 horas y posterior a esto se realizó una purificación utilizando la resina Profinity™ IMAC la cual fue cargada previamente con iones

níquel siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Rad). La muestra fue incubada en la resina durante 16 horas a 4°C y se recolectó la muestra conteniendo la proteína de interés. Posteriormente se realizaron 2 lavados a la resina utilizando solución amortiguadora de lavado utilizada en el punto 4.5.1 para finalmente realizar la elución utilizando solución amortiguadora de elución utilizada en el punto 4.5.1.

Para la digestión con TEV se tomaron 200 µg de proteína dializada previamente y se le adicionó 9 µL de la enzima. Se dejó incubar a 30 °C y 4°C por 16 horas y posterior a esto se realizó una purificación utilizando la resina PROTEINDEX™ HiBond™ Ni-NTA Agarose siguiendo las instrucciones del fabricante (Marvelgent bioscinces). La muestra fue incubada en la resina durante 16 horas a 4°C y se recolectó la muestra conteniendo la proteína de interés. Posteriormente se realizaron 2 lavados a la resina utilizando solución amortiguadora de lavado utilizada en el punto 4.5.1 para finalmente realizar la elución utilizando solución amortiguadora de elución utilizada en el punto 4.5.1.

Para la digestión con hidroxilamina realizó la reacción en un volumen final de 200 µL empleando el siguiente protocolo⁴². A partir de una solución de hidroxilamina 4 M se tomaron 90 µL y se adicionaron a 110 µL de la quimera para obtener una concentración final de 1.8 M de hidroxilamina. Se incubó a 45 °C con 50 rpm de agitación y se tomaron muestras a las 2, 19 y 22 h.

Todas las muestras de las diferentes digestiones fueron analizadas por SDS-PAGE empleando un gel de resolución al 16 % y un apilador al 4% y por

Tricina-SDS-PAGE al 15%. Los geles se revelaron utilizando una tinción con Azul Brillante de Coomassie.

4.9 Evaluación de la actividad antioxidante de la lunasina por el método de captación de radicales ABTS.

Para evaluar la actividad antioxidante de la lunasina se midió su capacidad de captación de radicales ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) usando el método de Ra (1999)⁴³. El ABTS fue disuelto en agua a una concentración de 7 mM. El radical catiónico de ABTS fue producido haciendo reaccionar la solución stock de ABTS (7 mM) con persulfato de potasio a una concentración final de 2.45 mM dejando la mezcla reaccionando a temperatura ambiente en oscuridad durante 12-16 h. La solución resultante se diluyó con PBS 5 mM (pH 7.4) hasta una absorbancia de 0.70 ± 0.02 a una longitud de onda de 734 nm. Después de adicionar 1 mL del reactivo a 10 μ L de la muestra, se registró la absorbancia al minuto 0, 1, 5, 6 y 10. La capacidad de captación de radicales ABTS se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Capacidad de captación de radicales ABTS (\%)} = \frac{(A_c - A_s)}{A_c} * 100$$

donde A_c es la absorbancia del control (ABTS sin muestra) y A_s es la absorbancia de las muestras después de reaccionar con el ABTS.

4.10 Microscopía de fluorescencia

Se realizó el análisis por microscopía de fluorescencia de TorAps-SmbP-RFP. Se utilizó un microscopio marca Leica (modelo DM3000) con lámpara de mercurio y filtro Texas Red con un rango de longitud de onda de excitación de

542-576 nm y emisión de 596-664 nm. Primero se realizó una microexpresión como en el punto 4.4.5. Se tomaron los 2 mL del cultivo expresado y se recolectó el sedimento celular por centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos. Se resuspendió el sedimento con 1 mL de solución amortiguadora PBS, se tomó una alícuota de 5 μ L colocándola en un portaobjetos. Las muestras fueron cubiertas con un cubreobjetos y fueron observadas con el objetivo de inmersión 100x.

4.11 Cuantificación de RFP por fluorescencia

Para la cuantificación de RFP de las diferentes expresiones se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones de RFP (70 μ g/mL, 50 μ g/mL, 20 μ g/mL, 10 μ g/mL, 5 μ g/mL, 2.5 μ g/mL y 1 μ g/mL). Las diluciones de las diferentes concentraciones se realizaron con solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, pH 8.0. Posteriormente se realizaron las mediciones en un espectrofotómetro de fluorescencia marca PerkinElmer (modelo LS 55) con una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm. Las mediciones se realizaron por triplicado.

4.12 Espectro de fluorescencia de GFP

Para la obtención del espectro de fluorescencia de GFP se utilizó un espectrofotómetro de fluorescencia marca PerkinElmer (modelo LS 55) con una longitud de onda de excitación de 488 nm y un barrido desde una longitud de onda de emisión de 480 nm a 550 nm.

4.13 Construcción del plásmido de edición CRISPR/Cpf1 para la edición de *Synechocystis* sp. PCC 6803

4.13.1 Diseño del crRNA

Para el diseño del crRNA se utilizó la herramienta Cas-Designer⁴⁴ empleando los siguientes criterios: PAM para FnCpf1 de *Francisella novicidia* 5'-TTN-3', genoma blanco de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (ASM131838v1) – cianobacteria y longitud del crRNA sin PAM de 20 nucleótidos. Una vez seleccionada la secuencia para el crRNA, se sintetizaron como oligos por la empresa GenScript los cuales son complementarios entre sí.

4.13.2 Digestión de los plásmidos pSL2680 y pCpf1b para la inserción del crRNA

Se utilizó el plásmido pSL2680¹⁷ (pSL2680 fue un regalo de Himadri Pakrasi (Addgene plasmid #85581; <http://n2t.net/addgene:85581>; RRID:Addgene_85581) y el pCpf1b⁴⁵ (pCPF1b fue un regalo de Cheng-Ca Zhang Addgene plasmid #122187; <http://n2t.net/addgene:122187>; RRID:Addgene_122187) los cuáles están diseñados para la edición en cianobacterias.

La digestión se llevó a cabo con la enzima de restricción AarI (Thermo Scientific™). Para pSL2680 la reacción se llevó a un volumen final de 100 µL conteniendo los siguientes reactivos: 80 µL de ADN, 10 µL de solución amortiguadora AarI 10x (Thermo Scientific™), 2 µL de AarI oligos, 4 µL de la enzima AarI y 4 µL de agua mQ. Se incubó durante 4 horas a 37 °C. Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

Para pCpf1b la reacción se llevó a un volumen final de 100 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 50 μ L de ADN, 10 μ L de solución amortiguadora Aarl 10x (Thermo Scientific™), 2 μ L de Aarl oligos, 4 μ L de la enzima Aarl y 34 μ L de agua mQ. Se incubó durante 4 horas a 37 °C. Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.13.3 Alineamiento de oligos para obtener el crRNA

Los oligos sintetizados con la secuencia del crRNA (crRNA_NF y crRNA_NR) fueron resuspendidos a una concentración de 200 μ M para obtener un stock. Para el alineamiento de los oligos la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 10 μ L de 100 μ M del oligo crRNA_{nblAF}, 10 μ L de 100 μ M del oligo crRNA_{nblAR}, 5 μ L de solución amortiguadora de alineamiento 10x (100 mM Tris-HCl, pH 7.85, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA) y 25 μ L de agua mQ. Para el alineamiento se empleó un termociclador marca ThermoFisher Scientific (modelo SimpliAmp) con las siguientes condiciones: 95 °C por 5 minutos y una rampa de enfriamiento de 0.1 °C/seg hasta 25 °C y almacenamiento a 4 °C. Los oligos alineados fueron diluidos 1:50 para su posterior uso.

4.13.4 Ligación de los plásmidos pSL2680 y pCpf1b con el crRNA_N

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μ L y consistió en los siguientes reactivos: 8 μ L del plásmido a utilizar (pSL2680 o pCpf1b) previamente digerido, 0.5 μ L del inserto (crRNA_N 1:50), 1 μ L de solución amortiguadora de ligasa 10x (BioBasic), y 0.5 μ L de T4 DNA ligasa. La

reacción se incubó a 4 °C toda la noche. Finalmente, la T4 DNA ligasa fue inactivada a 65 °C durante 10 minutos como sugiere el fabricante.

4.13.5 Transformación de pSL2680_crR y pCpf1b_crR en *E. coli* DH5α

La transformación se llevó a cabo en la cepa de *E. coli* DH5α la cual es especial para la propagación de ADN plasmídico. Se emplearon 10 µL del producto de ligación inactivado previamente en 50 µL de células de *E. coli* DH5α rubidio-competentes en un microtubo eppendorf de 1.5 ml en hielo y se incubó de 20 a 30 minutos. Posteriormente se procedió al choque térmico a 44 °C durante 45 segundos y se llevó de nuevo a incubación en hielo durante dos minutos, después de esto se le adicionaron 800 µL de caldo LB, se mezcló suavemente y se incubó 1 hora a 37 °C con agitación a 200 rpm. Después del tiempo de incubación, se centrifugaron los tubos a 10000 rpm durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante dejando aproximadamente 50 µL del caldo LB. Las células fueron resuspendidas en dicho volumen y se transfirieron a placas de agar LB suplementadas con Kanamicina (30 µg/mL), X-gal (200 µg/mL) e IPTG (1 mM) esparciéndolo por toda la placa por extensión con varilla. Las placas se incubaron a 37 °C durante 16 horas.

4.13.6 Selección de colonias y extracción de ADN plasmídico

Las colonias fueron seleccionadas empleando el fundamento del cribado azul-blanco de Sambrook⁴⁶. El procedimiento para la extracción del ADN plasmídico se llevó a cabo según el protocolo descrito en el punto 4.3.1.4 empleando el kit QIAPREP SPIN MINIPREP.

4.13.7 Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas

A partir del ADN plasmídico pSL2680_crRNA_{nblA} y pCpf1b_crRNA_{nblA} obtenido de las colonias seleccionadas realizó un análisis confirmatorio para ratificar su presencia. Para esto se realizó una amplificación por PCR utilizando el iniciador delantero crRNA_{nblA}F y el iniciador reverso crRNA_{nblA}R que flanquean la región CRISPR de los plásmidos. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo los siguientes reactivos: 1 μ L (aproximadamente 100 ng) de ADN plasmídico (pSL2680_gRNA_{nblA} y pCpf1b_gRNA_{nblA}), 5 μ L de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 μ L de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μ L de iniciador reverso (60 pmoles), 1 μ L (10 nM) de dNTPs, 0.5 μ L de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36.5 μ L de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca ThermoFisher Scientific (modelo SimpliAmp) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 3 minutos a 94 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94 °C, alineamiento por 30 segundos a 56 °C y elongación por 45 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 7 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.13.8 Amplificación de los fragmentos para el molde reparador que contiene el gen de la enzima FAP

Para la construcción del molde reparador se amplificarán 3 fragmentos: el brazo homólogo 1, la secuencia de la enzima FAP con una etiqueta de 6

histidinas y el brazo homólogo 2. Se diseñaron iniciadores que tuvieran extremos sobresalientes con complementariedad al plásmido y a los fragmentos entre sí. En la Figura 1 se muestra un esquema de como quedarán los fragmentos finales para su posterior ensamble empleando el kit GenBuilder™ DNA Assembly de GenScript. Cabe destacar que se siguieron las instrucciones del fabricante del kit para el diseño de los iniciadores.

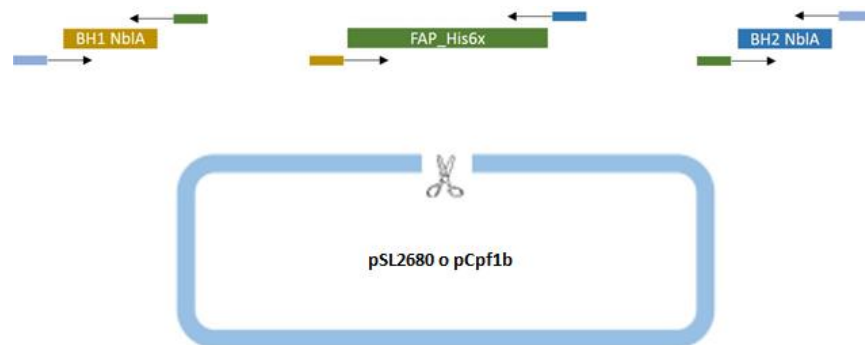


Figura 1. Esquema de la amplificación con extremos complementarios para el ensamble en los plásmidos de edición.

4.13.8.1 Amplificación de los brazos homólogos para el molde reparador

Las secuencias de los brazos homólogos flanquean el gen *nblA* el cual será sustituido por el gen de la enzima FAP. Se seleccionaron 600 pb para cada brazo homólogo y se amplificaron directamente del ADN genómico de *Synechocystis* sp. PCC 6803 el cual fue extraído empleando el kit DNeasy Blood & Tissue. A partir del ADN genómico se realizó una amplificación por PCR utilizando los iniciadores delanteros y reversos pBH1F y BH1/FAPR para el brazo 1 y los iniciadores delanteros y reversos FAP/BH2F y pBH2R para el brazo 2. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L conteniendo los

siguientes reactivos: 2 μL (aproximadamente 20 ng) de ADN genómico, 5 μL de solución amortiguadora Thermopol 10x (NEB), 3 μL de iniciador delantero (60 pmoles) (pBH1F o FAP/BH2F), 3 μL de iniciador reverso (60 pmoles) (BH1/FAPR o pBH2R), 1 μL (10 nM) de dNTPs, 0.5 μL de Vent polimerasa (NEB) y se completó con 35.5 μL de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca ThermoFisher Scientific (modelo SimpliAmp) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 95 °C, alineamiento por 30 segundos a 60 °C y elongación por 45 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones. Los fragmentos obtenidos se purificaron utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.13.8.2 Amplificación de la enzima FAP para la adición de la etiqueta de 6 histidinas

Para la amplificación de la enzima FAP por PCR se utilizó el iniciador delantero FAP6HF y el iniciador reverso FAP6HR. Cabe destacar que el iniciador reverso contiene un extremo sobresaliente para adicionar una etiqueta de 6 histidinas en el extremo C-terminal además del codón de terminación TAA. El gen de la enzima FAP fue sintetizado por la empresa GenScript Corporation y se envió dentro del plásmido pUC57. A partir de este molde, se realizó la amplificación en un volumen final de 50 μL conteniendo los siguientes reactivos: 1 μL (aproximadamente 10 ng) de ADN plasmídico, 5 μL de solución

amortiguadora Thermopol 10x (NEB), 3 μL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μL de iniciador reverso (60 pmoles), 1 μL (10 nM) de dNTPs, 0.5 μL de Vent polimerasa (NEB) y se completó con 36.5 μL de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca ThermoFisher Scientific (modelo SimpliAmp) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 95 °C, alineamiento por 30 segundos a 60 °C y elongación por 2 minutos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones. El fragmento obtenido se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.13.8.3 Amplificación de la enzima FAP_{Hisx6} para el molde reparador

Para la amplificación por PCR de la enzima FAP_{Hisx6} se utilizó el iniciador delantero BH1/FAPF y el iniciador reverso FAP/BH2R. A partir del fragmento obtenido previamente en el paso 4.12.8.2, se realizó la amplificación en un volumen final de 50 μL conteniendo los siguientes reactivos: 1 μL (aproximadamente 20 ng) del ADN molde, 5 μL de solución amortiguadora Thermopol 10x (NEB), 3 μL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μL de iniciador reverso (60 pmoles), 1 μL (10 nM) de dNTPs, 0.5 μL de Vent polimerasa (NEB) y se completó con 35.5 μL de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca ThermoFisher Scientific (modelo SimpliAmp) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 2 minutos a 95 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 95 °C, alineamiento por

30 segundos a 60 °C y elongación por 2 minutos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 5 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones. El fragmento obtenido se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

Los fragmentos obtenidos se purificaron utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION.

4.13.9 Digestión de los plásmidos pSL2680_crR y pCpf1b_crR para el ensamble del molde de reparación.

La digestión de pSL2680 se llevó a cabo con la enzima de restricción Sall (Sigma-Aldrich). La reacción se llevó a un volumen final de 100 µL conteniendo los siguientes reactivos: 80 µL de ADN plasmídico, 10 µL de solución amortiguadora SH 10x (Sigma-Aldrich), 4 µL de la enzima Sall y 6 µL de agua mQ. Se incubó durante 2 horas a 37 °C. Una vez terminada la digestión, se purificó utilizando el kit QIAQUICK GEL EXTRACTION. Para pCpf1b_crR la reacción se llevó a un volumen final de 100 µL conteniendo los siguientes reactivos: 80 µL de ADN plasmídico, 10 µL de solución amortiguadora O 10x (Thermo Scientific™), 4 µL de la enzima BgIII (Thermo Scientific™), 4 µL de la enzima BamHI (Thermo Scientific™) y 2 µL de agua mQ. Se incubó durante 2 horas a 37 °C.

4.13.10 Purificación de los plásmidos pSL2680_crR y pCpf1b_crR digeridos.

La purificación de las digestiones se llevó a cabo utilizando la precipitación con polietilenglicol (PEG) 8000 siguiendo el protocolo de Paithanker (1991)⁴⁷ y Sauer (2008)⁴⁸.

Se prepararon soluciones de NaCl 4 M, etanol al 70% y PEG 8000 al 13% y se mantuvieron a 4°C. Posteriormente se mezclaron en las siguientes proporciones los siguientes reactivos y plásmidos digeridos: 80 µL de ADN plasmídico digerido, 20 µL de NaCl 4 M y 100 µL de PEG 8000 al 13%. Se incubó en hielo la mezcla durante 20 min y se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 0 °C. Se removió el sobrenadante con cuidado de no retirar el precipitado formado. Se lavó con 500 µL de etanol al 70% frío y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min a 0 °C. Se removió el sobrenadante con cuidado de no retirar el precipitado. Se dejó evaporar los restos de etanol para finalmente resuspender en 5 µL de agua mQ.

4.13.11 Ensamble de pCpf1b con brazos de homología y el gen de la enzima FAP.

Para el ensamble se utilizó el kit GenBuilder™ DNA Assembly siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se mezclaron las siguientes muestras: 5 µL de pCpf1b_crR digerido, 3 µL de FAP_{Hisx6}, 1 µL de BH1 NblA y 1 µL de BH2 NblA. Se mezcló bien y se añadieron 10 µL del Gen Builder 2x Master Mix para obtener un volumen final de 20 µL. Se incubó en un termociclador marca ThermoFisher Scientific (modelo SimpliAmp) a 50 °C por 15 min. Finalmente, el producto de la reacción de

ensamble se transformó con 2 y 5 μL siguiendo el protocolo descrito en el punto 4.4.1.3.

4.13.12 Análisis confirmatorio por PCR de las colonias seleccionadas del ensamble del molde reparador

A partir del ADN plasmídico pCpf1b_crRM obtenido de las colonias seleccionadas se realizó un análisis confirmatorio para ratificar su presencia. Para esto se realizó una amplificación por PCR utilizando el iniciador delantero crRNA_{nbI}A_F y el iniciador reverso BH1_{FAP}R que flanquean desde la región CRISPR hasta el brazo homólogo 1, y el iniciador delantero FAP_{BH1}F y el iniciador reverso FAP_{BH2}R que flanqueaban la secuencia de la enzima FAP. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL conteniendo los siguientes reactivos: 1 μL (aproximadamente 100 ng) de ADN plasmídico (pCpf1b_crRM), 5 μL de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 μL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 μL de iniciador reverso (60 pmoles), 1.5 μL (10 nM) de dNTPs, 0.5 μL de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36 μL de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca ThermoFisher Scientific (modelo SimpliAmp) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 3 minutos a 94 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94 °C, alineamiento por 30 segundos a 56 °C y elongación por 45 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 7 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

4.13.13 Amplificación de los fragmentos del molde reparador de pCpf1b_crRM y secuenciación

A partir del ADN plasmídico pCpf1b_crRM obtenido de las colonias seleccionadas se realizó una amplificación por PCR para confirmar la presencia de los fragmentos del molde reparador. Para esto, se utilizaron los siguientes iniciadores: el iniciador delantero pCpf1BH1F y el iniciador reverso BH1_{FAP}R que flanquean el fragmento del brazo homólogo 1 y la enzima FAP, el iniciador delantero BH2_{FAP}F y el iniciador reverso pCpf1BH2R que flanquean la secuencia el fragmento de la enzima FAP y el brazo homólogo 2, el iniciador delantero pCpf1BH1F y el iniciador reverso pCpf1BH2R que flanquean la secuencia del fragmento del brazo homólogo 1, la enzima FAP y el brazo homólogo 2, el iniciador delantero FAP_{BH1}F y el iniciador reverso FAP_{BH2}R que flanquean el fragmento de la enzima FAP, el iniciador delantero pCpf1BH1F y el iniciador reverso BH1_{FAP}R que flanquean el fragmento del brazo homólogo 1 y finalmente el iniciador delantero BH2_{FAP}F y el iniciador reverso pCpf1BH2R que flanquean el fragmento del brazo homólogo 2. La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL conteniendo los siguientes reactivos: 1 µL (aproximadamente 100 ng) de ADN plasmídico (pCpf1b_crRM), 5 µL de solución amortiguadora Taq 10x (GenScript Corporation), 3 µL de iniciador delantero (60 pmoles), 3 µL de iniciador reverso (60 pmoles), 1 µL (10 nM) de dNTPs, 0.5 µL de Taq polimerasa (GenScript Corporation) y se completó con 36.5 µL de agua mQ. La amplificación se realizó en un termociclador marca ThermoFisher Scientific (modelo SimpliAmp) con las siguientes condiciones: el primer paso fue de 3 minutos a 94 °C, el segundo paso fueron 30 ciclos de desnaturalización por

30 segundos a 94 °C, alineamiento por 30 segundos a 56 °C y elongación por 45 segundos a 72 °C y el tercer paso fue una extensión final por 7 minutos a 72 °C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % con TAE como solución amortiguadora para confirmar las amplificaciones.

Para la secuenciación, se tomó el fragmento amplificado que contenía el brazo homólogo 1, la enzima FAP y el brazo homólogo 2 y se purificó utilizando el QIAquick Gel extraction kit de QIAGEN. Así mismo, también se purificó el fragmento obtenido en el punto 4.13.7 que contiene el fragmento del crRNA_{nblA}. En un tubo eppendorf para PCR de 0.2 mL se colocaron de 100 a 120 ng del producto de PCR mezclado con 10 pmoles del oligonucleótido en un volumen final de 16 µL. Se realizaron 5 secuenciaciones conteniendo los siguientes oligonucleótidos: el oligo crRNA_{nblA}F que sirvió para secuenciar toda la región CRISPR que contiene el crRNA_{nblA}, el oligo pCpf1BH1F que sirvió para secuenciar el brazo homólogo 1, el oligo FAP_{BH1}F que sirvió para secuenciar la enzima FAP de 5' a 3', el oligo FAP_{BH2}R que sirvió para secuenciar la enzima FAP de 3' a 5' y el oligo pCpf1BH2R que sirvió para secuenciar el brazo homólogo 2. Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su secuenciación. Los archivos obtenidos fueron analizados utilizando el software FlinchTV.

CAPÍTULO 5

5 RESULTADOS

5.1 Obtención de las construcciones pET30a-TorAps-SmbP-RFP, pET30a-TorAps-SmbP-GFP.

En la Tabla 2 se puede observar la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de TorAps-SmbP.

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de TorAps-SmbP. En negrita se resalta la secuencia del péptido señal TorA y en cursiva la secuencia de SmbP.

M	N	N	N	D	L	F	Q	A	S	R	R	R	F	L
ATG	AAC	AAC	AAC	GAC	CTG	TTC	CAG	GCG	AGC	CGT	CGT	CGT	TTC	CTG
A	Q	L	G	G	L	T	V	A	G	M	L	G	P	S
GCG	CAA	CTG	GGT	GGC	CTG	ACC	GTG	GCG	GGT	ATG	CTG	GGT	CCG	AGC
L	L	T	P	R	R	A	T	A	S	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>H</i>
CTG	CTG	ACC	CCG	CGT	CGT	GCG	ACC	GCG	AGC	<i>GGC</i>	<i>CAC</i>	<i>ACC</i>	<i>GCG</i>	<i>CAC</i>
<i>V</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>A</i>	<i>H</i>	<i>G</i>
<i>GTG</i>	<i>GAC</i>	<i>GAG</i>	<i>GCG</i>	<i>GTT</i>	<i>AAG</i>	<i>CAC</i>	<i>GCG</i>	<i>GAG</i>	<i>GAA</i>	<i>GCG</i>	<i>GTT</i>	<i>GCG</i>	<i>CAC</i>	<i>GGT</i>
<i>K</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>T</i>	<i>D</i>	<i>Q</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	<i>A</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>S</i>
<i>AAA</i>	<i>GAA</i>	<i>GGC</i>	<i>CAC</i>	<i>ACC</i>	<i>GAT</i>	<i>CAG</i>	<i>CTG</i>	<i>CTG</i>	<i>GAG</i>	<i>CAC</i>	<i>GCG</i>	<i>AAG</i>	<i>GAA</i>	<i>AGC</i>
<i>L</i>	<i>T</i>	<i>H</i>	<i>A</i>	<i>K</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>H</i>
<i>CTG</i>	<i>ACC</i>	<i>CAT</i>	<i>GCG</i>	<i>AAA</i>	<i>GCG</i>	<i>GCG</i>	<i>AGC</i>	<i>GAA</i>	<i>GCG</i>	<i>GGT</i>	<i>GGC</i>	<i>AAC</i>	<i>ACC</i>	<i>CAT</i>
<i>V</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>G</i>
<i>GTG</i>	<i>GGT</i>	<i>CAC</i>	<i>GGC</i>	<i>ATC</i>	<i>AAG</i>	<i>CAC</i>	<i>CTG</i>	<i>GAA</i>	<i>GAT</i>	<i>GCG</i>	<i>ATT</i>	<i>AAA</i>	<i>CAC</i>	<i>GGC</i>
<i>E</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>V</i>	<i>G</i>	<i>V</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>A</i>	<i>Q</i>	<i>E</i>	<i>A</i>
<i>GAG</i>	<i>GAA</i>	<i>GGC</i>	<i>CAC</i>	<i>GTG</i>	<i>GGT</i>	<i>GTT</i>	<i>GCG</i>	<i>ACC</i>	<i>AAG</i>	<i>CAC</i>	<i>GCG</i>	<i>CAA</i>	<i>GAG</i>	<i>GCG</i>
<i>I</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	<i>L</i>	<i>R</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	<i>K</i>	<i>S</i>	<i>H</i>			
<i>ATC</i>	<i>GAA</i>	<i>CAC</i>	<i>CTG</i>	<i>CGT</i>	<i>GCG</i>	<i>AGC</i>	<i>GAG</i>	<i>CAC</i>	<i>AAA</i>	<i>AGC</i>	<i>CAC</i>			

Una vez realizadas las reacciones de digestión del inserto de TorAps-SmbP contenido en el plásmido pUC57 y de los plásmidos pET30a el cual contenía uno el gen de RFP y el otro el gen de GFP, se sometieron a la reacción de ligación (ver Figura 2). El producto de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y se realizó la selección de 3 colonias transformantes.

