



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
AREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**

**EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y
DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE UNA
PROTEÍNA SINTÉTICA CON VALOR
NUTRICIO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADA EN NUTRICIÓN
P R E S E N T A
MA. ISABEL SÁNCHEZ CRISÓSTOMO

BAJO LA DIRECCION DEL DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA



PACHUCA, HGO.

DICIEMBRE 2010

Esta tesis fue financiada por PROMEP y llevada a cabo en el Laboratorio de Nutrición Molecular del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, con la asesoría del Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

DEDICATORIAS

A mis Padres, Rafaela Crisóstomo Peña y Eleuterio Sánchez Cruz por ser ellos dos mi árbol principal que me cobijó bajo su sombra dándome la fuerza para seguir y lograr alcanzar esta meta anhelada, que hoy, gracias a Dios conjuntamente con ellos he logrado. Para ustedes este logro, y todos los que me faltan por alcanzar...

A mi esposo Ricardo, quién durante casi 10 años y a pesar de todas las adversidades me ha apoyado y ha sido pieza fundamental en mi desarrollo personal y profesional.

A mis 3 hijitos Ricardo, Benja y Vale, por ser lo más inocente, amoroso y bello que tengo, por ellos quiero ser cada día mejor. Es posible, que un día, por alguna casualidad de la vida, conozcan estas palabras y quieran, sino seguir mis pasos al menos pensarme como un ejemplo. Gracias por existir en mi vida, los amo.

AGRADECIMIENTOS

Son numerosas las personas a las que debo agradecer por ayudarme en el logro de mi carrera, es demasiado poco el decir gracias, pero en el fondo de mi ser eternamente les estaré agradecida.

Porque sé que siempre ha estado a mi lado y que hubo momentos en que no lo quise ver... Gracias a Dios todo poderoso por darme la vida para lograr esta meta aspirada, después de tantos esfuerzos, y caídas que he tenido durante mi formación profesional. Gracias por darme la dicha de tener con vida a mis padres, para compartir con ellos este logro. Gracias por los 3 hijitos que me diste. Gracias mil gracias Dios.

A mis Padres, por su constante amor. Ellos han vivido a mi lado cada momento, cada sentimiento y sin importarles nuestras diferencias ni mis fallas me han apoyado y, por eso, no me cansaré nunca de expresarles hoy, mañana y siempre, pase lo que pase, que los amo con todo mi corazón.

A mi esposo, por brindarme su inmenso amor, y sobre todo tenerme mucha comprensión y paciencia durante estos años de nuestra vida compartida. Mil gracias, por la familia que tenemos, no sé lo que vaya a pasar mañana, lo que importa es que hoy estamos juntos.

A mi hermano Miguel, porque siempre fue el buen ejemplo del hermano mayor. Nunca olvidaré todos los momentos, juegos y riñas que compartimos cuando fuimos niños e íbamos juntos a la primaria. Y cuando entramos a la secundaria y al CBTis, siempre te admiré y quise superar tus calificaciones, y ya ves, nunca pude. Gracias por todas tus enseñanzas.

A todos mis amigos que formaron parte de mi formación académica, muy especialmente a Karina, que conozco desde la secundaria, y más que mi amiga es como mi hermana, a Yadira, Alejandra y Javier, que también nos une una larga amistad, a Plácido, Ericka, Nelvy, Arianna, y Francisco, que tuve la fortuna de conocer durante la licenciatura. Gracias a todos por su amistad, compañía y por darme las palabras de aliento que en su momento necesite.

A todos mis profesores de la Licenciatura, por ser pilares fundamentales en nuestra formación, en especial al Dr Gabriel Betanzos por aceptarme en su proyecto. Lo admiro, de verdad.

A mi cuñada Marlem y a su mamá, la señora Jacinta, por su ayuda desinteresada y por sus invaluable consejos. Gracias señora, algún día seré como usted.

A mis hijos, gracias, porque siendo tan pequeños, me han enseñado tanto...

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AOAC	Asociación de Análisis Químicos
DEP	Desnutrición Energético- Protéica
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SOC	Medio de cultivo para asegurar la máxima eficiencia de transformación
UV	Radiación ultra violeta

INDICE

FIGURAS Y TABLAS	VI
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
I. MARCO TEÓRICO	1
1. Las proteínas y aminoácidos	1
2. Funciones de las proteínas	3
3. Metabolismo de las proteínas	3
4. Alimentación y nutrición en el mundo	6
5. Alimentación y nutrición en México	6
6. Requerimientos nutricionales	8
7. Importancia de la calidad de las proteínas en la dieta	9
8. Digestibilidad de proteínas	10
9. La biotecnología	13
10. La biotecnología en la nutrición	16
II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	19
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. OBJETIVOS	22
1. Objetivo General	22
2. Objetivos Específicos	22
V. MATERIALES Y METODOS	23
1. MATERIALES	24
2. METODOS	24
2.1 Amplificación del gen sintético	25
2.2 Purificación de ADN del producto de PCR	26
2.3 Clonación del producto de PCR en <i>Escherichia coli</i> .	26
2.4 Extracción de ADN plasmídico por el método de Birnboim y Doly	28

2.5 Análisis de las transformantes por PCR y restricción con HinfI	28
2.6 Análisis de la molécula recombinante por digestión con Hinf I	29
2.7 Expresión de la proteína	30
2.8 Análisis de proteínas	30
2.9 Caracterización por Western Blot	32
2.10 Purificación de proteínas recombinantes en columna de Níquel ácido-nitril-tri-acético (Ni-NTA)	33
2.11 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry	34
2.12 Pruebas de digestibilidad <i>in vitro</i>	35
2.13 Análisis de la secuencia proteica	36
VI. RESULTADOS	37
1. Purificación del gen sintético	37
2. Clonación del gen sintético en el vector	38
3. Determinación de la presencia y orientación del inserto dentro del vector por PCR y por digestión con HinfI	38
4. Expresión de la proteína a nivel piloto en <i>Escherichia coli</i> por inducción con L-arabinosa	40
5. Detección de la proteína por Western Blot	42
6. Purificación de la proteína por columna de Níquel ácido-nitril-tri-acético (Ni-NTA Gibco)	42
7. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	44
8. Determinación de la digestibilidad <i>in vitro</i> de la proteína	45
9. Análisis computacional de la secuencia proteica	45
VII. DISCUSION	47
VIII. CONCLUSIONES	52
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
X. ANEXOS	59

FIGURAS

Figura 1. Fórmula general de los aminoácidos.	1
Figura 2. Desaminación oxidativa.	5
Figura 3. Reacción en cadena de la polimerasa	15
Figura 4. Diseño metodológico del proyecto	23
Figura 5. Mapa genético del plásmido pBAD TOPO®.	25
Figura 6. Amplificación del gen sintético.	37
Figura 7: Purificación del gen sintético	37
Figura 8. Extracción plasmídica después de la clonación	38
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR del gen clonado.	39
Figura 10. Sitios de corte del plásmido pBAD-TOPO.	40
Figura 11: Análisis de la expresión de la proteína por inducción con L-arabinosa por SDS-PAGE teñido por plata:	41
Figura 12: Análisis de la expresión de la proteína por inducción con L-arabinosa por SDS-PAGE teñido por Coomassie:	41
Figura 13: Análisis de la expresión de la proteína por Western Blot:	42
Figura 14. Análisis de las fracciones de lavados por SDS-PAGE al 12%.	43
Figura 15. Análisis de las eluciones por SDS-PAGE al 12%.	43
Figura 16. Análisis de las eluciones E1E2E3 por SDS-PAGE al 12% teñido con plata.	44
Fig 17. Perfil de hidropaticidad de proteína nativa (sin región de epítipo y de his).	46
Fig 18. Perfil de hidropaticidad de proteína nativa con región de epítipo y de his.	46

TABLAS

Tabla 1: Aminoácidos no esenciales y requerimientos de aminoácidos esenciales para un hombre de 70kg de peso	7
Tabla 2. Contenido de aminoácidos esenciales en proteínas de diversos orígenes.	10
Tabla 3. Digestibilidad de las proteínas en varios alimentos.	11
Tabla 4. Indicadores del estado nutricional en menores de 5 años en 2006.	12
Tabla 5. Concentración de proteína de las fracciones eluidas durante la cromatografía	44
Tabla 6. Porcentaje de digestibilidad de proteína de las fracciones eluidas durante la cromatografía	45
Tabla 7. Análisis computacional de la secuencia de la proteína sintética no fusionada y fusionada con el epítipo y cola de histidinas.	45

