



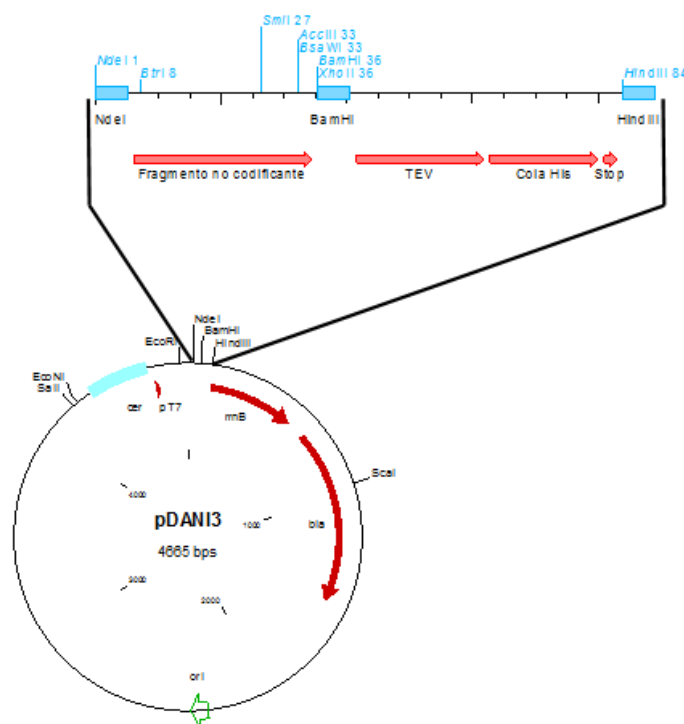
Universidad de Almería

Facultad de Ciencias Experimentales

Máster en Química Avanzada Aplicada

Curso académico 2011-2012

Utilización de técnicas moleculares para el rediseño de un vector de expresión



Autor:

Pedro Daniel Navarro Jiménez

Directores:

Francisco Javier Las Heras Vázquez

Sergio Martínez Rodríguez

1. Introducción.....	1
1.1 Plásmidos.....	1
1.2 Reacción en cadena de la polimerasa, PCR.....	3
1.3 Proteasa del virus del grabado del tabaco (Tobacco Etch Virus , TEV)....	5
1.4 Enzimas de restricción.....	6
2. Objetivos y plan de trabajo.....	8
2.1 Objetivos.....	8
2.2 Plan de trabajo.....	8
3. Material y métodos.....	9
3.1 Bases de datos.....	9
3.2 Preparación de cultivos.....	9
3.3 Extracción de ADN plasmídico (miniprep).....	9
3.4 PCR.....	11
3.5 Electroforesis de ADN.....	13
3.6 Extracción de ADN de gel de electroforesis.....	15
3.7 Clonación.....	16
3.8 Secuenciaciones.....	18
3.9 Transformación de células competentes E. coli DH5 α y BL21.....	18
3.10 Clonado y transformación en sistema Topoisomerasa.....	19
3.11 Mutagénesis.....	20
3.12 Sobreexpresión de proteínas.....	22
3.13 Purificación de proteínas en columna de afinidad.....	23
3.14 Purificación de proteínas en Batch; eliminación de la cola de histidinas....	24
3.15 Corte de la proteasa TEV.....	25
3.16 Electroforesis de proteínas.....	25
3.17 Tampones y disoluciones.....	29
4. Resultados y discusión.....	32
4.1 Diseño de oligonucleótidos.....	32
4.2 Preparación de pDANI1.....	35
4.2.1 Estrategia 1: clonación directa mediante corte y ligado hasta pDANI1.	35
4.2.2 Estrategia 2: Obtención de pDANI1 mediante clonación intermedia en pSC-B (pDANI2)	37
4.3 Preparación de pDANI3.....	41
4.4 Preparación de pDANI4.....	44
5. Conclusiones.....	49
6. Bibliografía.....	50

Índice de tablas:

Tabla 1. Volumen de reactivos empleados en PCR según el fabricante.....	12
Tabla 2. Efectividad del corte enzimático según tampón empleado.....	17
Tabla 3. Rampa de temperatura aplicada para QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	21
Tabla 4. Rampa de temperatura empleada para la amplificación de los oligonucleótidos	35
Tabla 5. Rampa de temperatura empleada en la mutagénesis dirigida.....	42
Tabla 6. Densidad óptica de las fracciones de proteína purificada	47

Índice de figuras:

Figura 1. Esquema de plásmido E. coli pBR322.....	2
Figura 2. Termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystem.....	3
Figura 3. Esquema de etapas en la PCR.	4
Figura 4. Ejemplo de corte mediante el empleo de una enzima de restricción.....	6
Figura 5. Corte mediante el empleo de enzimas de restricción generando extremos romos y cohesivos.....	7
Figura 6. Acondicionamiento del portageles.....	13
Figura 7. Introducción del portageles en la cubeta y carga de muestras.....	14
Figura 8. Bandas características del marcador de masa molecular TrackIt 1Kb DNA Ladder....	14
Figura 9. Fuente de alimentación y cubeta de electroforesis con conexiones.....	15
Figura 10. Punta empleada para la extracción de ADN de gel de electroforesis.....	15
Figura 11. Cristales empleados en electroforesis de proteínas.....	26
Figura 12. Colocación de los cristales en el soporte de preparación.....	26
Figura 13. Esquema para el acondicionamiento del sistema de electroforesis de proteínas....	28
Figura 14. Esquema del plásmido pBBM35.....	32

Figura 15. Esquema del oligonucleótido 0 diseñado.....	33
Figura 16. Esquema de estrategias següas para obtener pDANI1.....	36
Figura 17. Esquema del vector pSC-B.....	37
Figura 18. Productos de transformación.....	38
Figura 19. Electroforesis del corte con <i>EcoRI</i> de 6 transformantes.....	38
Figura 20. Electroforesis del corte <i>NdeI-HindIII</i> de 2 muestras de inserto y pBBM35.....	39
Figura 21. Colonias transformadas.....	39
Figura 22. Amplificación de 10 transformantes y pBBM35.....	40
Figura 23. Secuenciación parcial de pDANI1.....	40
Figura 24. Comparación de la secuenciación parcial del oligo 0 con pDANI1.....	41
Figura 25. Electroforesis de corte <i>EcoRI-BamHI</i> de pDANI3-1, pDANI3-2, pDANI1 y pJAVI80.	43
Figura 26. Comparación de secuencias de pDANI3-1, pDANI3-2 y oligo 0.....	43
Figura 27. Electroforesis del corte con <i>NdeI-BamHI</i> de pJOE4036 y gen hidantoín racemasa de pSER22.....	44
Figura 28. Transformación de pDANI4 en DH5 α	45
Figura 29. Electroforesis del corte <i>EcoRI-BamHI</i> de 10 muestras pDANI4 y pDANI3.....	45
Figura 30. Secuenciación parcial de pDANI4.....	46
Figura 31. Electroforesis SDS-PAGE tras corte con proteasa TEV y purificación en Batch.....	48

1. Introducción

1. Introducción

Desde el principio de los años 80, la Bioquímica y las áreas del conocimiento directamente relacionadas con ella están experimentando un extraordinario incremento en su aplicabilidad. Tradicionalmente la bioquímica había venido encontrando su marco tecnológico en ciencias de la vida tales como Farmacia y Medicina. El desarrollo de técnicas Bioquímicas para el aislamiento y estudio de ácidos nucleicos amplió este panorama, llevando a la Bioquímica hasta el núcleo de las ciencias agrícolas, ganaderas y muy especialmente la Industria Química en todas sus facetas. En la actualidad la Bioquímica debe ser considerada como la aplicación más rentable y prometedora de la Química tradicional.

1.1 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN dúplex circular, de 1 a 200 Kb que contienen la maquinaria genética indispensable, como el origen de replicación, para permitir su propagación autónoma en un huésped bacteriano o en una levadura. Los plásmidos pueden considerarse “parásitos moleculares”, aunque benefician a su huésped proporcionándole funciones que el huésped no tiene como por ejemplo la resistencia a un antibiótico (Rodríguez-Vico y col., 1999).

Una vez se descubrió la facilidad de replicación de este tipo de ADN, se comenzó el desarrollo de un gran número de vectores plasmídicos para la clonación mediante la modificación de plásmidos naturales. El plásmido de *E. coli* pBR322 es un buen ejemplo de las características útiles de un vector de clonación (Figura 1).

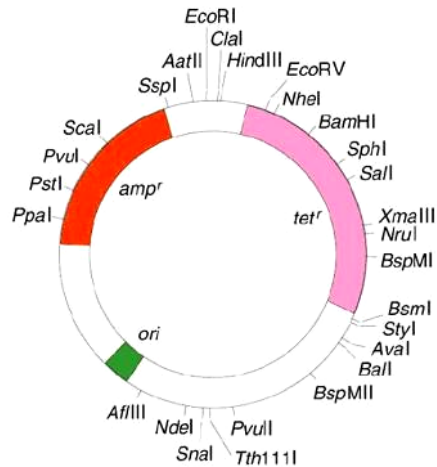


Figura 1. Esquema de plásmido *E. coli* pBR322.

Entre las características útiles de un vector se destacan:

- Origen de replicación: Permite propagar el plásmido y mantenerlo en un nivel de 10 a 20 copias por célula.
- Genes que confieran resistencia a diferentes antibióticos: éstos permiten la identificación de las células que contengan el plásmido intacto o una versión recombinante del mismo.
- Varias secuencias únicas de reconocimiento para diferentes endonucleasas de restricción: suministran los sitios donde cortar el plásmido para insertar secuencias de ADN foráneo. Esta región se conoce como polylinker o sitio de policlación.
- Un tamaño global pequeño que facilita la entrada del plásmido en la célula y la manipulación bioquímica del ADN: la eficiencia de la transformación bacteriana con ADN purificado (proceso poco eficiente) decrece al aumentar el tamaño del plásmido, siendo difícil la clonación de segmentos de ADN mayores de unos 15.000 pares de bases (pb) cuando se usa un plásmido como vector.

El empleo de vectores como herramientas de trabajo para el laboratorio bioquímico es un hábito muy extendido, prueba de ello es la enorme variedad de plásmidos disponibles a través de las casas comerciales, tanto vectores de clonación como de expresión.

El vector de expresión empleado para estos trabajos ha sido el plásmido pBBM35 (pJOE 4036.1) (Stumpp y col., 2000). La clonación de un gen en este plásmido permite la inducción de su expresión mediante L-ramnosa y ha sido utilizado con éxito en el grupo al cual me he incorporado. Este plásmido ha proporcionado mejores resultados que otros inducibles por lactosa o IPTG, sobre todo por evitar la formación de una gran fracción insoluble de la proteína sobreexpresada como cuerpos de inclusión.

1.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) es una técnica desarrollada en 1983 por Kary Mullis que permite amplificar una región de ADN *in vitro*, teniendo múltiples aplicaciones en el campo de la Biología Molecular (Perera y col., 2002).

Dicha técnica realizada en un termociclador (Figura 2), es altamente específica, rápida, sensible y versátil, y permite detectar cantidades ínfimas de un cierto ADN específico, facilitando su identificación y prescindiendo del uso de radioisótopos.



Figura 2. Termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystem.

El principio del método se basa en la repetición de ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable. El segmento de ADN de interés es amplificado al ser limitado por dos cebadores o iniciadores que lo flanquean, logrando su copiado de forma exponencial a través de los repetidos ciclos.

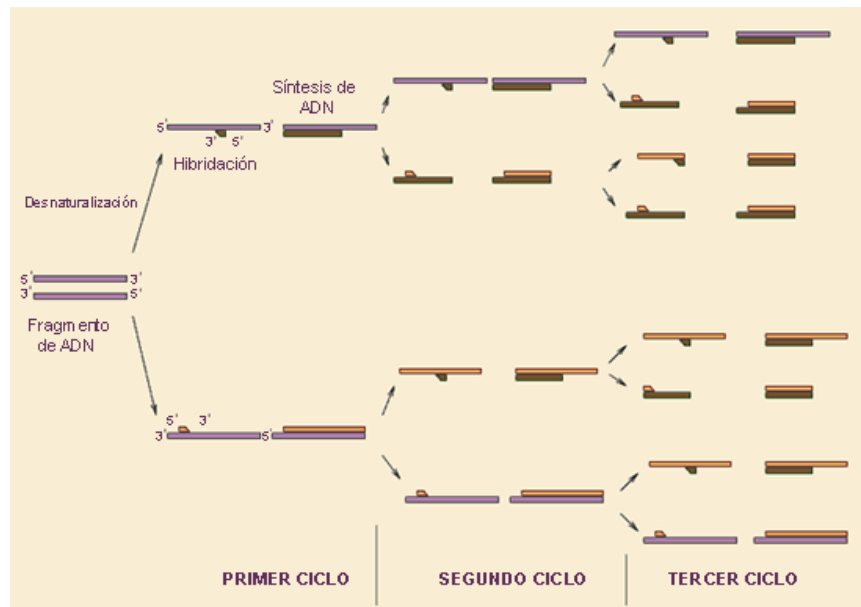


Figura 3. Esquema de etapas en la PCR.