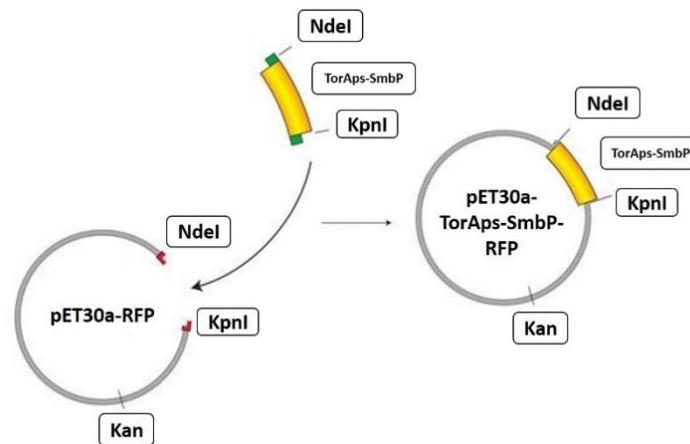


Figura 2. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP.

En la comprobación realizada por PCR se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso. Se obtuvo una banda encima de las 1000 pb del marcador GeneRuler 1kb DNA ladder como se muestra en la Figura 3. El carril 1 fue positivo para la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP mientras que el carril 3 y 4 no se tomaron en cuenta debido a que la amplificación resulto negativa para esas construcciones.

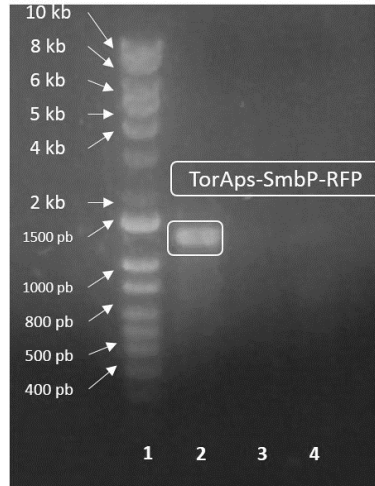


Figura 3. PCR de confirmación de la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP. En el carril 1 se muestra el marcador de peso. En el carril 2 al 4 se muestra la amplificación de TorAps-SmbP-RFP con los iniciadores T7 delantero y reverso. Peso esperado: 1283 pb.

Para la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-GFP se realizó la digestión del plásmido pET30a el cual contenía el gen de GFP y se sometieron a la reacción de ligación con TorAps-SmbP (ver Figura 4). El producto de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y se realizó la selección de 3 colonias transformantes.

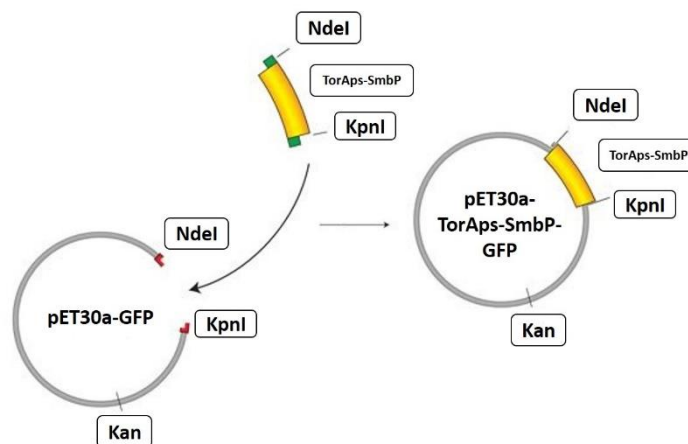


Figura 4. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP

En la comprobación realizada por PCR se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso. Se obtuvo una banda encima de las 1000 pb del marcador GeneRuler 1kb DNA ladder como se muestra en la Figura 5. Por lo tanto, las 3 colonias fueron positivas para la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-GFP.



Figura 5. PCR de confirmación de la construcción de pET30a-TorAps-SmbP-RFP. En el carril 1 se muestra el marcador de peso GeneRuler 1kb DNA Ladder. En el carril 2 al 4 se muestra la amplificación de TorAps-SmbP-RFP con los iniciadores T7 delantero y reverso. Peso esperado: 1325 pb.

5.2 Obtención de las construcciones con lunasina

En la Tabla 3 se observa la secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la lunasina.

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de la lunasina. En negritas se observa la secuencia de la cola poliaspártica que interacciona con las argininas de las histonas.

S	K	W	Q	H	Q	Q	D	S	C	R	K	Q	L	Q
AGC	AAA	TGG	CAG	CAT	CAG	CAA	GAT	TCT	TGC	CGT	AAA	CAG	CTG	CAA
G	V	N	L	T	P	C	E	K	H	I	M	E	K	I
GGC	GTG	AAC	CTG	ACC	CCG	TGT	GAA	AAA	CAC	ATC	ATG	GAA	AAA	ATC
Q	G	R	G	D	D	D	D	D	D	D	D	D	*	
CAA	GGC	CGC	GGT	GAT	GAC	GAC	GAT	GAT	GAC	GAT	GAC	GAT	TAA	

Se llevó a cabo una amplificación por PCR del inserto de lunasina que estaba contenido en el plásmido pUC57 mostrando un producto de amplificación en gel de agarosa al 0.7% de aproximadamente 129 pb. El producto de amplificación de Lunasina se puede apreciar en la Figura 6 el cual concuerda con el tamaño esperado.

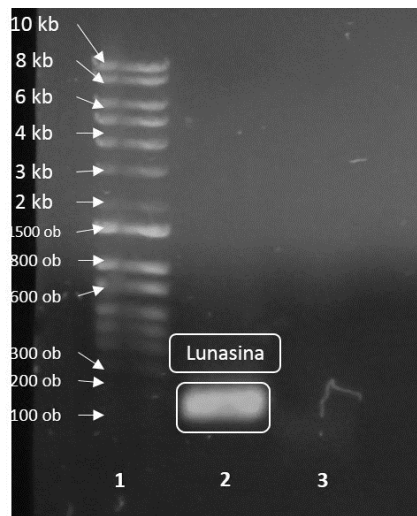


Figura 6. Producto de amplificación en gel de agarosa al 0.7% de la PCR para el inserto del péptido Lunasina contenido en el plásmido pUC57. Carril 1: Marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder, Carril 2: Lunasina, Carril 3: Control negativo. Peso esperado: 129 pb.

Una vez realizadas las reacciones de digestión del inserto de lunasina contenido en el plásmido pUC57 y de los plásmidos pET30a-SmbP_c y pET30a-CusF3H₊_c se sometieron a la reacción de ligación (ver Figura 7 y 8). El producto de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y se realizó la selección de 3 colonias transformantes de cada construcción.

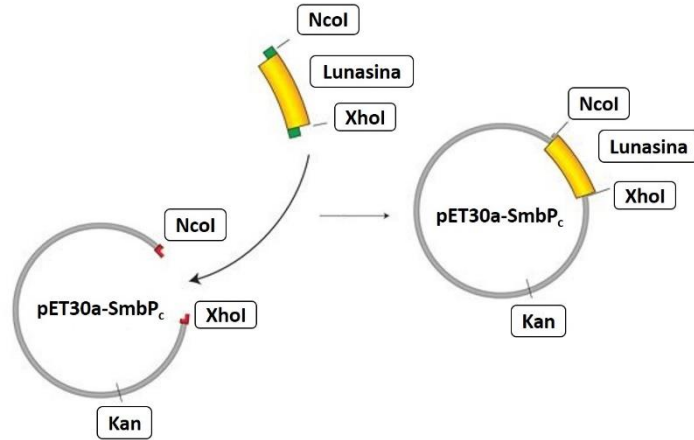


Figura 7. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-SmbP_c-Lun.

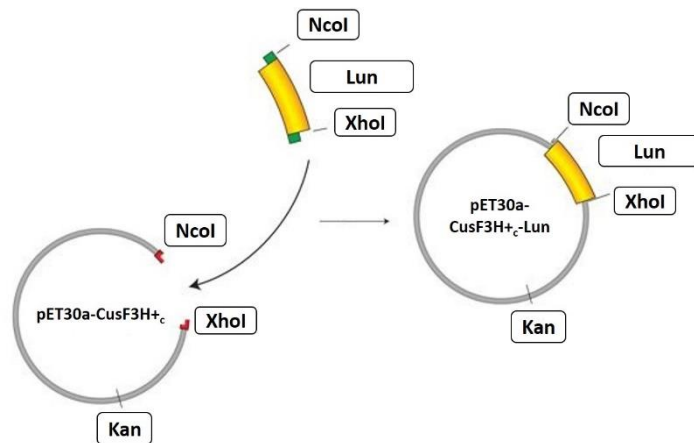


Figura 8. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-CusF3H_c-Lun.

En la comprobación realizada por PCR se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso. Se obtuvo una banda encima de las 1000 pb del marcador GeneRuler 1kb DNA ladder como se muestra en la Figura 9. El carril 2 no se tomó en cuenta debido a que la amplificación resulto negativa para esa construcción.

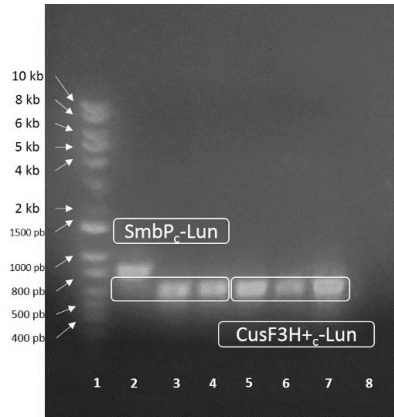


Figura 9. PCR de confirmación de la construcción de pET30a-SmbP_c-RFP. En el carril 1 se muestra el marcador de peso. En el carril 2 al 4 se muestra la amplificación de SmbP_c-RFP y en el carril 5 al 7 se muestra la amplificación de CusF3H_c-Lun. Para ambas construcciones se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso.

En la Tabla 4 se observa las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de las repeticiones en tándem de la lunasina.

Tabla 4. Secuencias de aminoácidos y nucleótidos de Lunx2. En negritas se encuentran los aminoácidos para el corte con hidroxilamina y en cursiva las secuencias de lunasina.

N	G	S	K	W	Q	H	Q	Q	D	S	C	R	K
AAC	GGT	AGC	AAG	TGG	CAG	CAC	CAG	CAA	GAC	AGC	TGC	CGT	AAA
Q	L	Q	G	V	N	L	T	P	C	E	K	H	I
CAG	CTG	CAA	GGC	GTG	AAC	CTG	ACC	CCG	TGC	GAG	AAG	CAC	ATC
M	E	K	I	Q	G	R	G	D	D	D	D	D	D
ATG	GAA	AAA	ATT	CAG	GGT	CGT	GGC	GAC	GAT	GAT	GAC	GAC	GAT
D	D	D	N	G	S	K	W	Q	H	Q	Q	D	S
GAC	GAT	GAC	AAC	GGT	AGC	AAG	TGG	CAA	CAC	CAG	CAA	GAT	AGC
C	R	K	Q	L	Q	G	V	N	L	T	P	C	E
TGC	CGC	AAG	CAG	CTG	CAA	GGC	GTT	AAT	CTG	ACC	CCG	TGC	GAA
K	H	I	M	E	K	I	Q	G	R	G	D	D	D
AAA	CAT	ATC	ATG	GAA	AAA	ATT	CAA	GGT	CGT	GGC	GAT	GAT	GAT
D	D	D	D	D	D	*							
GAT	GAT	GAC	GAT	GAC	GAT	TAA							

Para obtener la construcción que contuviera la secuencia de Lunx2, se realizó la digestión del plásmido pET30a, el cual contenía la secuencia de la proteína de fusión CusF3H_c, y de Lunx2, el cual estaba contenido en el plásmido

pUC57. Se sometieron a la reacción de ligación (ver Figura 10) y el producto de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y se realizó la selección de 3 colonias transformantes.

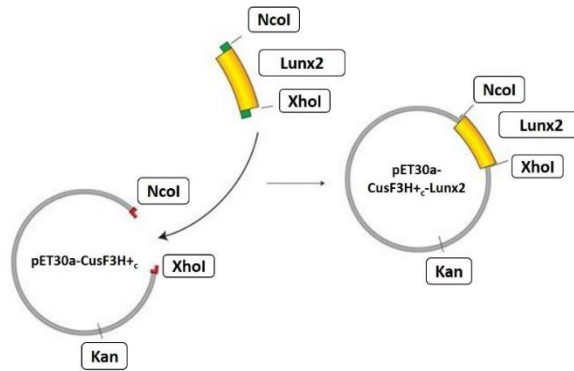


Figura 10. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-CusF3H+-Lunx2.

En la comprobación realizada por PCR se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso. Se obtuvo una banda alrededor de los 785 pb del marcador GeneRuler 1kb DNA ladder como se muestra en la Figura 11.

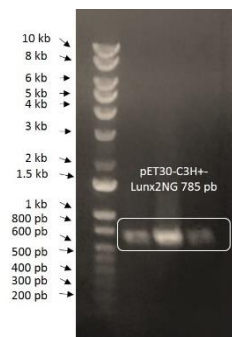


Figura 11. PCR de confirmación de la construcción de pET30a-CusF3H+-Lunx2. En el carril 1 se muestra el marcador de peso. En el carril 2 al 4 se muestra la amplificación de CusF3H+-Lunx2 con los iniciadores T7 delantero y reverso. Peso esperado: 785 pb.

En la Tabla 5 y 6 se observan las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de SmbP_{TEV}-Lun y CusF3H_{TEV}-Lun respectivamente.

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de SmbP_{TEV}-Lun. En *itálicas* se encuentra la secuencia de SmbP, en **negritas la secuencia de aminoácidos reconocido por la proteasa TEV y subrayado se encuentra la secuencia de lunasina.**

<i>M</i>	<i>S</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>T</i>	<i>A</i>	<i>H</i>	<i>V</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>A</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>A</i>
<i>ATG</i>	<i>AGC</i>	<i>GGT</i>	<i>CAC</i>	<i>ACC</i>	<i>GCG</i>	<i>CAT</i>	<i>GTG</i>	<i>GAT</i>	<i>GAG</i>	<i>GCG</i>	<i>GTT</i>	<i>AAG</i>	<i>CAC</i>	<i>GCG</i>	<i>GAG</i>	<i>GAA</i>	<i>GCG</i>	<i>GTG</i>	<i>GCG</i>
<i>E</i>	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>A</i>	<i>H</i>	<i>G</i>	<i>K</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>T</i>	<i>D</i>	<i>Q</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	<i>A</i>	<i>K</i>	<i>E</i>
<i>GAA</i>	<i>GCG</i>	<i>GTG</i>	<i>GCG</i>	<i>CAC</i>	<i>GGT</i>	<i>AAA</i>	<i>GAA</i>	<i>GGC</i>	<i>CAT</i>	<i>ACC</i>	<i>GAC</i>	<i>CAG</i>	<i>CTG</i>	<i>CTG</i>	<i>GAG</i>	<i>CAT</i>	<i>GCG</i>	<i>AAG</i>	<i>GAA</i>
<i>S</i>	<i>L</i>	<i>T</i>	<i>H</i>	<i>A</i>	<i>K</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>G</i>	<i>N</i>	<i>T</i>	<i>H</i>	<i>V</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>G</i>
<i>AGC</i>	<i>CTG</i>	<i>ACC</i>	<i>CAT</i>	<i>GCG</i>	<i>AAA</i>	<i>GCG</i>	<i>GCG</i>	<i>AGC</i>	<i>GAG</i>	<i>GCG</i>	<i>GGT</i>	<i>GGC</i>	<i>AAC</i>	<i>ACC</i>	<i>CAC</i>	<i>GTT</i>	<i>GGT</i>	<i>CAC</i>	<i>GGC</i>
<i>I</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	<i>D</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>G</i>	<i>E</i>	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>H</i>	<i>V</i>	<i>G</i>	<i>V</i>	<i>A</i>	<i>T</i>
<i>ATC</i>	<i>AAG</i>	<i>CAC</i>	<i>CTG</i>	<i>GAA</i>	<i>GAT</i>	<i>GCG</i>	<i>ATT</i>	<i>AAA</i>	<i>CAC</i>	<i>GGC</i>	<i>GAG</i>	<i>GAA</i>	<i>GGC</i>	<i>CAC</i>	<i>GTG</i>	<i>GGT</i>	<i>GTT</i>	<i>GCG</i>	<i>ACC</i>
<i>K</i>	<i>H</i>	<i>A</i>	<i>Q</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>I</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	<i>L</i>	<i>R</i>	<i>A</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	<i>K</i>	<i>S</i>	<i>H</i>	<i>G</i>	<i>T</i>
<i>AAG</i>	<i>CAC</i>	<i>GCG</i>	<i>CAA</i>	<i>GAG</i>	<i>GCG</i>	<i>ATC</i>	<i>GAA</i>	<i>CAC</i>	<i>CTG</i>	<i>CGT</i>	<i>GCG</i>	<i>AGC</i>	<i>GAG</i>	<i>CAC</i>	<i>AAA</i>	<i>AGC</i>	<i>CAC</i>	<i>GGT</i>	<i>ACC</i>
<i>E</i>	<i>N</i>	<i>L</i>	<i>Y</i>	<i>F</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>W</i>	<i>Q</i>	<i>H</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>C</i>	<i>R</i>	<i>K</i>	<i>Q</i>
<i>GAA</i>	<i>AAC</i>	<i>CTG</i>	<i>TAC</i>	<i>TTC</i>	<i>CAG</i>	<i>GGA</i>	<i>TCC</i>	<i>AAG</i>	<i>TGG</i>	<i>CAA</i>	<i>CAC</i>	<i>CAG</i>	<i>CAA</i>	<i>GAC</i>	<i>AGC</i>	<i>TGC</i>	<i>CGT</i>	<i>AAA</i>	<i>CAG</i>
<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>V</i>	<i>N</i>	<i>L</i>	<i>I</i>	<i>P</i>	<i>C</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>I</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>R</i>
<i>CTG</i>	<i>CAA</i>	<i>GGT</i>	<i>GTG</i>	<i>AAC</i>	<i>CTG</i>	<i>ACC</i>	<i>CCG</i>	<i>TGC</i>	<i>GAG</i>	<i>AAG</i>	<i>CAC</i>	<i>ATC</i>	<i>ATG</i>	<i>GAA</i>	<i>AAA</i>	<i>ATT</i>	<i>CAG</i>	<i>GGT</i>	<i>CGT</i>
<i>G</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	:									
<i>GGC</i>	<i>GAC</i>	<i>GAT</i>	<i>GAT</i>	<i>GAC</i>	<i>GAC</i>	<i>GAT</i>	<i>GAC</i>	<i>GAT</i>	<i>GAC</i>	<i>TAA</i>									

Tabla 6. Secuencia de aminoácidos y nucleótidos de CusF3H_{TEV}-Lun. En *itálicas* se encuentra la secuencia de CusF3H+, en **negritas la secuencia de aminoácidos reconocido por la proteasa TEV y subrayado se encuentra la secuencia de lunasina.**

<i>M</i>	<i>N</i>	<i>E</i>	<i>H</i>	<i>H</i>	<i>H</i>	<i>H</i>	<i>H</i>	<i>H</i>	<i>E</i>	<i>T</i>	<i>M</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>A</i>	<i>Q</i>	<i>P</i>	<i>Q</i>	<i>V</i>	<i>I</i>	
<i>ATG</i>	<i>AAC</i>	<i>GAA</i>	<i>CAT</i>	<i>CAT</i>	<i>CAC</i>	<i>CAC</i>	<i>CAC</i>	<i>CAC</i>	<i>GAG</i>	<i>ACC</i>	<i>ATG</i>	<i>AGC</i>	<i>GAA</i>	<i>GCG</i>	<i>CAG</i>	<i>CCG</i>	<i>CAA</i>	<i>GTG</i>	<i>ATC</i>	
<i>S</i>	<i>A</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>V</i>	<i>V</i>	<i>K</i>	<i>G</i>	<i>I</i>	<i>D</i>	<i>L</i>	<i>E</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>K</i>	<i>I</i>	<i>T</i>	<i>I</i>	<i>H</i>	<i>H</i>	
<i>AGC</i>	<i>GCG</i>	<i>ACC</i>	<i>GGT</i>	<i>GTG</i>	<i>GTT</i>	<i>AAG</i>	<i>GGC</i>	<i>ATT</i>	<i>GAT</i>	<i>CTG</i>	<i>GAA</i>	<i>AGC</i>	<i>AAG</i>	<i>AAA</i>	<i>ATC</i>	<i>ACC</i>	<i>ATT</i>	<i>CAC</i>	<i>CAC</i>	
<i>D</i>	<i>P</i>	<i>I</i>	<i>A</i>	<i>A</i>	<i>V</i>	<i>N</i>	<i>W</i>	<i>P</i>	<i>E</i>	<i>M</i>	<i>T</i>	<i>M</i>	<i>R</i>	<i>F</i>	<i>T</i>	<i>I</i>	<i>T</i>	<i>P</i>	<i>Q</i>	
<i>GAC</i>	<i>CCG</i>	<i>ATC</i>	<i>GCG</i>	<i>GCG</i>	<i>GTT</i>	<i>AAC</i>	<i>TGG</i>	<i>CCG</i>	<i>GAG</i>	<i>ATG</i>	<i>ACC</i>	<i>ATG</i>	<i>CGT</i>	<i>TTC</i>	<i>ACC</i>	<i>ATC</i>	<i>ACC</i>	<i>CCG</i>	<i>CAG</i>	
<i>T</i>	<i>K</i>	<i>M</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>I</i>	<i>K</i>	<i>T</i>	<i>G</i>	<i>D</i>	<i>K</i>	<i>V</i>	<i>A</i>	<i>F</i>	<i>N</i>	<i>F</i>	<i>V</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	
<i>ACC</i>	<i>AAG</i>	<i>ATG</i>	<i>AGC</i>	<i>GAA</i>	<i>ATT</i>	<i>AAG</i>	<i>ACC</i>	<i>GGT</i>	<i>GAT</i>	<i>AAA</i>	<i>GTG</i>	<i>GCG</i>	<i>TTC</i>	<i>AAC</i>	<i>TTT</i>	<i>GTT</i>	<i>CAG</i>	<i>CAA</i>	<i>GGC</i>	
<i>N</i>	<i>L</i>	<i>S</i>	<i>L</i>	<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>D</i>	<i>I</i>	<i>K</i>	<i>V</i>	<i>S</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>T</i>	<i>E</i>	<i>N</i>	<i>L</i>	<i>Y</i>	<i>F</i>	<i>Q</i>	
<i>AAC</i>	<i>CTG</i>	<i>AGC</i>	<i>CTG</i>	<i>CTG</i>	<i>CAG</i>	<i>GAC</i>	<i>ATT</i>	<i>AAA</i>	<i>GTG</i>	<i>AGC</i>	<i>CAA</i>	<i>GGT</i>	<i>ACC</i>	<i>GAG</i>	<i>AAC</i>	<i>CTG</i>	<i>TAC</i>	<i>TTT</i>	<i>CAG</i>	
<i>G</i>	<i>S</i>	<i>K</i>	<i>W</i>	<i>Q</i>	<i>H</i>	<i>Q</i>	<i>Q</i>	<i>D</i>	<i>S</i>	<i>C</i>	<i>R</i>	<i>K</i>	<i>Q</i>	<i>L</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>V</i>	<i>N</i>	<i>L</i>	
<i>GGA</i>	<i>TCC</i>	<i>AAG</i>	<i>TGG</i>	<i>CAA</i>	<i>CAC</i>	<i>CAG</i>	<i>CAA</i>	<i>GAT</i>	<i>AGC</i>	<i>TGC</i>	<i>CGT</i>	<i>AAA</i>	<i>CAG</i>	<i>CTG</i>	<i>CAA</i>	<i>GGC</i>	<i>GTT</i>	<i>AAC</i>	<i>CTG</i>	
<i>I</i>	<i>P</i>	<i>Q</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>H</i>	<i>I</i>	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>K</i>	<i>I</i>	<i>Q</i>	<i>G</i>	<i>R</i>	<i>G</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	
<i>ACC</i>	<i>CCG</i>	<i>TGC</i>	<i>GAG</i>	<i>AAG</i>	<i>CAC</i>	<i>ATC</i>	<i>ATG</i>	<i>GAA</i>	<i>AAA</i>	<i>ATT</i>	<i>CAA</i>	<i>GGT</i>	<i>CGT</i>	<i>GGC</i>	<i>GAC</i>	<i>GAT</i>	<i>GAT</i>	<i>GAC</i>	<i>GAC</i>	
<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	<i>D</i>	:																
<i>GAT</i>	<i>GAC</i>	<i>GAT</i>	<i>GAC</i>	<i>TAA</i>																

Para obtener la construcción que contuviera las secuencias de SmbP_{TEV}-Lun y CusF3H_{TEV}-Lun, se realizó la digestión de estos, los cuales estaban contenidos en el plásmido pUC57, y del plásmido pET30a. Se sometieron a la reacción de ligación (ver Figura 12 y 13) y el producto de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y se realizó la selección de 3 colonias transformantes.

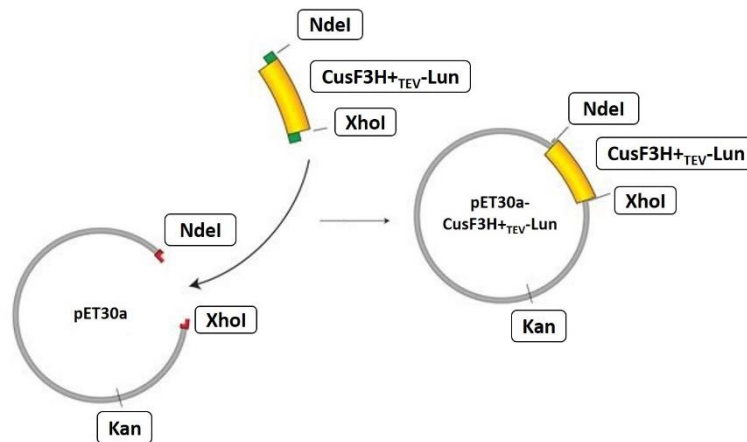


Figura 12. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-SmbP_{TEV}-Lun.