RESUMEN

En México prevalecen porcentajes altos de desnutrición en las comunidades rurales, situación todavía más acentuada en la población indígena. La desnutrición es un problema complejo causado principalmente por el poco acceso a los alimentos, a los servicios de salud, a la falta de conocimientos y a la diversidad de culturas. Uno de los principales problemas en México es que la gran mayoría de la población no consume los nutrimentos en las cantidades necesarias, especialmente proteínas de fuente animal, las cuales tienen alto contenido de aminoácidos esenciales necesarios para el crecimiento, desarrollo. Esto causa problemas en el desarrollo y crecimiento especialmente en los niños, lo que conduce a patologías como kwashiorkor y marasmo en los casos más severos. Como medida alterna, y sobre todo en países desarrollados, existe interés en la producción de alimentos mediante técnicas de biología molecular. Con base en un trabajo previo realizado en el laboratorio de nutrición Molecular de ICsa, se creó un gen sintético por PCR que codifica para una proteína con alto valor biológico. Sin embargo, no se demostró la expresión de la proteína; por lo que el objetivo de este trabajo fue encontrar las condiciones de expresión y el estudio *in vitro* de la digestibilidad. Los resultados de este trabajo, demuestran que la expresión en *E. coli* ocurre, aunque en pequeñas cantidades detectadas sólo por el ensayo de Western Blot. Al estudiar su digestibilidad *in vitro*, se encontró que la proteína tiene baja digestibilidad (aproximadamente 60%) esto sugiere que la proteína no puede ser usada para nutrición humana. Finalmente, el análisis virtual de hidropaticidad hecho con el algoritmo desarrollado por Kite y Doolittle reveló que es una proteína hidrofílica e inestable con una vida media de 10 horas, lo que puede explicar en parte las cantidades pequeñas de proteína encontradas.

Palabras clave: Desnutrición, técnicas de biología molecular, proteína de alto valor biológico, expresión, digestibilidad.

ABSTRACT

The prevalence of malnutrition in Mexico has high percentages in rural communities, especially in indigenous population. Malnutrition is a complex problem caused mainly by poor access to food, health services, lack of knowledge and cultural diversity. A major problem in Mexico is that the majority of the population doesn't consume sufficient quantities of nutrients, especially animal sources proteins, which are high in essential amino acids indispensable for growth and development. This causes problems in the development and growth mainly in children, leading to diseases such as kwashiorkor and marasmus in severe cases. As an alternative, especially in developed countries, there is a interest in food production by molecular biology techniques. Based on a previous work at Molecular Nutrition Laboratory of ICSa it was created a synthetic gene by PCR that encodes for a protein with high biological value. However, doesn't demonstrated the protein expression, therefore the objective of this study was to find the conditions expression and to study *in vitro* digestibility. The results demonstrate that expression occurred in small amounts in *E.coli*, only detected by the Western Blot assay. About the digestibility *in vitro*, it was found that the protein has low digestibility (approximately 60%), this suggest that the protein cannot be used for human nutrition. Finally, was made virtual analysis of hydropathic by using Kite and Doolittle's algorithm, it revealed that is a hydrophilic and unstable protein with a half life less 10 hours, which may partly explain the small amounts of protein found.

Keywords: Malnutrition, molecular biology techniques, high biological value protein, expression, digestibility.

1. MARCO TEÓRICO

1. LAS PROTEINAS Y AMINOACIDOS

Las proteínas son polímeros complejos de aminoácidos que producen todas las células vivas. Están constituidas por carbono, hidrógeno, oxígeno, azufre y nitrógeno. Existe gran variedad de proteínas con diversas funciones, formas, tamaños y estructuras, pero cada proteína en general está formada por 20 aminoácidos en diversas proporciones. A su vez los aminoácidos son compuestos orgánicos pequeños que tienen un grupo amino, $-NH_2$, un grupo carboxilo, $-COOH$, un átomo de hidrógeno y una cadena lateral R (Figura 1).^(1,2)

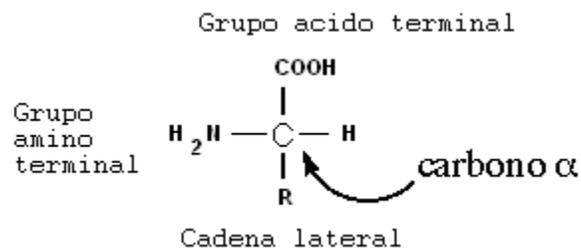


Figura 1. Fórmula general de los aminoácidos. Presentan un grupo radical amino, $-NH_2$, un grupo carboxilo, $COOH$, un átomo de hidrógeno, una cadena lateral R.

Fuente: Thornton, M.R. y Neilson, B.R. 1976.

Los distintos α - aminoácidos se diferencian por sus cadenas laterales. Dichas cadenas laterales se distinguen por sus características químicas dominantes. Estas características incluyen el carácter hidrofóbico o hidrofílico, la naturaleza polar o no polar, y la presencia o ausencia de grupos ionizables.^(1,2)

- a) **Aminoácidos con cadenas laterales alifáticas:** glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina poseen cadenas laterales alifáticas, o alcanos. En general a medida que el grupo R sea más grande el aminoácido se hace más hidrofóbico. Los aminoácidos más hidrofóbicos, como la isoleucina, se encuentran normalmente en el interior de las moléculas proteicas, donde están aislados del agua.⁽³⁾

- b) **Aminoácidos con cadenas laterales que contienen hidroxilo o azufre:** serina, cisteína, treonina y metionina. Debido a que sus cadenas laterales son débilmente polares, son en general más hidrofílicos que sus análogos alifáticos, aunque la metionina es muy hidrofóbica. ⁽³⁾
- c) **Aminoácidos aromáticos:** Estos son 3: fenilalanina, tirosina y triptófano. La fenilalanina, junto con los aminoácidos alifáticos valina, leucina e isoleucina, es uno de los aminoácidos más hidrofóbicos. La tirosina y el triptófano también presentan un carácter ligeramente hidrofóbico, aunque atenuado por algunos grupos polares de sus cadenas laterales. ⁽³⁾
- d) **Aminoácidos básicos:** Histidina, lisina y arginina llevan grupos básicos en sus cadenas laterales. Los aminoácidos básicos son muy polares y en consecuencia suelen hallarse normalmente en las superficies exteriores de las proteínas, donde pueden hidratarse por el entorno acuoso que les rodea. ⁽³⁾
- e) **Aminoácidos ácidos:** El ácido aspártico y el ácido glutámico son los únicos aminoácidos que llevan cargas negativas a pH fisiológico. El ácido aspártico y glutámico están acompañados por sus amidas, la asparagina y la glutamina. A diferencia de sus análogos ácidos, la asparagina y la glutamina tienen cadenas laterales sin carga, aunque son claramente polares. Como los aminoácidos básicos y los ácidos, también son claramente hidrofílicos y tienden a encontrarse en la superficie de las moléculas de proteína, en contacto con el agua que los rodea. ⁽³⁾

Los aminoácidos se combinan entre sí para formar proteínas por medio de enlaces peptídicos. El enlace peptídico es la unión covalente por formación de un enlace amida entre el grupo α - carboxilo de un aminoácido y el α - amino de otro. ⁽⁴⁾ Los productos que se forman a partir de esta unión se llaman péptidos. A la unión de dos aminoácidos se le conoce como dipéptido, a la unión de aproximadamente hasta 14 aminoácidos se conoce como oligopéptido, si la cadena es muy larga se llama polipéptido. ⁽⁴⁾

2. FUNCIONES DE LAS PROTEÍNAS

Las proteínas desempeñan una amplia variedad de funciones que determinan en gran parte la actividad metabólica y morfológica de los seres vivos. ⁽⁵⁾ Dichas funciones pueden agruparse en dos clases: dinámicas y estructurales. De las funciones dinámicas, la más importante es la función catalítica, la cual se lleva a cabo a través de enzimas, todas ellas de naturaleza proteica y que participan en la mayor parte de las reacciones químicas celulares. ⁽⁵⁾