Cada ciclo está constituido por tres etapas (Figura 3). La primera etapa de desnaturalización produce la ruptura de los puentes de hidrógeno de la doble hebra de ADN para dar lugar a dos hebras sencillas. En la segunda etapa se lleva a cabo la hibridación de las hebras sencillas del ADN diana con los cebadores o iniciadores a una temperatura que facilita el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas cadenas de ADN. La última etapa consiste en la extensión, donde, la polimerasa extiende la longitud de los cebadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la secuencia de nucleótidos de la cadena que actúa como molde.

La técnica de PCR ha revolucionado el trabajo en Biología Molecular y ha impulsado de forma extraordinaria el avance en las investigaciones en este área. Además ha supuesto un cambio general al permitir la producción de un número enorme de copias de una determinada secuencia sin necesidad de tener que recurrir a la clonación del ADN. La reacción tiene ciertas limitaciones, de hecho no ha desplazado a los métodos de clonaje que mantienen ventajas sobre ella; pero en muchas de sus aplicaciones, dicha técnica se muestra arrolladora y se ha instalado en los laboratorios de investigación básica, diagnóstico clínico y medicina legal, convirtiéndose en la base de una metodología analítica insustituible (Perera y col., 2002).

1.3 Proteasa del virus del grabado del tabaco (Tobacco Etch Virus, TEV)

Las proteínas llevan a cabo un sin fin de funciones vitales dentro y fuera de la célula, por lo que su síntesis es imprescindible para la vida. Éstas, están compuestas por una cadena polipeptídica, siendo energéticamente más eficiente para los organismos reciclar aminoácidos de moléculas de proteínas ya existentes que sintetizar nuevos. Los catalizadores biológicos encargados de llevar a cabo la degradación de proteínas por hidrólisis, para crear la reserva de aminoácidos libres que se usarán en la síntesis de otras proteínas, se denominan proteasas. Dentro de las diversas proteasas existentes nos encontramos con proteasas muy específicas y otras muy inespecíficas. Un ejemplo de inespecificidad sería la quimiotripsina, mientras que un ejemplo opuesto sería la enzima que nos ocupa, la proteasa TEV.

La proteasa TEV es frecuentemente utilizada para romper las colas de las proteínas recombinantes es la proteasa TEV (tobacco-etch-virus NIa proteasa). William Dougherty y colaboradores fueron los primeros en caracterizar la proteasa TEV en 1987, (Dougherty y col., 1987). Inicialmente se identificó como un producto de tratamiento de poliproteínas virales y denominada como “proteína de inclusión nuclear Ia” o “NIa”. En trabajos posteriores se demostró que la actividad de la proteasa residía en su dominio de C-terminal de 27kDa (Dougherty y Parks., 1991).

Un alineamiento de las secuencias de determinadas posiciones experimentales sugirió que el sitio de reconocimiento para la proteasa TEV se trata de un epítipo lineal que contiene siete residuos de aminoácidos. Esta conjetura se confirmó demostrando que la secuencia ENLYFQ↓S podía actuar como sitio de reconocimiento para la proteasa TEV cuando se encontraba en un contexto artificial (Carrington y Dougherty, 1988) y llevó a comprender que la proteasa TEV podría ser un reactivo útil para la eliminación de colas de afinidad mediante endoproteólisis específica (Parks y col., 1994).

La adición de colas como las de histidina, (His-tag), son una herramienta extremadamente útil en la purificación de proteínas. El empleo de estas colas para la purificación de proteínas es una técnica muy habitual en laboratorios. Existen diversas colas que se suelen añadir al gen de la proteína de interés, entre ellas, las colas de afinidad más comúnmente empleadas son; 6 histidinas

(His-tag) (Bornhorst y Falke, 2000), *Schistosoma japonicum* glutathione transferase (GST) (Smith, 2000), *Escherichia coli* maltose-binding domain (MBD) (Sachdev y Chirgwin, 1998) y *E. coli* thioredoxin (TRX) (Lavallie y col., 2000).

1.4 Enzimas de restricción

Las enzimas de restricción son proteínas capaces de reconocer una secuencia característica de nucleótidos dentro de una molécula de ADN y cortarla en un punto concreto (diana de restricción) o en un sitio no muy lejano a éste. Actúan hidrolizando los ácidos nucleicos, rompiendo los enlaces internos de la cadena sin afectar a los nucleótidos terminales. Se generan así dos fragmentos polinucleotídicos, como se muestra en la Figura 4.

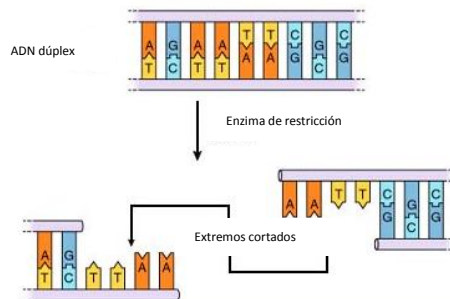


Figura 4. Ejemplo de corte mediante el empleo de una enzima de restricción.

Los cortes realizados por las enzimas de restricción dan lugar a extremos cohesivos o romos (Figura 5). Los extremos romos (Ver Figura 5 corte *Sma*I) son generados cuando la enzima corta las dos hebras por el mismo lugar, generando dos extremos doble cadena. Estos extremos pueden ser unidos con la ayuda de una enzima ligasa pero, como los extremos no son complementarios, la unión será más inespecífica.

Por otro lado, los extremos cohesivos (Ver Figura 5 corte *EcoRI*) son generados cuando la enzima corta las dos hebras asimétricamente, dejando los extremos de cada hebra de cadena simple complementarios entre sí. Estos extremos se pueden unir por medio de otra enzima, la ADN ligasa.

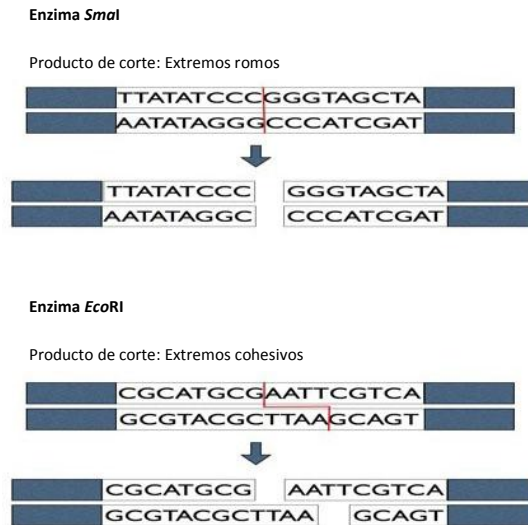


Figura 5. Corte mediante el empleo de enzimas de restricción generando extremos romos y cohesivos.

2. Objetivos y plan de trabajo

2. Objetivos y plan de trabajo

2.1 Objetivos

El objetivo principal de este Trabajo Fin de Máster ha sido la construcción de un vector de expresión que permita la purificación de una enzima recombinante mediante cola de histidinas y posterior separación de la cola por acción de la enzima TEV.

El segundo objetivo es la comprobación experimental del correcto funcionamiento del plásmido aplicándolo al gen de la hidantoín racemasa II de *Agrobacterium tumefaciens* C58 (*Athyua* II).

2.2 Plan de trabajo

Para cumplir con los objetivos propuestos se estableció el siguiente plan de trabajo:

- Diseño de oligonucleótidos para amplificación de la secuencia de ADN de interés.
- Amplificación por PCR.
- Purificación de ADN de gel de electroforesis.
- Clonación en vector pSC-B
- Análisis de transformantes.
- Clonación en vector de expresión pBBM35
- Sobreexpresión del gen en el hospedador *Escherichia coli* BL21.
- Purificación de la proteína de interés.
- Tratamiento de la proteína purificada con proteasa TEV.
- Análisis de resultados mediante electroforesis en condiciones desnaturalizante (SDS-PAGE).

3. Materiales y métodos

3. Materiales y Métodos

3.1 Bases de datos

- Comparación y alineamiento de secuencias nucleotídicas:
CLUSTALW (Thompson y col., 1994):
<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>
- Cálculo de la T_m de los oligonucleótidos diseñados:
DNA Calculator: <http://www.sigma-genosys.com/calc/DNACalc.asp>
- Cálculo de la secuencia reversa complementaria:
http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
- Análisis de plásmidos:
Clone Manager 9 Professional Edition
- Análisis de sitios de restricción de ADN:
Webcutter 2.0: <http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>

3.2 Preparación de cultivos

Para preparar cultivos de las cepas determinadas, se tomaron dichas cepas de una colección a -20°C , realizando el crecimiento a la temperatura y medio de cultivo adecuados.

Una vez descongeladas en hielo las cepas, se tomó una muestra de $50\mu\text{L}$ de cada una de ellas y se sembraron en una placa de petri con el medio de cultivo adecuado, con o sin antibiótico en función de la cepa. La manipulación de las muestras se realizó en todo momento en condiciones estériles bajo campana. Las placas de petri se incubaron a la temperatura de cultivo correspondiente, en el caso de las cepas de este trabajo a 37°C , y durante 24 horas.

De cada una de las placas crecidas se tomó una colonia aislada con un asa de siembra y se separó el inóculo en una placa nueva con el medio correspondiente, con o sin antibiótico, con el objetivo de obtener colonias individuales. Se incubaron a la temperatura de cultivo correspondiente (37°C) durante 24 horas.

Para preparar un cultivo líquido de estas colonias crecidas, así como de otras que pudieran ser necesarias para el desarrollo del trabajo de laboratorio, se toma una colonia individual con un asa de siembra y se pasa a un matraz con el medio de cultivo adecuado y con el antibiótico necesario en su caso, ampicilina. Dicho matraz se mantiene en agitación a la temperatura de cultivo, 37°C, durante una noche.

3.3 Extracción de ADN plasmídico (miniprep)

Las extracciones de ADN plasmídico realizadas a lo largo del trabajo, se han llevado a cabo empleando el kit comercial Plasmid Mini Kit I(Omega bio-tek). El procedimiento aplicado es el indicado por el fabricante que se muestra a continuación.

En primer lugar, los tubos conteniendo el medio y cepas crecidas se centrifugaron a 13.440g (Microcentrífuga Sigma 1-14, Sigma) 5 minutos. Seguidamente se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células mediante la adición de 250µL de Solution I/RNase A solution. A continuación se agitaron en Vortex para asegurar una óptima resuspensión. Luego se añadieron 250µL de Solution II y se mezcló por inversión y rotación de los tubos varias veces para obtener un lisado óptimo. En esta etapa se evitan en todo momento agitaciones vigorosas que podrían romper el ADN cromosómico perdiendo así pureza en la extracción del ADN plasmídico. Se incubaron durante 2-3 minutos asegurándonos en todo caso que la reacción de lisis no durará más de 5 minutos.

Tras la incubación se añadió 350µL de Solution III y mezclar inmediatamente por inversión varias veces hasta la formación de un precipitado blanquecino. Se centrifugó el producto a 12.470g 10 minutos a temperatura ambiente. Mientras se centrifugaba se acondicionó la columna HiBind añadiendo 100 µL de Equilibration Buffer, centrifugando a 12.470g durante 60 segundos y desechando el filtrado. Con la columna acondicionada, se cargó en ella el producto sobrenadante

centrifugado 10 minutos. Se centrifugó la columna con el producto a 12.470g 1 minuto, se desecha el filtrado y se añade 500 µL de HB Buffer. Nuevamente se centrifuga a 12.470g 1 minuto a temperatura ambiente para limpiar la columna. Se desechó el filtrado del tubo de colección, y se añadió 700µL de DNA Wash Buffer y se centrifugó a 12.470g 1 minuto. Se desechó el filtrado del tubo de recogida, y se repite este último paso nuevamente con otros 700µL de DNA Wash Buffer.

Finalmente se centrifugó la columna vacía a 12.470g 2 minutos para secarla. Se colocó la columna sobre un tubo eppendorf nuevo y adicionamos entre 30 y 50µL de Elution Buffer o H₂O, en función de las necesidades ya que cuando las muestras iban a ser empleadas para una secuenciación, la elución se llevaba a cabo con agua. Tras 1 minuto de incubación a temperatura ambiente se centrifugó a 12.470g para Eluir el ADN. Una vez obtenido el ADN plasmídico, el almacenaje de las muestras se llevaba a cabo -20 °C.

3.4 PCR

En varias ocasiones a lo largo del trabajo ha sido necesario realizar PCR. El uso de la PCR ha estado enfocado hacia la amplificación de fragmentos de ADN y mutagénesis dirigida, es por ello que las rampas de temperatura empleadas en cada momento fueran diferentes, ya que cada amplificación o mutagénesis vendrá regido por el uso de unos oligonucleótidos con una T_m característica. Como consecuencia de esta característica rampa de temperatura vendrá referenciado en su correspondiente apartado a lo largo de este trabajo.