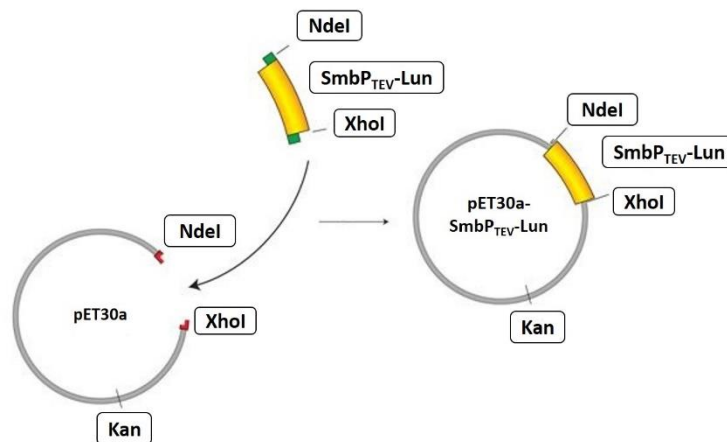


Figura 13. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pET30a-CusF3H_{TEV}-Lun.

En la comprobación realizada por PCR se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso. Se obtuvo una banda alrededor de los 627 pb del marcador GeneRuler 1kb DNA ladder como se muestra en la Figura 14. El carril 2 y 3 no se tomaron en cuenta debido a que la amplificación resulto negativa para esas construcciones.

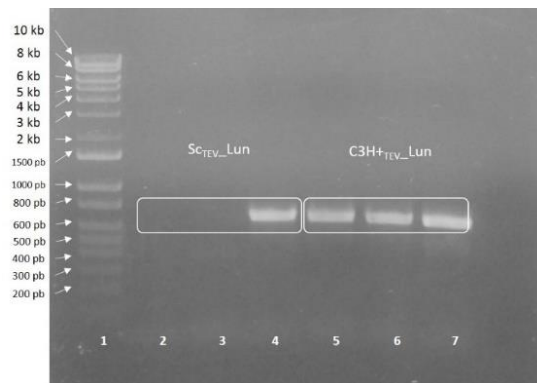


Figura 14. PCR de confirmación de la construcción de pET30a-SmbP_{TEV}-Lun y pET30a-CusF3H⁺_{TEV}-Lun. En el carril 1 se muestra el marcador de peso. En el carril 2 al 4 se muestra la amplificación de SmbP_{TEV}-Lun y en el carril 5 al 7 se muestra la amplificación de CusF3H⁺_{TEV}-Lun. Para ambas construcciones se utilizaron los iniciadores T7 delantero y reverso. Peso esperado: 627 pb.

5.3 Expresión a pequeña escala de TorAps-SmbP-RFP y análisis por SDS-PAGE.

Una vez transformada la construcción de TorAps-SmbP-RFP en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) se tomaron varias colonias para llevar a cabo la expresión a pequeña escala de la proteína de interés. Se analizaron las fracciones solubles e insolubles de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular teórico para TorAps-SmbP-RFP es de aproximadamente 40 KDa la cual se observa en la Figura 15.

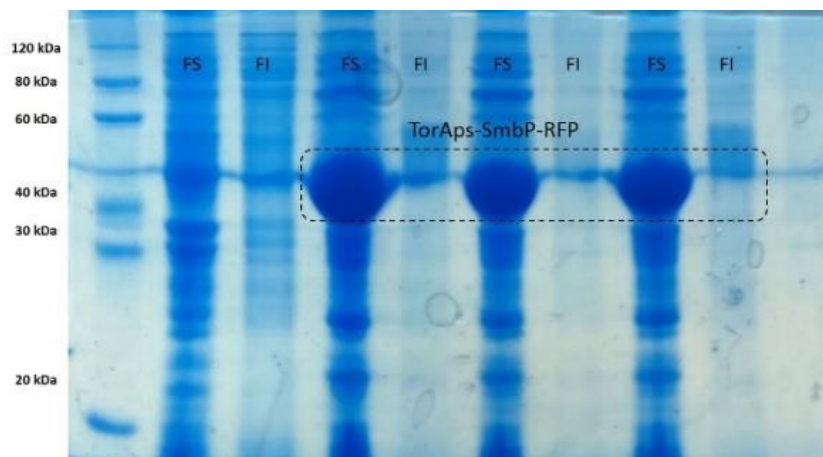


Figura 15. SDS-PAGE 12% de la expresión a pequeña escala de TorAps-SmbP-RFP. FS= fracción soluble, FI= fracción insoluble. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Peso molecular calculado: 36.1 kDa.

5.4 Extracción periplásmica de TorAps-SmbP-RFP y TorAps-SmbP-GFP por el método de lisozima/choque osmótico y análisis por SDS-PAGE.

Se realizó la expresión en 30 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina y posteriormente se sometió al método de lisozima/choque osmótico para la extracción de TorAps-SmbP-RFP. Para esto se tomaron los pesos de los tubos antes y después de contener el sedimento celular para obtener el peso húmedo de los mismos (ver Tabla 7).

Tabla 7. Pesos del sedimento celular para la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-RFP.

Muestra	Tubo sin sedimento celular (g)	Tubo con sedimento celular (g)	Sedimento celular (g)
TorAps-SmbP-RFP 1	16.2056	16.4612	0.2556
TorAps-SmbP-RFP 2	16.1846	16.4460	0.2614
TorAps-SmbP-RFP 3	16.1654	16.4454	0.2795

Se resuspendieron los sedimentos celulares de TorAps-SmbP 1, 2, y 3 en 2.56 mL, 2.61 mL y 2.8 mL de buffer hipertónico respectivamente para obtener una concentración celular de 0.1 g/mL. Después de obtener la fracción hipertónica, los sedimentos celulares se resuspendieron en solución hipotónica en los mismos volúmenes utilizados en la solución hipertónica para obtener una concentración celular de 0.1 g/mL.

Se analizaron las fracciones hipertónicas e hipotónicas de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular teórico para TorAps-SmbP-RFP es de aproximadamente 40 KDa el cual se puede observar en la Figura 16.



Figura 16. SDS-PAGE 12% de la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-RFP. FHiper= fracción hipertónica, FHipo= fracción hipotónica. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.

Para TorAps.SmbP-GFP se realizó una expresión a pequeña escala en 2 mL de caldo LB suplementado con Kanamicina y se sometió al método de lisozima/choque osmótico para su extracción. Para esto se tomaron los pesos de los tubos antes y después de contener el sedimento celular para obtener el peso húmedo de los mismos (ver Tabla 8).

Tabla 8. Pesos del sedimento celular para la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-GFP.

Muestra	Tubo sin sedimento celular (g)	Tubo con sedimento celular (g)	Sedimento celular (g)
TorAps-SmbP-GFP 1	0.9891	1.0082	0.0191
TorAps-SmbP-GFP 2	0.9966	1.0186	0.0220
TorAps-SmbP-GFP 3	0.9857	1.0086	0.0229

Se resuspendieron los sedimentos celulares de TorAps-SmbP-GFP en 200 μ L de buffer hipertónico para obtener una concentración celular de 0.1 g/mL. Después de obtener la fracción hipertónica, los sedimentos celulares se resuspendieron en solución hipotónica en los mismos volúmenes utilizados en la solución hipertónica para obtener una concentración celular de 0.1 g/mL.

Se analizaron las fracciones hipertónicas e hipotónicas de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular teórico para TorAps-SmbP-GFP es de aproximadamente 40 KDa el cual se puede observar en la Figura 17.

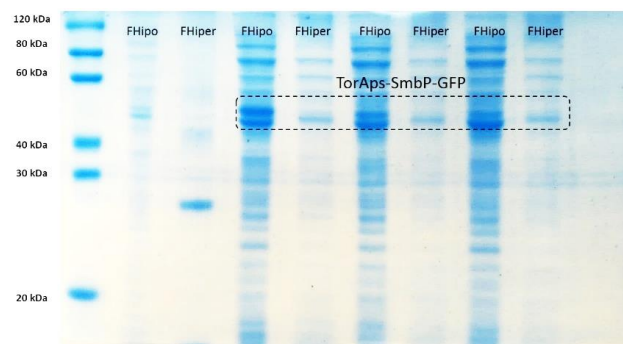


Figura 17. SDS-PAGE 12% de la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-GFP. FHiper= fracción hipertónica, FHipo= fracción hipotónica. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard.

5.5 Expresión a pequeña escala de las construcciones de lunasina

Una vez transformada la construcción de SmbP_c-Lun en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) se tomaron varias colonias para llevar a cabo la expresión a pequeña escala de la proteína de interés. Se analizaron las fracciones solubles e insolubles de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular teórico para SmbP_c-Lun es de aproximadamente 17 KDa el cual se observa en la Figura 18.

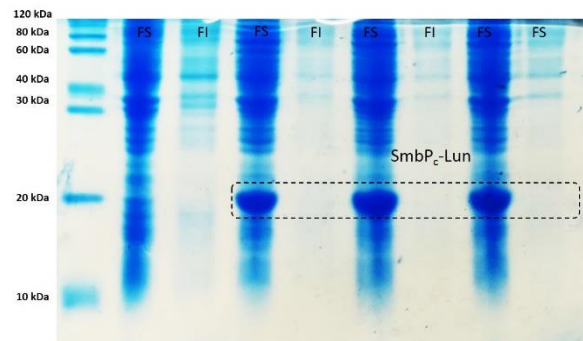


Figura 18. SDS-PAGE 15% de la microexpresión de SmbP_c-Lun. FS= fracción soluble, FI= fracción insoluble. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Peso molecular calculado 16.1 kDa.

Después de transformar la construcción de CusFH_c-Lun en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) se tomaron varias colonias para llevar a cabo la expresión a pequeña escala de la proteína de interés. Se analizaron las fracciones solubles e insolubles de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular teórico para CusF3H_c-Lun es de aproximadamente 17 KDa el cual se observa en la Figura 19.

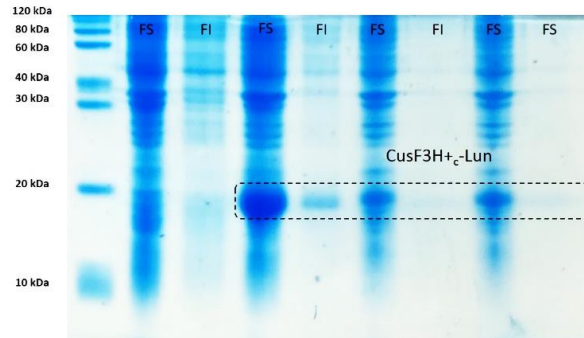


Figura 19. SDS-PAGE 15% de la microexpresión de CusF3H+c-Lun. FS= fracción soluble, FI= fracción insoluble. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Peso molecular calculado: 16.5 kDa.

Luego se transformó la construcción de CusFH+c-Lunx2 en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y se tomaron varias colonias para llevar a cabo la expresión a pequeña escala de la proteína de interés. Se analizaron las fracciones solubles de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular teórico para CusF3H+c-Lunx2 es de aproximadamente 21.7 KDa el cual se observa en la Figura 20.

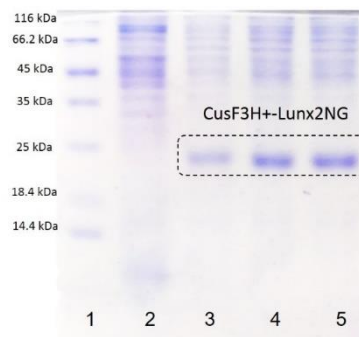


Figura 20. SDS-PAGE 15% de la microexpresión de CusF3H+c-Lunx2. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: control negativo *E. coli* BL21(DE3) sin transformar; Carril 3-5: CusF3H+c-Lunx2 producida con 3 colonias distintas.

Una vez obtenida la cepa de *E. coli* BL21(DE3) con la construcción de SmbP_{TEV}-Lun, se tomaron varias colonias para llevar a cabo la expresión a

pequeña escala de la proteína de interés. Se realizó la expresión a 25 y 37 °C para observar si había diferencias en la expresión. Se analizaron las fracciones solubles de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular teórico para SmbP_{TEV}-Lun es de aproximadamente 17 KDa el cual se observa en la Figura 21.

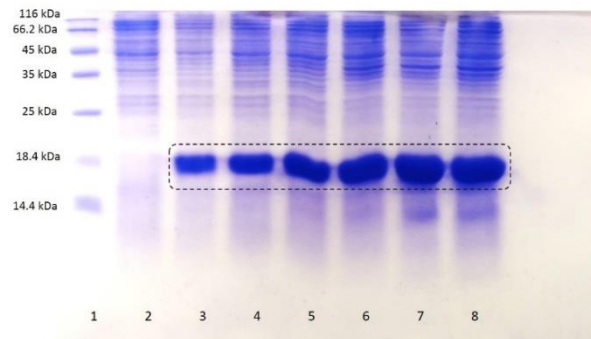


Figura 21. SDS-PAGE 15% de la expresión a pequeña escala de SmbP_{TEV}-Lun. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: control negativo *E. coli* BL21(DE3) sin transformar; Carril 3-5: expresión a 25 °C de SmbP_{TEV}-Lun; Carril 6-8: expresión a 37 °C de SmbP_{TEV}-Lun. Peso molecular calculado: 16 kDa.

Para la producción de CusF3H₊TEV-Lun, se transformó la construcción de esta en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y se tomaron varias colonias para llevar a cabo la expresión a pequeña escala de la proteína de interés. Se realizó la expresión a 25 y 37 °C para observar si había diferencias en la expresión. Se analizaron las fracciones solubles de cada expresión realizada por el método SDS-PAGE. El peso molecular teórico para CusF3H₊TEV-Lun es de aproximadamente 17 KDa el cual se observa en la Figura 22.

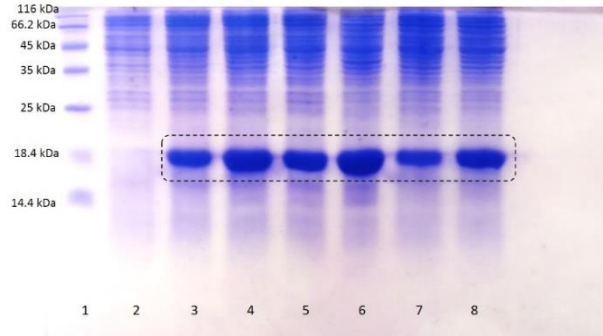


Figura 22. SDS-PAGE 15% de la microexpresión de CusF3H₊TEV-Lun. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: control negativo *E. coli* BL21(DE3) sin transformar; Carril 3-5: expresión a 25 °C de CusF3H₊TEV-Lun; Carril 6-8: expresión a 37 °C de CusF3H₊TEV-Lun.

5.6 Purificación de TorAps-SmbP-RFP y TorAps-SmbP-GFP por cromatografía IMAC

Para la purificación de TorAps-SmbP-RFP se obtuvieron los sedimentos celulares de 1 L de cultivo de la expresado de y se sometió al método de lisozima/choque osmótico para realizar la extracción periplásmica de las proteínas. Para esto se tomaron el peso del tubo empleado antes y después de contener el sedimento celular para obtener el peso húmedo del mismo (ver Tabla 9).

Tabla 9. Peso del sedimento celular para la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-RFP.

Muestra	Tubo sin sedimento celular (g)	Tubo con sedimento celular (g)	Sedimento celular (g)
TorAps-SmbP-RFP	75.4374	80.5862	5.1488

Se resuspendieron los sedimentos celulares en 50 mL de solución hipertónica obteniendo una concentración celular de 0.1 g/mL.

Después de obtener la fracción hipertónica, los sedimentos celulares se resuspendieron en solución hipotónica en los mismos volúmenes utilizados en la solución hipertónica para obtener una concentración celular de 0.1 g/mL. Una vez obtenidas las fracciones hipotónicas se descartaron los sedimentos celulares.

Se obtuvieron en total 100 mL de fracción hipertónica e hipotónica los cuales fueron sometidos a cromatografía IMAC. Después de lavar la columna con solución amortiguadora de lavado se realizó la elución como se describió en el punto 4.6.1. De las fracciones obtenidas, se analizaron por el método SDS-PAGE (ver Figura 23) las que tenían la coloración roja característica y que estaban dentro del pico de absorbancia.

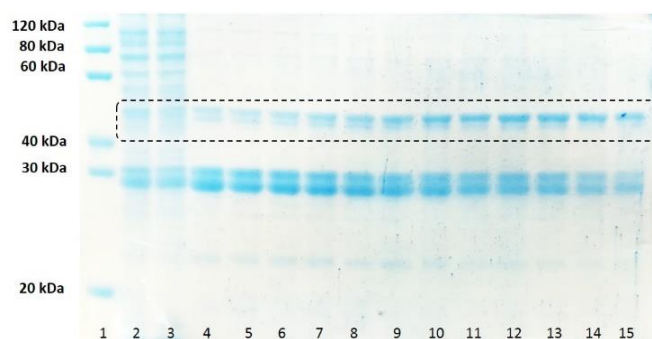


Figura 23. SDS-PAGE 12% de la purificación de TorAps-SmbP-RFP. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: fracción periplásmica. Carril 3: fracción no unida. Carril 4-15: fracciones obtenidas en la elución.

En la Figura 24 se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FLPC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para TorAps-SmbP-RFP. Cabe destacar que se obtuvieron fracciones en volúmenes de 0.5 mL de la elución por gradiente.

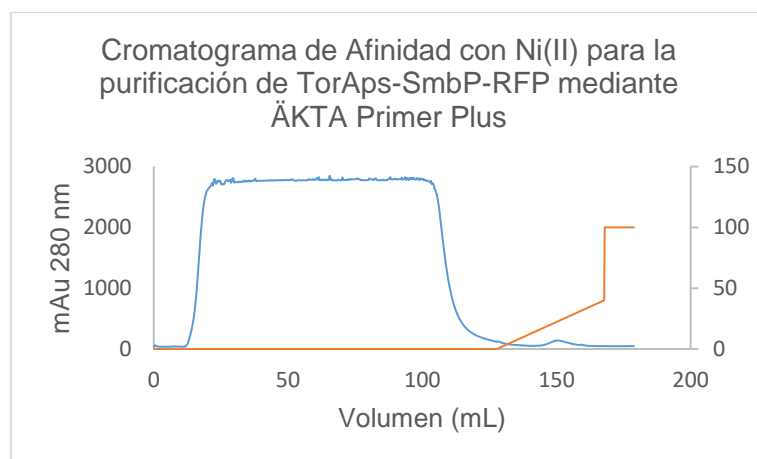


Figura 24. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para TorAps-SmbP-RFP.

Para la purificación de TorAps-SmbP-GFP se obtuvieron los sedimentos celulares de 1 L de cultivo de la expresado y se sometió al método de lisozima/choque osmótico para realizar la extracción periplásmica de las proteínas. Para esto se tomaron el peso del tubo empleado antes y después de contener el sedimento celular para obtener el peso húmedo del mismo (ver Tabla 10).

Tabla 10. Peso del sedimento celular para la extracción periplásmica de TorAps-SmbP-GFP.

Muestra	Tubo sin sedimento celular (g)	Tubo con sedimento celular (g)	Sedimento celular (g)
TorAps-SmbP-GFP	75.3301	80.8914	5.5613

Se resuspendieron los sedimentos celulares en 50 mL de solución hipertónica obteniendo una concentración celular de 0.1 g/mL.

Después de obtener la fracción hipertónica, los sedimentos celulares se resuspendieron en solución hipotónica en los mismos volúmenes utilizados en la

solución hipertónica para obtener una concentración celular de 0.1 g/mL. Una vez obtenidas las fracciones hipotónicas se descartaron los sedimentos celulares.

Para esta proteína solo los 50 mL de la fracción hipotónica fueron sometidos a cromatografía IMAC. Después de lavar la columna con solución amortiguadora de lavado se realizó la elución como se describió en el punto 4.6.1. De las fracciones obtenidas, se analizaron por el método SDS-PAGE las que tenían la coloración verde característica y que estaban dentro del pico de absorbancia.

En la Figura 25 se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FLPC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para TorAps-SmbP-GFP. Se obtuvieron fracciones en volúmenes de 0.5 mL de la elución en un solo paso.

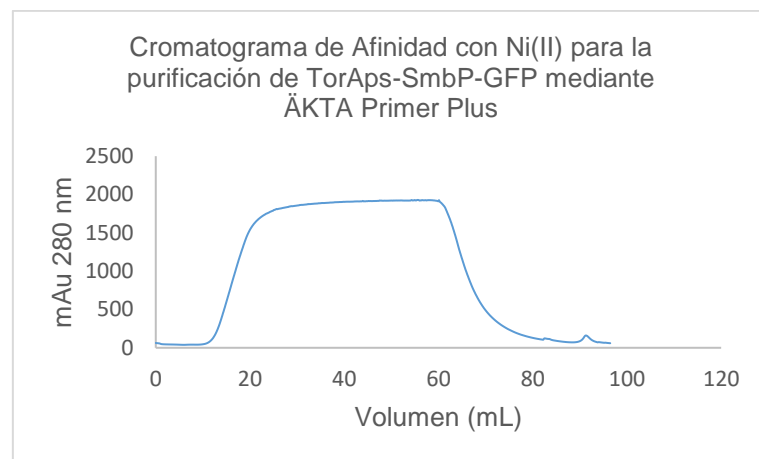


Figura 25. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para TorAps-SmbP-GFP.

5.7 Microscopía de fluorescencia.

Después de realizar la expresión a pequeña escala de proteínas de TorAps-SmbP-RFP se tomó el sedimento celular de 2 mL de cultivo y se

resuspendió en 1 mL de solución amortiguadora PBS. Se tomó una alícuota de 5 μ L para la realización de la observación por el microscopio de fluorescencia. Así mismo, se realizó el análisis de la expresión citoplásmica utilizando SmbP_c-RFP. Como control negativo se utilizó *E. coli* BL21(DE3) sin transformar. En la Figura 26 se muestran las imágenes tomadas del microscopio de fluorescencia de las diferentes expresiones.

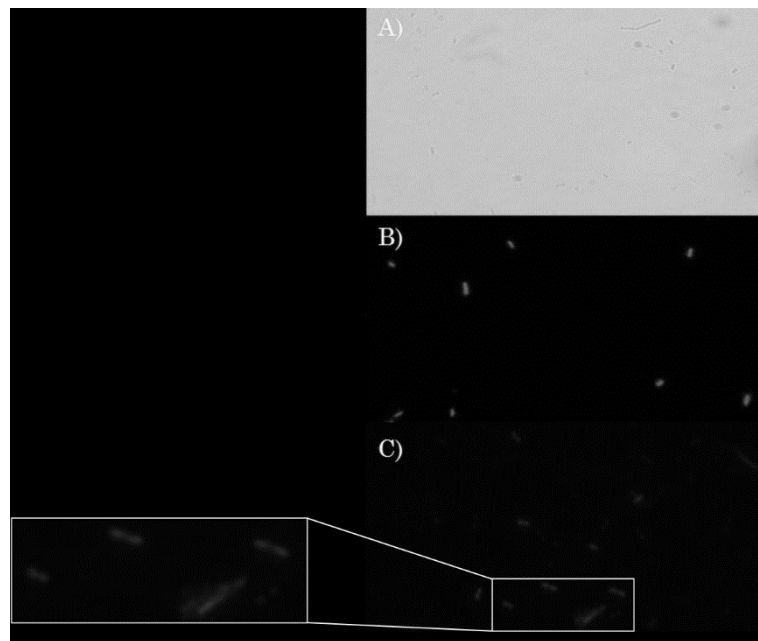


Figura 26. Análisis de la expresión de TorAps-SmbP-RFP por microscopia de fluorescencia. Campo claro: A) *E. coli* BL21(DE3). Fluorescencia: B) SmbP_c-RFP, C) TorAps-SmbP-RFP.

5.8 Cuantificación de RFP por espectrofotometría de fluorescencia.

Se cuantificó la concentración de RFP de las fracciones de elución obtenidas en la cromatografía IMAC. En la Tabla 11 se muestran los datos utilizados para la curva de calibración.

Tabla 11. Datos de la curva de calibración para la cuantificación por espectrofotometría de fluorescencia.

Estándar	Concentración (µg/mL)	Intensidad promedio ± DS (R.F.U)
1	70	331.97 ± 13.74
2	50	246.33 ± 5.77
3	20	106.3 ± 5.46
4	10	54.07 ± 2.23
5	5	29.97 ± 1.19
6	2.5	13.9 ± 0.53
7	1	5.87 ± 0.21

Posteriormente se llevó a cabo la lectura de las muestras a analizar utilizando una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 585 nm. Se realizaron los cálculos correspondientes con la ecuación obtenida de la gráfica de la curva de calibración (ver Figura 27). Se obtuvieron 4.13 mg de TorAps-SmbP-RFP por litro de cultivo expresado.

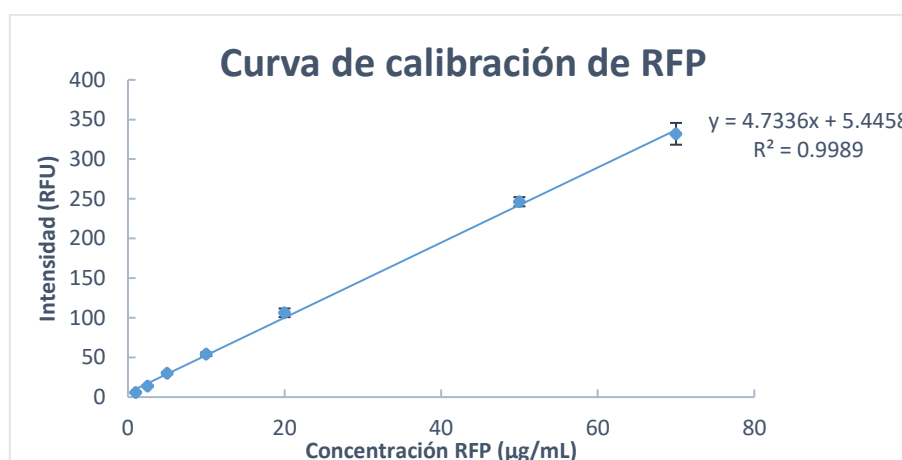


Figura 27. Gráfica de la curva de calibración de RFP a 585 nm de longitud de onda de emisión. Las proteínas fueron excitadas a 530 nm.

5.9 Obtención del espectro de fluorescencia de GFP.

En la Figura 28 se observa el espectro de fluorescencia de GFP obtenido después de una excitación a 488 nm y un barrido desde 480 nm hasta 550 nm obteniendo un pico máximo de emisión a los 509 nm.

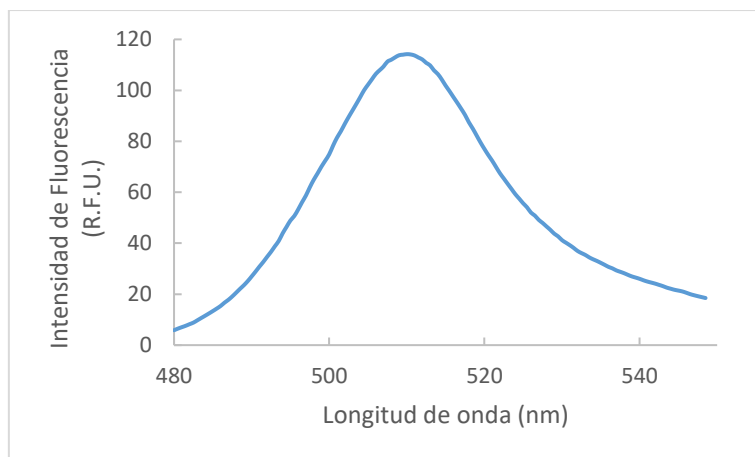


Figura 28. Espectro de fluorescencia de GFP. La proteína fue excitada a 488 nm.