Las proteínas tienen otras múltiples funciones en el metabolismo, como la regulación a través de hormonas de naturaleza proteica. Las proteínas plasmáticas son fundamentales en la regulación de la presión coloidosmótica y en el mantenimiento del equilibrio hidroelectrolítico, como la albúmina. El carácter anfotérico de las proteínas se refiere a la capacidad que éstas tienen para captar o liberar hidrogeniones del medio que los contiene, regulando así el equilibrio ácido-base de los líquidos corporales. ⁽⁵⁾

Existen además proteínas con función protectora como las inmunoglobulinas, en las que radica la respuesta inmune. Otras participan en los mecanismos de reconocimiento como es el caso de los receptores membranales o citosólicos. ⁽⁵⁾

Algunas otras tienen función estructural, tal es el caso, entre otras, de la colágena que interviene en la estructura del tejido conectivo, y la queratina, que forma parte de la piel y sus anexos. ⁽⁵⁾

3. METABOLISMO DE LAS PROTEÍNAS

La digestión de las proteínas se inicia en el estómago inmediatamente después de la ingestión. Las secreciones gástricas incluyen ácido clorhídrico (pH entre 1 y 2) y pepsina. El ácido desnatura las proteínas, provocando su desdoblamiento y rompiendo los enlaces que constituyen las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria. El desdoblamiento expone los enlaces peptídicos a la enzima gástrica de tipo proteolítico, pepsina que se secreta como

el precursor inactivo pepsinógeno sobre el cual actúa el ácido clorhídrico y forma la pepsina. Ésta actúa específicamente en los enlaces peptídicos entre los aminoácidos que contienen un anillo aromático o un ácido carboxílico en su grupo R y rompe las proteínas formando polipéptidos más cortos. A medida que los polipéptidos pasan al intestino delgado, el pH cambia de ácido a básico y la pepsina se inactiva. El páncreas secreta los zimógenos (precursores inactivos o proenzimas) denominados tripsinógeno, quimiotripsinógeno, proelastasa y procarboxipeptidasa al intestino delgado, en donde se transforman en sus formas más activas. La enterocinasa que secreta el intestino activa el tripsinógeno, el cual se transforma en tripsina. Ésta a su vez activa más tripsinógeno, quimiotripsinógeno, proelastasa y procarboxipeptidasa. La tripsina actúa sobre los enlaces peptídicos entre los aminoácidos con grupos R básicos. La quimiotripsina rompe los enlaces peptídicos entre aminoácidos que tienen grupos R neutros, mientras que la elastasa actúa en los enlaces entre los aminoácidos pequeños, como glicina, alanina y serina. La carboxipeptidasa ataca el aminoácido terminal carboxílico liberando un aminoácido a la vez. El intestino delgado secreta aminopeptidasa, que actúa sobre el extremo amino terminal para liberar aminoácidos libres únicos. La digestión termina cuando los aminoácidos libres se absorben a través de la pared intestinal. Un proceso que requiere transporte activo y utiliza energía. ⁽⁴⁾

Todos los diferentes aminoácidos circulan en la sangre y en el líquido extracelular en cantidades pequeñas. Su concentración total es de alrededor de 30 mg por cada 100 mL de líquido. Las células absorben con rapidez a los aminoácidos en cuanto entran en contacto con ellas. ⁽⁴⁾

El hígado actúa como amortiguador de los aminoácidos. Cuando la concentración sanguínea de aminoácidos se eleva, las células hepáticas absorben una gran proporción de los mismos y los puede almacenar de manera temporal, tal vez combinados entre sí para formar moléculas proteínicas pequeñas. Cuando la concentración de aminoácidos de la sangre se vuelve menor que lo normal, los aminoácidos almacenados pasan de nuevo desde las células hepáticas hacia la sangre para que se empleen según se requieran en cualquier sitio del cuerpo. ⁽⁴⁾

En un proceso similar a la digestión, las proteínas de las células vivas se degradan constantemente y se *sintetizan de novo*. Este proceso se denomina recambio de proteínas. Para el recambio proteico se utiliza de 1 a 2% de las proteínas totales del organismo diariamente. Se observan tasas más altas de recambio en lactantes y durante los periodos de desarrollo acelerado. Las proteínas individuales experimentan recambio a diferentes tasas. La tasa de degradación se denomina vida media (el tiempo necesario para reducir la concentración a la mitad si no se producen nuevas proteínas). Muchas proteínas experimentan recambio en las células en las cuales se encuentran. Las proteínas plasmáticas se enlazan con receptores específicos en las células hepáticas, penetran al interior y sufren degradación. Las enzimas tienen vida media muy corta, mientras que las proteínas del tejido muscular y otras proteínas estructurales tienen vidas medias prolongadas. La peptidasa y las proteasas del interior de las células descomponen las proteínas. El exceso de aminoácidos que se consume en la dieta o se produce durante el recambio de proteínas (los que no se utilizan para formar proteínas) sufre eliminación del grupo amino mediante transaminasas específicas por cada par de aminoácido y alfa-cetoácido (Figura 2).

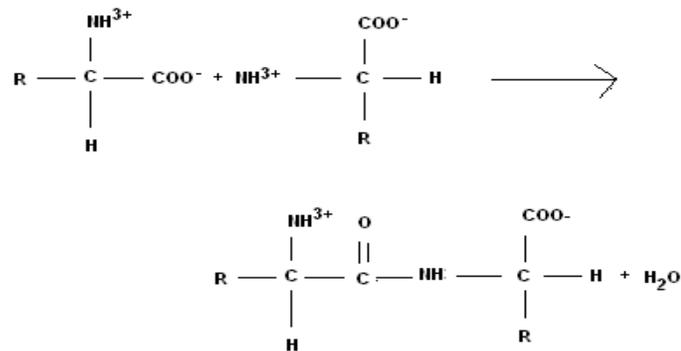


Figura 2. Desaminación oxidativa. Para cada par de aminoácidos, se produce amoníaco, que finalmente es transformado a urea en el hígado

Fuente: Thornton, M.R. y Neilson, B.R. 1976.

El amoníaco que se produce por la desaminación oxidativa se transforma en urea en el hígado y posteriormente los riñones la excretan. Así, la urea es el producto final del catabolismo de las proteínas. ⁽⁴⁾

4. ALIMENTACIÓN Y NUTRICIÓN EN EL MUNDO

Según estimaciones, de 1996-1998 hay 826 millones de personas desnutridas, 792 millones en el mundo en desarrollo y 34 millones en el desarrollado. ⁽⁶⁾

Esto significa que en toda sociedad, existen niños con hambre, madres con falta de peso que dan a luz a niños enfermizos, y adultos que padecen hambre crónica y carecen de recursos para mantener a sus familias por encima del nivel de subsistencia. ⁽⁶⁾

El hambre generalizada constituye un obstáculo para el desarrollo, ya que impide el crecimiento económico nacional y mantiene a millones de personas en la pobreza. Y es precisamente la falta de ingresos económicos suficientes lo que impide a la población urbana y rural obtener la diversidad de alimentos necesaria para una dieta adecuada. ⁽⁶⁾ Esto contribuye al incremento de las tasas de morbilidad y mortalidad, disminuye el promedio de vida, además, tiene efectos adversos sobre el crecimiento, desarrollo y capacidad de aprendizaje, en infantes y niños. ⁽⁷⁾

5. ALIMENTACION Y NUTRICIÓN EN MÉXICO

La desnutrición infantil en México por deficiencia de proteínas

La desnutrición es un estado patológico inespecífico sistémico y potencialmente reversible. Este se origina como resultado de la deficiente incorporación de los nutrimentos a las células de los organismos. La desnutrición se manifiesta en diversos grados de intensidad y variadas manifestaciones clínicas de acuerdo con factores ecológicos,⁽⁸⁾ debido a que, si aunado a la desnutrición existe un pobre saneamiento del medio, contaminación del aire y agua, se aumenta los riesgos de propagación de enfermedades gastrointestinales, que merma más aún el estado nutricional y si a esto se añade la poca accesibilidad a

los alimentos por factores ambientales como la erosión del suelo e incluso la superpoblación el problema de desnutrición es todavía mayor.