El equipo empleado ha sido un termociclador 2720 Thermal Cycler de Applied Biosystem (Figura 2). La polimerasa utilizada ha sido la misma en cada uno de los ensayos llevados a cabo, ésta es KAPA HiFi PCR Kits whit dNTPs kk2101, Kapabiosystem. Los reactivos así como la cantidad de cada uno de ellos necesaria para una óptima PCR fueron los indicados por el fabricante y son recogidos en la siguiente tabla (Tabla 1):

Template (ADN molde)	5 µL
Oligonucleótido 1	0,8 µL
Oligonucleótido 2	0,8 µL
dNTP	0,8 µL
5x Buffer	5 µL
Polimerasa	0,8 µL
H ₂ O	11,8 µL

Tabla 1. Volumen de reactivos empleados en PCR según el fabricante.

En todas las PCR llevadas a cabo el volumen final de cada tubo ha sido 25µL, indicándolo en el procedimiento del equipo en el momento de su uso.

Como sucede en reacciones en las que emplean enzimas, éstas dan inicio a la reacción y por tanto serán el último reactivo en incorporarse al tubo de reacción. También requieren un tratamiento distinto al resto de reactivos ya que tanto su conservación como su uso debe realizarse a -20°C, por lo tanto cuando fue necesario el uso de la Taq Polimerasa se realizó empleando una gradilla que conservase el tubo a -20°C.

Una vez adicionados todos los reactivos en el tubo de reacción de PCR, se les añadió una gota de aceite mineral a cada tubo con el fin de proteger la muestra y evitar su posible evaporación. Una vez acondicionadas completamente las muestras, se cerraron los tubos y se colocaron sobre la plataforma del termociclador. A continuación se introdujeron las rampas de temperaturas así como el número de ciclos deseado.

Transcurrido los ciclos indicados el equipo queda a temperatura constante de 4°C hasta que el usuario recoja las muestras y apague el equipo. En todos los casos las muestras no estuvieron más de 5 minutos a esa temperatura.

3.5 Electroforesis de ADN

Las electroforesis de ADN se han realizado en geles de agarosa al 1,5%. La agarosa es un polímero soluble en agua a temperaturas superiores a 65°C, que al gelificar forma una matriz inerte con diferentes tamaños de poro, lo que permite la separación de moléculas de ADN en función del recorrido de cada molécula. Debido a la carga negativa de los ácidos nucleicos, la aplicación de una diferencia de potencial en dicho polímero producirá una migración de los distintos fragmentos de ADN hacia el ánodo. La movilidad relativa de cada uno de los fragmentos dependerá, fundamentalmente, de su tamaño.

Para preparar los geles de agarosa, se añaden la cantidad necesaria de agarosa en 50 mL de tampón TAE 1X. Para su total disolución se calienta la mezcla en microondas, ya que la agarosa es insoluble a temperatura ambiente. Una vez enfriada la muestra hasta 40°C, se le añaden 50 µL de SYBR Green 1000x para teñir el ADN presente en el gel, permitiendo visualizar posteriormente el ADN. Todo el volumen se vierte en un portageles donde previamente se coloca un peine para formar el número de pocillos necesarios en función de las muestras a cargar (Figura 6). Antes de la gelificación, se eliminan las posibles burbujas que se hayan podido formar.



Figura 6. Acondicionamiento del portageles.

Al enfriarse la mezcla, la agarosa gelifica, pudiendo retirar el peine. El portageles se introduce entonces en una cubeta de electroforesis con tampón TAE 1X, quedando totalmente cubierto (Figura 7). Al colocar el portageles en la cubeta, los pocillos deben quedar en el polo negativo para que al cargar el ADN migre hacia el polo positivo.

Antes de cargar las muestras (20 μ L) se les añade 5 μ L de tampón de carga (excepto en casos que la muestra proceda de una amplificación por PCR con la ADN polimerasa Go Taq u otros casos similares). Esto permite que la muestra quede de color azul y más densa, de forma que será más fácil depositarla en el fondo del pocillo y evitará que se difunda a través de gel antes de aplicar la corriente. Además, los compuestos coloreados del tampón permiten visualizar el frente de la electroforesis.

Las muestras de ADN se cargan en las distintas calles con una pipeta sin tocar el pocillo para evitar la rotura del gel (Figura 7).

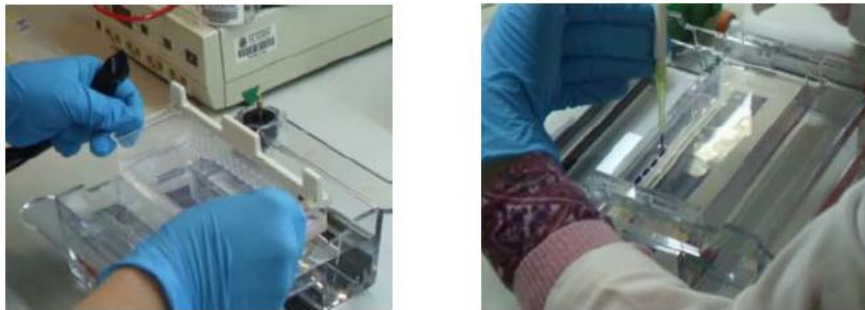


Figura 7. Introducción del portageles en la cubeta (izquierda) y carga de muestras (derecha).

En una de las calles se carga un marcador de masa molecular que permite deducir el tamaño aproximado de las bandas de la muestra de ADN (TrackIt 1Kb DNA Ladder, Invitrogen). El perfil que presenta este marcador viene representado en la Figura 8.

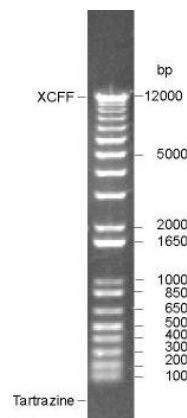


Figura 8. Bandas características del marcador de masa molecular TrackIt 1Kb DNA Ladder.

La cubeta se conecta a una fuente de alimentación Power PAC 300 de Bio Rad aplicando un voltaje continuo de 90-110 voltios durante aproximadamente 1 hora (Figura 9). Transcurrido ese tiempo, se extrae el gel del portageles y se visualiza el resultado en un transiluminador de luz blanca donde se toman las correspondientes fotografías.



Figura 9. Fuente de alimentación y cubeta de electroforesis con conexiones.

3.6 Extracción de ADN de gel de electroforesis

En algunos casos ha sido necesario extraer ADN de un gel de electroforesis. Esto se lleva a cabo pipeteando el gel con una punta especial (GelX Disposable Gel Excision, Cleaver Scientific. Figura 8). Estas puntas son introducidas en el gel sobre la banda de interés y succionadas. Posteriormente el fragmento de gel es depositado en un tubo eppendorf.



Figura 10. Punta empleada para la extracción de ADN de gel de electroforesis.

Las extracciones se han realizado empleando el kit comercial MicroElute© Gel extraction Kit (Omega bio-tek) y siguiendo el protocolo suministrado por el fabricante. Se añadió 350µL de

Binding Buffer (XP2) y se incubaron los tubos a 55°C durante 7 minutos para fundir el gel. Cada 2 minutos se mezclaron los tubos mediante Vortex. Seguidamente se colocó una columna MicroElute HiBind DNA sobre un tubo de 2mL, ambos suministrados en el kit. Se tomó el volumen de nuestra mezcla DNA/Agarosa y se añadió a la columna como máximo 700 µL en cada columna y se centrifugó a 7.370g durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Seguidamente, se desechó el líquido del tubo de recogida y se añadió 300µL Binding Buffer (XP2) centrifugando como el paso anterior. Nuevamente se desechó el líquido y se lavó la columna añadiendo 700 µL de SPW Wash Buffer diluido con etanol absoluto. Se centrifugó igual que en los pasos anteriores y se repitió esta etapa de lavado con otros 700 µL de SPW Wash Buffer. A continuación se desechó el líquido del tubo de recogida y se centrifugó la columna vacía a 13.840g durante 2 minutos para obtener así buenas recuperaciones. Finalmente, se desechó el tubo de recogida y se colocó la columna sobre un tubo nuevo de 1,5mL, se adicionó 20µL de agua Milli Q filtrada y autoclavada, y se dejó a temperatura ambiente 2 minutos para posteriormente centrifugar 1 minuto a 13.840g. En el tubo queda el ADN resuspendido en 20µL que se almacenó a -20°C.

3.7 Clonación

Cortes del ADN

A lo largo del trabajo se han realizado numerosos cortes mediante el empleo de enzimas de restricción. Las enzimas de restricción empleadas han sido suministradas por Roche España. Para su utilización ha sido necesario emplear un tampón de reacción óptimo que favorezca el corte, tanto de la enzima en solitario como de una combinación de enzimas. Esta optimización de tampones-enzimas viene proporcionado por el fabricante, dejando al investigador la posibilidad de variar la efectividad del corte empleando otro tampón (Tabla 2).

Tampón 10x Enzima	A	B	L	M	H
EcoRI	100	100	25-50	50-75	100
HindIII	50-75	100	25-50	100	50-75
NdeI	25-50	75-100	10-25	50-75	100
BamHI	100	100	75-100	100	25-50

Tabla 2. Efectividad del corte enzimático según tampón empleado. Fuente: Roche España.

En cualquier caso, todos los cortes realizados han sido llevados a cabo con una ó 2 enzimas, en presencia de agua y de un tampón determinado en función del corte realizado. Para mejor entendimiento del trabajo, los tampones se han ido indicando a lo largo del desarrollo de la memoria, conjuntamente con el tiempo de corte. En todas las reacciones llevadas a cabo, el volumen final ha sido de 20µL y la temperatura de la reacción 37°C,

Ligados del ADN

Tras la acción de las enzimas de restricción, en ciertos momentos del trabajo era necesario realizar el ligado de fragmentos de ADN. Éstos ligados se llevaron a cabo mediante el empleo de los reactivos comerciales T4 DNA Ligase suministrados por Roche España (ligasa y tampón de ligado). Todas las reacciones de ligado se llevaron a cabo a 4°C durante toda la noche.

Los reactivos empleados fueron:

- T4 DNA ligasa: 1µL
- Tampón de ligado 10x (T 10x): 2µL
- Plásmido: 4µL
- Inserto: 13µL
- Agua: Para los controles de plásmido en sustitución de inserto; 13µL

3.8 Secuenciaciones

Como parte indispensable para la obtención de resultados en el trabajo fue necesaria la secuenciación de muestras. En todos los casos las muestras enviadas a analizar fueron de ADN plasmídico. La secuenciación fue realizada por una empresa externa, Sistemas Genómicos (www.sistemasgenómicos.com).

Las secuenciaciones de pDANI1, pDANI2 y pDANI3 se realizaron con “Economic Service”, mientras que la muestra pDANI4 fue secuenciada mediante “Standard Service”.

En ambos casos, el tratamiento previo al envío que se le dio a la muestra fue su dilución en agua o adición de oligo PCR para el caso de secuenciación de las muestras pDANI1, pDANI3 y pDANI4, en las condiciones que indica la empresa en su formulario de envío. En el caso de pDANI2 al tratarse de un plásmido comercial, los oligos fueron añadidos por la propia empresa.

3.9 Transformación de células competentes *E. coli* DH5 α y BL21

A lo largo del Trabajo Fin de Máster se han realizando varias transformaciones en células competentes (ligados, sobreexpresión, etc.). Las cepas empleadas en cada ocasión no han sido siempre las mismas ya que, por ejemplo, en el empleo del kit de mutagénesis el fabricante recomienda encarecidamente el uso de sus células competentes.

Los procedimientos de transformación indicados en este apartado se corresponden con aquellas transformaciones en las que no se empleaban células suministradas en algún kit comercial, (Topoisomerasa con células competentes SoloPack o en mutagénesis dirigida con células XL 10-Gold).

E. coli DH5 α

Las células competentes almacenadas a -80°C se descongelaron en hielo y se separaron en alícuotas de 90 μ L, teniendo en cuenta que se emplean 3 controles, positivo, negativo y de religado, para la reacción de ligado transformada. El plásmido con inserto ligado

(20µL) se adiciona sobre una alícuota de células y se incubó en hielo durante 22 minutos agitando cada 5 minutos con la precaución de evitar que se destemplan las células. Seguidamente se realizó un choque térmico de 2 minutos a 42°C, para continuar después incubando las células en hielo 10 minutos.

Transcurrido este tiempo se llevó la mezcla de transformación a tubos de cultivo con 900µL de medio LB sin antibióticos, con incubación a 37°C y agitación suave durante una hora. Tras la incubación de las muestras se realizó una centrifugación a 12.850g 5 minutos eliminando el sobrenadante. Tras la resuspensión del precipitado se plaquearon las células para, seguidamente, proceder a su incubación durante 24 horas a 37°C.

E. coli BL21

Para la expresión de la proteína estudiada se hizo necesaria la transformación previa del plásmido desde células DH5α a BL21.

El procedimiento de transformación seguido para la transformación en BL21 es análogo al descrito en DH5α con la salvedad de adicionar únicamente 1µL de plásmido extraído mediante kit en cada alícuota de células transformantes.

3.10 Clonado y transformación en sistema Topoisomerasa

El empleo del sistema Topoisomerasa como estrategia de clonado se realiza en laboratorios para evitar el empleo de ligasas a la hora de clonar un fragmento de ADN. En este trabajo se usó el sistema StrataClone Blunt PCR Cloning Kit (Agilent technologies).

