



PRODUCCIÓN DE UN KIT DE MARCADORES DE MASA MOLECULAR DE PROTEÍNAS PARA ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Garmendia Sofia

*Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL
Directora: Rivas Maria Gabriela*

Área: Ciencias Biológicas

INTRODUCCIÓN

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) es una de las técnicas más usadas en la caracterización básica de proteínas. Comúnmente incluye la determinación aproximada de la masa molecular, evaluación de pureza de proteínas luego de un proceso de aislamiento, análisis de expresión proteica, identificación de fracciones que contienen la proteína *target* durante procesos de purificación, etc (Laemmli U.K. 1970, Schägger H. 2003, Hames B.D. 1998). La aplicación de esta técnica requiere del uso de marcadores de masa molecular los cuales son mezclas de proteínas de tamaño conocido que dan una idea aproximada de la masa de las proteínas analizadas. Se estima que el costo adicional por el uso de este insumo varía entre 2 y 5 dólares por cada análisis electroforético, valor considerado muy elevado teniendo en cuenta el uso intensivo del mismo en el trabajo rutinario. Ya que este insumo es muy usado en varios de los proyectos que se desarrollan en el laboratorio, surgió la necesidad de pensar en un proyecto para la producción de un kit de marcadores de masa molecular de menor costo con las herramientas con las que se contaban de modo de tener un insumo más económico y de producción propia. El proceso de producción incluye el uso de técnicas de biología molecular, microbiología, purificación y caracterización básica de proteínas.

OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es desarrollar un proceso optimizado para la producción de un marcador de masa molecular de forma de generar un insumo más económico para uso en investigación y/o docencia. Los objetivos específicos dentro de este proyecto son: 1) clonar los genes que expresan las proteínas que serán utilizadas en el kit, 2) optimizar las condiciones de expresión de estas proteínas, aislar las proteínas y confirmar la masa molecular; y optimizar las cantidades necesarias de cada proteína para obtener un patrón electroforético apropiado.

Título del proyecto: Producción, purificación y caracterización bioquímica y molecular de proteínas y compuestos relacionados.
Instrumento: SAT 630890- AFE
Año convocatoria: 2017
Organismo financiador: FBCB-UNL
Director/a: Dra. María Gabriela Rivas (Investigador Adjunto CONICET, Profesor Adjunto, FBCB, UNL)

METODOLOGÍA

Los genes que codifican a las proteínas propuestas para el kit de marcadores de masa molecular fueron clonados en distintos vectores de expresión tal como lo indica la Tabla 1. Siendo que tres de los constructos ya habían sido preparados en nuestro laboratorio, los mismos fueron usados para producir las proteínas correspondientes (Tabla 1, proteínas con *).

Proteína/ Masa molecular (masa molecular en kDa)	Vector de expresión	Enzima de restricción (ER)	[IPTG] (mM)	Tiempo de inducción (h)
Arginina decarboxilasa (85)	pET29 b(+)	NdeI-NotI	0.1	5
ModA-GST*(50)	pET41	LIC*	0.2	2
ModA*(25)	pET46	LIC*	0.2	2
MorP*(15)	pET29 b(+)	XhoI-EcoRI	0.2	5

Tabla 1. Vectores, ER y concentración de inductor utilizados en la producción del kit. * *Ligation Independent Cloning*

Producción de las proteínas de 15 kDa, 25 kDa y 50 kDa.

Se cultivaron células *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con los vectores para expresión de las proteínas de 15 kDa (MorP), 25 kDa (ModA) y 50 kDa (ModA-GST), respectivamente. La expresión fue realizada con la concentración optimizada de IPTG y el tiempo de incubación que se informan en la Tabla 1.

Las células se recolectaron por centrifugación y se lisaron por sonicado. El extracto bruto obtenido fue centrifugado de forma de obtener el extracto soluble.

La purificación se realizó por cromatografía líquida usando una resina IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) equilibrada y la elución de la proteína se realizó con tampón conteniendo imidazol.

La pureza de las proteínas fue analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Las cantidades de cada proteína fueron determinadas colorimétricamente utilizando un kit comercial (Bicinchoninic Acid kit, ThermoScientific) mediante una curva de calibrado realizada con diferentes concentraciones de albúmina, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Producción de la proteína de 85 kDa.

El gen que codifica la proteína Arginina decarboxilasa se amplificó por PCR (Polymerase Chain Reaction). Los amplicones fueron digeridos con enzimas de restricción (Tabla 1) y ligados en vectores de expresión. Células competentes (*E. coli* DH5 α) fueron transformadas con los constructos así preparados de forma de aislar clones.

La optimización de las condiciones de expresión se realizó en células BL21(DE3) y la inducción de la expresión fue evaluada a distintas concentraciones de IPTG y tiempos de inducción. Posteriormente, se realizaron cultivos en mayor escala. La recolección de biomasa y la obtención de extracto bruto y extracto soluble se realizaron como está anteriormente descrito.