La incorporación deficiente de nutrientes, se debe a falta de ingestión, aumento de los requerimientos, gasto excesivo y a la combinación de los tres factores anteriores. ⁽⁸⁾

La prevalencia de la DEP se ha calculado para diversas regiones del mundo entre el 0.5% y el 7% de la población menor de 5 años. ⁽⁹⁾

Cuando se habla de la magnitud de la desnutrición en un país, en realidad se alude a la prevalencia de la desnutrición en la infancia, en especial entre los menores de cinco años, que es el grupo más vulnerable. ⁽⁸⁾ La desnutrición, cuando ocurre en la infancia, constituye todavía un problema más serio de salud pública en cualquier país. ⁽⁸⁾

La prevalencia de DEP en México es alta, como lo demostró la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en 2006 (Tabla 1).⁽¹⁰⁾

Tabla 1. Indicadores del estado nutricional en menores de 5 años en 2006.

Indicador	%
Bajo Peso	5
Estatura baja o desmedro	12.7
Bajo peso para la estatura (emaciación)	1.6

Fuente: Instituto Nacional de Salud Pública y Secretaría de Salud. 2006.

La DEP es causa de morbilidad y mortalidad en los menores de 5 años de edad. Las formas leve y moderada son las que más prevalecen en México, y deben ser prevenidas, detectadas y tratadas en forma oportuna. Aunque es menor la prevalencia de las formas graves, su mortalidad es muy alta y trae como consecuencia secuelas importantes a largo plazo. ⁽⁸⁾

Situación alimentaria en México

Gran parte de la dieta mexicana se basa de principalmente en el consumo de maíz (ingerido sobre todo como tortilla nixtamalizada), frijol y chile. Se sabe

que, contrariamente a lo que se piensa, la dieta mexicana promedio es equilibrada y valiosa. Por lo que resulta más valiosa y recomendable comparada con la de los países de gran desarrollo industrial, siempre y cuando se dé en condiciones de suficiencia y variedad. En la dieta tradicional mexicana predominan los cereales y leguminosas, una gran variedad de frutas y verduras y presencia de pequeñas cantidades de alimentos de origen animal. Sin embargo existe una gran diversidad de factores dietéticos entre los distintos núcleos de población, lo que ocasiona que la alimentación no siempre se dé en condiciones de suficiencia y diversidad, por ejemplo: las dietas de la población marginada aportan cantidades insuficientes de proteínas y de algunas vitaminas y minerales. Las deficiencias de estos nutrimentos se presentan con mayor frecuencia y gravedad en el medio rural. ⁽⁸⁾

6. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

Los criterios y procedimientos para evaluar las necesidades nutricionales humanas han derivado principalmente de recomendaciones formuladas por organizaciones internacionales como la FAO y la OMS. ⁽¹¹⁾ Los informes FAO/OMS de 1973 y 1985, recomendaron que la necesidad de un grupo está representada por el promedio de las necesidades de los individuos que lo integran y que dichas necesidades deben determinarse a partir de las estimaciones del gasto de energía. Por lo que los requerimientos de un individuo estándar constituyen el punto de referencia para evaluar las necesidades energéticas de la población en general. ⁽¹¹⁾

Requerimientos de proteínas y aminoácidos

El nombre proteína proviene de la palabra griega *proteios*, que significa lo primero, dado que constituyen gran parte del cuerpo, lo mantienen como unidad y lo hacen funcionar. ⁽¹²⁾ Para ello es indispensable ingerir en la dieta una cantidad mínima de proteína para asegurar la renovación de las proteínas de los tejidos.

Hoy en día se sugiere que las proteínas deben cubrir entre 10% y 15% del total de las calorías diarias ingeridas. ⁽¹³⁾

Como se mencionó anteriormente las proteínas son polímeros grandes constituidos por unidades de aminoácidos. En el organismo en general existen 20 aminoácidos, nueve de los cuales son esenciales; los otros once son los no esenciales. ⁽¹³⁾ Los aminoácidos esenciales son aquellos que el organismo no puede sintetizar y, por tanto, deben ser obtenidos a partir de la dieta cotidiana. ^(13,14,16) El ser humano requiere una dieta con una composición balanceada de aminoácidos (Tabla 2). Sin embargo se sabe que las proteínas de fuente vegetal son deficientes en al menos uno de los aminoácidos esenciales. ⁽¹⁵⁾

7. IMPORTANCIA DE LA CALIDAD DE LAS PROTEINAS EN LA DIETA

Al consumir diferentes mezclas de alimentos por lo general se logra una complementación adecuada de los aminoácidos, con lo cual se obtiene una proteína de buena calidad. La calidad de una proteína está relacionada con su composición en aminoácidos esenciales y con su digestibilidad. Una proteína que contiene todos los aminoácidos esenciales se denomina proteína de alto valor biológico. ⁽⁸⁾

Las proteínas de origen animal, en particular las del huevo y la leche, contienen aminoácidos en cantidades y proporciones ideales, razón por la cual se les considera proteínas de alta calidad y se les utiliza como referencia para establecer las recomendaciones de este nutrimento. ⁽¹¹⁾

Sin embargo, todos los alimentos contienen proteínas, aunque no en la misma cantidad. El aprovechamiento de una proteína aislada no depende de su origen vegetal o animal sino de la combinación de proteínas, que es la regla en la práctica y conduce a un alto aprovechamiento. Las proteínas de los cereales son generalmente deficientes en lisina, mientras que las leguminosas lo son en metionina y cisteína. Al mezclar cereales y leguminosas opera una corrección de las limitaciones de cada uno ya que los cereales tienen relativo exceso de

metionina y cisteína y las leguminosas tienen cierta abundancia de lisina y triptófano (Tabla 3).⁽¹⁷⁾

Tabla 2: Aminoácidos no esenciales y requerimientos de aminoácidos esenciales para un hombre de 70kg de peso.

Aminoácidos esenciales y requerimientos		Aminoácidos condicionalmente esenciales	Aminoácidos no esenciales
Lisina	1.6	Arginina ¹	Acido glutámico
Triptófano	0.5	Tirosina ²	Acido aspártico
Fenilalanina	2.2	Cisteína ³	Alanina
Metionina	2.2	Glicina ⁴	Prolina
Treonina	1.0	Serina ⁵	Hidroxiprolina
Leucina	2.2		Glutamina
Isoleucina	1.4		Asparagina
Valina	1.6		
Histidina			

¹ Errores congénitos de síntesis de la urea, desnutrición proteica, exceso de producción de amoníaco, ingestión excesiva de lisina, quemaduras, infecciones, diálisis de peritoneo, crecimiento acelerado o sepsis

² Se sintetiza a partir de la fenilalanina

³ Se sintetiza a partir de la metionina

⁴ Esquizofrenia, hiperplasia prostática benigna

⁵ Nefropatía

Fuente: Pacheco, 2006; Laguna y Piña 2002.

8. DIGESTIBILIDAD DE PROTEINAS

La digestibilidad proteica de un alimento se define como la proporción del nitrógeno del mismo que es absorbida tras su digestión. Aunque el contenido en aminoácidos sea el principal indicador de la calidad de la proteína, su verdadera calidad depende también de la extensión en que estos aminoácidos sean utilizados por el organismo. Por ello, la digestibilidad puede afectar a la calidad proteica. En la Tabla 4 se muestran algunos ejemplos de los porcentajes de digestibilidad proteica en diversos alimentos. Como se puede observar, en el caso del huevo que es usado como patrón de referencia para evaluar la calidad proteica

de un alimento por tener un alto contenido de aminoácidos esenciales, es también el alimento con una mayor porcentaje de digestibilidad. ⁽¹⁸⁾

Tabla 3. Contenido de aminoácidos esenciales en proteínas de diversas fuentes.

Aminoácido (mg/g proteína)	Fuente de proteínas.											
	Huevo	Leche	Carne	Pescado	Trigo	Arroz	Maíz	Centeno	Soya	Alubias	Frijol	Cacahuete
Histidina	22	27	34	35	21	21	27	20	30	26	26	27
Isoleucina	54	47	48	48	34	40	34	35	51	41	41	40
Leucina	86	95	81	77	69	77	127	67	82	71	70	74
Lisina	70	78	89	91	23 ^a	34 ^a	25 ^a	32 ^a	68	63	71	39 ^a
Metionina + Cisteína	57	33	40	40	36	49	41	37	33	22 ^b	24 ^b	32
Fenilalanina + Tirosina	93	102	80	76	77	94	85	79	95	69	76	100
Treonina	47	44	46	46	28	34	32 ^b	29 ^b	41	33	36	29 ^b
Triptofano	17	14	12	11	10	11	6 ^b	11	14	8 ^a	9 ^a	11
Valina	66	64	50	61	38	54	45	46	52	46	41	48
Puntuación Química (%) *	100	100	100	100	40	59	43	55	100	73	82	67

* Basada en el patrón de la FAO/OMS. ^a Principal aminoácido limitante. ^b Segundo aminoácido limitante.