El procedimiento de clonado y posterior transformación comienza con el producto PCR del inserto de interés. Una vez obtenido el producto PCR se añadió a un tubo eppendorf 3µL de tampón (suministrado en el kit), 1µL de vector y 5µL de producto PCR. Se incubó toda la reacción 5 minutos a temperatura ambiente. Para la transformación se añadió 2µL de la reacción anterior a las células competentes (Solopack) suministradas en el kit y descongeladas en hielo. La mezcla se

dejó en hielo 20 minutos para realizar posteriormente un shock térmico a 42°C durante 45 segundos. Transcurrida esta operación se incubaron las muestras en hielo 2 minutos. El siguiente paso consistió en la adición de 250µL de medio LB precalentado a 42°C y dejar incubar a 37°C durante 1 hora.

Tras la incubación se centrifugaron las células eliminando el sobrenadante para resuspender todo el precipitado y sembrarlo en placas de medio LB con ampicilina y 20µL de X-gal al 2%. Transcurridas 24 horas se analizaron las colonias blancas.

3.11 Mutagénesis

La mutagénesis fue realizada empleando el kit comercial QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent technologies). Los procesos llevados a cabo para la óptima realización de la mutagénesis vienen indicados por el fabricante e implicaron las siguientes etapas y reactivos.

La primera etapa consiste en la realización de una PCR para la cual se emplearon los siguientes reactivos indicados a continuación:

- Tampón de reacción 10x: 5 µL
- dsDNA template de una dilución 1/500: 10-100ng
- Ooligonucleótido 1: 125ng
- Oligonucleótido 2: 125ng
- dNTP mix: 1 µL
- Reactivo QuikSolution: 1,5 µL
- H₂O a un volumen final de 50 µL

Finalmente añadir 1 µL de QuikChange Lightning Enzyme. A continuación se añadió una gota de aceite mineral a los tubos de PCR y se realizaron los ciclos de reacción indicados en la tabla (Tabla 3):

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	2 minutos
2	18	95°C	20 segundos
		60°C	10 segundos
		68°C	*2minutos y 30 segundos
3	1	68°C	5 minutos

*El fabricante indicaba que debemos añadir 30 segundos por cada Kb de plásmido, por lo tanto dado nuestro tamaño de plásmido de 4,6 Kb se ajustó el tiempo a lo referido en la tabla.

Tabla 3. Rampa de temperatura aplicada para QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit.

Una vez obtenido nuestro producto PCR, se traspasó a un tubo nuevo sin coger el aceite y se adicionó 2µL de enzima de restricción *DpnI* (suministrada en el kit) a cada reacción de amplificación. Se mezcla completamente cada reacción pipeteando arriba y abajo varias veces para posteriormente hacer un spin breve e incubar a 37°C durante 5 minutos para digerir el ADN parental, sin mutar.

Una vez digerido el ADN parental se procede a la transformación en células ultracompetentes XL 10-Gold suministradas en el kit. Las células se descongelaron en hielo en alícuotas de 45µL. Luego se añadió 2 µL de β-ME mix, suministrado en el kit, a cada alícuota de células. Se agitó el contenido del tubo suavemente y se incubó en hielo 2 minutos. Transcurrido este tiempo se transfirió 2µL del ADN tratado con *DpnI* I a las células y se agitó la reacción de transformación e incubó en hielo durante 30 minutos. A continuación se realizó un choque térmico a 42°C durante 30 segundos para incubar posteriormente en hielo 2 minutos. Luego se adicionó 500µL de NZY⁺ (Ver tampones y disoluciones) precalentado a 42°C y se incubaron los tubos a 37°C durante 1 hora con agitación suave. Finalmente se plaquearon las muestras y se incubaron a 37°C más durante al menos 16 horas.

3.12 Sobreexpresión de proteínas

Hidantoín racemasa (pSER22 y pDANI4)

La cepa de *E. coli* BL21 conteniendo el plásmido de interés se creció en un medio de LB (Ver tampones y disoluciones) con $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina. Se transfirió una única colonia a 10 ml de medio LB con ampicilina a la concentración arriba mencionada en un matraz de 100 ml. El cultivo fue incubado con agitación toda la noche a 37°C . Se incubaron 800 ml de LB a la concentración de ampicilina apropiada en un matraz de 2L con 5ml del cultivo crecido durante la noche. Después de 2h de incubación a 37°C con agitación vigorosa, la OD_{600} del cultivo resultante estaba entre 0,3-0,4. Para la inducción de la expresión del gen, se añadió L-rhamnosa a una concentración final de 0,2 % (w/v) y el cultivo se continuó a 32°C durante seis horas más. Las células fueron sedimentadas mediante centrifugación a $1.840g$, 4°C durante 25 minutos (Beckman JA2-21), y almacenadas a -20°C hasta su uso.

Proteasa TEV

Se preparó un inóculo de BL21 DE3 en medio Terrific (Ver tampones y disoluciones) suplementado con 0,8% de glicerol, 2mM MgSO_4 y 0.37% aspártico, con kanamicina ($100\mu\text{g/ml}$), durante 12 horas en agitación constante a 37°C . A continuación se inoculó 800mL de medio Terrific con kanamicina, en una proporción 1/20 con el inóculo crecido y se auto-expresa la proteína dejando en agitación durante 12 horas a 37°C y suplementando el medio con lactosa 0,5% y glucosa 0,015%.

Una vez autoinducida la expresión de la proteasa, se centrifugó a $10.000g$ (Beckman J-26 XPI, rotor JLA-8.100) y se lavó las células en tampón fosfato potásico 50mM pH 7,5, NaCl 300mM y etilenglicol 20%. Finalmente se precipitaron por centrifugación igual que en el paso anterior y se pesan para su posterior congelación.

3.13 Purificación de proteínas en columnas de afinidad

Hidantoín racemasa (pSER22 y pDANI4)

Para la purificación de proteínas mediante el empleo de columnas de afinidad, el primer paso consistió en la resuspensión de las células BL21 de pSER22 y pDANI4 en 50ml de tampón de lavado (Ver tampones y disoluciones). Se rompieron las paredes celulares mediante sonicado en hielo usando un Procesador de Ultrasonidos UP 200 S (Dr. Hielscher GmbH, Germany) durante 6 periodos de 60s, con un modo de pulso de 0,5 y una potencia de sonicado del 60%. Los restos celulares se centrifugaron y el precipitado se eliminó a 10000g, 4°C durante 20 min (Beckman JA2-21,). El sobrenadante se transfirió a una columna TALON[®] de resina de afinidad con metal, y posteriormente se lavó cuatro veces con tampón de lavado. Después de lavar, la enzima hidantoín racemasa se eluyó con tampón de elución (Ver tampones y disoluciones). La pureza de la proteína se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

La enzima purificada de pDANI4 se dializó en tampón de diálisis TEV (Ver tampones y disoluciones) para su posterior tratamiento con la proteasa TEV. Por otro lado, la proteína de pSER22 se dializó en tampón fosfato sódico 100mM a pH 7,5. Tras la diálisis, las muestras se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

Proteasa TEV

Las células congeladas se resuspendieron en 20mM Tris-HCl pH 7.5, 300mM NaCl, 0,3mM DTT y 20% Etilenglicol, en una proporción de 6mL de tampón por gr de célula. Para la ruptura celular se sonicaron durante 6 ciclos de 30 segundos con intervalos de descanso de 1 minuto en el mismo equipo sonicador UP 200 S. La separación de los restos del extracto celular se realizó por centrifugación a 14.000g (Beckman JA21, rotor JA20), el sobrenadante se filtró y se pasó por una columna que contiene la matriz TALON[®] para retener la proteasa por afinidad de la cola de histidinas a cationes de cobalto. La columna se lavó y se eluyó con tampón fosfato potásico 20mM pH 7.5, NaCl 350mM, 500mM Imidazol 0,3mM DTT.

Una vez cuantificada la proteína pura por medida espectrofotométrica (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific), se diluyeron hasta 1 mg/mL con Tris 10mM, EDTA 0,5mM, DTT 0,3mM, 80% glicerol y se congelan a -20°C hasta su uso.

La determinación de la concentración de las diferentes proteínas de este trabajo se llevó a cabo midiendo la absorbancia a 280nm, empleando coeficientes de extinción molar (ϵ) calculados a partir de los residuos de tirosina, empleando el método de Gill y von Hippel (Gill y von Hippel, 1989)

3.14 Purificación de proteínas en Batch; eliminación de cola de histidinas

Tras tratar la proteína purificada con TEV, se realizó una post-purificación de la proteína para la eliminación de la cola de histidinas. Esta purificación se llevó a cabo en tubos de 2mL. Para ello se tomó 600 μ L de matriz TALON™ de resina de afinidad con metal (CLONTECH Laboratories, Inc.) y se centrifugaron a 700g durante 2 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la matriz con 3 volúmenes de 1mL de tampón de lavado. Se agitó suavemente el tubo para mezclar bien los componentes y se centrifugaron a 700g 2 minutos para desechar el sobrenadante. Tras el lavado se adicionó 1mL de enzima TEV y se agitó suavemente en plataforma agitadora. El tiempo de agitación óptimo fue de 4 horas a 4°C en lugar de 20 minutos a temperatura ambiente como indicaba el fabricante de la matriz.

Tras el periodo de agitación de la proteína con la matriz, se centrifugó a 700g durante 5 minutos y se tomó el sobrenadante que fue identificado como “Eluido”. Seguidamente se lavó la matriz con 3 fracciones de 1mL de tampón de lavado, coleccionando todas las fracciones y empleando la última para el análisis mediante electroforesis e identificada como “Lavado”. Finalmente la proteína fue eluida de la matriz mediante la adición de 1,5mL de tampón de elución y posterior centrifugado a 700g 5 minutos. Esta fracción se identificó como “Purificado”.

Las muestras obtenidas fueron conservadas a 4°C hasta su utilización.

3.15 Corte de la proteasa TEV

Por su tratamiento especial en el trabajo se indica de manera independiente el corte de la proteasa TEV.

Los reactivos implicados en el corte fueron:

- Proteína dializada: 890 μ L de concentración 25,43 mg mL⁻¹
 - Proteasa TEV: 1 μ L de concentración 1mg mL⁻¹
 - Tampón Tris-HCl 50mM pH 7,5 0,5mM EDTA: 50 μ L
 - DTT: A la concentración final de 1mM
- Todo ello a un volumen final de 1mL.

Tras la adición de los reactivos las muestras se incubaron durante 2, 6 y 24 horas a 20°C, para realizar posteriormente una electroforesis SDS-PAGE.

3.16 Electroforesis de proteínas

La separación se lleva a cabo a través de un gel espaciador y otro separador. El gel espaciador contiene acrilamida pero en un porcentaje muy bajo, es decir, su poro es muy amplio y ambos, muestra y gel espaciador, están preparados en un tampón de baja fuerza iónica y pH diferente del gel separador que contiene acrilamida necesaria para ejercer el apropiado tamizado molecular. El mayor diámetro de poro del gel espaciador ejerce menor resistencia a la movilidad de las moléculas por lo que se avanzan más rápido que en el gel separador.

Las masas de las proteínas pueden determinarse midiendo la movilidad de las mismas en geles de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS). A pH neutro, en SDS al 0,1% y 2- β -mercaptoetanol 0,1M, las cadenas proteicas pueden unir SDS, se disocian y los puentes disulfuro se rompen por acción del 2- β -mercaptoetanol. Con ello, al disociarse las subunidades de proteína, la estructura secundaria se deshace y los complejos de polipéptidos y SDS adoptan una configuración uniforme y una relación carga/masa idéntica debido a que la cantidad de SDS unida por unidad de peso de proteína es constante. La carga viene entonces determinada por el SDS en

vez de por la carga intrínseca de los aminoácidos. El resultado efectivo es que las proteínas uniformemente cargadas negativamente se desplazarán en el gel según su tamaño molecular debido al tamizado molecular ejercido por el gel (Rodríguez-Vico y col., 1999)

Las electroforesis de proteínas resultan más complejas que las empleadas en ADN en este trabajo. Los geles utilizados para el desarrollo del trabajo fueron geles de poliacrilamida al 15%. La preparación de geles comienza por el lavado de los cristales con acetona y posteriormente con etanol. Seguidamente se toman un cristal espaciador y un cristal pequeño (Figura 11) para colocarlos en el marco de preparación.



Figura 11. Cristales empleados en electroforesis de proteínas.

Una vez introducidos se presiona el cierre y se coloca sobre el soporte de preparación (Figura 12). Una vez instalados sobre el soporte se añaden las disoluciones de los geles.

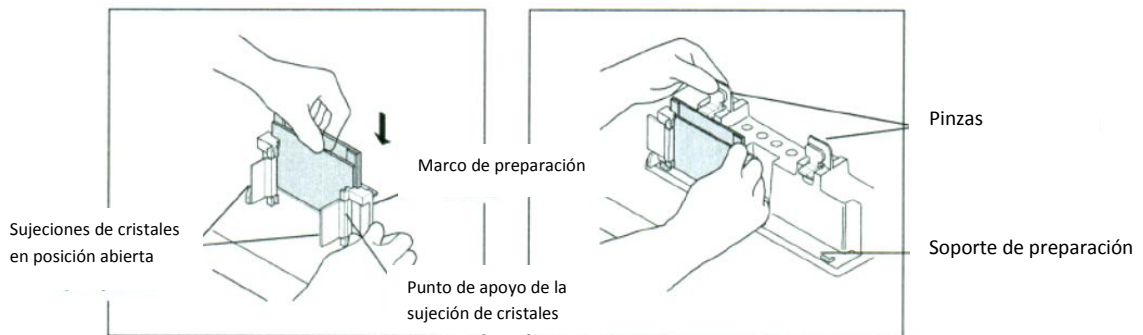


Figura 12. Colocación de los cristales en el soporte de preparación.