5.10 Purificación de lunasina con las diferentes proteínas de fusión empleando cromatografía IMAC

Después de obtener el lisado de 1 L de cultivo expresado de SmbP_c-Lun, se purificó por cromatografía IMAC. Para observar el comportamiento de esta proteína en la cromatografía IMAC, se realizó la elución en un solo paso utilizando la solución amortiguadora de elución descrita en el punto 4.6.1. De las fracciones obtenidas, se analizaron por SDS-PAGE (ver Figura 29) solo las que estaban dentro del pico de absorbancia.

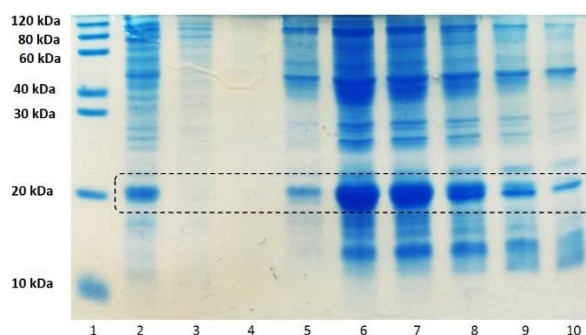


Figura 29. SDS-PAGE 15% de la purificación de SmbP_c-Lun de 1 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: lisado. Carril 3: fracción no unida. Carril 4-10: fracciones obtenidas en la elución.

En la Figura 30 se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FLPC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para SmbP_c-Lun de 1 L de cultivo expresado. Se obtuvieron fracciones en volúmenes de 0.5 mL de la elución en un solo paso.

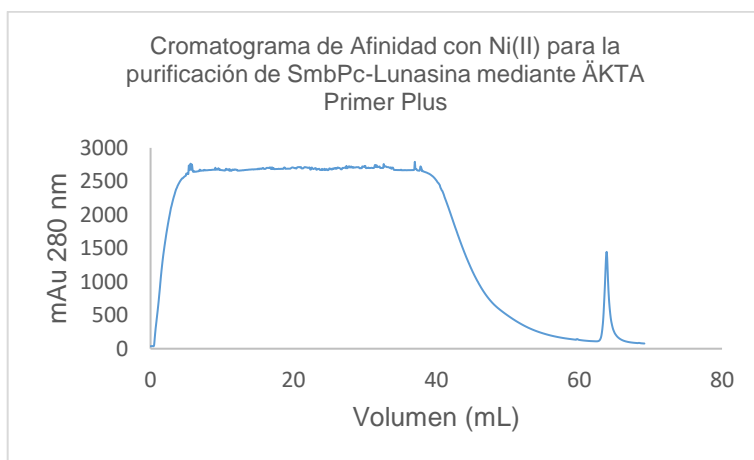


Figura 30. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbP_c-Lun de 1 L de cultivo.

Debido a que las fracciones obtenidas no presentaban la pureza deseada, se expresaron 3 L de cultivo de SmbP_c-Lun para lograr saturar la columna. Se obtuvo el lisado con solución amortiguadora de lisis conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl y 5 mM imidazol y se sometió a cromatografía IMAC. En este caso se optó por realizar lavados a la columna con solución amortiguadora de lavado como se describe en el punto 4.6.1. Después de realizar el lavado se realizó la elución en gradiente y se analizó por SDS-PAGE (ver Figura 31) las fracciones obtenidas que se encontraban dentro del pico de absorbancia.

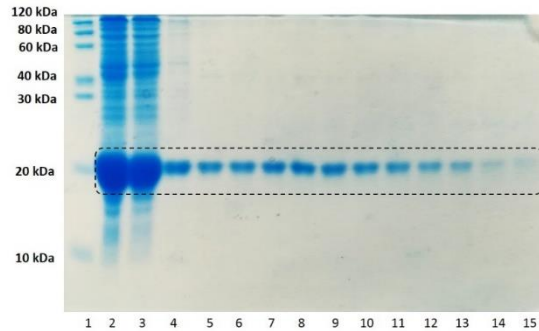


Figura 31. SDS-PAGE 15% de la purificación de SmbP_c-Lun de 3 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: lisado. Carril 3: fracción no unida. Carril 4-10: fracciones obtenidas en la elución.

En la Figura 32 se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FLPC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para SmbP_c-Lun de 3 L de cultivo expresado. Se obtuvieron fracciones en volúmenes de 0.5 mL de la elución en gradiente.

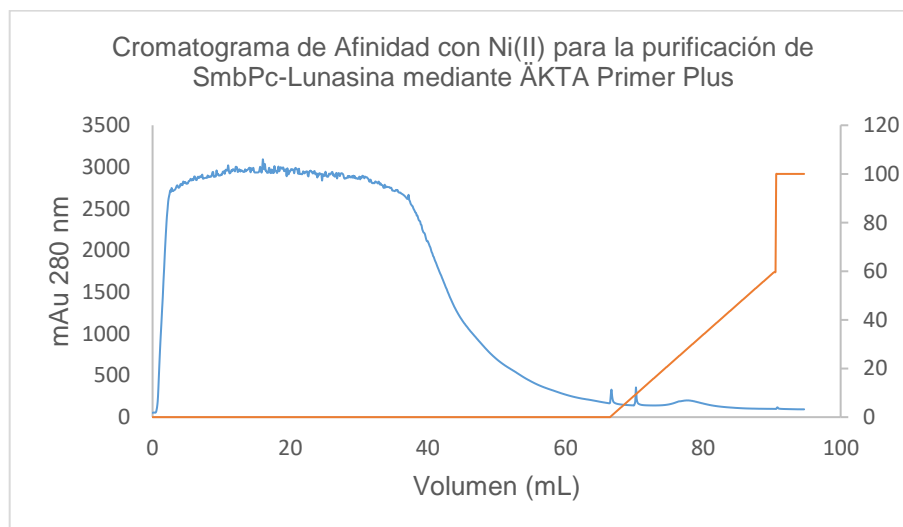


Figura 32. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbP_c-Lun de 3 L de cultivo.

Aunque fue posible obtener fracciones más puras, se pudo observar fracción no unida que una gran cantidad de proteína no se unió a la columna (ver

Figura 31). Por lo tanto, se infirió que la cantidad de proteína expresada en 3 L de cultivo sobresaturaba la columna.

Debido a esto, se decidió realizar la expresión de solo 2 L de cultivo de SmbPc-Lun. Se obtuvo el lisado con solución amortiguadora de lisis conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl y 5 mM imidazol y se sometió a cromatografía IMAC. Después de realizar el lavado se realizó la elución en gradiente y se analizó por SDS-PAGE (ver Figura 33) las fracciones obtenidas que se encontraban dentro del pico de absorbancia.

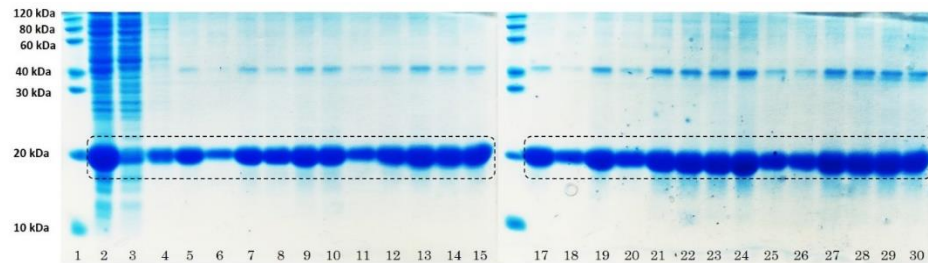


Figura 33. SDS-PAGE 15% de la purificación de SmbP_c-Lun de 2 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: lisado. Carril 3: fracción no unida. Carril 4-15, 17-30: fracciones obtenidas en la elución.

En la Figura 34 se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FLPC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para SmbP_c-Lun de 2 L de cultivo expresado. Se obtuvieron fracciones en volúmenes de 0.5 mL de la elución en gradiente.

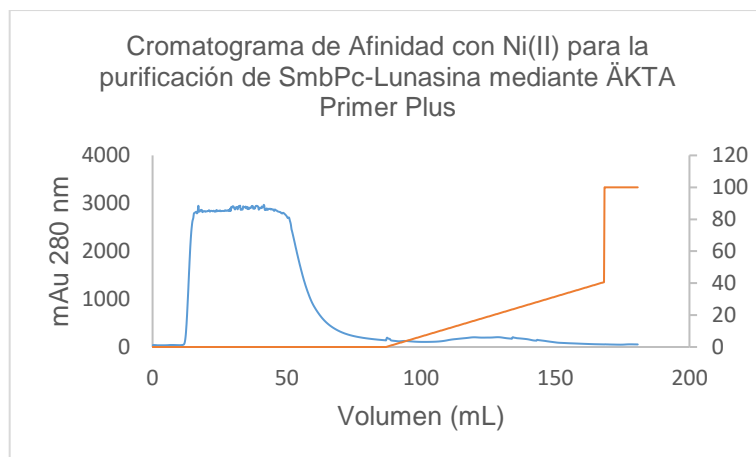


Figura 34. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbP_c-Lun de 2 L de cultivo.

Para la purificación de CusF3H_c-Lun se obtuvo el lisado de 2 L de cultivo expresado y se purificó por cromatografía IMAC. Se expresaron 2 L de cultivo debido a los resultados obtenidos en los experimentos realizados con SmbP_c-Lun. Después de realizar el lavado se realizó la elución en gradiente y se analizó por SDS-PAGE (ver Figura 35) las fracciones obtenidas que se encontraban dentro del pico de absorbancia.

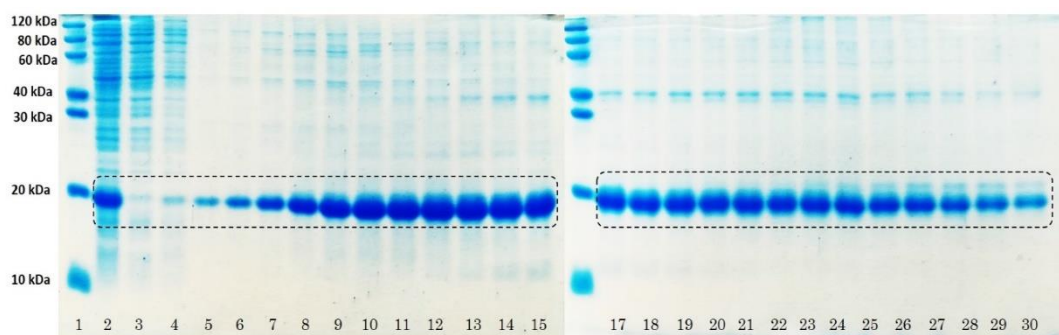


Figura 35. SDS-PAGE 15% de la purificación de CusF3H_c-Lun de 2 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular PAGE-MASTER Protein Standard. Carril 2: lisado. Carril 3: fracción no unida. Carril 5-15, 17-30: fracciones obtenidas en la elución.

En la Figura 36 se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FLPC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para CusF3H_c-

Lun de 2 L de cultivo expresado. Se obtuvieron fracciones en volúmenes de 0.5 mL de la elución en gradiente.

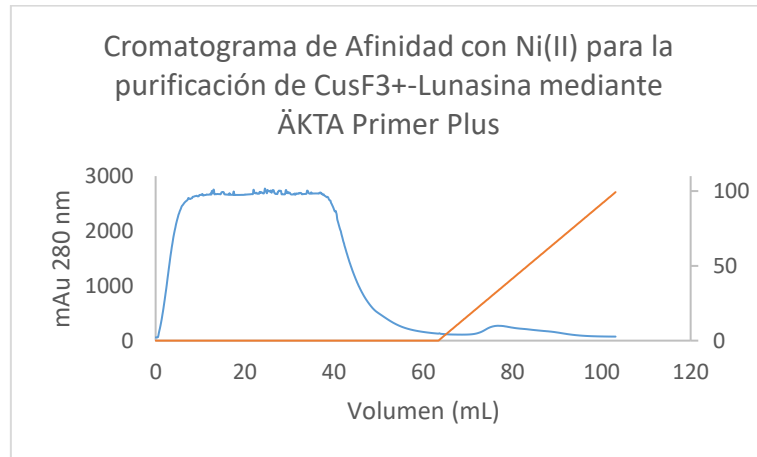


Figura 36. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para CusF3H_c-Lun de 2 L de cultivo.

Para la purificación de CusF3H_c-Lunx2 se obtuvo el lisado de 1 L de cultivo expresado y se purificó por cromatografía IMAC. Se expresaron 1 L de cultivo debido a los resultados obtenidos en los experimentos realizados con CusF3H_c-Lunx2. Después de realizar el lavado se realizó la elución en gradiente y se analizó por SDS-PAGE (ver Figura 37) las fracciones obtenidas que se encontraban dentro del pico de absorbancia.

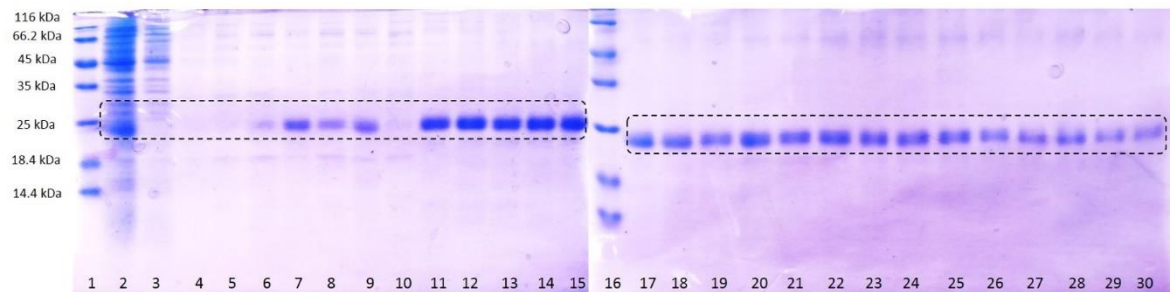


Figura 37. SDS-PAGE 15% de la purificación de CusF3H_c-Lunx2 de 1 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: lisado; Carril 3: fracción no unida. Carril 4-15 y 17-30: fracciones obtenidas en la elución por gradiente.

Para la purificación de SmbP_{TEV}-Lun se obtuvo el lisado de 1 L de cultivo expresado y se purificó por cromatografía IMAC. Después de realizar el lavado se realizó la elución en gradiente y se analizó por SDS-PAGE (ver Figura 38) las fracciones obtenidas que se encontraban dentro del pico de absorbancia.

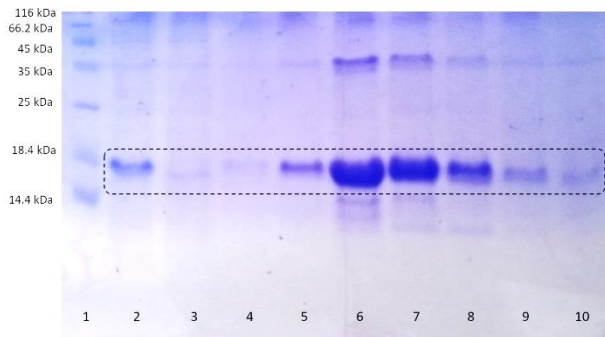


Figura 38. SDS-PAGE 15% de la purificación de SmbP_{TEV}-Lun de 1 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: lisado; Carril 3: fracción no unida; Carril 4-10: fracciones obtenidas en la elución.

En la Figura 39 se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FLPC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para SmbP_{TEV}-Lun de 1 L de cultivo expresado. Se obtuvieron fracciones en volúmenes de 1 mL de la elución en un solo paso.

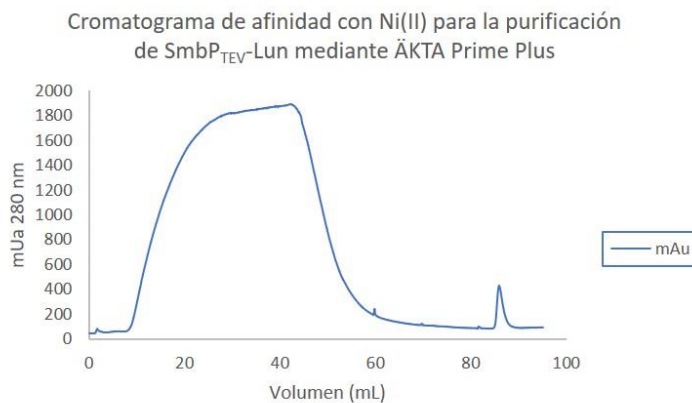


Figura 39. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbP_{TEV}-Lun de 1 L de cultivo.

Para la purificación de CusF3H+TEV-Lun se obtuvo el lisado de 1 L de cultivo expresado y se purificó por cromatografía IMAC. Después de realizar el lavado se realizó la elución en gradiente y se analizó por SDS-PAGE (ver Figura 40) las fracciones obtenidas que se encontraban dentro del pico de absorbancia.

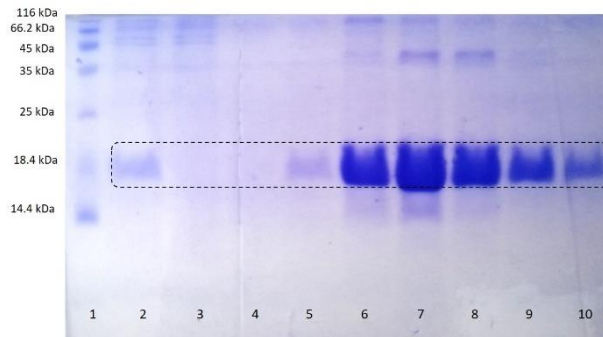


Figura 40. SDS-PAGE 15% de la purificación de CusF3H+_c-Lun de 1 L de cultivo expresado. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: lisado; Carril 3: fracción no unida; Carril 4-10: fracciones obtenidas en la elución.

En la Figura 41 se observa el cromatograma de afinidad obtenido con el equipo FLPC ÄKTA prime plus observando el pico de elución para CusF3H+TEV-Lun de 1 L de cultivo expresado. Se obtuvieron fracciones en volúmenes de 1 mL de la elución en un solo paso.

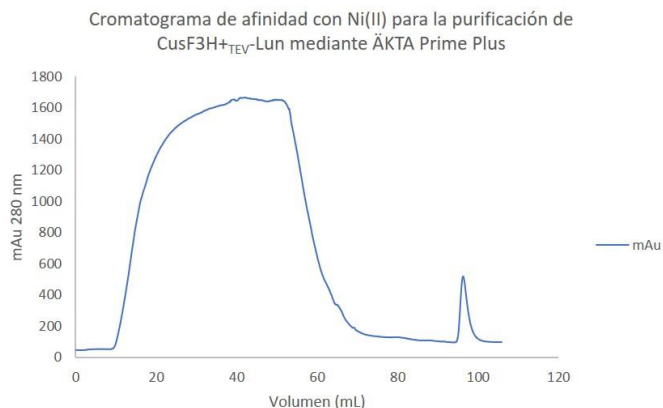


Figura 41. Cromatograma de afinidad con Ni(II) para SmbP_{TEV}-Lun de 1 L de cultivo.

5.11 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Se cuantificó la concentración de proteínas de las fracciones de elución obtenidas en la cromatografía IMAC. En la Tabla 12 se muestran los datos utilizados para la curva de calibración.

Tabla 12. Datos de la curva de calibración para el método de Bradford.

	Concentración de estándares (mg/mL)	Reactivo de Bradford (µL)	Volumen de muestra (µL)	Absorbancia promedio a 595 nm
Estándar 1	1	250	5	0.939
Estándar 2	0.8	250	5	0.860
Estándar 3	0.6	250	5	0.770
Estándar 4	0.4	250	5	0.647
Estándar 5	0.2	250	5	0.545
Estándar 6	0.1	250	5	0.484

Posteriormente se llevó a cabo la lectura de la absorbancia a la longitud de onda a 595 nm de las muestras a analizar y se realizaron los cálculos correspondientes con la ecuación obtenida de la gráfica de la curva de calibración (Ver Figura 42).

Se obtuvo una concentración de 0.537 mg/mL correspondientes a 10.74 mg de SmbPc-Lun de 2 L cultivo expresados de las fracciones analizadas a partir de los cálculos realizados utilizando la ecuación de la recta. Para CusF3H+c-Lun se obtuvo una concentración de 0.432 mg/mL correspondientes a 8.64 mg de 2 L cultivo expresados.

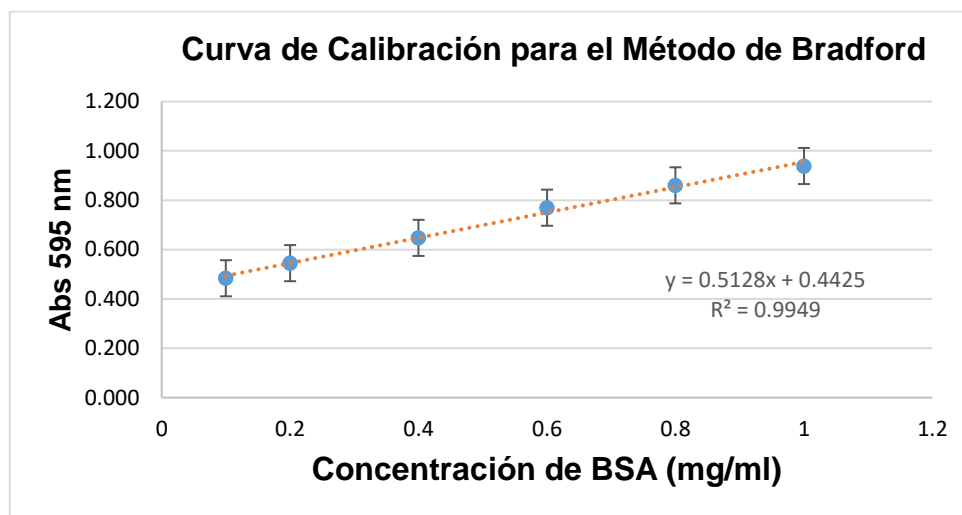


Figura 42. Gráfica de la curva de calibración del método de Bradford a 595 nm.

5.12 Digestión y remoción de la proteína de fusión de la lunasina empleando enteroquinasa, hidroxilamina y TEV y análisis por SDS-PAGE.

Para la digestión de SmbP_c-Lun con la enteroquinasa de cadena ligera, se emplearon 200 µg de proteína y se realizó la separación de la proteína de fusión realizando una segunda purificación utilizando una resina IMAC cargada con iones Ni(II). Después de la incubación con la resina, se removió el sobrenadante conteniendo el péptido lunasina separado de la proteína de fusión y se lavó la

resina con la solución amortiguadora de lavado utilizada en el punto 4.6.1. Se realizó la elución de la proteína de fusión con la solución amortiguadora de elución utilizada en el punto 4.6.1. En la Figura 43 se muestra el análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas.

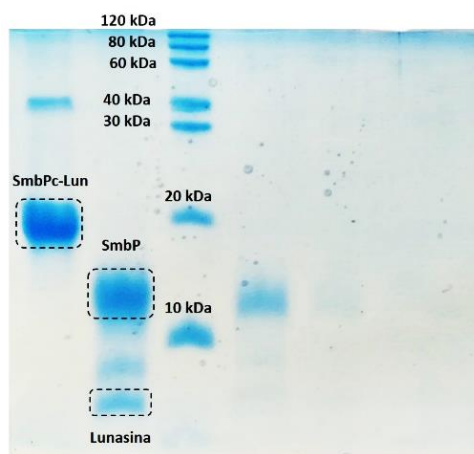


Figura 43. SDS-PAGE 16.5% de la remoción de la proteína SmbP_c de Lun después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se purificó con la resina Profinity™ IMAC cargada con iones níquel. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: SmbP_c-Lun. Carril 2: Digestión de SmbP_c-Lun. Carril 3: Marcador de peso molecular. Carril 4: Sobrenadante. Carril 5: Lavado de la resina. Carril 6: Elución de SmbP.

Para la digestión de CusF3H_c-Lun con la enteroquinasa de cadena ligera, se cortaron 200 µg de proteína y se realizó la separación de la proteína de fusión realizando una segunda purificación utilizando una resina IMAC cargada con iones Ni(II). Después de la incubación con la resina, se removió el sobrenadante conteniendo el péptido lunasina separado de la proteína de fusión y se lavó la resina con la solución amortiguadora de lavado utilizada en el punto 4.6.1. Se realizó la elución de la proteína de fusión con la solución amortiguadora de elución utilizada en el punto 4.6.1. En la Figura 44 se muestra el análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas.

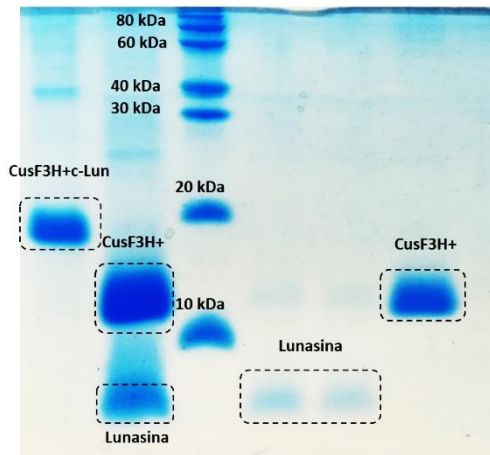


Figura 44. SDS-PAGE 16.5 % de la remoción de la proteína CusF3H+c de Lun después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se purificó con la resina Profinity™ IMAC cargada con iones níquel. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: CusF3H+c-Lun. Carril 2: Digestión de CusF3H+c-Lun. Carril 3: Marcador de peso molecular. Carril 4: Sobrenadante (Lunasina). Carril 5: Lavado de la resina. Carril 6: Elución de CusF3H+.

Así mismo, se analizó por medio de un gel de Tricina-SDS-PAGE como se muestra en la Figura 45.