Fuente: Fennema, 2000.

Métodos empleados para determinar la digestibilidad de la proteína.

La calidad nutritiva de las proteínas puede valorarse por métodos biológicos, químicos y enzimáticos. ⁽¹⁸⁾

- a) **Métodos biológicos:** Se basan en la ganancia en peso o en la retención de nitrógeno en ensayos con animales experimentales

alimentados con dietas que contengan la proteína a analizar, como control se utiliza una dieta exenta de proteínas. Para valorar la calidad de una proteína suele utilizarse el protocolo recomendado por FAO/OMS. El animal de ensayo habitual es la rata, aunque a veces los ensayos se efectúan con personas. Para asegurar que el consumo de proteínas es menor que las necesidades diarias, se utiliza una dieta que contenga un 10% de proteína en términos de peso seco. En estas condiciones, las proteínas de la dieta son utilizadas al máximo para el crecimiento. Lo común es que el ensayo dure 9 días. Durante cada uno de estos días se tabula la cantidad (grs) de dieta consumida por cada animal y se recogen la orina y las heces, que se someten a análisis de su riqueza en nitrógeno. ⁽¹⁸⁾

Tabla 4. Digestibilidad de las proteínas en varios alimentos.

Fuente de proteína.	% de Digestibilidad.
Huevos	97
Leche, queso	95
Pescado, carne	94
Maíz	85
Arroz (pulido)	88
Trigo (entero)	86
Harina de trigo (blanca)	96
Gluten de trigo	99
Harina de avena	86
Mijo	79
Frijoles	88
Cacahuates	94
Harina de soya	86
Alubias	78
Maíz, cereal	70
Trigo, cereal	77
Arroz, cereal	75

Fuente: FAO, 1993.

- b) **Métodos químicos:** Se puede calcular el valor nutritivo de una proteína determinando su contenido en aminoácidos y comparando su riqueza en aminoácidos esenciales con la de una proteína patrón ideal. ⁽¹⁸⁾
- c) **Métodos enzimáticos:** A veces se utilizan métodos enzimáticos *in vitro* para medir la digestibilidad y liberación de aminoácidos esenciales. El método consiste en digerir las proteínas con tres enzimas (tripsina pancreática, quimiotripsina y peptidasa intestinal porcina), en condiciones de ensayo normalizadas. Estos métodos, además de proporcionar información sobre la digestibilidad de una determinada proteína, permiten detectar los cambios de la calidad nutritiva de las proteínas inducidas por el procesado. ⁽¹⁸⁾

9. LA BIOTECNOLOGIA

La Federación Europea de biotecnología define a esta disciplina como la aplicación conjunta de la bioquímica, la microbiología y la ingeniería genética para obtener una serie de productos de importancia práctica mediante la utilización de cultivos de microorganismos, tejidos o sus componentes. ⁽¹⁹⁾ Existen dos tipos de biotecnología:

Biotecnología tradicional: En esta, se incluyen los principales productos de la industria como son: alimentos, ingredientes, saborizantes o edulcorantes, alcohol industrial, antibióticos y ácido cítrico. ⁽²⁰⁾

Biotecnología nueva: Supone el uso de las técnicas más novedosas de la ingeniería genética y la fusión celular para obtener organismos capaces de formar productos nuevos aplicados a la salud principalmente. ⁽²⁰⁾

Aunque hasta la fecha la mayor parte de los productos microbianos se derivan de la biotecnología microbiana tradicional, una creciente cantidad de productos se están fabricando mediante organismos modificados por ingeniería genética. ⁽²¹⁾

La ingeniería genética en la biotecnología

La elucidación en 1953 de la estructura del ADN revolucionó la biología molecular al derivarse una gran cantidad de técnicas denominadas en su conjunto tecnología del ADN recombinante que han permitido entender mejor la función de los genes en un organismo. Tras el descubrimiento en 1970 de las endonucleasas de restricción por Werner Arber y Hamilton Smith, ⁽²²⁾ es posible manipular la molécula de tal forma que ésta puede cortarse específicamente con estas enzimas y los fragmentos generados pueden transferirse de un organismo a otro. Más adelante, entre 1980 y 1986 se manipularon genéticamente las bacterias y las plantas con varios propósitos en la producción de hormonas, factores de crecimiento y mejoramiento de variedades de tabaco. ⁽⁸⁾

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Entre 1983 y 1985, Kary Mullis desarrolló una nueva técnica que hizo posible la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de ADN sin clonarlo, se le conoce como reacción en cadena de la polimerasa, la cual se basa en tres pasos (Figura 3):

Fase 1: Desnaturalización: mediante calentamiento del ADN blanco que contienen la secuencia que va a amplificarse, para separar sus cadenas complementarias.

Fase 2: Extensión: se añade un exceso de cebadores y se hace descender la temperatura, de forma que los cebadores puedan formar puentes de hidrógeno con el ADN a ambos lados de la secuencia diana. Debido a que existe un exceso

de cebadores, las cadenas del ADN diana siempre se asociarán a los cebadores en vez de entre sí.

Fase 3: Extensión final: se añaden a la mezcla de reacción nucleósidos trifosfato y una ADN polimerasa. La ADN polimerasa extiende los cebadores y sintetiza copias de la secuencia diana de ADN. Al final de un ciclo, las secuencia diana de ambas cadenas han sido copiadas. Cuando se repite el ciclo de tres fases, las cuatro cadenas del primer ciclo se copian para producir ocho fragmentos. El tercer ciclo genera 16 productos. En teoría, 20 ciclos producirán aproximadamente un millón de copias de la secuencia diana de ADN; 30 ciclos generarán alrededor de mil millones de copias. ⁽²³⁾

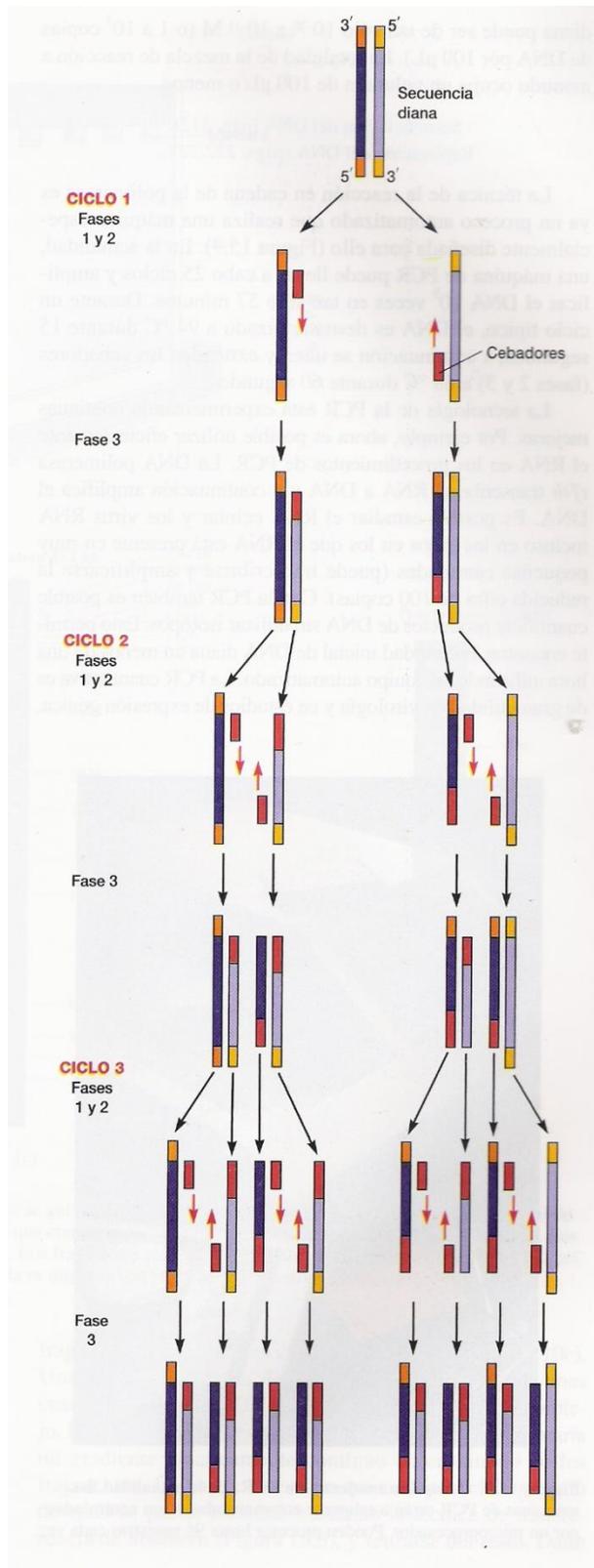


Figura 3. Reacción en cadena de la polimerasa. Basada en 3 fases, utilizando cebadores y una ADN polimerasa esta técnica sintetiza grandes cantidades de una determinada secuencia de ADN

Fuente: Prescott, 1999.