Esta técnica implica el uso de dos geles, un gel espaciador o superior y un gel separador o inferior. A la hora de la preparación de los geles se realizará primero el gel separador. La disolución

recién preparada del gel separador será añadida entre los cristales y se deja gelificar. El volumen a adicionar de gel separador será aquel que deje aproximadamente medio centímetro respecto al final del peine. Una vez gelificado el gel separador se añade la otra disolución correspondiente al gel apilador. El volumen a añadir será hasta el final del cristal. Seguidamente se pone un peine de 1mm que contiene 10 pocillos y se deja gelificar. Una vez gelificado se retira el peine y se guarda en tampón de electroforesis 1x a 4°C hasta su uso.

El gel apilador contiene agua, Tris pH 6,8, 40% acrilamida, 2% bis-acrilamida, 10% SDS, TEMED y PSA. Por su parte, el gel separador contiene lo mismo que el apilador con la salvedad de Tris pH 8,8 y una mayor cantidad de PSA. Se ha constatado que la presencia de 2-propanol en los geles separadores, favorece el avance homogéneo del frente de la electroforesis. Por este motivo los geles separadores contendrán 100 µL de 2-propanol por cada gel.

Una vez obtenido el gel, para su utilización se seguirán una serie de pasos (Figura 13). En primer lugar se tomará el gel y se introducirá en el soporte del electrodo. Este soporte viene preparado para portar 2 geles, así que en el caso de utilizar únicamente un gel se empleará un soporte adicional de plástico que compensa la presión del cierre y hace posible emplear un solo gel. Con cuidado de que no se caigan los geles y se rompa el cristal, se pone el soporte del electrodo dentro del marco de sujeción. Se cierran los seguros que aprisionan los cristales y se introduce todo el marco de sujeción dentro de la cubeta. A continuación se llena toda la cubeta, incluida la parte interior entre los cristales, con tampón de electroforesis 1X hasta que el volumen sea ligeramente inferior a la altura de los pocillos.

El acondicionamiento de los pocillos se realiza empleando una pipeta de punta fina con el fin de limpiar de tampón los pocillos. Una vez limpios de tampón todos los pocillos se comienzan a cargar todas las muestras. Una vez cargadas las muestras se termina de llenar la cubeta de tampón de electroforesis. Finalmente se conecta la tapa de la cubeta con la precaución de conectar bien los electrodos. Esta tapa irá conectada a la fuente de alimentación empleada en electroforesis de ADN pero con una potencia mayor, entre 140-160V.

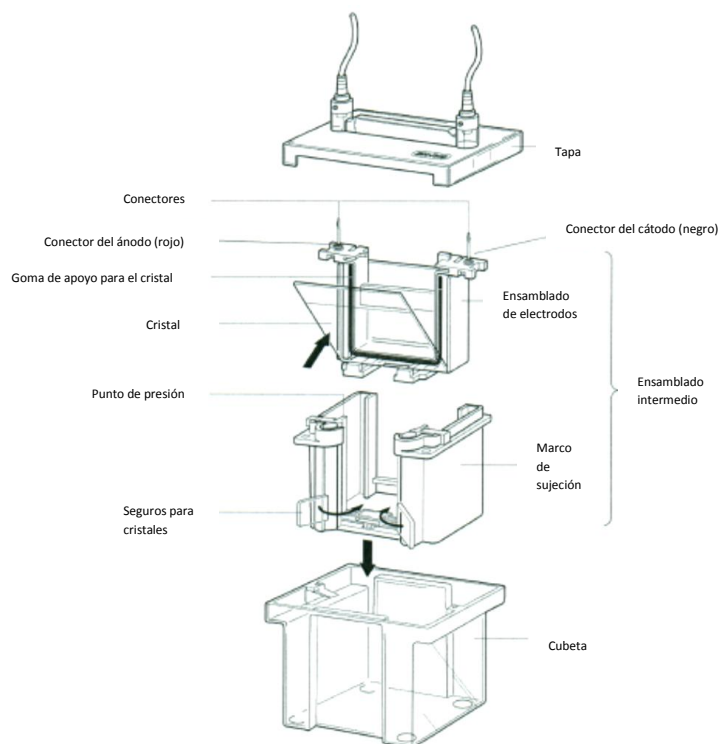


Figura 13. Esquema para el acondicionamiento del sistema de electroforesis de proteínas.

El procedimiento seguido para la preparación de las proteínas en geles SDS-PAGE es el siguiente:

- Se toma 60 μ L de proteína
- Se adiciona 20 μ L de Tampón de carga 4X
- 1 μ L de β -Mercaptoetanol
- Se calientan los tubos a 96°C durante 10 minutos en un termobloque
- Rápidamente se traspasan a un baño de hielo durante 10 minutos

El marcador de peso molecular se preparará de manera análoga pero sin la necesidad de adicionarle tampón de carga, ya que el marcador empleado Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis (GE Healthcare) ya lo lleva.

Tras este breve procedimiento, las muestras pueden ser almacenadas a -20°C siendo sólo de utilidad para la realización de electroforesis.

3.17 Tampones y disoluciones

– *Preparación de medio de cultivo LB:*

- Triptona: 10g/L
- Extracto de levadura: 5g/L
- NaCl: 10g/L

Ajustar a pH 7,2 y autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Una vez atemperado se almacena a 4°C.

Si se desea medio de cultivo LB con antibiótico, se añade éste en función de la cepa de trabajo y de la concentración de antibiótico deseada. En este trabajo sólo se empleará ampicilina, AMP, como antibiótico y a una concentración final de 100 µg/mL a partir de una disolución stock 50 mg/mL.

Una vez preparado el medio LB líquido, las placas de LB con ampicilina se preparan añadiendo 15g/L de agar tipo europeo. Se adiciona el agar a la botella con LB y se autoclava a 121°C durante 20 minutos. Se deja atemperar y se adiciona el antibiótico oportuno. Se homogeniza la disolución y se reparte en placas.

– *Medio NZY⁺*

- NZ amina: 10g/L
- Extracto de levadura: 5g/L
- NaCl: 5g/L
- H₂O a un volumen final de 1 Litro

Ajustar a pH 7,5. Se autoclava la disolución a 121°C 20 minutos y se añaden los siguientes reactivos esterilizados y filtrados:

- MgCl₂ 1 M: 12,5 mL
- MgSO₄ 1 M: 12,5 mL
- Glucosa 20% (w/v): 20 mL ó 10 ml 2M de glucosa

- *Medio Terrific:*
 - Tristona: 12 gr/L
 - Extracto de levadura: 24 gr/L
 - Glicerol al 0,4%
 - KH_2PO_4 : 17 mM
 - K_2HPO_4 : 72 mM

- *TAE 1X preparado a partir de una dilución de TAE 50X:*
 - Tris-Base: 242 g/L
 - EDTA: 18,6 g/L
 - Ácido acético glacial: 57,1 mL
 - Ajustar a pH 8,5

- *Tampón de carga de electroforesis ADN:*
 - TAE 1X: 59,9%
 - Glicerina: 40%
 - Azul de bromofenol: 1%

- *Tampón de carga electroforesis de proteínas 4X:*
 - Tris-base: 0,25M
 - SDS: 4%
 - Glicerol: 40%
 - Azul de bromofenol: 0,08%
 - Agua destilada
 - Ajustar a pH 6,8

- *Tampón 10x de electroforesis de proteínas*
 - Tris-Base: 30,30 g/L
 - Glicina: 150 g/L
 - SDS: 10 g/L
 - Ajustar a pH 8,3

– *Tampón de diálisis TEV:*

En la diálisis se realizan 4 cambios de 250mL del siguiente tampón:

- Tris-HCl: 50 mM
 - EDTA: 0,5 mM
 - Agua Milli Q
- Ajustar a pH 7,5.

Tras este proceso, la disolución es filtrada a través de un filtro de 0,22 μm . El último cambio de la diálisis llevará este tampón e incluirá DTT 1mM.

– *Tampón de lavado TALON para proteínas:*

- FNa: 50 mM
 - NaCl: 300 mM
 - Na_3N : 0,02%
- Ajustar a pH 7

– *Tampón de Elución TALON para proteínas:*

- Tris-Base: 2 mM
 - NaCl: 100 mM
 - Imidazol: 150 mM
- Ajustar a pH 8

– *Disolución de teñido gel de electroforesis de proteínas:*

- Brilliant Blue R: 0,1%
- Metanol: 40%
- Ácido acético: 10%
- Agua destilada para un volumen final de 1L

– *Disolución de desteñido gel de electroforesis de proteínas:*

- Metanol: 40%
- Ácido acético: 10%
- Agua destilada para un volumen final de 1L

4. Resultados y discusión

4. Resultados y Discusión

4.1 Diseño de oligonucleótidos

El plásmido de partida sobre el que se va a trabajar y establecer las modificaciones oportunas es pBBM35. Este plásmido es pequeño y presenta pocos sitios de reconocimiento para las enzimas de corte más usuales (Figura 14). Este plásmido presenta el promotor zhaP e incluye además una cola de histidinas para clonar entre los sitios *NdeI*-*Bam*HI (Stumpp y col., 2000). Analizando su estructura vemos sus sitios de reconocimiento para enzimas más comerciarles.

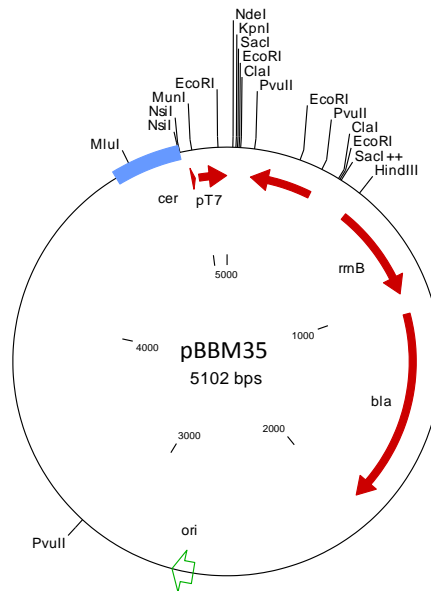


Figura 14. Esquema del plásmido pBBM35.

Dos enzimas que cortan este plásmido en un único punto son *NdeI* y *HindIII*, y por ello fueron elegidas como extremos para clonar nuestro fragmento de interés (Oligo 0) (Figura 15). Como se muestra en la figura, se trata de un oligo de 89 pares de bases (pbs) que será insertado en lugar de un fragmento de 519 pbs del plásmido original.

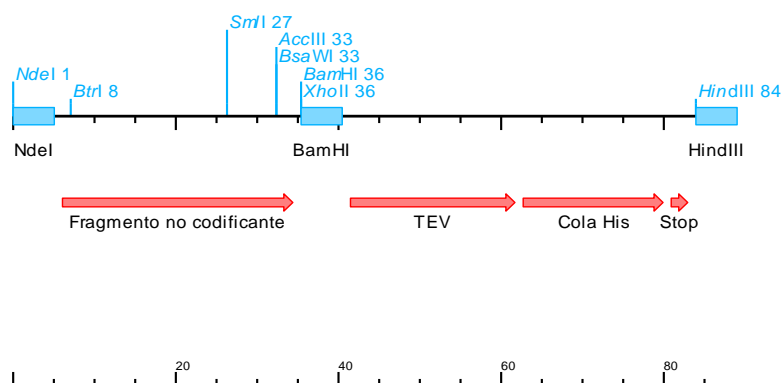


Figura 15. Esquema del oligonucleótido 0 diseñado.

La secuencia de nucleótidos del oligo 0 vendrá dada como se indica a continuación:

5´CATATGTGACGTGAATGAGATAGAGTCTTGAGTCCGGATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATCATCAT
CATCATCATTAAAAGCTT-3´

Como se observa en la Figura 15, el oligo contiene 3 regiones de interés. La primera región se corresponde con una secuencia de 29pbs que no contiene ninguna región reconocible por enzimas de corte, es el llamado “fragmento no codificante”. La segunda es la región “TEV”, sitio de reconocimiento de la TEV proteasa (31pbs). Finalmente una tercera región con una “cola de seis histidinas” que contribuirán a la purificación de la proteína sobreexpresada (18pbs). Todo el oligo fue diseñado atendiendo al diseño de los sitios de corte deseados, el análisis para descartar la existencia de otros sitios de corte distintos fue realizado empleando la herramienta informática Webcutter 2.0.

El tamaño del oligo desarrollado fue de 89 bps, ya que la empresa que los sintetiza, Integrated DNA Technologies Inc., presenta unas tarifas en función de las bases añadidas así como su concentración. En este caso para estar dentro de la tarifa deseada se eligió la opción de diseñar un oligonucleótido de 89 bps.