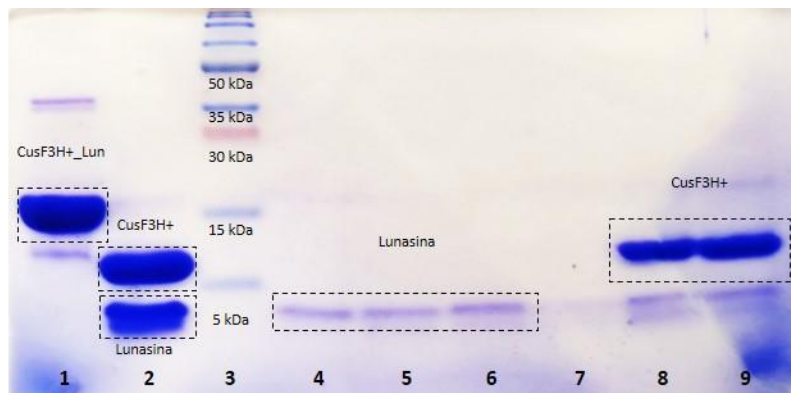


Figura 45. Tricina-SDS-PAGE 15% de la remoción de la proteína CusF3H+c de Lun después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se purificó con la resina Profinity™ IMAC cargada con iones níquel. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: CusF3H+c-Lun. Carril 2: Digestión de CusF3H+c-Lun. Carril 3: Marcador de peso molecular. Carril 4: Sobrenadante (Lunasina). Carril 5-7: Lavado de la resina. Carril 8 y 9: Elución de CusF3H+.

Para la digestión con hidroxilamina, se utilizaron 110 µL de CusF3H+c-Lunx2 con 90 µL de una solución de 4 M de hidroxilamina (concentración final de

1.8 M) en solución amortiguadora que contenía 50 mM Tris-HCl pH 8.0 y 500 mM NaCl. Se tomaron alícuotas a diferentes horas (2, 19 y 20 h) incubando a 45 °C y 50 rpm. En la Figura 46 se muestra el análisis por SDS-PAGE de las muestras recolectadas. Como se puede observar, existe una disminución en la banda de la proteína (CusF3H+-Lunx2), no obstante, no se observa el patrón de digestión esperado en donde debería aparecer la banda de la lunasina alrededor de los 5 kDa.



Figura 46. SDS-PAGE al 16.5% de la digestión de CusF3H+c-Lunx2 con hidroxilamina. Carril 1: Marcador de peso molecular Wide Range Protein Molecular Weight Marker, Unstained (BioBasic); Carril 2: CusF3+c-Lunx2 antes de la digestión; Carril 3-6: digestión de CusF3H+c-Lunx2 con hidroxilamina a las 2, 19, 20 y 21 h respectivamente.

Como CusF3H+c-Lunx2 contenía el sitio de reconocimiento de la enteroquinasa entre CusF3H+c y Lunx2, se realizó la digestión cortando 200 µg de proteína y se realizó la separación de la proteína de fusión realizando una segunda purificación utilizando una resina IMAC cargada con iones Ni(II). Después de la incubación con la resina, se removió el sobrenadante conteniendo el péptido lunasina separado de la proteína de fusión y se lavó la resina con la solución amortiguadora de lavado utilizada en el punto 4.6.1. Se realizó la elución de la proteína de fusión con la solución amortiguadora de elución utilizada en el

punto 4.6.1. En la Figura 47 se muestra el análisis por Tricina-SDS-PAGE de las fracciones obtenidas.

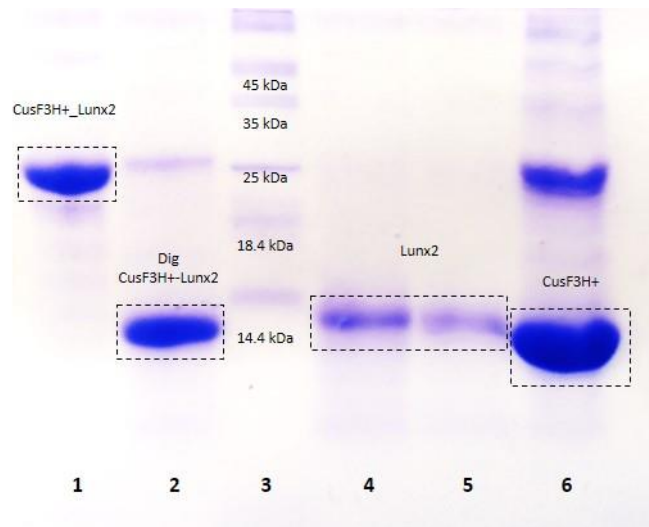


Figura 47. Tricina-SDS-PAGE 15 % de la remoción de la proteína CusF3H+c de Lunx2 después de la incubación con enteroquinasa durante 16 horas. Se purificó con la resina Profinity™ IMAC cargada con iones níquel. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: CusF3H+c-Lunx2. Carril 2: Digestión de CusF3H+c-Lunx2. Carril 3: Marcador de peso molecular. Carril 4: Sobrenadante (Lunx2). Carril 5: Lavado de la resina. Carril 6: Elución de CusF3H+.

Para la digestión con TEV, primero se realizaron pruebas preliminares empleando dos temperaturas (4 °C y 30 °C) durante 16 h. En la Figura 48 se muestra el análisis por SDS-PAGE de las muestras recolectadas. Como se puede notar, las reacciones realizadas con estas dos temperaturas no lograron la digestión de la proteína en su totalidad, sin embargo, es posible observar el péptido lunasina a 5 kDa como se esperaba. Por lo tanto, se decidió realizar las posteriores digestiones a 4 °C durante 16 h.

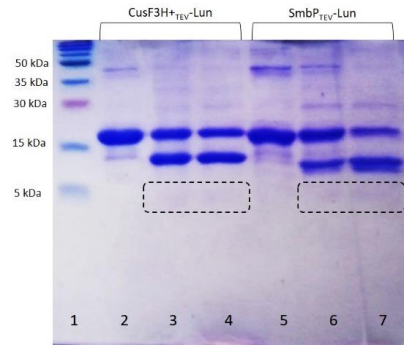


Figura 48. SDS-PAGE al 16% de las digestiones con TEV a 4 y 30 °C. Carril 3 y 6: digestión a 4 °C; Carril 4 y 7: digestión a 30 °C. Carril 1: Marcador de peso molecular Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard; Carril 2: CusF3H+TEV-Lun sin digerir; Carril 3 y 4: digestiones de CusF3H+TEV-Lun; Carril 5: SmbP_{TEV}-Lun; Carril 6 y 7: digestiones de SmbP_{TEV}-Lun.

Para la digestión de SmbP_{TEV}-Lun con TEV para para la remoción de la proteína de fusión, se emplearon 200 µg de proteína y se realizó la separación de la proteína de fusión realizando una segunda purificación utilizando una resina IMAC cargada con iones Ni(II). Después de la incubación con la resina, se removió el sobrenadante conteniendo el péptido lunasina separado de la proteína de fusión y se lavó la resina con la solución amortiguadora de lavado utilizada en el punto 4.6.1. Se realizó la elución de la proteína de fusión con la solución amortiguadora de elución utilizada en el punto 4.6.1. En la Figura 49 se muestra el análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas.

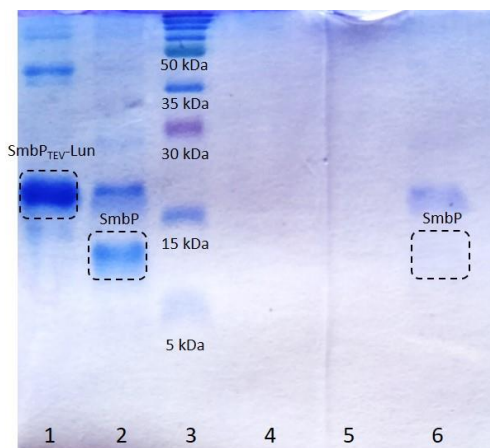


Figura 49. SDS-PAGE al 15% de la remoción de la proteína de fusión SmbP de Lun después de la incubación con TEV durante 16 h a 4 °C. Se purificó con la resina PROTEINDEX™ HiBond™ Ni-NTA Agarose. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: SmbP_{TEV}-Lun. Carril 2: Digestión de SmbP_{TEV}-Lun. Carril 3: Marcador de peso molecular Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard. Carril 4: Sobrenadante que contiene la lunasina. Carril 5: Lavado de la resina. Carril 6: Elución de SmbP.

Para la digestión de CusF3H₊TEV-Lun con TEV para para la remoción de la proteína de fusión, se emplearon 200 µg de proteína y se realizó la separación de la proteína de fusión realizando una segunda purificación utilizando una resina IMAC cargada con iones Ni(II). Después de la incubación con la resina, se removi6 el sobrenadante conteniendo el péptido lunasina separado de la proteína de fusión y se lav6 la resina con la soluci6n amortiguadora de lavado utilizada en el punto 4.6.1. Se realiz6 la eluci6n de la proteína de fusión con la soluci6n amortiguadora de eluci6n utilizada en el punto 4.6.1. En la Figura 50 se muestra el análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas.

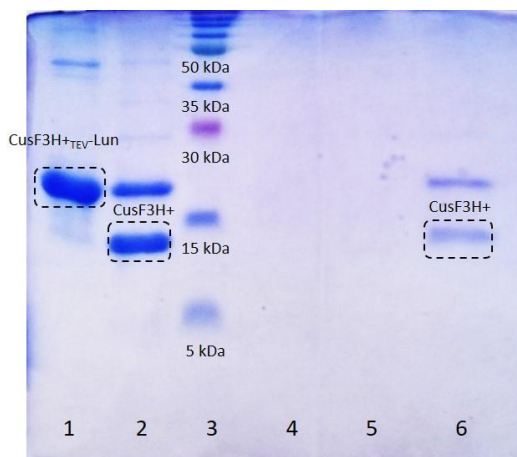


Figura 50. SDS-PAGE al 15% de la remoción de la proteína de fusión SmbP de Lun después de la incubación con TEV durante 16 h a 4 °C. Se purificó con la resina PROTEINDEX™ HiBond™ Ni-NTA Agarose. Se realizó la digestión de 200 µg. Carril 1: SmbP_{TEV}-Lun. Carril 2: Digestión de SmbP_{TEV}-Lun. Carril 3: Marcador de peso molecular Broad Multi Color Pre-Stained Protein Standard. Carril 4: Sobrenadante que contiene la lunasina. Carril 5: Lavado de la resina. Carril 6: Elución de SmbP.

5.13 Capacidad de captación de radicales ABTS

Para medir la actividad antioxidante de la lunasina, se utilizó el ensayo de descolorización con el reactivo ABTS. Después de ajustar el reactivo ABTS+ a una absorbancia de 0.7 a 734 nm, se adicionaron las muestras y se registraron las reducciones de las lecturas. En la Figura 51 se muestra que la lunasina presentó una máxima capacidad de captación de radicales ABTS del 30% y la lunasina en tándem un 16% a los 10 minutos de reacción. Así mismo, en la misma figura se observa la evaluación de CusF3H_c-Lun, CusF3H_c-Lunx2 y CusF3H_c obteniendo un 9%, 6% y 6% respectivamente.

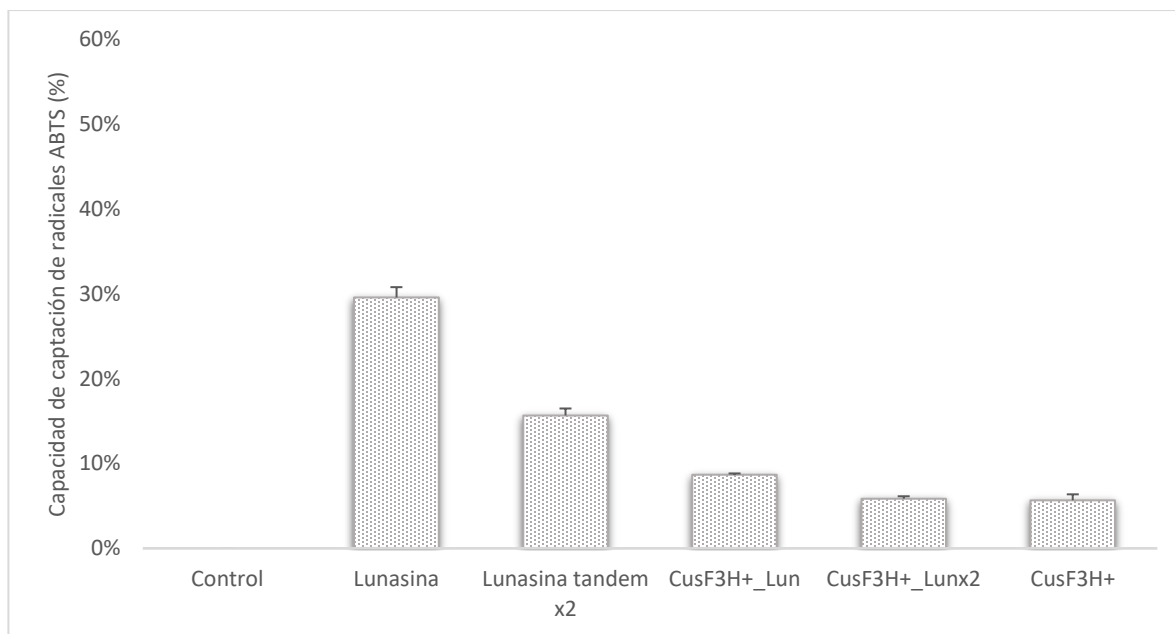


Figura 51. Efecto de lunasina, lunasina en tándem, CusF3H+-Lun, CusF3H+-Lunx2 y CusF3H+ en la capacidad de captación de radicales ABTS. Las barras de error muestran la desviación estándar.

5.14 Diseño del crRNA

Para el diseño y obtención del crRNA primero se hizo la selección de la región blanco en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que será sustituida con la secuencia de la enzima FAP. Para esto se utilizó la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI) para tener acceso al genoma de *Synechocystis* y así poder identificar la secuencia que se desea modificar.

El gen seleccionado para esto fue el *nbIA* el cual está conformado por dos secuencias codificantes, la *ssl0452* y la *ssl0453*. Estos codifican para la proteína de degradación de ficobilisoma, la cual está conformada por dos proteínas de diferente secuencia aminoacídica que forman un heterodímero. En la Tabla 13 se muestra la secuencia nucleotídica de este gen.

Tabla 13. Secuencia nucleotídica del gen *nblA* de *Synechocystis* sp. PCC 6803. En negritas se muestra las secuencias codificantes para la proteína de degradación de ficobilisoma y en itálicas la región no codificante.

ATGAAACCTGAATCCTTCGATCTCACCATTGAACAAATGTTTGAGTTCGTCGCATGCA
GGATGCCACCGCCAACATCAGCCAGGAGCAAGCCCTGGAAC*TTTTGGTCCAAGCCTCT*
CGACTGTTGATGATTAATCCAACGTCATCCGGGACTTAATGCGCCAGGCTCCCCTGG
AGCCCCTAGGTTAA*GCACAGGCAGGCAAAAAATTAGCTTGCTGTCTTAGCCATTAGTTA*
CAATTTTTGACCGCCCCATTTTTTCAGGAGTGCGATCGCCATGATCAACAACGAAGCCTT
TAACTATCCTTAGAGCAGAAATTTCAACTGCAGTGTTTGCAACAGGAATATCAAGAAC
TAGACCGGGAGCAGACCGTTAACTATTTACTAGAAACCATGCAACAAATCATGGTGCG
GGATAACCTGATCCGGGATTTGATGAAAAATTC*ACTCCTCCCCTAG*

Para diseñar el crRNA se utilizó la herramienta bioinformática Cas-Designer. Primero se seleccionó la endonucleasa que se utilizó en el presente proyecto, Cpf1 de *Francisella novicidia*, la cual reconoce el PAM 5'-TTN-3', luego se seleccionó el genoma blanco, en este caso fue *Synechocystis* sp. PCC 6803 y finalmente se introdujo la secuencia blanco, la del gen *nblA*. La herramienta permite hasta un máximo de 1000 caracteres y una longitud de crRNA sin PAM de 15 a 25 nucleótidos. En nuestro caso seleccionamos un crRNA de 20 nucleótidos.

Se obtuvieron 79 posibles resultados para emplear como crRNA, no obstante, se comenzó a hacer el descarte en base a las sugerencias de la herramienta Cas-Designer. Primero se seleccionaron todas las secuencias que tuvieron un puntaje fuera del marco mayor a 66, después se descartaron todas las secuencias con más de 4 timinas repetidas (TTTT) y finalmente por criterio personal se escogieron las secuencias con un %GC entre 40 y 60. En la Tabla

14 se muestran los resultados obtenidos de los crRNA generados y seleccionados.

Tabla 14. Secuencias de crRNA obtenidas con la herramienta Cas-Designer que tienen como blanco el gen *nblA*.

Secuencia 5' a 3'	Posición	Posición de corte	Orientación	%GC sin PAM	Puntaje fuera del marco	0 errores	1 error	2 errores
TTTGAGTTCGTCGCATGCAGGA	40	13.8	+	60	69.8	1	0	0
TTTGGTCCAAGCCTCTCGACTGT	102	27.4	+	60	67.3	1	0	0
TTAATCATCAACAGTCGAGAGGC	112	24.3	-	50	68.5	1	0	0
TTTAATCATCAACAGTCGAGAGG	113	24.5	-	45	68.7	1	0	0
TTGCCTGCCTGTGCTTAACCTAG	181	39.4	-	55	73.5	1	0	0
TTTGCCTGCCTGTGCTTAACCTA	182	39.6	-	55	76.2	1	0	0
TTAAGCACAGGCAGGCAAAAAA	186	45.7	+	45	75.6	1	0	0
TTAGCTTGCTGTCTTAGCCATTA	209	50.8	+	45	68.8	1	0	0
TTGCTGTCTTAGCCATTAGTTAC	214	51.9	+	40	66.3	1	0	0
TTGTAACATAATGGCTAAGACAGC	216	47.0	-	40	78.2	1	0	0

Finalmente, de entre estos candidatos para crRNA se seleccionó el que realizaba el corte más cercano al 50 en la posición de corte. En la Tabla 15 se muestra el par de oligos que se emplearán como crRNA para los próximos experimentos los cuales se sintetizaron por la empresa T4OLIGO ADN SINTETICO SA PI DE CV. Cabe destacar que se adicionaron 4 pb como extremos sobresalientes en la región 5' los cuales servirán para poder ligar el crRNA e los plásmidos que serán digeridos con la enzima de restricción AarI la cual deja estos extremos sobresalientes.

Tabla 15. Secuencia de oligos utilizados como crRNA. Las secuencias son complementarias entre sí para poder alinearlas y clonarlas en los plásmidos de edición.

Oligo	Secuencia
crRNA _{nblA} F	5'-AGATGCTTGCTGTCTTAGCCATTA-3'
crRNA _{nblA} R	5'-AGACTAATGGCTAAGACAGCAAGC-3'

5.15 Construcción de pSL2680 y pCpf1b con crRNA_{nblA}

Una vez seleccionado el crRNA, este fue sintetizado como oligos por la empresa T4OLIGO ADN SINTETICO SA PI DE CV. Para poder obtener el crRNA como doble cadena y poder ligarlo en los plásmidos se realizó el alineamiento como se describe en el punto 4.13.3.

Una vez realizadas las reacciones de digestión de los plásmidos pSL2680 y pCpf1b, llevó a cabo la reacción de ligación (ver Figura 52 y 53). El producto de ligación se transformó en la cepa de *E. coli* DH5 α y se realizó la selección de 3 colonias transformantes.

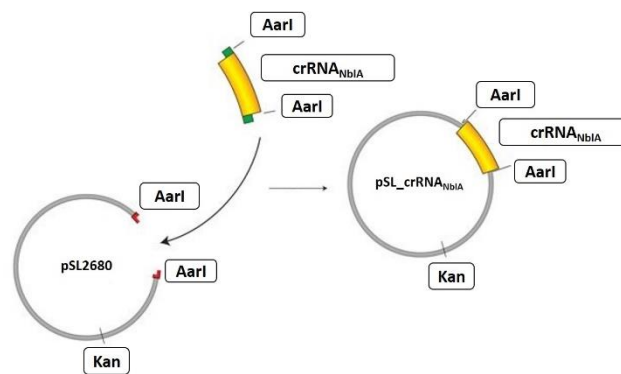


Figura 52. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pSL_crRNA_{nblA}.

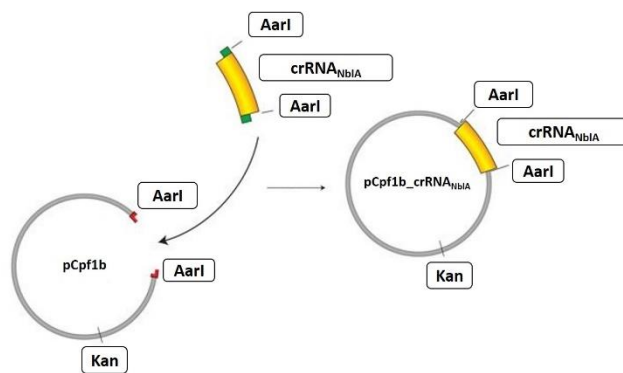


Figura 53. Esquema de la digestión y ligación para obtener la construcción de pCpf1b_crRNA_{nblA}.

En la comprobación realizada por PCR se utilizaron los iniciadores crRNA_{nblA}F delantero y crRNA_{nblA}R reverso como se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Iniciadores utilizados para la amplificación de la región de CRISPR de los plásmidos pSL2680 y pCpf1b.

Iniciador	Secuencia de nucleótidos
crRNA _{nblA} F	5'-TTGACAGCTAGCTCAGTCC-3'
crRNA _{nblA} R	5'-GGTACCAACTACCGCATTA-3'

Para la construcción pSL_crRNA_{nblA} se obtuvo una banda alrededor de las 330 pb del marcador GeneRuler 1kb DNA ladder como se muestra en la Figura 54. El carril 4 y 6 fueron positivos para la construcción de mientras que el carril 5 no se tomó en cuenta debido a que la amplificación resulto negativa para esa construcción.

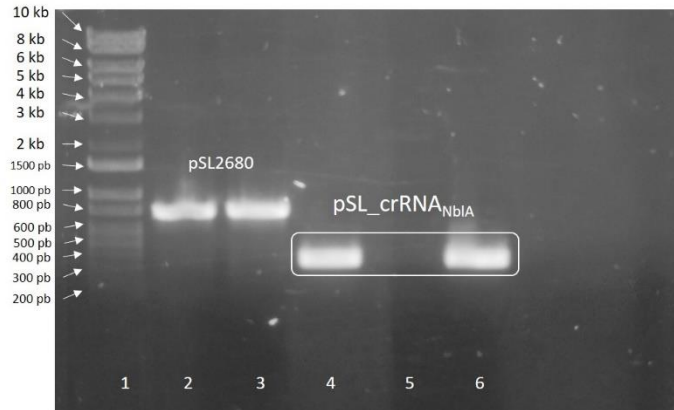


Figura 54. PCR de confirmación de la construcción de pSL_crRNA_{nblA}. En el carril 1 se muestra el marcador de peso GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carril 2 y 3: amplificación de la región CRISPR sin modificar del plásmido pSL2680; Carril 4-6: amplificación de la región CRISPR modificado con crRNA_{nblA} del plásmido pSL_crRNA_{nblA}. Peso esperado: 330 pb.

Para la construcción pCpf1b_crRNA_{nblA} se obtuvo una banda alrededor de las 330 pb del marcador GeneRuler 1kb DNA ladder como se muestra en la Figura 55. El carril 4 al 6 fueron positivos para la construcción.

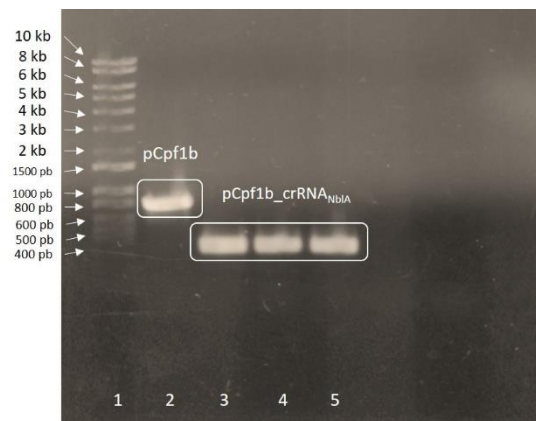


Figura 55. PCR de confirmación de la construcción de pCpf1b_crRNA_{nblA}. En el carril 1 se muestra el marcador de peso GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carril 2: amplificación de la región CRISPR sin modificar del plásmido pCpf1b; Carril 4-6: amplificación de la región CRISPR modificado con crRNA_{nblA} del plásmido pCpf1b_crRNA_{nblA}. Peso esperado: 330 pb.

5.16 Amplificación de fragmentos para la construcción del molde reparador

A partir de la secuencia de la enzima FAP (ver Tabla 17) se diseñaron iniciadores para amplificar la secuencia de la enzima FAP para la adición de una etiqueta de 6 histidinas esto con la finalidad de facilitar su purificación una vez que esta sea producida. La Tabla 18 muestra las secuencias de los iniciadores.