10. LA BIOTECNOLOGÍA EN LA NUTRICIÓN

La aplicación de la biotecnología moderna a la producción alimentaria presenta nuevas oportunidades además de desafíos para la salud y el desarrollo humano. La biotecnología moderna permite que plantas, animales y microorganismos sean genéticamente modificados con características novedosas. (24)

La inclusión de rasgos novedosos ofrece un aumento de la productividad agrícola, mejoramiento de la calidad y características de nutrición y procesamiento, lo que puede contribuir en forma directa a mejorar la salud y el desarrollo humano. Desde la perspectiva de la salud, también puede haber beneficios indirectos, como la reducción del uso de sustancias químicas para la agricultura, un aumento de la producción agrícola, la sustentabilidad de los cultivos y la seguridad alimentaria, particularmente en los países en desarrollo. (24)

El desarrollo de técnicas de biología molecular es una poderosa herramienta de la biología moderna, su uso podría ayudar a combatir la desnutrición, especialmente en sectores de la población más vulnerables como son los niños y en comunidades donde el factor predominante es la pobreza. (25,26)

Aportaciones de la Biotecnología en la Nutrición.

Al iniciar la década de los noventa se empezó a utilizar la ingeniería genética en la producción de alimentos. Entre las primeras aplicaciones estuvieron las enzimas y hormonas obtenidas a partir de bacterias transgénicas para la industria de los quesos y el incremento en la producción de leche de vaca, respectivamente. (8)

En 1994 entró al mercado mundial un tipo de jitomate que conservó la firmeza durante más tiempo que el tradicional. Esto se logró a través de la modificación de los genes de la misma planta para hacer más lento el proceso de maduración. (8)

En los últimos años, la biotecnología ha transformado diversos cultivos importantes en la producción de alimentos con el fin de hacerlos resistentes a plagas. ⁽⁸⁾

Se han logrado insertar uno o más genes de un organismo donante con una característica que el receptor no tiene. En el algodón se insertó el gen de *Bacillus thuringiensis* que produce un cristal de proteína llamada delta endotoxina que es ingerida por el insecto en su fase larvaria provocándole alteraciones gastrointestinales al unirse a los receptores específicos en la mucosa, que finalmente le produce la muerte; es decir, actúa como bioinsecticida; de esta manera se ha disminuído considerablemente el uso de insecticidas. ⁽²⁷⁾ La calabaza y la papaya se han hecho resistentes a ciertas enfermedades. En la papa se insertó el gen de una lisozima aislada del bacteriofago T4 incrementando la resistencia a *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica. ⁽²⁸⁾ El salmón del atlántico con tratamientos de ese tipo (el gen que modula la hormona del crecimiento) adquiere su talla normal en la mitad del tiempo usual. ⁽²⁹⁾ Los tomates *Flavr Savr^{MR}* fueron los primeros tomates o alimentos transgénicos puestos en venta, en el que se inhibe la expresión del gen que normalmente causa la maduración del fruto, por lo tanto permanece firme más tiempo. Esto permite a los productores un periodo de tiempo mas prolongado para la transportación y la oportunidad de que el fruto sufra menores daños durante la cosecha. ⁽²⁹⁾ En la actualidad existen productos en los cuales se ha modificado el contenido de nutrimentos que mejorarán la nutrición humana o animal. ⁽⁸⁾ Uno de los más conocidos es el arroz, en el cual se han hecho modificaciones genéticas para que tenga un elevado nivel de β -caroteno, precursor de la vitamina A (llamado 'arroz dorado'). ⁽³⁰⁾ Otro es el arroz "rico en hierro", debido a que en él se insertó la proteína transportadora de hierro ferritina de la soya. Éste, contiene el doble de hierro que las semillas de arroz no modificado. ⁽³¹⁾ El arroz fue modificado con tres genes que aumentan el almacenamiento de hierro en los granos de arroz y la absorción de hierro en el tracto digestivo. ⁽³²⁾ También, existen importantes esfuerzos para establecer métodos que podrían aumentar el contenido proteico de vegetales básicos como la mandioca, el plátano y la papa. Los resultados de estudios en invernaderos

muestran que estos vegetales tienen 35-45% más proteínas y mejores niveles de aminoácidos esenciales.⁽³³⁾ Por otra parte, con la finalidad de brindar alimentos más saludables, se realizan esfuerzos para aumentar el contenido de almidón de la papa de manera que absorba menos grasa durante la fritura. Con el fin de crear grasas más sanas, la composición de ácidos grasos de la soya y la canola se alteró para producir aceites con niveles menores de grasas saturadas. Finalmente, ya se ha incrementado el contenido de licopeno y luteína del tomate, al igual que las isoflavonas de la soya. Se sabe que estos fitonutrientes mejoran la salud o previenen enfermedades.⁽³⁴⁾

II. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Para dar respuesta a las necesidades de un gran segmento de la población mexicana se han creado políticas y programas relacionados con el consumo de alimentos en México, que han tenido un efecto directo sobre el estado nutricional de las personas. Las intervenciones directas sobre alimentación dirigidas a grupos vulnerables, representan una alternativa de mayor complejidad en su ejecución y frecuentemente su efecto suele ser menor que el esperado. ⁽⁸⁾

En un trabajo previo se creó un gen sintético que codifica para una proteína compuesta por 107 aminoácidos, destacando por su alto contenido en aminoácidos esenciales, es decir de alto valor biológico. ⁽³⁵⁾ El gen se amplificó por PCR y una vez comprobada su amplificación y su secuencia nucleotídica se intentó realizar la expresión a nivel laboratorio de la proteína en los microorganismos *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. Los análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida teñidos por azul de Coomassie y por tinción de plata no demostraron la presencia de la proteína. ⁽³⁵⁾ Por lo que se pensó básicamente en tres situaciones: a) Que el inserto posiblemente no está orientado correctamente dentro del vector de expresión y por lo tanto no existe expresión, b) Que en caso de que la proteína se exprese, ésta se agregue y no pueda disolverse y c) que el producto de expresión se da a niveles bajo indetectables por los métodos empleados. Por lo que en el presente trabajo se emplearon técnicas más sensibles para comprobar la presencia del inserto, así como la purificación y la digestibilidad *in vitro*.

Una vía alterna en conjunto con los problemas gubernamentales para subsanar los problemas graves de desnutrición, es el empleo y aplicación de la biotecnología en los programas alimentarios, mediante la producción de alimentos con características únicas especialmente con alto valor biológico. Sin embargo, como se mencionó, la expresión de la proteína no fue comprobada.

III. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas son macromoléculas de vital importancia para el organismo, debido a que desempeñan funciones específicas. Por ello deben ser incluídas en la alimentación en cantidades adecuadas. El consumo deficiente de proteínas ocasiona disminución de las reservas del organismo, que se manifiesta en diversos estados de desnutrición, siendo más afectados los niños menores de 5 años. Se calcula que la prevalencia de desnutrición en este grupo de edad y de acuerdo al indicador talla para la edad es de 12.7%.

Como medida alterna y sobretodo en países desarrollados existe un gran interés en la producción de alimentos genéticamente modificados que han sido aceptados debido a que hasta ahora ninguno de ellos ha tenido efectos tóxicos en el humano. ^(8,36) La biotecnología, por medio de técnicas de ingeniería genética, transfiere segmentos de ADN e incluso genes completos a organismos. Como resultado de esta transferencia, el organismo puede contar con propiedades que no poseía en forma natural. Por ejemplo se han creado vegetales resistentes a plagas, herbicidas, insecticidas y enfermedades propias de la planta; en algunos se ha alargado el proceso de maduración como es el caso de los jitomates *Flavr Savr^{MR}*. En el caso de los productos cárnicos como el salmón, se ha modificado el gen que modula la hormona del crecimiento para que estos adquieran el peso y tamaño en menor tiempo.