La cadena complementaria de este oligo 0 sería obtenida mediante amplificación por PCR, en un procedimiento similar al encontrado en bibliografía (Huanting y Naismith, 2009), así como

para obtener un mayor número de copias. Se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar mediante PCR dicho oligo 0. Los oligos diseñados fueron:

Oligonucleótido 1 Temp5

5`-GGGAATTCCATATGTGACGTGAATGAGA-3´

Oligonucleótido 2 Temp3

5´-CCCAAGCTTTTAATGATGATGAT-3´

Estos oligos están compuestos de una parte que hibridará con nuestro fragmento de interés y otros nucleótidos subrayados en los oligos Temp5 y Temp3 que no hibridaran. Estas secuencias añadidas facilitan o permiten la unión de las enzimas de corte utilizadas al ADN. Estas secuencias contienen 7 y 3 nucleótidos, para los oligos 1 y 2 respectivamente, y aumentaban el porcentaje de corte al 90% para un corte de 20 horas a 37°C.

Antes de realizar el pedido de los oligonucleótidos se hizo un análisis del diseño mediante el uso de la aplicación informática DNA-calculator. Los resultados obtenidos para los 3 oligonucleótidos fueron:

– Oligonucleótido 0 (oligo de 89 bps)

5´CATATGTGACGTGAATGAGATAGAGTCTTGAGTCCGGATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATCATCATCATCATCATTAAAAGCTT-3´

Longitud: 89 Masa molecular: 27440.19 T_m: 88.77° C GC: 39.33% Estructura secundaria: Débil, Dímero primario: No

– Oligonucleótido1 Temp5

5`-GGGAATTCCATATGTGACGTGAATGAGA-3´

Longitud: 28 Masa molecular: 8716.52 T_m: 71.65° C GC: 42.86% Estructura secundaria: Débil, Dímero primario: No

– Oligonucleótido2 Temp3

5´-CCCAAGCTTTTAATGATGATGAT-3´

Longitud: 23 Masa molecular: 7037.46 T_m: 62.69° C GC: 34.78% Estructura secundaria: No, Dímero primario: No

Como se aprecia en los resultados obtenidos, todos los oligonucleótidos muestran una baja o nula probabilidad de formar estructuras secundarias. Analizado este dato y la T_m se realizó el pedido de la síntesis de los oligos.

4.2 Preparación de pDANI1

4.2.1 Estrategia 1: clonación directa mediante corte y ligado hasta pDANI1

Una vez recepcionado los oligonucleótidos se amplificaron por PCR aplicando las siguientes rampas de temperatura (Tabla 4):

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	2 minutos
2	30	98°C	20 segundos
		55°C	15 segundos
		68°C	30 segundos
3	1	68°C	5 minutos

Tabla 4. Rampas de temperatura empleadas para la amplificación de los oligonucleótidos.

Al finalizar la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2,67% para ver el producto resultante. La electroforesis se realizó a este elevado porcentaje debido al pequeño tamaño del fragmento amplificado (89pbs). Esta electroforesis dio un resultado positivo, por tanto se extrajo el ADN del gel empleando el kit comercial MicroElute.

Paralelamente a este análisis se realizó la extracción de plásmido pBBM35. Para ello se puso un precultivo de 20mL de células DH5 α que contienen el plásmido y se encontraban almacenadas en placas a 4°C. De este precultivo se hicieron 5 alícuotas de 4mL y se les extrajo el ADN empleando el kit comercial Plasmid Mini Kit I. Las muestras se eluyeron en 30 μ L de Elution

Buffer y las 5 fracciones fueron agrupadas en un único tubo eppendorf. De este tubo se tomaron 2 alícuotas de 5µL para realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1%. En la electroforesis se comprobó que el resultado obtenido era positivo, con lo cual se procedió al corte de pBBM35 y el inserto con las enzimas de restricción adecuadas, *NdeI* y *HindIII*. El corte se realizó empleando tampón 10x B (T 10x B) y 20 horas.

A continuación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y posterior extracción de ADN del gel. Seguidamente se realizó un ligado y transformación en células competentes DH5α. De esta transformación se obtuvieron placas con colinas transformantes.

Analizando las colinas transformadas se comprobó que el corte y ligado no había sido todo lo efectivo que se esperaba, ya que los transformantes del control del ligado eran más numerosos que los ligados producidos.

Aún así se chequeo la eficiencia del ligado mediante una amplificación por PCR. En la electroforesis resultante del análisis de 19 transformantes no se obtuvo un resultado positivo, con lo cual se abandonó esta estrategia.

Ante esta situación se decidió proceder con el trabajo siguiendo otra estrategia alternativa para obtener pDANI1 (Figura 16).

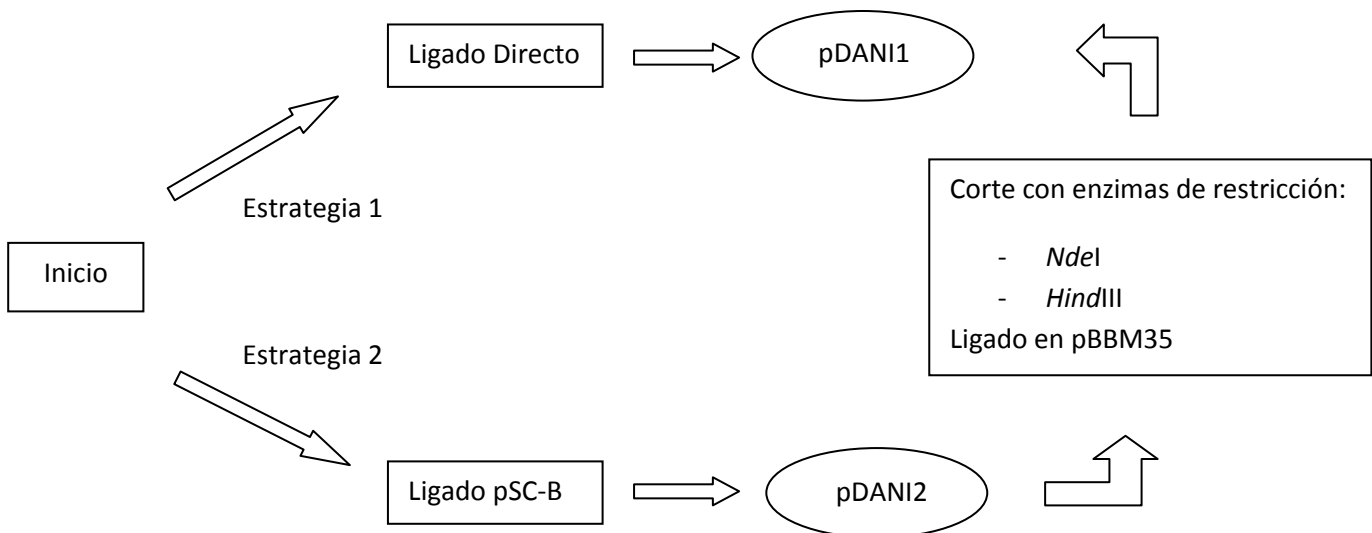
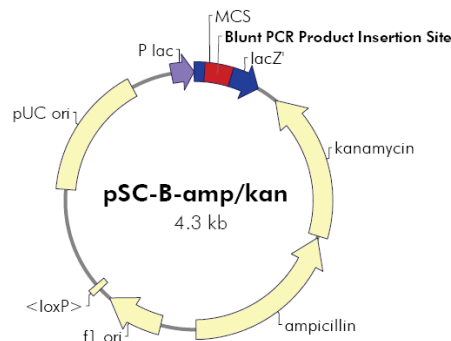


Figura 16. Esquema de estrategias seguidas para obtener pDANI1.

4.2.2 Estrategia 2: Obtención de pDANI1 mediante clonación intermedia en pSC-B (pDANI2)

Esta segunda estrategia consiste en el empleo de vectores Topoisomerasa como vectores de subclonado. El producto de PCR proveniente de la amplificación con los oligos Temp5 y Temp3, fue clonado en el sistema StrataClone Blunt PCR Cloning Kit. Los transformantes obtenidos fueron sometidos a diferentes ensayos de restricción usando las enzimas *NdeI-HindIII* o *EcoRI*. Mientras que la primera pareja de enzimas son las incluidas en el inserto amplificado, el plásmido utilizado pSC-B contiene 2 sitios de restricción propios para enzima de restricción *EcoRI* (Figura 17). Todos los resultados fueron negativos.

Map for the StrataClone Blunt PCR Cloning Vector pSC-B-amp/kan



pSC-B-amp/kan Blunt PCR Cloning Vector PCR Product Insertion Site Region
(sequence shown 4263-4272, 1-252)

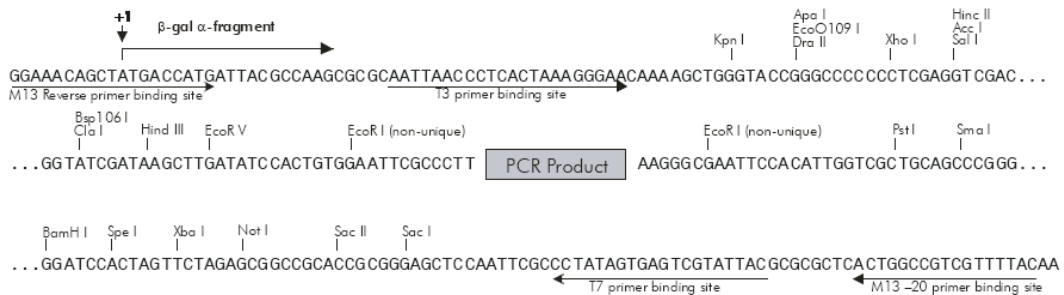


Figura 17. Esquema del vector pSC-B.

Decidimos sustituir el kit utilizado por uno nuevo, repitiendo la misma estrategia descrita anteriormente, obteniendo una serie de transformantes tal y como se puede apreciar en la figura 18.

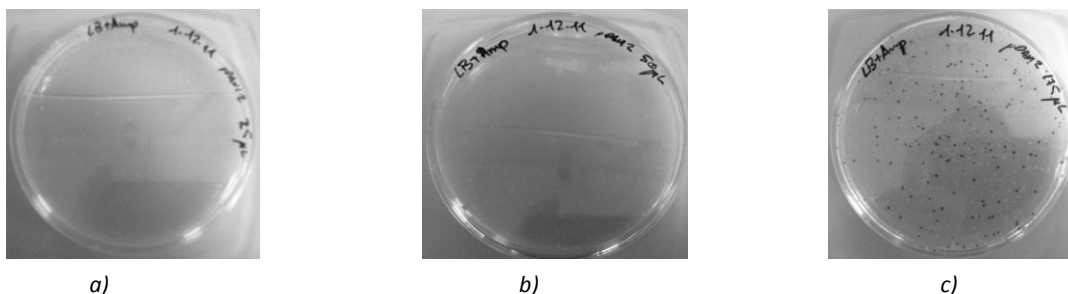


Figura 18. Productos de transformación. Todas las imágenes se corresponden a la misma muestra pero a distinto volumen de células plaqueadas; a) 25 μ L, b) 50 μ L, c) 175 μ L.

Como se aprecia en las imágenes de las placas, la mayor cantidad de transformantes fue obtenida en la placa correspondiente a 175 μ L de células resuspendidas de la transformación (Figura 18. c)). Dado que aquí el número era considerablemente superior y las colonias azules eran más abundantes que en las otras placas, los transformantes empleados para las sucesivas extracciones de ADN fueron obtenidos de esta placa.

En un primer momento se realizó un análisis de 10 transformantes mediante una extracción de ADN empleando el método Birnboim y Doly (Birnboim y Doly, 1979). En la electroforesis de la extracción y la posterior al corte con *EcoRI* comprobamos que con miniprep se obtiene un plásmido más puro y adecuado para el trabajo. Por este motivo se extrae plásmido de 6 de los 10 transformantes anteriores.

Tras un corte con *EcoRI* de 2 horas, se comprobó que 4 de los 6 transformantes contenían el inserto deseado (Figura 19).

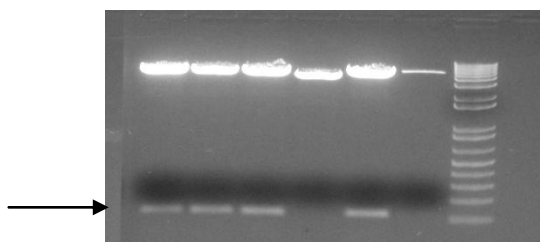


Figura 19. Electroforesis del corte con *EcoRI* de 6 transformantes.

Obtenida la evidencia gráfica de la existencia de pDANI2, el siguiente paso fue cortar el inserto de pDANI2 para ligarlo en pBBM35. Se realizó un corte con *NdeI* y *HindIII* a las muestras 3ª y 5ª de la electroforesis anterior así como a pBBM35. El corte se realizó usando T 10x B e incubando durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se realizó nuevamente una electroforesis (Figura 20).