Tabla 17. Secuencia nucleotídica de la enzima FAP.

```
AGCGCGAGCGCGGTGGAGGACATTCGTAAGTGCTGAGCGACAGCAGCAGCC
CGGTGGCGGGTCAGAAGTACGACTATATTCTGGTGGGTGGCGGTACCGCGGCG
TGC GTTCTGGCGAACCGTCTGAGCGCGGATGGCAGCAAACGTGTGCTGGTTCT
GGAGGCGGGTCCGGACAACACCAGCCGTGATGTTAAGATCCCGGCGGCGATTA
CCCGTCTGTTCCGTAGCCCGCTGGACTGGAACCTGTTTAGCGAGCTGCAGGAA
CAACTGGCGGAACGTCAGATTTACATGGCGCGTGGTCGTCTGCTGGGCGGTAG
CAGCGCGACCAACGCGACCCTGTACCACCGTGGCGCGGCGGGTGA CTATGAT
GCGTGGGGCGTGGAGGGTTGGAGCAGCGAAGACGTGCTGAGCTGGTTCTGTTT
AGCGGAGACCAACGCGGATTTTGGTCCGGGTGCGTACCACGGTAGCGGCGG
TCCGATGCGTGTGAAAACCCGCGTTATACCAACAAGCAACTGCACACCGCGTT
CTTTAAAGCGGCGGAGGAAGTTGGCCTGACCCCGAACAGCGACTTCAACGATT
GGAGCCACGATCACGCGGGCTATGGTACCTTTCAGGTTATGCAAGACAAAGGTA
CCCGTGC GGATATGTACCGTCAGTATCTGAAGCCGGTGTGGGCCGTGCTAAC
CTGCAAGTTCTGACCGGTGCGGCGGTGACCAAGGTTAACATTGATCAAGCGGC
GGGTAAAGCGCAAGCGCTGGGTGTGGAGTTCAGCACCGATGGTCCGACCGGT
GAACGTCTGAGCGCGGAAC TGGCGCCGGGCGGTGAAGTGATTATGTGCGCGG
GTGCGGTTACACCCCGTTCCTGCTGAAACATAGCGGCGTTGGTCCGAGCGCG
GAGCTGAAGGAATTTGGTATTCCGGTGGTTAGCAACCTGGCGGGCGTGGGTCA
GAACCTGCAGGACCAACCGGCGTGCCTGACCGCGGCGCCGGTTAAGGAGAAAT
ACGACGGCATCGCGATTAGCGATCACATCTATAACGAAAAGGGTCAAATTCGTA
AACGTGCGATTGCGAGCTACCTGCTGGGCGGTGCTGGCGGTCTGACCAGCACC
GGTTGCGACCGTGGTGCGTTTGTGCGTACCGCGGGTCAGGCGCTGCCGGATCT
GCAAGTGCGTTTTGTTCCGGGTATGGCGCTGGACCCGGATGGTGTGAGCACCT
ATGTTTCGTTTCGCGAAGTTTCAGAGCCAAGGCCTGAAATGGCCGAGCGGTATTA
CCATGCAGCTGATTGCGTGCCGTCCGCAAAGCACCGGCAGCGTGGGTCTGAAA
AGCGCGGATCCGTTTGCTCCGCCGAAACTGAGCCCGGGCTACCTGACCGACAA
GGATGGTGC GGATCTGGCGACCCTGCGTAAAGGCATTCACTGGGCGCGTGACG
TTGCGCGTAGCAGCGCGCTGAGCGAGTACCTGGATGGTGAAC TTTTCCGGGC
AGCGGTGTGGTTAGCGACGATCAGATCGACGAATATATTCGTCTGATCCAC
AGCAGCAACGCGATCACCGGCACCTGCAAGATGGGCAACGCGGGTGACAGCA
GCAGCGTGGTTGATAACCAGCTGCGTGTGCACGGCGTTGAGGGTCTGCGTGTG
GTTGATGCGAGCGTGGTTCCGAAAATTCCGGGCGGTCAAACCGGTGCGCCGGT
GGTTATGATTGCGGAACGTGCGGCGGCGCTGCTGACCGGCAAGGCGACCATC
GGTGCAGCGCGGCGGCGCCGGCGACCGTTGCGGCGTAA
```

Tabla 18. Iniciadores utilizados para la amplificación de la enzima FAP y adicionar la etiqueta de 6 histidinas

Iniciador	Secuencia de nucleótidos
FAP6HF	5'-ATGGCTAGCGCGAGCGC-3'
FAP6HR	5'-TTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCGCCGCAACGGTCGCCG-3'

En la Figura 56 se muestra la amplificación del fragmento de la enzima FAP con la etiqueta de histidinas. Se obtuvo una banda alrededor de las 1806 pb como se esperaba.

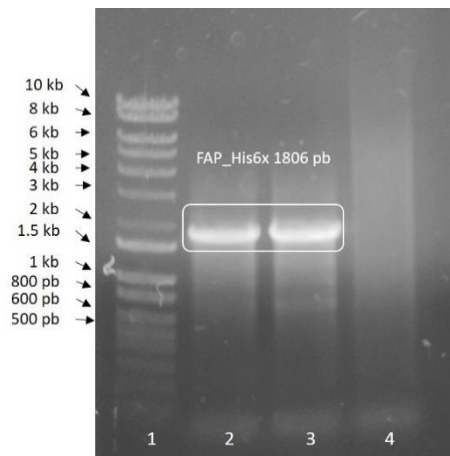


Figura 56. Amplificación de la enzima FAP para la adición de la etiqueta de 6 histidinas. Carril 1: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carril 2 y 3: FAP_{His6x}; Carril 4: control negativo. Peso esperado: 1806 pb.

Posteriormente se diseñaron iniciadores para la amplificación de los brazos homólogos y la secuencia de la enzima FAP con la etiqueta de histidinas para que tuvieran complementariedad entre ellos (como se mostró en la Figura 1). Esto se realizó con la finalidad de realizar el ensamble de estos fragmentos con el plásmido linealizado empleando el kit GenBuilderTM DNA Assembly. En la Tabla 19 se muestra el listado de los iniciadores empleados.

Tabla 19. Iniciadores utilizados para la amplificación de los fragmentos para el ensamble del molde reparador.

Iniciador	Secuencia de nucleótidos
pBH1F	5'-GTAGTTGGTACCGTCGACTTATGGTTGATTTCGCATTGTTTT-3'
BH1 _{FAP} R	5'-GCTAGCCATAGCTGTTGCCCTCCAAGGC-3'
FAP _{BH1} F	5'-CAACAGCTATGGCTAGCGCGAGCGC-3'
FAP _{BH2} R	5'-AGAGTTGTGTTAGTGGTGGTGGTGGTGGT-3'
BH2 _{FAP} F	5'-CACCACTAACACAACCTCTAGGTTTAGGCATC-3'
pBH2R	5'-GATCCTCTAGAGTCGACCAAATGTAAAGAATATTCTCAGA -3'
pCpf1BH1F	5'-AGAAATTCGATATCTAGATCTTTTATGGTTGATTTCGCATTGTTTT-3'
pCpf1BH2R	5'-GTTGTTGCCATTGCGGATCCCAAATGTAAAGAATATTCTCAGA-3'

En la Tabla 20 se muestra la secuencia de los brazos homólogos que flanquean el gen *nbIA*. Se seleccionaron 600 pb de cada brazo para el molde de reparación.

Tabla 20. Secuencia de los brazos homólogos para el molde reparador

Brazo homólogo 1
TTATGGTTGATTTCGCATTGTTTTGCTCCTGAAATTTTCGGCAAATACAAATACTTC GCTCTTCTAGCCCTATTAACCATTTTAACGACAAATTGATGGGGCAACGATTAAC AAATAATGAATAAATTTTATGTTTTTCAAGATGAAAATTTGAAAATTTGATTTCCCTT ATATTTCTACTATAGAAGACTAATACAATTAGATCTAAAATTTGCAAGTATAAAAAT CAGCAAATAGTTATATTGTTAATAATTCAATGACCCAATAACTCGTACTGTTATCT ACGTGGTGAAAGCCAAAAAGACGAACAGTTTAGCCTCCTCCTCCTCGGCGATCG CCAAGCGAAATGTCATGGGAGATGTTGAGATTGAGCATTTTTTTCTAAAAGCCCT TGCTAAAACAAACCACATGTGCAGGGTGTCCCGATGTTGACTAAATTCAGCGG ACTTAAAACCTATTTTTTCCCTGGGTTGCTAGGTTTGCCCCCGTTTTGGGCAAG CTTGATAAGCAGATACTGTTAATTGGGTCAACTTTTTGTTACATTTATTTACAATT GATTGTTTACAATTGAAAGGTAGTCGCCTTGGAGGGCAACAGCT
Brazo homólogo 2
CACAACCTAGGTTTAGGCATCAAGCAAGGCTCTAACGGAAACCTTCGACAAAA TTAAACGATCTGACCACCTTGCTTGACCGGCCAGAGAGCATCTTAATCATTGAC GATGACTGTCAACAATTATCGAAAATCAACAACCCCTACTCCTCACAGTTGATTG TATGTTGTTACCACTGTCATTTCGTTTTTATTGCTTTTCTCCTCTCTTTTCTTTCTAG CGGGCAGCCTGCATCTGGCGATGGCGCTGGGCTACCTGCCAACATTCCGTCAC CAAATTGTGCCAGGGGACCAGGACACTAAACTCAACCCCCACCTGTTCCCCGGT GGCTTGGAACATTAATTTAGTACACTTTACTTCATCCCGTGCCTGTGCTACCCGG TCCAGTAACTCTTGTTGTTGCTCTGGGGTGA AAAAGACTAAACGCTGGCTTTCTA GTAGCTGGCAGGAGCGGCTAAACCAAGTGTCTAAAATCTCCCAACAGGGGCTCT AAGATAGTTTTGAGCAGTTCTTTTTCGTCTGGTTGGGGATTGATCATGGTAGTGA AACTAGTCTTAGTCAAATGTTAAATAAAGTTTTCTGAGAATATTCTTTACATTTG

Como se puede observar en la Figura 57, fue posible amplificar los fragmentos de los brazos homólogos a partir del ADN genómico de *Synechocystis* sp. PCC 6803 obteniendo las bandas esperadas alrededor de los 600 pb.

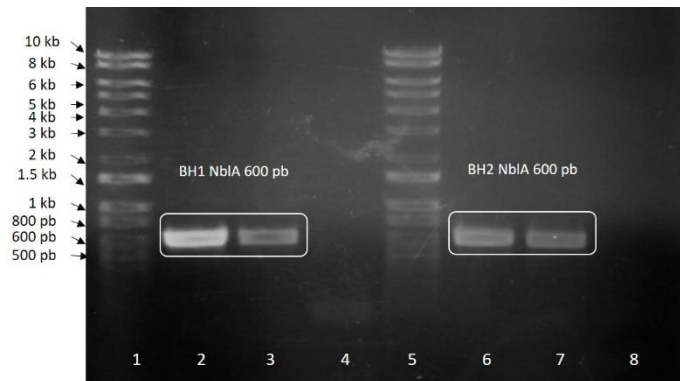


Figura 57. Amplificación de los brazos homólogos para el molde reparador. Carril 1 y 5: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder. Carril 2 y 3: Brazo homólogo 1; Carril 4 y 8: control negativo; Carril 6 y 7: Brazo homólogo 2.

Finalmente, a partir de la secuencia obtenida de la enzima FAP a la que se le añadió la etiqueta de histidinas, se le realizó una segunda amplificación para obtener el fragmento que será utilizado en el ensamble del molde reparador en los plásmidos de edición. En la Figura 58 se puede observar la banda obtenida alrededor de las 1826 pb como se esperaba.

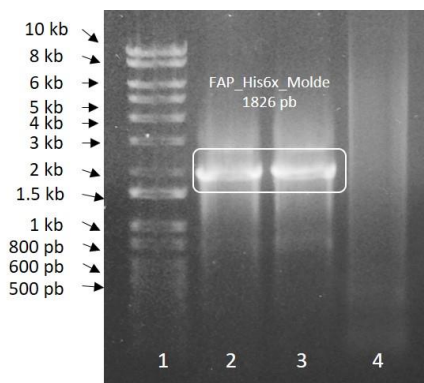


Figura 58. Amplificación de la enzima FAP_{Hisx6} para el molde reparador. Carril 1: marcador de peso molecular GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carril 2 y 3: FAP_{Hisx6}; Carril 4: control negativo.

5.17 Obtención de la construcción pCpf1b_crRNA_{nblA} y

secuenciación

El plásmido pCpf1b_crRNA_{nblA} previamente digerido fue ensamblado con los fragmentos BH1, FAP y BH2 utilizando el GenBuilder™ DNA Assembly de Genscript. Se seleccionaron 3 colonias y se extrajo el ADN plasmídico para comprobar mediante PCR que el ensamble se había realizado.

En la comprobación realizada por PCR se utilizaron los iniciadores crRNA_{nblA}F y BH1_{FAP}R que flanqueaban desde la región CRISPR hasta el brazo homólogo 1, y FAP_{BH1}F y FAP_{BH2}R que flanqueaban la secuencia de la enzima FAP. El resultado esperado era una banda alrededor de los 950 pb y otra en los 1800 pb del marcador GeneRuler 1kb DNA ladder como se muestra en la Figura 59. Se analizaron los plásmidos de 3 colonias diferentes, siendo el plásmido 2 del carril 4 y 5 positivo.

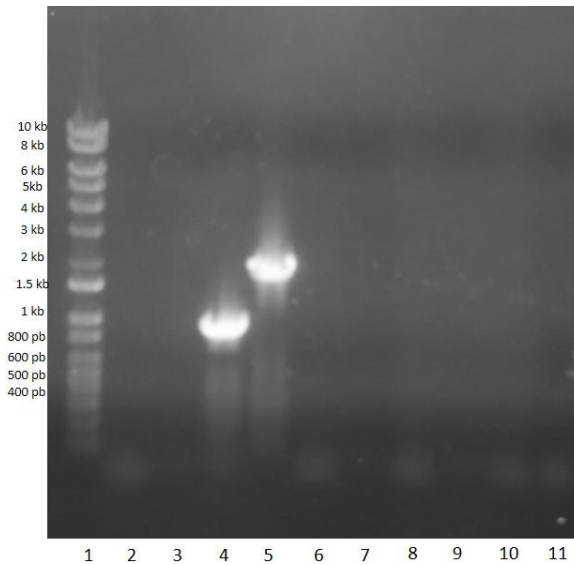


Figura 59. PCR de confirmación de la construcción de pCpf1b_crRM En el carril 1 se muestra el marcador de peso GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carriles 2-7: plásmidos de 3 colonias diferentes, Carriles 8 y 9: pCpf1b sin modificar, Carriles 10 y 11: controles negativos. Carril 2, 4 y 6: amplificación con crRNA_{nblAF} y BH1_{FAPR}, peso esperado: 950; Carril 3, 5 y 7: amplificación con los iniciadores, peso esperado: 1800 pb.

Una vez obtenido el plásmido se realizó una segunda PCR flanqueando diferentes fragmentos del molde reparador ensamblado en el plásmido. En la Figura 60 se puede observar las bandas obtenidas utilizando los diferentes iniciadores empleados para la obtención de los fragmentos para el ensamble del molde reparador (ver Tabla 19).

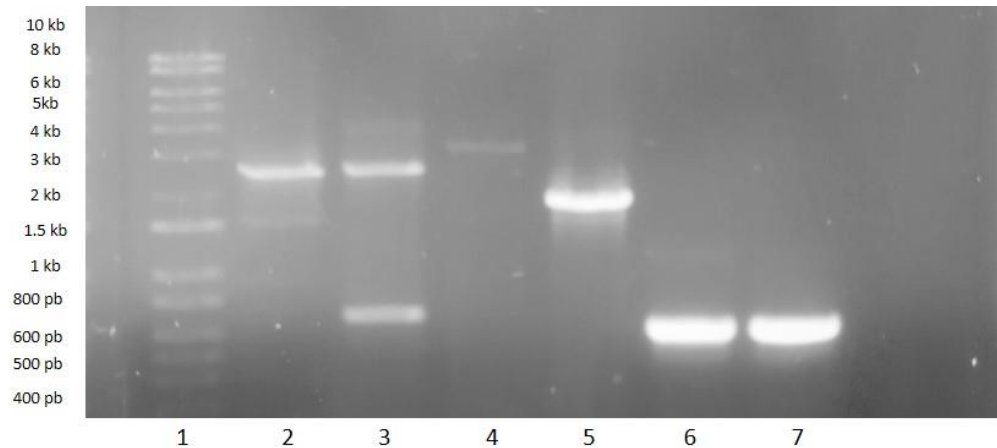


Figura 60. PCR de confirmación del molde de pCpf1b_crRM. En el carril 1 se muestra el marcador de peso GeneRuler 1kb DNA Ladder; Carriles 2: amplificación de BH1 + FAP, peso esperado: 2400 pb, Carril 3: amplificación de FAP + BH2, peso esperado: 2400 pb, Carril 4: BH1 + FAP + BH2, peso esperado: 3000 pb, Carril 5: FAP, peso esperado: 1800 pb, Carril 6: BH1, peso esperado: 600 pb, Carril 7: BH 2, peso esperado: 600 pb.

A partir de la amplificación obtenida de la Figura 55 y del carril 4 de la Figura 60, se realizó la secuenciación del molde reparador. En la Figura 61 se observa la secuenciación obtenida del fragmento que contenía el crRNA_{nblA} la cual fue analizada con el software FlinchTV y en la Figura 62 se observa el alineamiento de la secuenciación con la secuencia de crRNA_{nblA}.

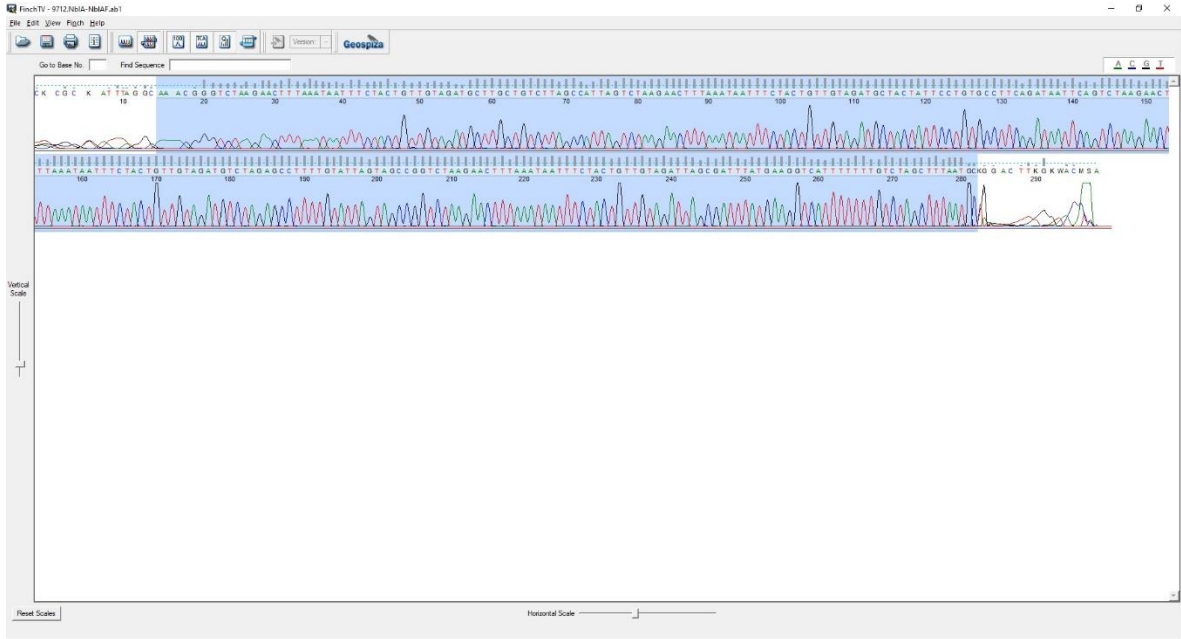


Figura 61. Secuenciación obtenida de crRNA_{nblA} de la amplificación con los iniciadores crRNA_{nblA}F y crRNA_{nblA}R.

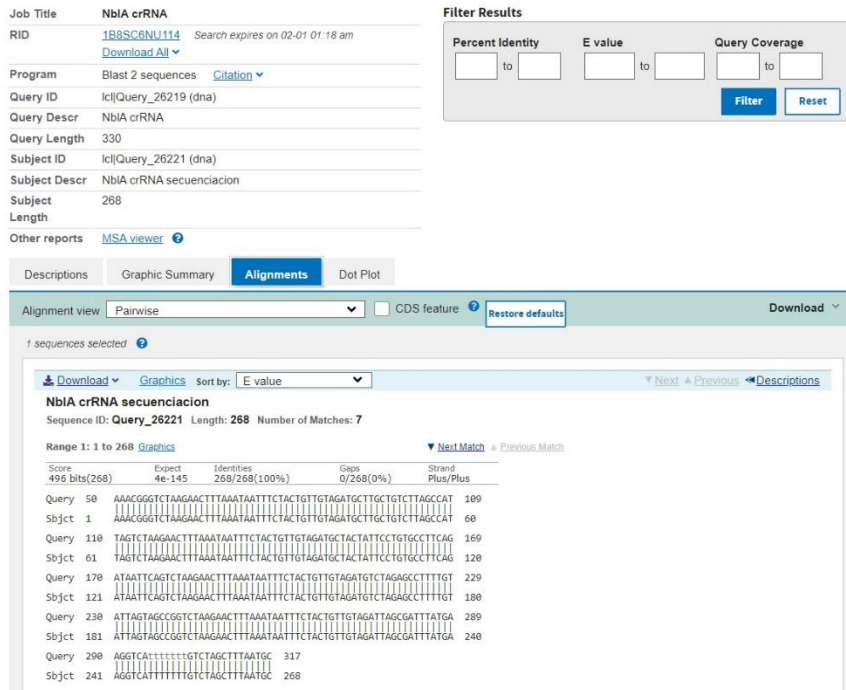


Figura 62. Alineamiento de la secuenciación obtenida con la secuencia del crRNA_{nblA}.

En la Figura 63 se observa la secuenciación obtenida del fragmento del molde reparador que contenía el BH1 la cual fue analizada con el software FlinchTV y en la Figura 64 se observa el alineamiento de la secuenciación con la secuencia de BH1.

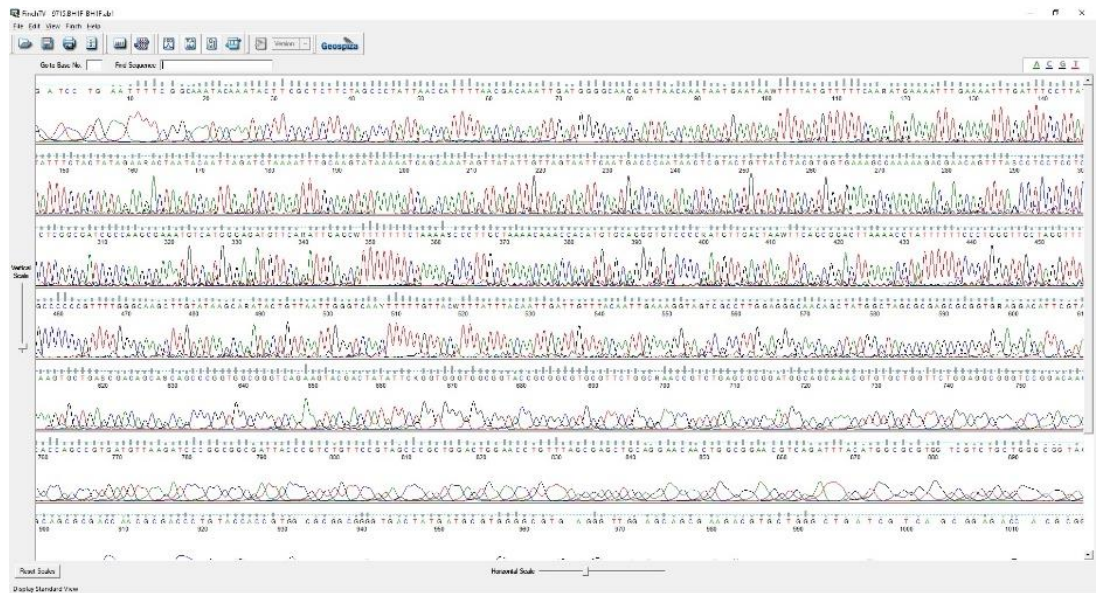


Figura 63. Secuenciación obtenida de BH1 de la amplificación con los iniciadores pCpf1BH1F y pCpf1BH2R.

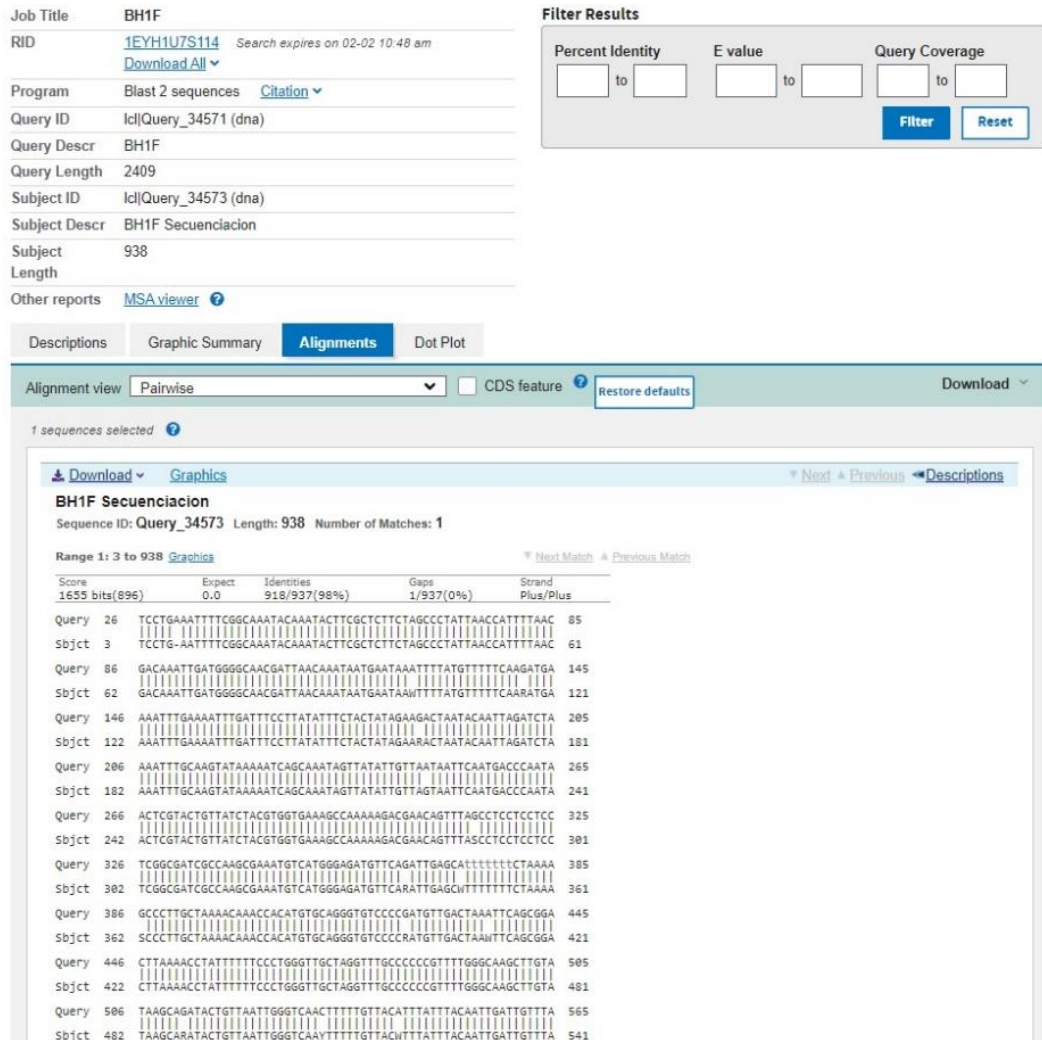


Figura 64. Alineamiento de la secuenciación obtenida con la secuencia del BH1.

En la Figura 65 y 66 se observa la secuenciación obtenida del fragmento del molde reparador que contenía la enzima FAP la cual fue analizada con el software FlinchTV y en la figura 67 y 68 se observa el alineamiento de la secuenciación con la secuencia de FAP. Para la secuenciación de FAP, se realizó en 2 partes ya que el secuenciador analiza hasta un aproximado de 800 pares de bases.