Todos los alimentos existentes, producidos usando la biotecnología del ADN recombinante han experimentado un riguroso análisis de inocuidad lo cual fue discutido en 2001 en la consulta FAO/OMS sobre alergenicidad de los alimentos obtenidos por medios biotecnológicos. ⁽³⁶⁾ La evaluación de la alergenicidad implica la comparación de la secuencia de aminoácidos de la proteína introducida con la secuencia de aminoácidos de alergenos conocidos, y la estabilidad digestiva de la proteína introducida ⁽³⁷⁾

De tal forma, que el presente trabajo se enfocó al estudio de la proteína sintética creada previamente en el Laboratorio de Nutrición Molecular del ICSa. La proteína sintética es de alto valor biológico y se pretende, una vez demostrada su inocuidad que sea utilizada como aditivo alimentario en productos ampliamente

consumidos por la población mexicana como es el caso de la tortilla y el pan, según la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos efectuada en 2006 por el INEGI. ⁽³⁸⁾

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL.

Expresar, purificar y determinar la digestibilidad *in vitro* de una proteína sintética con valor nutricional.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Clonar el gen en un vector de expresión que permita obtener una proteína fusionada a una secuencia de epítipo V5 y con una secuencia de polihistidinas
- 2) Sobre expresar la proteína sintética en *Escherichia coli* para tener cantidades detectables.
- 3) Purificar la proteína mediante cromatografía en columna de sepharosa-Ni.
- 4) Detectar la expresión de la proteína mediante un ensayo de Western Blot.
- 5) Determinar la digestibilidad de la proteína a las proteasas bajo un sistema *in vitro* y de acuerdo con los métodos oficiales de la AOAC
- 6) Conocer algunos parámetros bioquímicos mediante el análisis de la secuencia de la proteína utilizando programas de cómputo disponibles en línea.

V. MATERIALES Y METODOS

El trabajo experimental se muestra en la siguiente figura:

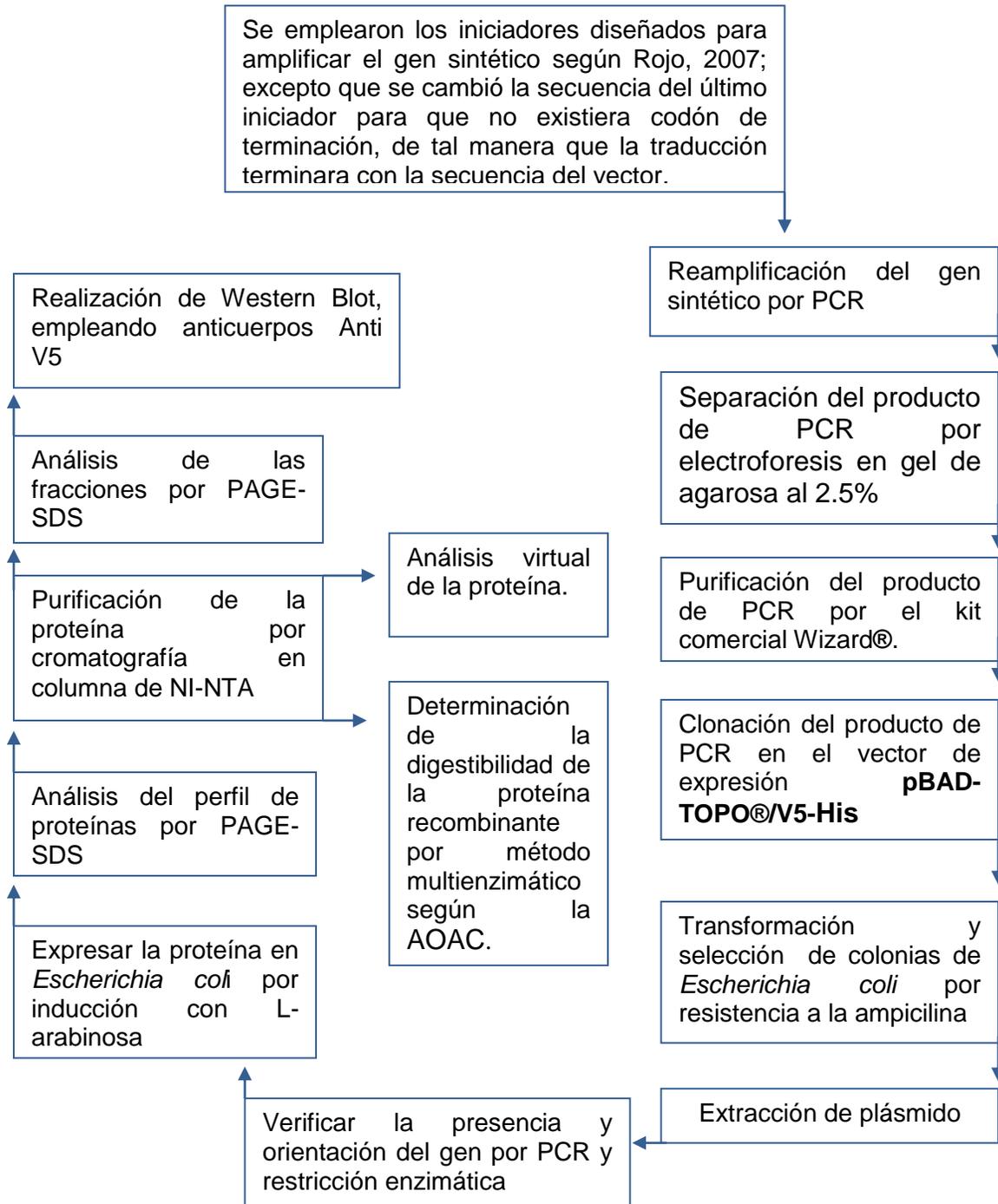


Figura 4. Diseño metodológico del proyecto

1. MATERIALES

Vectores: Se utilizó el vector pBAD TOPO® para la expresión de la proteína en *Escherichia coli*. El mapa y la secuencia nucleotídica se muestra en la Figura 5.

Cepas microbianas: *Escherichia coli* BL21 (F mcrA, dcm, gal)

Medios de cultivo: Los medios de cultivo utilizados fueron el Luria-Bertania (LB) y medio para transformación (SOC).

Antibiótico para medio de cultivo

Ampicilina 100 mg/mL. Se preparó una solución utilizando 100 mg de ampicilina disueltos en 1 mL de agua destilada estéril, se tomaron alícuotas y se almacenaron a 4° C hasta su uso.

2. MÉTODOS

2.1 Amplificación del gen sintético

La amplificación del gen sintético se llevó a cabo bajo condiciones según Rojo, 2007 y Dillon y Rosen 1993. ^(35, 39) Los iniciadores empleados fueron los mismos que los reportados, excepto; que se cambió la secuencia del último iniciador que codifica para el extremo NH₂ terminal de la proteína, de tal manera que se eliminó el codón de terminación, con ello la traducción fue terminada con el codón de término del vector como se aprecia en la Figura 5B; esto a su vez, ocasiona que se forme una proteína de fusión donde además de la secuencia proteica, se encuentra una secuencia del epítipo de V5 constituido por 34 aminoácidos derivado de las proteínas P y V de paramyxovirus ⁽⁴⁰⁾ seguido de una secuencia terminal rica en histidinas.

Primera reacción de PCR

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL que contenía: 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 4. 3 pmoles de cada iniciador, y 1.5 U de Taq Polimerasa recombinante de Invitrogen.