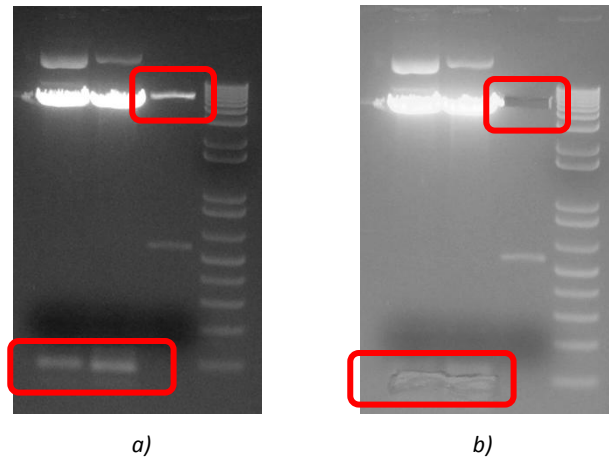


Figura 20.A) Electroforesis del corte *NdeI-HindIII* de 2 muestras de inserto y pBBM35 (3ª calle) .B) Mismo gel que a) tras seccionarse las bandas del inserto y pBBM35..

De esta electroforesis se tomaron las bandas correspondientes para realizar la extracción de ADN del gel, según el kit comercial disponible, y su posterior ligado. Tras el ligado se transformó el producto en células de *E. coli* DH5 α y Strataclone Solopack (Figura 21).

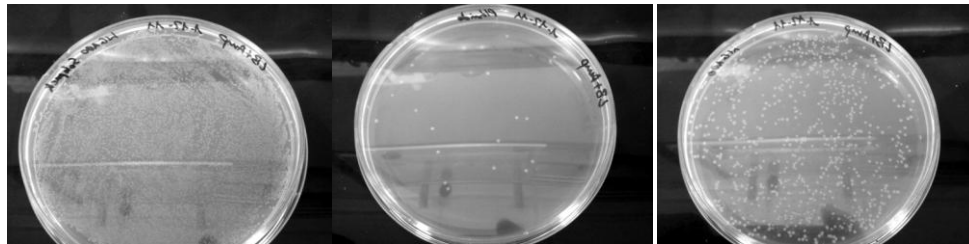


Figura 21. Colonias transformadas. De izquierda a derecha: Ligado SoloPack, Control del plásmido y Ligado.

secuencias confirmó la presencia de inserto en la muestra. Sin embargo, se observó que el inserto ligado no era idéntico al diseñado inicialmente, suministrado por la empresa IDT. La falta de 3 nucleótidos (remarcados) afecta al sitio de reconocimiento *Bam*HI, con lo cual no sería posible emplear este plásmido para clonado por carecer del sitio de reconocimiento para *Bam*HI. Por ese motivo se decidió diseñar pDANI3.

```
oligo      -----CATATGTGACGTGAATGAGATAG
pDANI1     ACTGGTCGTAATGAACAATTCTTAAGAAGGAGATACATATGTGACGTGAATGAGATAG
          *****

oligo      AGTCTTGAGTCCG GATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATCATCATCATCATTAA
pDANI1     AGTCTTGAGT--- GATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATCATCATCATCATTAA
          *****

oligo      AAGCTT-----
pDANI1     AAGCTNGGCNNTGCGGATANNNNNNNNNNNNNNN
          *****
```

Figura 24. Comparación de la secuenciación parcial del oligo 0 con pDANI1.

4.3 Preparación de pDANI3

Debido a la situación inesperada, tuvimos que plantear una nueva estrategia, ya que la ausencia de 3 nucleótidos sobre el sitio de reconocimiento para la enzima *Bam*HI impide el uso de este plásmido según la hipótesis de partida. Para realizar esta modificación se hizo necesaria una mutagénesis dirigida para insertar las 3 bases que faltaban. Esta técnica implica la necesidad de un diseño de oligonucleótidos en el cual se incluyesen las bases. Los oligonucleótidos empleados para la mutagénesis fueron:

Oligonucleótido Mut 5

5'-GTC TTG AGT CCG GAT CCG AGA-3'

Longitud: 21 Masa molecular: 6391.06 T_m: 67.74° C GC: 57.14% Estructura secundaria: Muy débil, Dímero primario: No

Oligonucleótido Mut 3

5'-TCT CCG ATC CGG ACT CAA GAC-3'

Longitud: 21 Masa molecular: 6391.06 T_m: 67.74° C GC: 57.14% Estructura secundaria: Muy débil, Dímero primario: No

Donde la secuencia subrayada indica las bases que se van a introducir en la secuencia.

Una primera mutagénesis resultó negativa. Tras comprobar que los resultados negativos no se debieron a una mala digestión con *DpnI*, se pensó que el problema podría estar en proceso de la PCR. Analizando el diseño inicial de los oligonucleótidos se comprobó como la T_m era inferior (57°C) a la que temperatura de hibridación que marcaba el kit de mutagénesis y a la cual se realizó la PCR (60°C). Por esta razón se disminuyó la temperatura de hibridación a 55°C, aplicando unas rampas de temperatura de trabajo como el que se indica en la tabla (Tabla 5).

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95°C	2 minutos
2	18	95°C	20 segundos
		55°C	10 segundos
		68°C	2 minutos y 30 segundos
3	1	68°C	5 minutos

Tabla 5. Rampas de temperatura empleadas en la mutagénesis dirigida.

Posteriormente se continuó con el protocolo comercial indicado digiriendo con *DpnI* y transformando en XL 10-Gold. Producto de esta transformación se obtuvieron 2 colonias de transformantes de las que se les extrajo el ADN plasmídico y se les realizó un corte con *EcoRI* y *BamHI*, usando T 10x B, (Figura 25) junto a las muestras de control pDANI1 y pJAVI80 (Martínez-Rodríguez y col. 2012). pJAVI80 contiene una estructura muy similar a pDANI1, siendo de interés el que presente estos mismos sitios de corte. Como consecuencia de un corte con *EcoRI* y *BamHI* se generan una banda de 1283pbs y otra de 4566pbs, ésta última no siendo de gran interés al ser muy similar a las presentadas en pDANI3 tras el corte, 4574pbs.

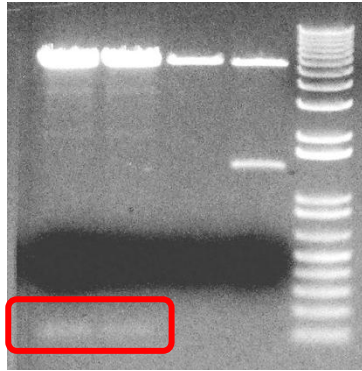


Figura 25. Electroforesis del corte *EcoRI-BamHI* de pDANI3-1, pDANI3-2, pDANI1 y pJAVI80.

Nuevamente, ante la evidencia del corte y para cerciorar un correcto resultado, se enviaron las 2 muestras a secuenciar obteniendo los siguientes resultados (Figura 26):

```

pDANI3-1      AATGAACAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGTGACGTGAATGAGATAGAGTCTTGAG
pDANI3-2      AATGAACAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGTGACGTGAATGAGATAGAGTCTTGAG
oligo         -----CATATGTGACGTGAATGAGATAGAGTCTTGAG
                *****

pDANI3-1      TCCGGATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATCATCATCATCATCATTTAAAAGCTTGGC
pDANI3-2      TCCGGATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATCATCATCATCATCATTTAAAAGCTTGGC
oligo         TCCGGATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATCATCATCATCATCATTTAAAAGCTT---
                *****

pDANI3-1      NNTN-GNCGANAGAGAAANNNNNNNN
pDANI3-2      TGTTTGGCGANAGNNGNNNNNNNN--
oligo         -----
    
```

Figura 26. Comparación de secuencias de pDANI3-1, pDANI3-2 y oligo 0.

Como se observa en la comparación, las 2 muestras analizadas contienen el inserto diseñado. La única diferencia existente entre ambas es el codón de stop. En la primera, pDANI3-1, el triplete de stop esta completo, no así en pDANI3-2 donde existe la delección de un nucleótido. Dado este resultado en la secuenciación, se trabajó en los sucesivos pasos con pDANI3-1.

4.4 Preparación de pDANI4

Una vez obtenido el plásmido pDANI3 el siguiente paso lógico es probarlo en un caso real y ver si efectivamente se cumplen todas las premisas de partida que planteábamos. Para ello, se hizo un chequeo de las proteínas de trabajo presentes en el grupo y cuyos ADN codificantes que pudieran ser cortadas con *NdeI-BamHI* para ser clonado en pDANI3. De entre todas las proteínas se eligió la hidantoín racemasa 2 de *Agrobacterium tumefaciens* C58 (*Athyua* II) (Martínez-Rodríguez y col., 2004)

Una vez elegida la proteína II se refrescó la cepa conteniendo el plásmido pSER22 que albergaba el gen *Athyua* II. Se realizó un cultivo y se hizo una extracción de ADN plasmídico mediante miniprep. Ésta se cortó con *NdeI* y *BamHI* usando tampón 10x B. El corte se prolongó durante 2 horas y media tras las cuales se realizó una electroforesis al 1,5% (Figura 27).

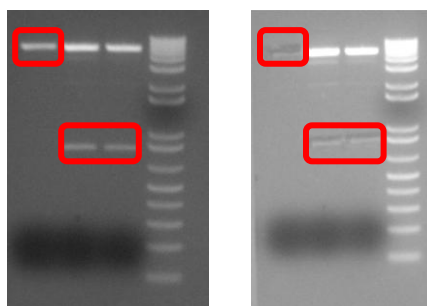


Figura 27. Electroforesis del corte con *NdeI-BamHI* de pDANI3 y gen hidantoín racemasa II de pSER22. Extracción de ADN de gel (derecha).

Tras comprobar un corte efectivo de las enzimas, se extrajo el ADN del gel mediante kit y posterior ligado. En los ligados se establecieron, aparte del control de ligado, y control positivo y negativo, controles de inserto sin ligasa y plásmido abierto sin ligasa. El motivo de contar con más controles es el de asegurar que el producto ligado fuese realmente el ligado que se busca y no productos religados. Los diferentes ligados se usaron para transformar DH5 α (Figura 28).

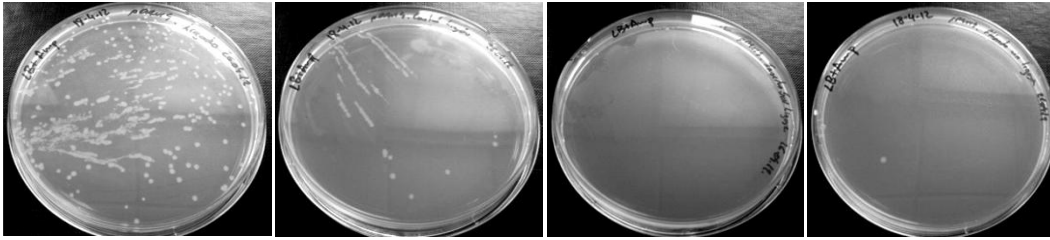


Figura 28. Transformación de pDANI4 en DH5 α . Izq. a der: pDANI4, control de ligado, inserto sin ligasa y plásmido sin ligasa.

En la placa correspondiente al control del ligado (plásmido sin inserto más ligasa) se aprecia un crecimiento sensible de colonias. Aún así la proporción del número de colonias de ligado es muy alto con respecto al control, así que se decidió analizar 10 transformantes. Para ello se puso un cultivo de cada uno de ellos, se les extrajo el ADN plasmídico y se cortaron con *EcoRI*-*Bam*HI usando T 10x B, 2 horas (Figura 29). Como control del corte y de viabilidad del producto se puso una muestra de pDANI3.

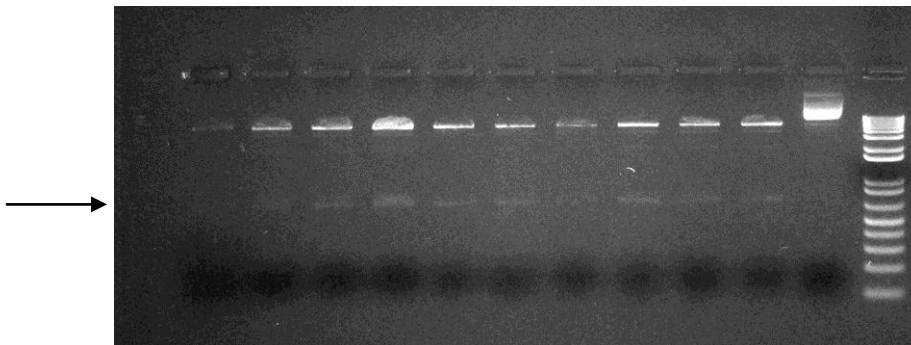


Figura 29. Electroforesis del corte *EcoRI*-*Bam*HI de 10 muestras pDANI4 y pDANI3 (última calle).

Un análisis del corte *EcoRI*-*Bam*HI nos permitiría discernir si el plásmido que tenemos es pDANI3 o pDANI4, ya que pDANI3 daría 2 bandas a 4574 y 91pbs, mientras que pDANI4 daría 3 señales a 4574, 635 y 177pbs. Como se aprecia en la Figura 29, todas las muestras tienen el inserto deseado a excepción, obviamente, de la muestra pDANI3. Con esto se concluye que las muestras podrían tener nuestro gen. Para confirmarlo se envió la muestra 4ª a secuenciar (Figura 30).