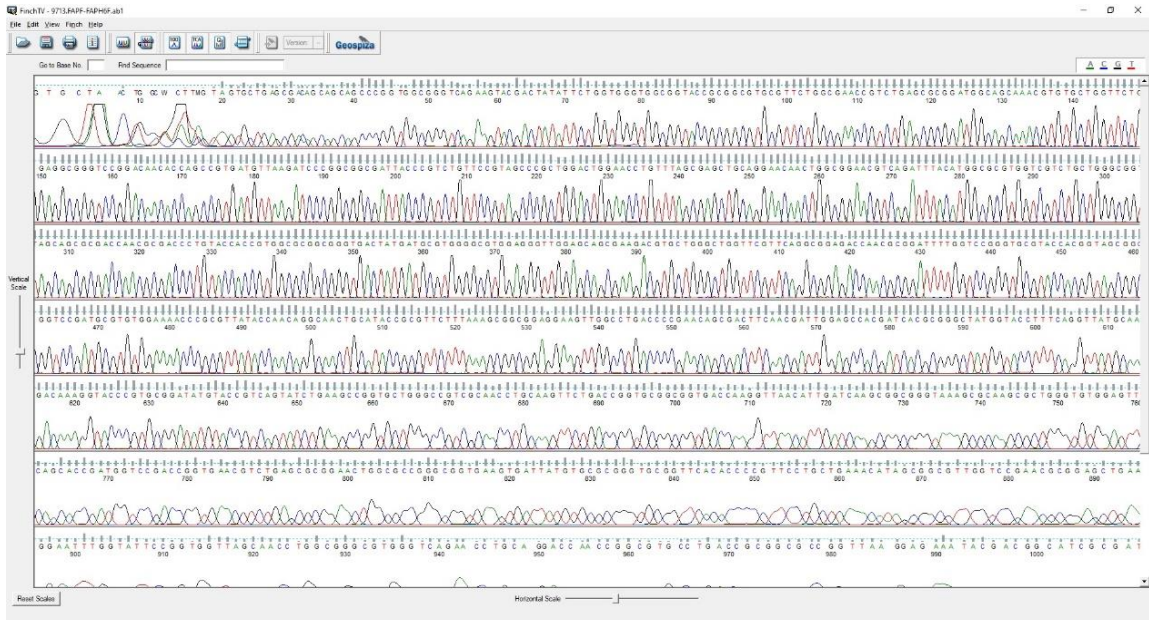


Figura 65. Secuenciación obtenida de la primera parte de FAP de la amplificación con los iniciadores pCpf1BH1F y pCpf1BH2R.

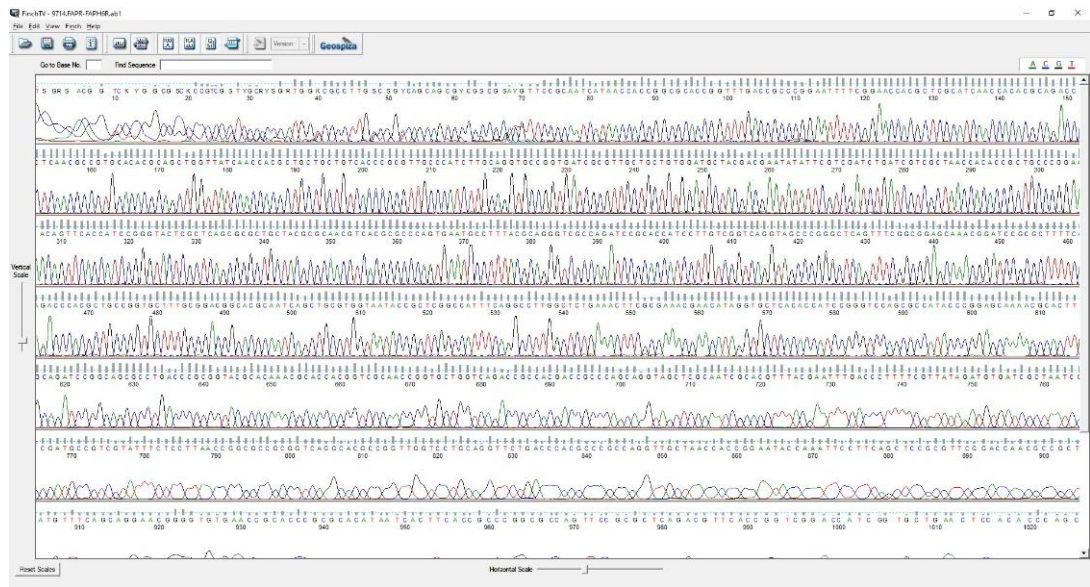


Figura 66. Secuenciación obtenida de la segunda parte de FAP de la amplificación con los iniciadores pCpf1BH1F y pCpf1BH2R.

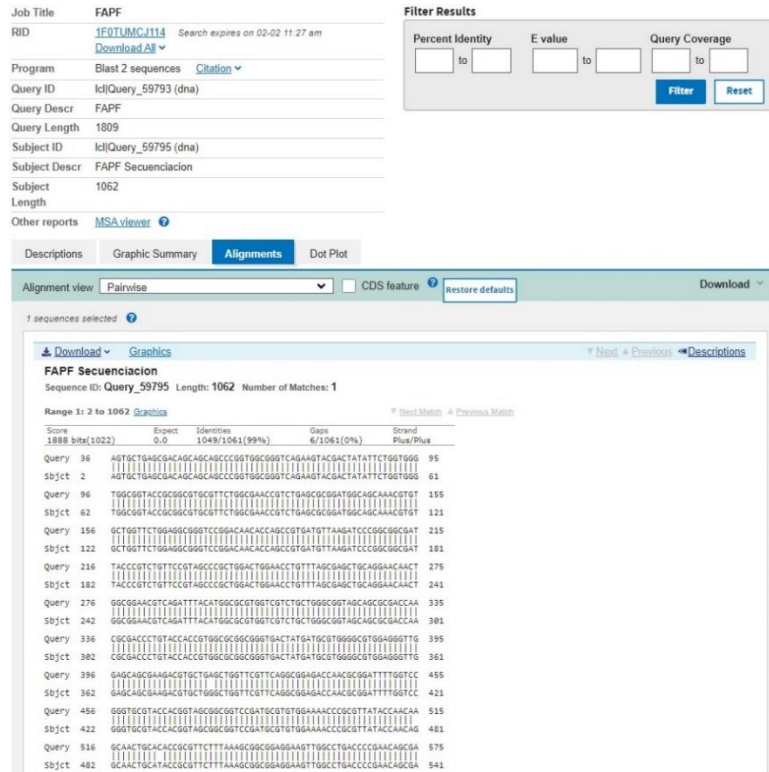


Figura 67. Alineamiento de la secuenciación de la primera parte de FAP obtenida.

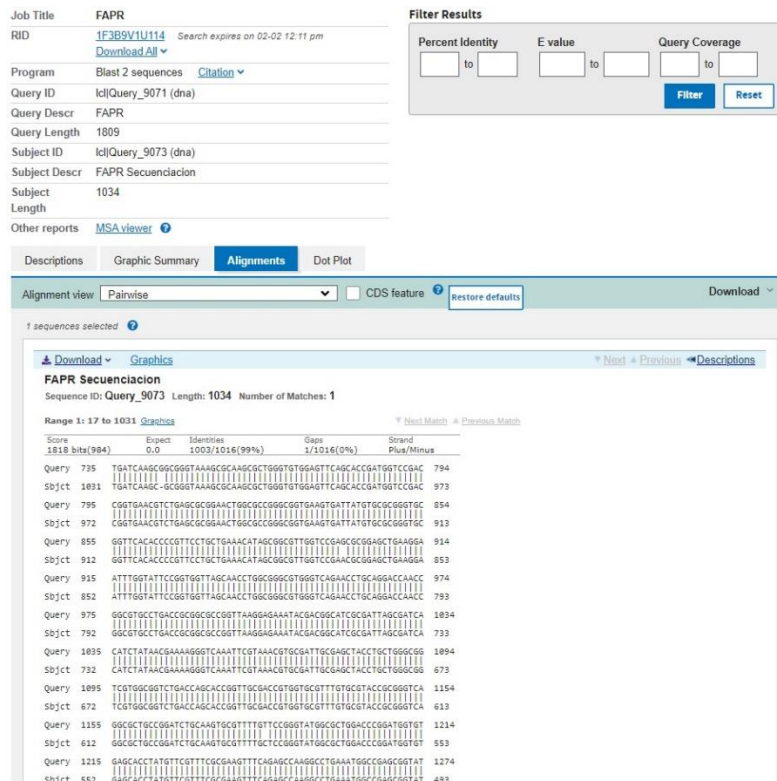


Figura 68. Alineamiento de la secuenciación de la segunda parte de FAP obtenida

Finalmente, en la Figura 69 se observa la secuenciación obtenida del fragmento del molde reparador que contenía el BH2 la cual fue analizada con el software FinchTV y en la Figura 70 se observa el alineamiento de la secuenciación con la secuencia de BH2.

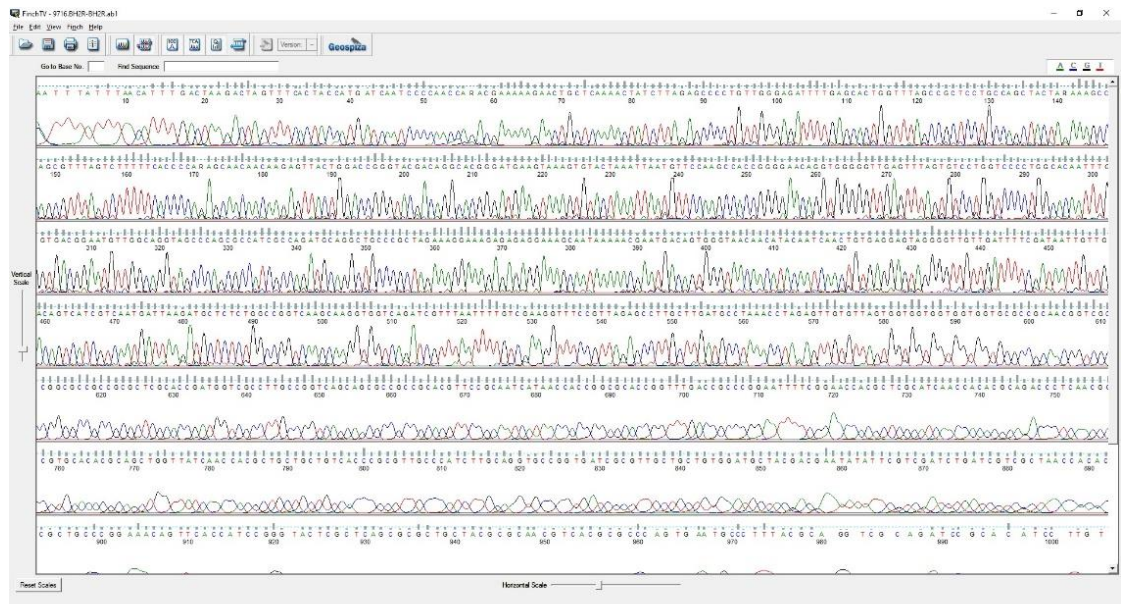


Figura 69. Secuenciación obtenida de BH1 de la amplificación con los iniciadores pCpf1BH1F y pCpf1BH2R.

Job Title **BH2**

RID [1F3RHXD114](#) Search expires on 02-02 12:17 pm
[Download All](#)

Program Blast 2 sequences [Citation](#)

Query ID IclQuery_50353 (dna)

Query Descr BH2

Query Length 2409

Subject ID IclQuery_50355 (dna)

Subject Descr BH2 Secuenciacion

Subject Length 1000

Other reports [MSA viewer](#)

Filter Results

Percent Identity to E value to Query Coverage to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions [Graphic Summary](#) **Alignments** [Dot Plot](#)

Alignment view [Pairwise](#) CDS feature [Restore defaults](#) [Download](#)

1 sequences selected

[Download](#) [Graphics](#) [Next](#) [Previous](#) [Descriptions](#)

BH2 Secuenciacion

Sequence ID: **Query_50355** Length: **1000** Number of Matches: **1**

Range 1: 3 to 1000 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1807 bits(978)	0.0	993/1001(99%)	4/1001(0%)	Plus/Minus
Query 1383	GGATGGTGC	GGATGGTGC	GGATGGTGC	1441
Sbjct 1808	GGAT-GTGC	GGATGGTGC	GGATGGTGC	944
Query 1442	GTACAGCG	GTACAGCG	GTACAGCG	1501
Sbjct 943	GTACAGCG	GTACAGCG	GTACAGCG	884
Query 1502	GCGCGATC	GCGCGATC	GCGCGATC	1561
Sbjct 883	GCGCGATC	GCGCGATC	GCGCGATC	824
Query 1562	GCACCTGC	GCACCTGC	GCACCTGC	1621
Sbjct 823	GCACCTGC	GCACCTGC	GCACCTGC	764
Query 1622	TGCACGGC	TGCACGGC	TGCACGGC	1681
Sbjct 763	TGCACGGC	TGCACGGC	TGCACGGC	704
Query 1682	GTCAAACG	GTCAAACG	GTCAAACG	1741
Sbjct 703	GTCAAACG	GTCAAACG	GTCAAACG	644
Query 1742	AGGCACCA	AGGCACCA	AGGCACCA	1801
Sbjct 643	AGGCACCA	AGGCACCA	AGGCACCA	584
Query 1802	accactaac	accactaac	accactaac	1861
Sbjct 583	accactaac	accactaac	accactaac	524
Query 1862	AATTAACG	AATTAACG	AATTAACG	1921
Sbjct 523	AATTAACG	AATTAACG	AATTAACG	464

Figura 70. Alineamiento de la secuenciación obtenida con la secuencia del BH1

CAPÍTULO 6

6 DISCUSIONES

En estudios previos se ha demostrado el uso de SmbP, una proteína aislada del periplasma de la bacteria gram (-) *Nitrosomonas europaea*, como una proteína de fusión para la expresión de proteínas recombinantes citoplásmicas y periplásmicas³³. No obstante, los niveles de expresión periplásmica fueron bajos por lo que se vio la necesidad de mejorar su potencial para exportar proteínas al periplasma. En nuestro grupo de trabajo se exploró el intercambio del péptido señal nativo de SmbP por el de las proteínas CusF y PelB para mejorar los niveles de expresión periplásmica lo cual fue monitoreado con la proteína RFP. SmbP con el péptido señal de PelB logró exportar mayores cantidades de RFP que SmbP nativa. Sin embargo, estos resultados solo evaluaron la capacidad de exportar proteínas al periplasma de *E. coli* utilizando la vía Sec. *E. coli* posee dos vías principales para el transporte de proteínas desde el citoplasma al periplasma: la ruta Sec y la ruta Tat⁴⁹. La ruta Tat exporta proteínas plegadas al espacio periplásmico utilizando el complejo TatABC comprendiendo de las siguientes proteínas de membrana: TatA, TatB y TatC. Este complejo funciona como receptor y canal para transportar proteínas sustratos de Tat. Con la finalidad de explorar la ruta Tat para exportar proteínas recombinantes al periplasma

utilizando la proteína de fusión SmbP, en este trabajo se realizó una construcción conteniendo el péptido señal de TorA el cual es uno de los que más se ha estudiado y utilizado⁵⁰.

Después de la expresión y purificación de RFP con esta nueva construcción, nuestros resultados demostraron que SmbP con el péptido señal de TorA fue capaz de producir mayores cantidades de RFP que la versión nativa de SmbP obteniendo 4.13 mg y 0.0067 mg respectivamente por litro de cultivo expresado. Así mismo, se evaluó la fluorescencia de RFP por microscopia de fluorescencia pudiendo distinguir las diferencias en la distribución de RFP de las construcciones periplásmicas y citoplásmicas. Cuando la proteína RFP se encuentra localizada en el espacio periplásmico, se puede observar una tendencia de acumulación en los polos de la célula. Esta distribución característica ha sido ampliamente demostrada en estudios secretando GFP utilizando la vía Tat y con versiones mejoradas de GFP que pueden ser plegadas en el espacio periplásmico después de haber sido secretada a través de la ruta Sec^{50,51}. En estos estudios se observó que cuando GFP era expresada en el periplasma de *E. coli* y era resuspendida en solución amortiguadora PBS se producía un efecto de polarización de las proteínas distribuyéndolas hacia los polos.

Se ha reportado que SmbP wild type no produce GFP activa en el periplasma de *E. coli* mientras que en la expresión citoplásmica produjo grandes cantidades de GFP fluorescente³³. Por lo tanto, se decidió explorar la ruta Tat para evaluar la capacidad de exportar la proteína GFP de manera activa al

periplasma de *E. coli*. Después de obtener nuestra nueva construcción de TorAps-SmbP-GFP se pudo observar que de manera efectiva TorAps-SmbP fue capaz de transportar GFP de manera activa en el periplasma de *E. coli* lo cual fue corroborado mediante un espectro de fluorescencia de la fracción hipotónica obtenida mediante el método de lisozima/choque osmótico. Estos resultados demuestran que SmbP no afecta la capacidad del complejo Tat de exportar GFP de manera eficiente y activa obteniendo una absorbancia máxima de emisión a 510 nm.

La lunasina es un péptido de 43 aminoácidos de la semilla de la soya que ha llamado la atención debido a su acción como agente quimiopreventivo y anticancerígeno⁵². Así mismo, se ha evaluado su potencial antioxidante⁵³, antiinflamatorio⁵⁴, inmunomodulador⁵⁵ así como su actividad en la regulación del colesterol⁵⁶. Se ha empleado una gran variedad de métodos para la obtención de la lunasina a partir de fuentes nativas como la soya y otro tipo de productos como la cebada, el trigo y la avena. Sin embargo, estas metodologías emplean diferentes técnicas cromatográficas y considerables cantidades de fuente de lunasina lo cual hace más costoso el proceso de obtención. Por ejemplo, se ha purificado el péptido lunasina a partir de la harina de soya desgrasada empleando una cromatografía de intercambio aniónico como primer paso, una ultrafiltración y una cromatografía en fase reversa obteniendo hasta 9.2 g de lunasina con una pureza mayor al 99% empleando 20.8 kg de la harina de soya. Este tipo de metodologías cromatográficas suelen ser más costosas que el empleo de cromatografía IMAC. Así mismo, el producto obtenido a partir de las fuentes

naturales como la harina de soya puede contener una asparagina extra en la cola poliaspártica lo cual podría afectar en su actividad biológica⁵⁷.

Comparado con la obtención de lunasina de fuentes naturales como la harina de soya, la producción recombinante empleando sistemas de expresión procariota como *E. coli* son una alternativa más rentable debido a que este microorganismo es fácil de cultivar, sus sustratos son de bajos costos y existe una gran variedad de cepas modificadas genéticamente para la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, existen una serie de inconvenientes al sobreproducir una proteína recombinante en *E. coli* tales como la degradación por proteasas del hospedero, obtención de proteínas insolubles formando cuerpos de inclusión así como problemáticas al momento de purificar la proteína⁵⁸. Una de las estrategias para superar estas problemáticas es el empleo de proteínas de fusión.

Como se mencionó anteriormente, SmbP ha sido empleada como proteína de fusión para la expresión de diferentes proteínas recombinantes, sin embargo, su capacidad para producir péptidos no ha sido evaluada. Después de la expresión y purificación de SmbP_c-Lun se pudo observar que empleando un solo paso de purificación es posible obtener niveles de pureza altos de la proteína (ver Figura 33). No obstante, posterior a la remoción de la proteína de fusión SmbP del péptido lunasina se observó que empleando un segundo paso de purificación no fue posible separarlos (ver Figura 43). Se obtuvieron 10.74 mg de SmbP_c-Lun de 2 litros de cultivo expresado de los cuales 3.54 mg corresponden a lunasina libre.

CusF es una proteína que fue aislada del periplasma de *E. coli* y fue modificada adicionándole 3 histidina extras para aumentar su afinidad al metal Ni(II) la cual fue nombrada como CusF3H⁺³⁵. De igual forma, esta proteína no ha sido empleada para la producción de péptidos por lo que se evaluó la capacidad de obtener el péptido lunasina. Después de la expresión y purificación de CusF3H_c-Lun se observó que se pudo obtener altos niveles de pureza empleando un solo paso de purificación (ver Figura 35). Después de la remoción de la proteína de fusión se empleó una segunda purificación lo cual aumento más los niveles de pureza de la proteína logrando separar de manera satisfactoria el péptido lunasina de la proteína de fusión CusF3H⁺ (ver Figura 44). Se obtuvieron 8.64 mg de CusF3H_c-Lun de 2 litros de cultivo expresado de los cuales 2.85 mg corresponden a lunasina ya que esta es una tercera parte de la quimera.

El péptido lunasina ha sido expresado de manera recombinante en *E. coli* y fue purificado por cromatografía IMAC con iones Ni(II) ya que fue producido con una etiqueta de histidinas. En este estudio se obtuvieron 4.73 mg de lunasina pura en caldo LB a 37 °C por 4 h y utilizando 1 mM de IPTG como inductor. Sin embargo, no se menciona en cuanto medio de cultivo fue expresado y no se reporta algún porcentaje de pureza obtenida solo pudiendo apreciar por SDS-PAGE múltiples bandas contaminantes después de la purificación⁵⁹. Comparado con nuestro sistema de expresión de proteínas de fusión en las que se produjo 3.54 mg y 2.85 mg de lunasina con SmbP y CusF3H⁺ respectivamente se puede inferir que la producción que obtuvimos es comparable con la metodología empleada con estos autores. Así mismo, la pureza teórica obtenida utilizando la

proteína de fusión CusF3H+ después de la segunda purificación por IMAC calculada con el software ImageJ fue de aproximadamente 90%.

En otro trabajo el péptido lunasina fue expresado de forma recombinante utilizando la hirudina como proteína de fusión y purificada empleando una cromatografía de interacciones hidrofóbicas ya que posee un dominio N-terminal con naturaleza hidrofóbica. No obstante, adicionalmente se realizaron otras dos purificaciones empleando una cromatografía de intercambio catiónico y HPLC en fase reversa para la obtención de lunasina pura. Los resultados obtenidos fueron 86 mg/L de medio y la pureza obtenida por encima del 95% evaluada por HPLC. Las condiciones utilizadas para la producción de lunasina fueron en un cultivo fed-batch empleando un biorreactor con condiciones controladas³⁷. Comparando nuestro sistema con el empleado por este autor se puede destacar que obtuvieron mayores cantidades debido al empleo de un biorreactor en el cual pueden ser monitoreados parámetros que no pueden ser monitoreados cuando se realizan producciones a nivel laboratorio. Sin embargo, el empleo de múltiples pasos de purificación puede hacer más costoso el proceso, comparado con nuestro sistema de proteínas de fusión que fue posible obtener hasta un 90% de pureza empleando una primera purificación IMAC y posteriormente una segunda purificación IMAC para remover la proteína de fusión del péptido lunasina una vez digerido con la enteroquinasa.

La enteroquinasa de cadena ligera es una proteasa ampliamente empleada para la remoción de proteínas de fusión²⁰. No obstante, existen otras opciones menos costosas para emplear en la remoción de proteínas de fusión.

En este caso se probaron dos alternativas para la remoción de la proteína de fusión.

Primero se evaluó la separación mediante una digestión química empleando hidroxilamina, el cual es un reactivo que realiza la digestión en el extremo C-terminal del residuo de asparagina en la cadena peptídica asparagina-glicina (NG). Aprovechando esta cualidad de realizar la digestión con un patrón de dos aminoácidos, se decidió realizar una construcción en tándem de la lunasina adicionando los sitios NG entre la proteína de fusión el péptido 1 y el péptido 2 como se muestra en la Tabla 4. La finalidad de hacerlo en tándem es incrementar la cantidad de péptido obtenido ya que se ha demostrado que realizando repeticiones del péptido incrementa los rendimientos de la proteína obtenida pero conforme se va incrementando las repeticiones estos rendimientos van disminuyendo⁶⁰. Después de expresar y purificar el tándem (CusF3H+-Lunx2) se realizaron las pruebas de digestión con hidroxilamina. Como se observa en la figura 45, la banda de la quimera va desapareciendo conforme pasa el tiempo de digestión, pero no es posible detectar la banda correspondiente a lunasina. Esto puede ser debido a que altas concentraciones de sales (por ejemplo 1.8 M de hidroxilamina) en la mezcla de reacción pueden afectar el análisis por SDS-PAGE⁴². Esto nos puede decir que, aunque no se aprecie la banda de lunasina no significa que esta no esté presente en la solución por lo que sería necesario realizar una diálisis a la muestra antes de ser analizada por SDS-PAGE.

No hay reportes de producción de lunasina en *E. coli* empleando la estrategia de repeticiones en tándem. No obstante, existe un trabajo en el que fue posible producir lunasina en repeticiones tándem utilizando la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. En este estudio se emplearon hasta 4 repeticiones de lunasina separadas por el sitio de reconocimiento de la enteroquinasa de cadena ligera y conteniendo una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal para facilitar su purificación. Este estudio reveló que las 4 repeticiones de lunasina formaban un dímero al analizar por SDS-PAGE obteniendo una banda aproximadamente en los 46 kDa. Se obtuvieron hasta 0.24 mg/mL de cultivo libre de células. Esto nos da un primer acercamiento a la producción de lunasina con repeticiones tándem en *E. coli* y con nuestras proteínas de fusión ya que tampoco ha sido evaluada esta cualidad con estas.

El virus Etch del tabaco (TEV) codifica un dominio catalítico (proteasa TEV) de 27 kDa con actividad proteolítica de serina similar a la pepsina. Los residuos de la triada catalítica del sitio activo son His46, Asp86 y Cys151 que reconocen la secuencia de aminoácidos ENLYFQG/S en una proteína y corta entre Q y G/S. Se han implementado protocolos para su producción en laboratorio para obtenerla a bajos costos⁶¹. Debido a esto, se decidió realizar construcciones que, en lugar del sitio de reconocimiento de enteroquinasa, contuviera el sitio de reconocimiento de la proteasa TEV entre la proteína de fusión (SmbP o CusF3H+) y la proteína de interés (Lunasina).

Después de la expresión y purificación de SmbP_{TEV}-Lun y CusF3H₊TEV-Lun, se pudo observar que empleando un solo paso de purificación es posible

obtener niveles de pureza altos de la proteína (ver Figura 38 y 39). Se pudo observar que empleando un sitio diferente de corte en la quimera no afecta en la capacidad de las proteínas de fusión de unirse a la columna IMAC funcionalizada con níquel. Se obtuvieron 7.8 y 8.75 mg por litro de cultivo expresado de SmbP_{TEV}-Lun y CusF3H_{TEV}-Lun respectivamente. Comparado con lo producido con las construcciones SmbP_c-Lun y CusF3H_c-Lun con el sitio de corte de enteroquinasa, pudimos obtener mayor cantidad de proteína empleando las construcciones con el sitio de la proteasa TEV. Después de la remoción de la proteína de fusión se empleó una segunda purificación, sin embargo, la banda obtenida fue muy poco apreciable en el gel. Esto se puede deber a que la proteína se encontraba en muy poca cantidad después de la purificación ya que no se logró el 100% de la digestión de la quimera empleando TEV (ver figura 46). De los 7.8 mg de SmbP_{TEV}-Lun de 1 litro de cultivo expresado, 2.57 mg corresponden a lunasina ya que esta es una tercera parte de la quimera. Mientras que de los 8.75 mg de CusF3H_{TEV}-Lun, 2.89 mg corresponden a lunasina.