La proteína de 85 kDa se localizó en cuerpos de inclusión, por lo tanto, se realizó un paso de solubilización siguiendo el protocolo descrito en el artículo de Ira Palmer *et al.* (Palmer I. *et al* 2012) La pureza de la proteína se verificó por SDS-PAGE.

Pruebas preliminares de mezclas de proteínas

De modo de establecer la proporción indicada de cada proteína en el kit, se realizaron pruebas con diferentes masas de las cuatro proteínas por SDS-PAGE.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

A continuación, se describen los resultados para cada una de las proteínas y para las mezclas analizadas.

Proteína de 15 kDa.

Para esta proteína la cantidad de biomasa obtenida fue de 2 g de células/L de cultivo y el rendimiento de la purificación fue de 85 mg de proteína /L de cultivo. La figura 1 muestra el perfil electroforético de la proteína después del paso por la resina IMAC.

El hecho de que se observe una tenue banda a 30 kDa y que por cromatografía de exclusión molecular observemos solo un pico (resultados no mostrados), demuestra que la proteína forma dímeros.

Proteína de 25 kDa.

El extracto crudo de esta proteína fue sometido a un paso de purificación en una resina IMAC. El rendimiento de la purificación fue de aproximadamente 100 mg/L de cultivo. La figura 2 muestra el perfil electroforético de la proteína aislada.

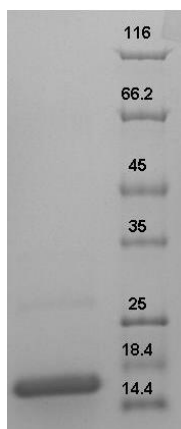


Figura 1. SDS-PAGE (15%) de la proteína de 15 kDa después del paso de purificación por cromatografía IMAC.

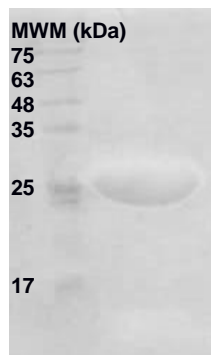


Figura 2. Perfil electroforético (15%) de la proteína de 25 kDa después del paso de purificación por cromatografía IMAC.

Proteína de 50 kDa.

Para esta proteína se observó que dependiendo del tiempo de inducción la misma se podía encontrar soluble o en cuerpos de inclusión. Siendo que habíamos optimizado un protocolo de solubilización, el mismo fue aplicado para la fracción insoluble de esta proteína obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 3. En el caso de que la proteína se encontrara en la fracción soluble se requieren dos pasos de purificación en una resina IMAC.

Proteína de 85 kDa.

La localización de esta proteína fue en cuerpos de inclusión por lo que se recurrió a un protocolo de solubilización con urea. Se analizó la pureza de la proteína solubilizada de los cuerpos de inclusión (Figura 4) y se concluyó que el método puede establecerse como protocolo de aislamiento de la misma.

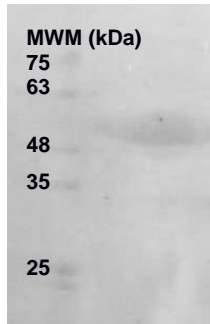


Figura 3. SDS-PAGE (12%) de la proteína de 50 kDa.

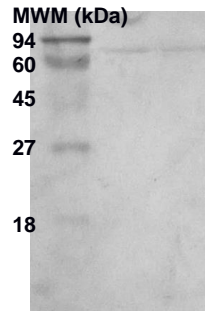


Figura 4. SDS-PAGE (15%) con 15 μ g y 10 μ g de 85 kDa, respectivamente.

Se realizaron ensayos preliminares con diferentes cantidades de las proteínas purificadas en geles de poliacrilamida tomando como referencia las proporciones de un marcador de masa molecular comercial. Los resultados no se muestran debido a que aún no han sido encontradas las cantidades de proteína más conveniente para la mezcla.

A modo de conclusión, se puede decir que hasta el momento se lograron producir y purificar cuatro proteínas del kit que incluyen un rango de 15 a 85 kDa. En cuanto a la purificación, las proteínas de 25 kDa y 50 kDa requirieron dos pasos por una resina IMAC ya que se observaban bandas extras por SDS-PAGE. La proteína de 15 kDa se purificó en un paso, pero el gel de poliacrilamida mostró una banda a 30 kDa. Actualmente se trabaja en la monomerización del dímero con reductores. Para la proteína de 85 kDa fue necesario un proceso de solubilización con urea ya que se encontraba en cuerpos de inclusión, esto permitió obtenerla sin impurezas. Finalmente, los ensayos preliminares de mezclas de proteínas por SDS-PAGE están en proceso de optimización y se deberá seguir trabajando en esta tarea.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Schägger, H.**, 2003. SDS electrophoresis techniques. in *Membrane Protein Purification and Crystallization. A Practical Guide* 2nd edn. Academic, San Diego, California.
- Hames, B.D.**, 1998. Gel Electrophoresis of proteins: A practical approach. 3rd edn. Oxford New York Tokyo OXFORD UNIVERSITY PRESS.
- Palmer, I. and Wingfield, P.T.**, 2012. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci.* 70(1) 6.3.1-6.3.20.