AGGNNAGGGCCATGCATGCATCGAAATTAATACGACGAAATTAATACGACTCACTATAGGGCAATTGCGATCACCACAATTCAGCAA
ATTGTGAACATCATCACGTTTCATCTTTCCCTGGTTGCCAATGGCCATTTTCCTGTGAGTAACGAGAAGGTCGCGAATTCAGGCGCTTT
TTAGACTGGTCGTAATGAACAATTCTTAAGAAGGAGATATACATATGCGCATCCTCGTCGTCATCCCAATACCACCCGATCCATGAC
CGCAACGATCGCTGACGCCGCCATGCGGGTGGTCGGCCGGGATACCGAAATCTTGGCGTGACATCCTCCATGGGGCCTGTCTCCAT
CGAAGGTTATTATGACGAGGTTTTTGCCGTGCCGGCCTGTGCTTGAACCTTGCCAAGGCTCCGGCGCTTGGCGTTGACGCGGCCGT
CATCGCTGTTTCGACGATACCGGGCTCGATGCGGGCGCGCATTTCGCGATATACCGGTCATCGGCCTCTGCGAGGCGCGGCTCTC
CGCCACTGCCTTCATCGCGCAGAAATTCACCATCGTGACGACGATGGAGCGTCCCGGTTGCCGCTCGAACACCTGGTTCATCGTTAT
GGCATGTCCGCCCGCTGCAATGTGCGCGCCGCCGATATCCCGTCTGTGCTCGAAGATCCCGCTTGAACGCCCGCAAAGGCTG
CGGCAGGAGATTGCGCTGGCTCTGAAGGAAGACCGGGCGGAGGCAATCGTTCTCGGCTGCGCCGGCATGGCAGACCTGACCGCCG
AGCTGCGCGCCGAATTCGGCGTGCCGGTCGTTGATGGTGTGCGAGCCCGCTTAAACAGGCCGAATCCCTTGTTCCATGGGGCTTT
CCACCGCAAAGCGGTGCTTATGCCAAGCCGGTCGCCAAGCCCTATCACGGCCTGCTGGAGGCATTCGGCCGGACCGCATGACG
GCGATCGAAGGTCGTGGATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATCATCATCATCATTAAAAGCTTGGCANNNTGGNGANNAG
NNNNNNNNNN

Figura 30. Secuenciación parcial de pDANI4. La región subrayada se corresponde con el oligo 0 y la coloreada al gen clonado.

Confirmados los resultados mediante secuenciación, se procedió a la transformación en *E. coli* BL21 del plásmido analizado por secuenciación (pDANI4-4). Se realizó un cultivo de una de las colonias obtenidas de BL21 pDANI4. Tras la sobreexpresión de la cepa se procedió a la purificación en columna de afinidad metálica TALON[®]. En la purificación en columna de la AtHya II, las alícuotas de proteína fueron recolectadas en fracciones de 3mL a las cuales se les midió su DO₂₈₀ (Nanodrop). Los valores de densidad óptica para las 4 fracciones recolectadas fueron (Tabla 6):

Elución 1	3,197
	3,228
Elución 2	5,907
	5,903
Elución 3	0,117
	0,106
Elución 4	0,088
	0,231

Tabla 6. Densidad óptica de las fracciones de proteína purificada.

En investigaciones bibliográficas se comprobó que existe una gran flexibilidad a la hora de realizar el corte con la proteasa TEV. Así se pueden encontrar cortes desde 30 minutos hasta 24 ó 48 horas. Se establecieron 4 cortes a 0, 2, 6 y 24 horas. Análogamente a las horas de trabajo se comprobó que la temperatura de corte también era muy variable y por lo tanto en función de la bibliografía consultada se estableció una temperatura de 20°C (Nallamsetty y col., 2004).

Tras realizar el corte con la proteasa TEV y purificar Batch en lugar de en columna, se realizó una electroforesis SDS-PAGE (Figura 31). En esta purificación se recogieron 3 fracciones (Eluido, Lavado y Purificado). El eluido corresponde con la fracción no unida de la proteína tras mantenerse en contacto con la matriz. El corte con la TEV será efectivo si en la fracción “Eluido” hay muestra. En el caso opuesto, la fracción “Purificado” corresponde con la proteína retenida en la matriz mediante la cola de histidinas.

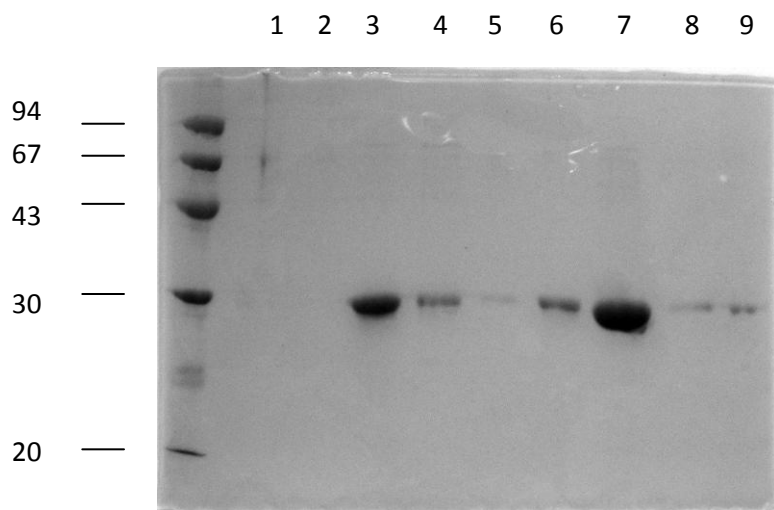


Figura 31. Electroforesis SDS-PAGE de AtHyua II sin corte con la proteasa TEV (0h) o tras el corte con la proteasa TEV 2 y 24h y posterior purificación en Batch. Calles: 1. 0h Eluido; 2. 0h Lavado; 3. 0h Purificado; 4. 2h Eluido; 5. 2h Lavado; 6. 2h Purificado; 7. 24h Eluido; 8. 24h Lavado; 9. 24h Purificado.

Analizando la Figura 31 vemos lo siguiente:

- A tiempo cero, sin corte con la proteasa TEV, no se obtiene AtHyua II eluida (Calle 1), ya que queda retenida en la matriz, por tener cola de histidinas, y es eluida mediante la adición de tampón de elución (Calle 3).
- A tiempo 2 horas, se observa como AtHyua II aparece en las mismas proporciones en las fracciones eluido y purificado, calles 4 y 6, respectivamente. Esto indica, que aunque la proteasa TEV ha separado AtHyua II de la cola de histidinas, su eficiencia ha sido aproximadamente del 50%.
- A tiempo 24 horas se observa que la fracción mayoritaria de AtHyua II aparece en el eluido (calle 7), mientras que en la fracción purificada (calle 9) es muy escasa. Esto indica que el corte con la proteasa TEV ha sido muy efectivo (>90%).

5. Conclusiones

5. Conclusiones

Mediante los experimentos llevados a cabo han quedado probados una serie de puntos clave en el diseño inicial del plásmido.

En primer lugar, el plásmido pDANI3 ha podido construirse de acuerdo al planteamiento inicial, incluyendo sitio de reconocimiento TEV, estableciendo así un punto de partida para el desarrollo de nuevos plásmidos basados en esta estructura inicial y que pueden modificar sus sitios de corte *NdeI* y *BamHI* para clonar otros genes.

En segundo lugar, se ha demostrado la viabilidad de pDANI3 mediante el clonado, sobreexpresión y purificación de la hidantoín racemasa II de *Agrobacterium tumefaciens* C58. Esta proteína ha sido posteriormente tratada con la proteasa TEV para la liberación de la cola de histidinas, obteniendo así la enzima sin la cola de histidina.

6. Bibliografía

6. Bibliografía

Birnboim, H.C., Doly, J., 1979, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, Volume 7 Number 6.

Bornhorst, J.A., Falke, J.J., 2000, Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, Volume 326, Pages. 245-254.

Cabrita, L.D., Weiwen Dai, Stephen P Bottomley, 2006, A family of E. coli expression vector for laboratory scale and high throughput soluble protein production. *BMC Biotechnology*, Volume 6, Article number 12.

Carrington, J.C., Dougherty, W.G., 1967, Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease, *Journal of Virology*. Volume 61, Pages 2540–2548.

Carrington, J.C., Dougherty, W.G., 1988, A viral cleavage site cassette: Identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* Volume 85, Pages 3391–3395.

Dougherty, W.G., Parks, T.D., 1991, Post-translational processing of the tobacco etch virus 49-kDa small nuclear inclusion polyprotein: identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains, *Virology* Volume 183, Pages 449–45.

Gill S.C., von Hippel P.H., 1989, Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*, Volume 182(2), Pages 319-26.

Huanting Liu, James H. Naismith , 2009, A simple and efficient expression and purification system using two newly constructed vectors, , Protein Expression and Purification, Volume 63, Pages 102-111.

Lavallie, E.R., Lu, Z., Diblasio-Smith, E.A., Collins-Racie, L.A., Mccoy, J.M., 2000, Thioredoxin as a fusion partner for production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. Methods in Enzymology. Volume 326, Pages. 322-340.

Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ, Clemente-Jiménez JM, Rodríguez-Vico F., 2004, Biochemical characterization of a novel hydantoin racemase from *Agrobacterium tumefaciens* C58. Biochimie, Volume 86(2), Pages 77-81.

Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ, Clemente-Jiménez JM, Rodríguez-Vico F., 2012, Mutational and structural analysis of L-N-carbamoylase: new insights into a peptidase M20/M25/M40 family member. Journal bacteriology, enviado.

Nallamsetty, S., Kapust, R. B., Tözsér, J., Cherry, S., Tropea, J. E., Copeland, T. D., y Waugh, D. S., 2004, Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease in vivo and in vitro. Protein Expr. Purif. Volume 38, Pages 108-115.

Parks, T.D., Leuther, K.K., Howard, E.D., Johnston, S.A., Dougherty, W.G., 1994, Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase, Anal. Biochem. Volume 216, Pages 413–417.

Perera, J.; Tormo, A.; García, J.M., 2002, Ingeniería Genética. Volumen II: Expresión de DNA en sistemas heterólogos. Editorial Síntesis.

Rodríguez-Vico F, Las Heras-Vázquez FJ, Clemente-Jiménez JM, Rodríguez-Vico F, 1999, Ingeniería de ácidos nucleicos. Servicio de publicaciones de la Universidad de Almería.

Rodríguez-Vico F, Las Heras-Vázquez FJ, Clemente-Jiménez JM, Rodríguez-Vico F, 1999, Prácticas de la asignatura: Bioquímica. Servicio de publicaciones de la Universidad de Almería.

Sachdev, D., Chirgwin, J.M., 1998, Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin. *Protein Expression and Purification*, Volume 12 Issue 1, Pages 122-132.

Smith, D.B., 2000, Generating fusions to glutathione S-transferase for protein studies. *Methods in Enzymology*, Volume 326, Pages 254-270.

Stumpp, T., B. Wilms, and J. Altenbuchner.,2000, Ein neues L-Rhamnose induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. *Biospektrum* Volume 6, Pages 33-36.

Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J., 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. Volume 22, Issue 22, Pages 4673-80.

Plasmidos		Fuente/ referencia
pBBM35	Vector de expresión inducible en ramnosa, Amp ^r	Stumpp et al. 2000
pSC-B-amp/kan	Vector StrataClone blunt PCR Cloning Kit	Stratagene
pJAVI80	pBBM35- <i>NdeI-HindIII</i> L-Carbamilasa <i>Geobacillus estearothermophilus</i> CECT43	Martínez-Rodríguez y col. 2012
pSER22	pBBM35- <i>NdeI-BamHI</i> , hidantoín-racemasa II de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	Martínez-Rodríguez y col. 2004
pDANI1	pBBM35- <i>NdeI-HindIII</i> – Oligo 0	Este trabajo
pDANI2	pSC-B-amp/kan- Oligo 0	Este trabajo
pDANI3	pDANI1- Mutado para obtener sitio <i>BamHI</i>	Este trabajo
pDANI4	pDANI3- <i>NdeI-BamHI</i> , hidantoín racemasa II de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 incluyendo sitio de corte TEV	Este trabajo
PCR primers		Sitios incluidos
Oligo 0	CATATG <u>TGACGTGAATGAGATAGAGTCTTGAGTCCGGATCCGAGAATCTTTATTTTCAGGGCCATCATCATCATCATTAAAAGCTT</u>	Sitio: <i>NdeI</i> , <i>BamHI</i> , TEV His ₆ , STOP , <i>HindIII</i> . <u>Región no</u> <u>codificante</u>
Temp 5	GGGAATTC CATATGTGACGTGAATGAGA	Sitio corte <i>NdeI</i>
Temp 3	CCCAAGCTT TTAATGATGATGAT	Sitio corte <i>HindIII</i>
Mut 5	GTC TTG AGT CCG GAT CCG AGA	Mutagénesis para <i>BamHI</i>
Mut 3	TCT CGG ATC CGG ACT CAA GAC	Mutagénesis para <i>BamHI</i>