Para probar la actividad del péptido lunasina se midió su capacidad de captación de radicales ABTS empleando el método desarrollado por Re *et al.* (1998)⁴³. Este método se determina por la descolorización del ABTS^{•+} mediante la reducción del radical catiónico como el porcentaje de inhibición de la absorbancia a 734 nm. Como se mostró en la Figura 51 pudimos observar que la lunasina alcanzo un 30% de máxima capacidad de captación de radicales ABTS mientras que para la lunasina en tándem fue del 16%. La capacidad antioxidante y antiinflamatoria de la lunasina ha sido demostrada en estudios previos⁶², por lo

que esperábamos resultados positivos al evaluarla por este método. Existen reportes que describen que la lunasina puede poseer propiedades redox esto debido a la capacidad de poder formar un enlace disulfuro entre la Cys10 y Cys22. Aunque esta propiedad puede explicar la capacidad de captación de radicales ABTS de la lunasina, esta no está completamente confirmada³⁶. Así mismo, se midió capacidad de captación de radicales ABTS de CusF3H_c-Lun y CusF3H₊-Lunx2 para evaluar si la proteína de fusión CusF3H₊ afectaba de manera positiva o negativa en la actividad antioxidante. Para CusF3H_c-Lun alcanzo un 9% de máxima capacidad de captación de radicales ABTS mientras que para CusF3H₊-Lunx2 fue del 6%. Del mismo modo, se evaluó si CusF3H₊ tenía algún efecto en la capacidad de captación de radicales ABTS alcanzando solamente un 6%. Esto puede evidenciar que la proteína de fusión no estorba al péptido para ejercer su actividad, no obstante, no es comparable con la actividad del péptido libre. Recientemente, se ha evaluado la capacidad de las proteínas SmbP y CusF3H₊ para producir péptidos con actividad antimicrobiana. Se evaluó la actividad antimicrobiana de los péptidos libre y de los péptidos unidos a las proteínas SmbP y CusF3H₊ demostrando que incluso sin remover las proteínas de fusión, estos tuvieron actividad antimicrobiana concordando con los resultados que nosotros obtuvimos^{63,64}.

Synechocystis sp. PCC 6803 es una cianobacteria con capacidad fotosintética, que ha sido estudiada como organismo modelo para estudiar para el estudio de la fotosíntesis oxigénica y que además ya se encuentra secuenciado su genoma completo⁶⁵. Debido a su capacidad de usar CO₂ como fuente de

carbono, luz como energía y agua, se ha vuelto un microorganismo interesante para la producción de diferentes compuestos. Los biocombustibles han emergido como una alternativa a la alta demanda del petróleo que ha existido durante los años. Como se sabe, este es una fuente no renovable que se estima que en un futuro se agote debido al alto consumo. Así mismo, los biocombustibles aparecen a atender otro tipo de problemáticas como las emisiones de gas invernadero como el CO₂⁶⁶. Es por eso que aprovechando todas estas características antes mencionadas se decidió utilizar *Synechocystis* como una biofábrica para la producción de la enzima FAP la cual recientemente se ha comprobado su habilidad de descarboxilar ácidos grasos a hidrocarburos utilizando luz¹⁴.

Para generar un plásmido para la introducción de la enzima FAP en el genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803, se empleó el plásmido pSL2680¹⁷. Este posee la endonucleasa guiada por RNA sencillo, Cpf1, la cual carece de tracrRNA, utiliza un PAM rico en timinas (5'-TTN-3') y realiza un corte de doble cadena de ADN escalonado⁶⁷. Estas cualidades las hacen diferentes y únicas de su predecesora Cas9 la cual requiere la maduración de un crRNA, un tracrRNA, utiliza un PAM rico en guaninas (5'-NGG-3')²⁹. Cas9 ha sido empleada para realizar modificaciones en el genoma de cianobacterias, no obstante, se ha demostrado que las eficiencias son muy bajas debido a que resulta ser letal para ellas^{17,68}. No obstante, Cpf1 ha demostrado ser más flexible en este tipo de microorganismo obteniendo mayores eficiencias de edición. Una de las explicaciones que se han sugerido es que las cianobacterias resisten y realizan

una mejor reparación a un corte de doble cadena escalonado (Cpf1) que a un corte en romo (Cas9)¹⁷.

Primero que nada, fue necesario seleccionar en que parte del genoma de *Synechocystis* se introduciría la secuencia de la enzima FAP. La proteína degradadora de ficobilisoma, como lo dice su nombre, es una proteína heterodimérica que se encarga de degradar el ficobilisoma cuando la cianobacteria se encuentra en deficiencia de nitrógeno en el medio⁶⁹. Este gen que codifica esta proteína ha sido reemplazado por el de la proteína amarillo fluorescente (YFP) empleando CRISPR/Cpf1¹⁷ lo cual no afecto en el crecimiento de la cianobacteria y fue posible monitorear la expresión mediante la fluorescencia que emite esta proteína. Debido a estos antecedentes decidimos sustituir este gen con el de la enzima FAP.

Para eso, es esencial diseñar y seleccionar un crRNA que es el que se encarga de guiar a la endonucleasa Cpf1 a la región del genoma en la que se quiere realizar la modificación. Como se muestra en la Tabla 10 se generó un crRNA de 20 pb tomando los diferentes criterios sugeridos por la herramienta bioinformática Cas-Designer⁴⁴. Así mismo se evaluó si este crRNA podía cortar fuera del gen que se busca reemplazar empleando la herramienta bioinformática Cas-OFFinder⁷⁰ y se encontró que con dos errores, no cortaba fuera de esta (datos no mostrados). Así mismo, se encontró que el crRNA obtenido era similar al que se empleó en el estudio del diseño del plásmido pSL2680¹⁷.

El molde para la recombinación homóloga es otro punto crucial además del crRNA para la modificación del genoma ya que este es el que se usará para

realizar la reparación después del corte con la nucleasa Cpf1. Se ha sugerido que dependiendo la longitud del fragmento que nosotros queremos introducir es el tamaño de los brazos homólogos que se debe utilizar. Así mismo, un aumento en la longitud de los brazos homólogos puede compensar un inserto de tamaño aumentado. De 200 a 400 pb para los brazos homólogos son ideales para inserciones de ADN grandes mientras que para insertos cortos de 100 pb o menos, utilizar brazos homólogos de 50 pb debe ser suficiente⁷¹. Esto último es ventajoso ya que se puede sintetizar el fragmento completo con los brazos homólogos y el inserto. A pesar de todo esto, la longitud de los brazos homólogos no sigue una regla en específico por lo que en base a lo reportado para *Synechocystis* se utilizó una longitud de 600 pb para cada brazo ya que la longitud de la enzima FAP es de 1806 pb.

Al realizar el ensamble de los fragmentos para el molde de reparación en el plásmido pSL2680 tuvimos complicaciones ya que al momento de analizar por PCR no obteníamos la amplificación deseada (datos no mostrados). Este plásmido fue diseñado y probado para ser utilizado entre una amplia diversidad de cianobacteria. No obstante, en estudios recientes se reportó que por razones desconocidas no fue posible realizar la digestión utilizando estas dos enzimas de restricción. Debido a esto, decidieron diseñar otro plásmido en el cual modificaron los sitios de restricción reemplazando los de KpnI-Sall por los de BgIII-BamHI⁴⁵. Además, en el caso del plásmido pSL2680 se tenía que hacer el curado creciendo las células por muchas generaciones, sembrar en placas sin antibióticos y hacer el cribado de las colonias que hayan perdido el plásmido de manera espontánea,

debido a esto, se adicionó el gen de sensibilización a la sacarosa (*sacB*) para disminuir el tiempo en el cual el plásmido es curado de la cianobacteria ya que después de 5 generaciones, se sembraban en placas de 5% de sacarosa y las colonias que crecían eran analizadas por PCR y se comprobaba la pérdida del plásmido^{17,45}. Debido a esto es que se sustituyó el plásmido pSL2680 por el pCpf1b al cual le fue adicionado el mismo crRNA ya que la región de CRISPR no fue modificada. Con esto se obtuvo un plásmido al cual se le puede agregar un molde reparador con cualquier secuencia de interés y producirlo en *Synechocystis* sp. PCC6803.

CAPÍTULO 7

7 CONCLUSIONES

TorAps-SmbP fue capaz de transportar RFP al periplasma de *E. coli* lo cual fue monitoreado por microscopia de fluorescencia y por la extracción periplásmica con el método de lisozima/choque osmótico.

Se obtuvo mejor producción de RFP utilizando TorAps-SmbP comparado con SmbP wild type obteniendo 4.13 ± 0.22 y 0.0067 ± 0.0003 mg respectivamente de 1L de cultivo

Mediante el espectro de fluorescencia de GFP se pudo comprobar que TorAps-SmbP tuvo la capacidad de exportarla de manera activa al espacio periplásmico de *E. coli*.

Se obtuvieron las construcciones de pET30a-SmbP_c-Lun, pET30a-CusF3H_{+c}-Lun, pET30a-CusF3H_{+c}-Lunx2, pET30a-CusF_{TEV}-Lun y pET30a-CusF3H_{+TEV}-Lun confirmadas por PCR.

Fue posible expresar y purificar SmbP_c-Lun, CusF3H_{+c}-Lun, CusF3H_{+c}-Lunx2, SmbP_{TEV}-Lun, CusF3H_{+TEV}-Lun mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).

No fue posible detectar la lunasina después de la digestión con hidroxilamina debido a que las altas concentraciones de esta en la solución dificultan el análisis por SDS-PAGE.

Se logró digerir CusF3H_c-Lun y purificar lunasina empleando una segunda cromatografía IMAC, mientras que con SmbP_c-Lun fue posible digerirla más no purificar lunasina.

Se logró digerir CusF3H_{TEV}-Lun y SmbP_{TEV}-Lun y purificar el péptido lunasina empleando una segunda cromatografía IMAC, sin embargo, no fue posible detectar la banda después de la purificación debido a la baja concentración del péptido puro.

Se evaluó la actividad antioxidante de la lunasina y la lunasina en tándem obteniendo 30% y 16% de inhibición, mientras que para las quimeras CusF3H_c-Lun, CusF3H_c-Lunx2 y CusF3H₊ fue de 9%, 6% y 6% respectivamente.

Mediante el uso de las herramientas bioinformáticas Cas-Designer y Cas-Offinder fue posible diseñar un crRNA dirigido al gen *nblA* óptimo para la edición con CRISPR/Cpf1.

Se logró alinear el crRNA_{*nblA*} y ligarlo en los plásmidos pSL2680 y pCpf1 los cuales fueron confirmados por PCR con iniciadores que amplifican la región de CRISPR y posteriormente secuenciarlos.

No fue posible ensamblar el molde reparador en el plásmido pSL_crRNA_{*nblA*} debido a que las digestiones con Sall no se llevaron a cabo

correctamente ya que al realizar el análisis por PCR no se obtuvo la banda esperada.

Se logró amplificar los brazos homólogos del genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 que flanquean el gen *nblA* con una longitud de 600 pb y el gen de la enzima FAP adicionando una etiqueta de histidinas.

Se logró generar el plásmido pCpf1_crRNA_{nblA} el cual contiene el crRNA y que sirve como base para poder realizar la inserción de moldes reparadores con diferentes secuencias de proteínas de interés para su producción en *Synechocystis* sp. PCC 6803.

Se logró obtener el plásmido pCpf1_crRM el cual contiene los brazos homólogos y la secuencia de FAP el cuál fue confirmado mediante PCR y secuenciación.

CAPÍTULO 8

8 PERSPECTIVAS

En el presente estudio se elaboró y caracterizó la construcción de un plásmido para la modificación del genoma de *Synechocystis* sp. PCC 6803 utilizando CRISPR/Cpf1 y poder producir una fotoenzima que tiene la capacidad de descarboxilar ácidos grasos a hidrocarburos utilizando luz. *Synechocystis* sp. PCC 6803 es una cianobacteria que se ha estudiado ampliamente para la obtención de diversos metabolitos, sin embargo, falta por explotar más su capacidad para la producción de proteínas recombinantes.

Una de las perspectivas de este proyecto es realizar la conjugación de *Synechocystis* con el plásmido construido para poder realizar la inserción del gen de la fotoenzima en su genoma mediante la herramienta CRISPR/Cpf1. Además, es necesario secuenciar la modificación para garantizar que la inserción se realizó de manera correcta.

Otra de las perspectivas de este proyecto es producir la fotoenzima en *Synechocystis* ya modificada, extraerla y purificarla para poder evaluar la presencia de esta. Finalmente, cuantificar la cantidad de proteína obtenida y probar su capacidad de producir hidrocarburos a partir de ácidos grasos.

CAPÍTULO 9

9 SEGURIDAD EN EL TRABAJO DE DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La disposición de residuos que se generaron durante el presente proyecto se gestionados de acuerdo con los lineamientos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL en el programa de Manejo Integral de Residuos.

Los residuos se dispusieron como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 21. Disposición de los residuos generados.

Colector	Residuo generado
Colector A (Soluciones Salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas)	<ul style="list-style-type: none">➤ Solución amortiguadora TAE (Tris, ácido acético, EDTA)➤ TFB1 (RbCl, CaCl₂, MnCl₂, KAc, Glicerol)➤ Solución amortiguadora TGS (Tris, Glicina, SDS)➤ Solución hipertónica (Sacarosa, Tris-HCl, EDTA, Lisozima)➤ Solución amortiguadora de equilibrio (Tris-HCl, NaCl)➤ Solución amortiguadora de elución (Tris-HCl, NaCl, imidazol)
Colector G (Combinaciones orgánicas sólidas)	<ul style="list-style-type: none">➤ Agarosa➤ Poliácrilamida
Colorantes y Lugol	<ul style="list-style-type: none">➤ Azul de Coomassie

10REFERENCIAS

1. Malik, A. Protein fusion tags for efficient expression and purification of recombinant proteins in the periplasmic space of *E. coli*. *3 Biotech* **6**, 1–7 (2016).
2. Sanchez, S. & Demain, A. Special issue on the production of recombinant proteins. *Biotechnol. Adv.* **30**, 1100–1101 (2012).
3. Overton, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today* vol. 19 590–601 (2014).
4. Fosgerau, K. & Hoffmann, T. Peptide therapeutics: Current status and future directions. *Drug Discov. Today* **20**, 122–128 (2015).
5. Lau, J. L. & Dunn, M. K. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg. Med. Chem.* (2017) doi:10.1016/j.bmc.2017.06.052.
6. Nakurte, I. *et al.* Detection of the lunasin peptide in oats (*Avena sativa* L.). *J. Cereal Sci.* **57**, 319–324 (2013).
7. Rizzello, C. G., Nionelli, L., Coda, R. & Gobbetti, M. Synthesis of the cancer preventive peptide lunasin by lactic acid bacteria during sourdough fermentation. *Nutr. Cancer* **64**, 111–120 (2012).
8. Setrerrahmane, S., Zhang, Y., Dai, G., Lv, J. & Tan, S. Efficient production of native lunasin with correct n-terminal processing by using the pH-induced self-cleavable Ssp DnaB mini-intein system in *Escherichia coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**, 612–622 (2014).
9. Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C. C. & de Lumen, B. O. Lunasin, a novel seed peptide for cancer prevention. *Peptides* **30**, 426–430 (2009).
10. Jeong, H. J., Jeong, J. B., Kim, D. S. & De Lumen, B. O. Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide Lunasin. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 632–637 (2007).
11. Lule, V. K., Garg, S., Pophaly, S. D., Hitesh & Tomar, S. K. 'Potential health benefits of lunasin: A multifaceted soy-derived bioactive peptide'. *J. Food Sci.* **80**, C485–C494 (2015).
12. Kyle, S., James, K. a R. & McPherson, M. J. Recombinant production of the therapeutic peptide lunasin. *Microb. Cell Fact.* **11**, 1–8 (2012).
13. Sorigué, D. *et al.* Microalgae synthesize hydrocarbons from long-chain fatty acids via a light-dependent pathway. *Plant Physiol.* **171**, 2393–2405 (2016).

14. Sorigué, D. *et al.* An algal photoenzyme converts fatty acids to hydrocarbons. *Science* (80-.). **357**, 903–907 (2017).
15. Gomes, A., Byregowda, S., Veeregowda, B. & Balamurugan, V. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. *Recomb. Gene Expr.* **4**, 15–51 (2016).
16. Yu, Y. *et al.* Development of synechocystis sp. PCC 6803 as a phototrophic cell factory. *Marine Drugs* vol. 11 2894–2916 (2013).
17. Ungerer, J. & Pakrasi, H. B. Cpf1 Is A Versatile Tool for CRISPR Genome Editing Across Diverse Species of Cyanobacteria. *Sci. Rep.* **6**, 39681 (2016).
18. Wendt, K. E., Ungerer, J., Cobb, R. E., Zhao, H. & Pakrasi, H. B. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Microb. Cell Fact.* **15**, 1–8 (2016).
19. Terpe, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 72 211–222 (2006).
20. Young, C. L., Britton, Z. T. & Robinson, A. S. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnol. J.* **7**, 620–634 (2012).
21. Bulaj, G. Formation of disulfide bonds in proteins and peptides. *Biotechnol. Adv.* **23**, 87–92 (2005).
22. Patel, R., Smith, S. M. & Robinson, C. Protein transport by the bacterial Tat pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1843**, 1620–1628 (2014).
23. Costa, S., Almeida, A., Castro, A. & Domingues, L. Fusion tags for protein solubility, purification, and immunogenicity in *Escherichia coli*: The novel Fh8 system. *Front. Microbiol.* **5**, 1–20 (2014).
24. Chun, H., Joo, K., Lee, J. & Shin, H. C. Design and efficient production of bovine enterokinase light chain with higher specificity in *E. coli*. *Biotechnol. Lett.* **33**, 1227–1232 (2011).
25. Hidalgo-Cantabrana, C., O’Flaherty, S. & Barrangou, R. CRISPR-based engineering of next-generation lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **37**, 79–87 (2017).
26. Yan, M. Y. *et al.* CRISPR-Cas12a-assisted recombineering in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**, 1–13 (2017).
27. Zhang, H., Cheng, Q. X., Liu, A. M., Zhao, G. P. & Wang, J. A novel and efficient method for bacteria genome editing employing both

- CRISPR/Cas9 and an antibiotic resistance cassette. *Front. Microbiol.* **8**, 1–11 (2017).
28. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F. & Marraffini, L. A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* **31**, 233–239 (2013).
 29. Jiang, Y. *et al.* Multigene editing in the Escherichia coli genome via the CRISPR-Cas9 system. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 2506–2514 (2015).
 30. Westbrook, A. W., Moo-Young, M. & Chou, C. P. Development of a CRISPR-Cas9 tool kit for comprehensive engineering of bacillus subtilis. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 4876–4895 (2016).
 31. Oh, J. H. & Van Pijkeren, J. P. CRISPR-Cas9-assisted recombineering in Lactobacillus reuteri. *Nucleic Acids Res.* **42**, 1–11 (2014).
 32. Li, Y.-D., Zhou, Z., Lv, L.-X., Hou, X.-P. & Li, Y.-Q. New approach to achieve high-level secretory expression of heterologous proteins by using Tat signal peptide. *Protein Pept. Lett.* **16**, 706–710 (2009).
 33. Vargas-Cortez, T., Morones-Ramirez, J. R., Balderas-Renteria, I. & Zarate, X. Expression and purification of recombinant proteins in Escherichia coli tagged with a small metal-binding protein from Nitrosomonas europaea. *Protein Expr. Purif.* **118**, 49–54 (2016).
 34. Cantu-Bustos, J. E. *et al.* Expression and purification of recombinant proteins in Escherichia coli tagged with the metal-binding protein CusF. *Protein Expr. Purif.* **121**, 61–65 (2016).
 35. Vargas-Cortez, T., Morones-Ramirez, J. R., Balderas-Renteria, I. & Zarate, X. Production of recombinant proteins in Escherichia coli tagged with the fusion protein CusF3H+. *Protein Expr. Purif.* **132**, 44–49 (2017).
 36. Aleksis, R., Jaudzems, K., Muceniece, R. & Liepinsh, E. Lunasin is a redox sensitive intrinsically disordered peptide with two transiently populated α -helical regions. *Peptides* **85**, 56–62 (2016).
 37. Tian, Q. *et al.* Hirudin as a novel fusion tag for efficient production of lunasin in Escherichia coli. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **47**, 619–626 (2017).
 38. Skala, W., Goettig, P. & Brandstetter, H. Do-it-yourself histidine-tagged bovine enterokinase: A handy member of the protein engineer's toolbox. *J. Biotechnol.* **168**, 421–425 (2013).
 39. French, C., Keshavarz-Moore, E. & Ward, J. M. Development of a simple method for the recovery of recombinant proteins from the Escherichia coli periplasm. *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 332–338 (1996).
 40. Pierce, J. J., Turner, C., Keshavarz-Moore, E. & Dunnill, P. Factors determining more efficient large-scale release of a periplasmic enzyme

- from *E. coli* using lysozyme. *J. Biotechnol.* **58**, 1–11 (1997).
41. Ramanan, R. N., Ling, T. C. & Ariff, A. B. The performance of a glass bead shaking technique for the disruption of *Escherichia coli* cells. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **13**, 613–623 (2008).
 42. Crimmins, D. L., Mische, S. M. & Denslow, N. D. Chemical Cleavage of Proteins in Solution. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **41**, (2005).
 43. Re, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 1231–1237 (1999).
 44. Park, J., Bae, S. & Kim, J.-S. Cas-Designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics* **31**, 4014–4016 (2015).
 45. Niu, T.-C. *et al.* Expanding the Potential of CRISPR-Cpf1-Based Genome Editing Technology in the Cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *ACS Synth. Biol.* **8**, 170–180 (2019).
 46. Sambrook, J. & Russel, D. W. Molecular Cloning, 3-Volume Set : A Laboratory Manual. *Cold Spring Harboc Laboratory Press* (2000).
 47. Paithankar, K. R. & Prasad, K. S. N. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1346–1346 (1991).
 48. Sauer, M. L., Kollars, B., Geraets, R. & Sutton, F. Sequential CaCl₂, polyethylene glycol precipitation for RNase-free plasmid DNA isolation. *Anal. Biochem.* (2008) doi:10.1016/j.ab.2008.05.044.
 49. Natale, P., Brüser, T. & Driessen, a. J. M. Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane-Distinct translocases and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1778**, 1735–1756 (2008).
 50. Freudl, R. Beyond amino acids: Use of the *Corynebacterium glutamicum* cell factory for the secretion of heterologous proteins. *J. Biotechnol.* **258**, 101–109 (2017).
 51. Thomas, J. D., Daniel, R. A., Errington, J. & Robinson, C. Export of active green fluorescent protein to the periplasm by the twin-arginine translocase (Tat) pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **39**, 47–53 (2001).
 52. de Lumen, B. O. Lunasin : A Cancer-Preventive Soy Peptide. *Nutr. Rev.* **63**, 16–21 (2005).
 53. García-Nebot, M. J., Recio, I. & Hernández-Ledesma, B. Antioxidant activity and protective effects of peptide lunasin against oxidative stress in intestinal Caco-2 cells. *Food Chem. Toxicol.* **65**, 155–161 (2014).
 54. Jia, S., Zhang, S., Yuan, H. & Chen, N. Lunasin Inhibits Cell Proliferation via Apoptosis and Reduces the Production of Proinflammatory Cytokines in Cultured Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–9 (2015).

55. Chang, H.-C. *et al.* Soy peptide lunasin in cytokine immunotherapy for lymphoma. *Cancer Immunol. Immunother.* **63**, 283–295 (2014).
56. Mack, C. P. An Epigenetic Clue to Diabetic Vascular Disease. *Circ. Res.* **103**, 568–570 (2008).
57. Seber, L. E. *et al.* Scalable purification and characterization of the anticancer lunasin peptide from soybean. *PLoS One* **7**, 1–13 (2012).
58. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front. Microbiol.* **5**, 1–17 (2014).
59. Liu, C. F. & Pan, T. M. Recombinant expression of bioactive peptide lunasin in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **88**, 177–186 (2010).
60. Li, C., Ng, M. L. P., Zhu, Y., Ho, B. & Ding, J. L. Tandem repeats of Sushi3 peptide with enhanced LPS-binding and -neutralizing activities. *Protein Eng. Des. Sel.* **16**, 629–635 (2003).
61. Nam, H., Hwang, B. J., Choi, D., Shin, S. & Choi, M. Tobacco etch virus (TEV) protease with multiple mutations to improve solubility and reduce self-cleavage exhibits enhanced enzymatic activity. *FEBS Open Bio* **10**, 619–626 (2020).
62. Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C.-C. & de Lumen, B. O. Antioxidant and anti-inflammatory properties of cancer preventive peptide lunasin in RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**, 803–808 (2009).
63. Montfort-Gardeazabal, J. M., Claudio, P. C. M.-S., Casillas-Vega, N. G. & Zarate, X. Expression and Purification of the VpDef Defensin in *Escherichia coli* using the Small Metal-Binding Proteins CusF3H+ and SmbP. *Protein Pept. Lett.* **28**, 108–114 (2021).
64. Montfort-Gardeazabal, J. M., Balderas-Renteria, I., Casillas-Vega, N. G. & Zarate, X. Expression and purification of the antimicrobial peptide Bin1b in *Escherichia coli* tagged with the fusion proteins CusF3H+ and SmbP. *Protein Expr. Purif.* **178**, 105784 (2021).
65. Kaneko, T. *et al.* Sequence Analysis of the Genome of the Unicellular Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. II. Sequence Determination of the Entire Genome and Assignment of Potential Protein-coding Regions. *DNA Res.* **3**, 109–136 (1996).
66. Scaldaferrri, C. A. & Pasa, V. M. D. Production of jet fuel and green diesel range biohydrocarbons by hydroprocessing of soybean oil over niobium phosphate catalyst. *Fuel* **245**, 458–466 (2019).
67. Zetsche, B. *et al.* Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell* **163**, 759–771 (2015).

68. Wendt, K. E., Ungerer, J., Cobb, R. E., Zhao, H. & Pakrasi, H. B. CRISPR/Cas9 mediated targeted mutagenesis of the fast growing cyanobacterium *Synechococcus elongatus* UTEX 2973. *Microb. Cell Fact.* **15**, 115 (2016).
69. Baier, A., Winkler, W., Korte, T., Lockau, W. & Karradt, A. Degradation of Phycobilisomes in *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Biol. Chem.* **289**, 11755–11766 (2014).
70. Bae, S., Park, J. & Kim, J.-S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* **30**, 1473–1475 (2014).
71. Li, K., Wang, G., Andersen, T., Zhou, P. & Pu, W. T. Optimization of Genome Engineering Approaches with the CRISPR/Cas9 System. *PLoS One* **9**, e105779 (2014).