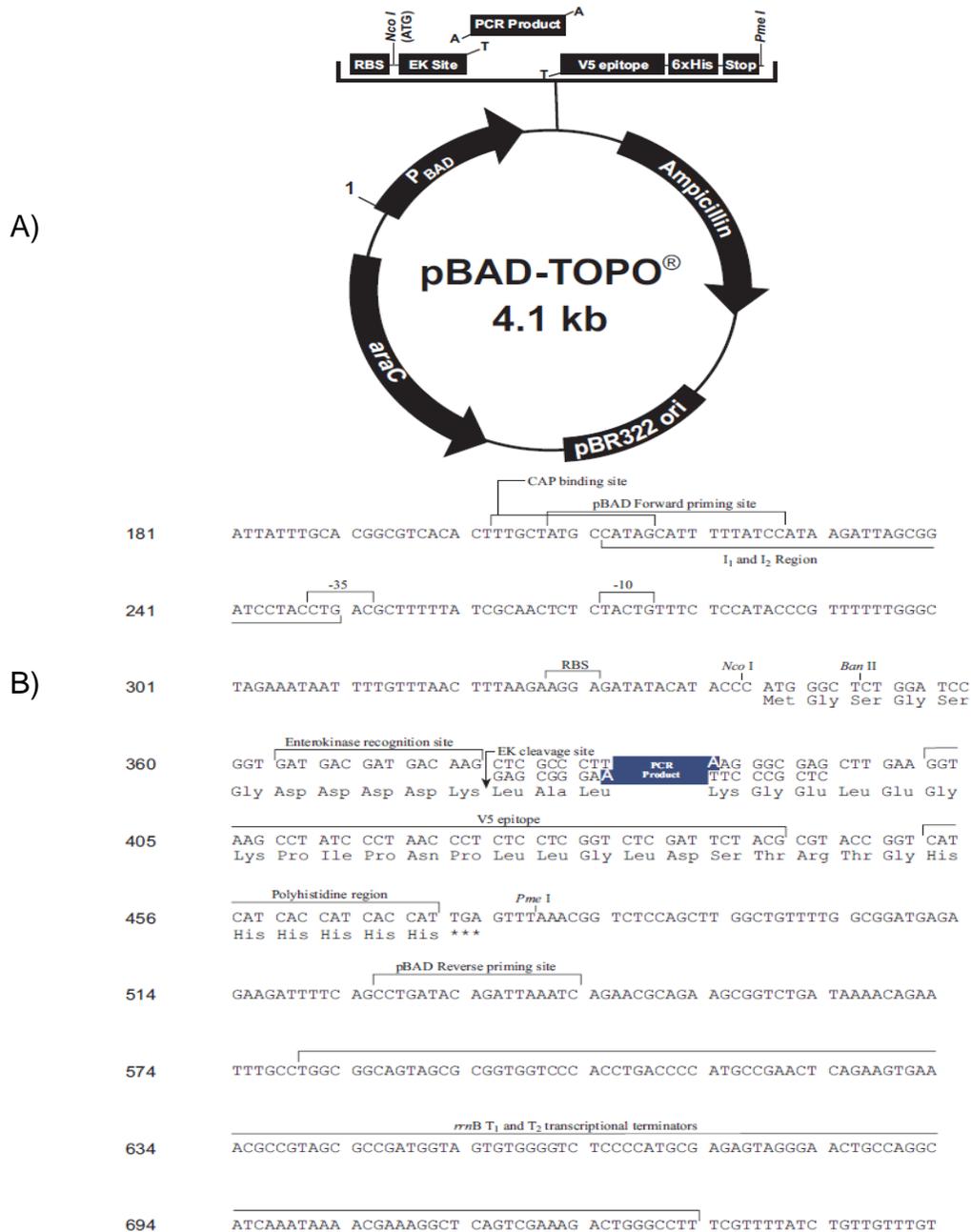


Figura 5. Mapa genético del plásmido pBAD TOPO®. A) El plásmido pBAD-TOPO, es un vector de 4.1 kb, útil para la clonación y expresión, en donde la expresión es regulada por el promotor de la L-arabinosa (*ara C*) que puede permitir la expresión de la proteína de interés en forma fusionada con sitio de reconocimiento de corte para enterocinasa (EK site) justo tres aminoácidos antes del sitio de clonación del fragmento ver figura B; epítipo V5 que sirve para detectar la proteína de fusión por análisis por Western Blot empleando anticuerpos Anti-V5 y una etiqueta de polihistidinas en la región C-terminal de la proteína de fusión para permitir la purificación de la proteína por una columna de Níquel ácido-nitril-tri-acético Ni-NTA. El plásmido, posee el gen de resistencia contra ampicilina para seleccionar clones. En la figura B) se puede observar la secuencia nucleotídica de los iniciadores pBAD forward y pBAD reverse que sirven para corroborar la orientación del inserto.

Fuente: Manual de Invitrogen: pBad- TOPO® TA Expression kit, 2004.

La reacción se realizó en un termociclador Techne TC-512 con las siguientes condiciones de termociclado: Temperatura de desnaturalización inicial de 94° C durante 4 minutos, seguido de 10 ciclos de 94° C durante 1 minuto, 60° C durante 1 minuto, extensión a 72° C durante 1 minuto y la extensión final de 5 minutos a 72° C.

Segunda reacción de PCR

Esta reacción se realizó en un volumen final de 100 μ L que contenía: 1 μ L de la primera reacción de PCR, 10 mM de Tris-HCl pH 8.3 50 mM KCl, 200 μ M dNTPs, 100 pmoles de cada oligonucleótido Sitio 1 y Sitio 2, 1.5 U de Taq polimerasa. Se utilizó un termociclador Techne TC-512 para llevar a cabo la reacción de PCR con las siguientes condiciones de termociclado: una temperatura de 94° C durante 4 minutos, 35 ciclos a 94° C durante 1 minuto, 50° C durante 1 minuto y extensión, 72° C durante 1 minuto. Una extensión final de 5 minutos a 72° C.

Los productos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2.5%. a 80 V y el gel se observó con un fotodocumentador UVP.

2.2 Purificación de ADN del producto de PCR

Utilizando un transiluminador de luz UV y con ayuda de marcador de peso molecular conocido ⁽⁴¹⁾ se ubicó la banda y se cortó el gel con la banda de interés a partir del cual se llevó a cabo la purificación de ADN mediante el kit comercial “Wizard[®] Gel and PCR Clean-up System”, el volumen final del purificado fue de 30 μ L.

2.3 Clonación del producto de PCR en *Escherichia coli*

Clonación del producto de PCR dentro del pBAD-TOPO[®]

Una vez purificado el producto de PCR deseado, se clonó dentro del vector pBAD-TOPO[®] (Invitrogen). La reacción de clonación del fragmento se llevó a cabo como a continuación se indica.

En un tubo Eppendorf nuevo y estéril de 0.2 mL se mezclaron: 4 μ L de producto de PCR recién preparado, 1 μ L de solución de sales diluida 1:4, 1 μ L. de vector

TOPO. La reacción, se mezcló e incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se colocó en hielo y se procedió a la transformación. Por lo que, fue necesario tener listo células competentes de *Escherichia coli*.

Preparación de células competentes de *Escherichia coli*

A partir de un cultivo de *E. coli* BL21 de toda la noche en medio LB, se inocularon 200 μL . y se incubaron a 37° C con agitación a 250 rpm hasta alcanzar un valor de absorbancia de aproximadamente 0.4 a 600nm que se verificó en un espectrofotómetro Jenway 6405UV/Vis. Con ello, se tiene que la cepa se encuentra en la fase log de crecimiento. Se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos a 4° C, y se resuspendió con CaCl_2 0.1 M, se colocó en hielo por espacio de 2 horas, posteriormente se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones y se resuspendió con CaCl_2 0.1 M y glicerol al 15% frío hasta homogenizar completamente. La muestra se repartió en alícuotas de 200 μL y se congelaron inmediatamente a -70° C hasta su uso. ⁽⁴²⁾

Transformación de células competentes

Se tomó todo el volumen de la reacción de clonación y se agregaron 100 μL de células de *E. coli* BL21 químicamente competentes, la mezcla se incubó durante 25 minutos en hielo y posteriormente se realizó un choque térmico, incubando primeramente la mezcla a 42° C durante 30 segundos e inmediatamente después sumergiendo los tubos Eppendorf en hielo durante 2 minutos. En un tubo Falcon estéril se agregaron 250 μL de medio SOC y se agregó el contenido del tubo Eppendorf. Se dejó en una incubadora a 37° C a 170 rpm durante 1 hora. Posteriormente se toman 150 μL del cultivo y se sembraron en placas con medio LB con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se llevaron a incubar durante 24 horas a 37° C. Se seleccionaron al azar 10 colonias y se crecieron por 24 horas en tubos con medio líquido LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por una parte, en condiciones de esterilidad, se congelaron 500 μL de cada uno de los tubos agregándoles un volumen igual de glicerol y se guardaron a -70° C; por otra parte, con el resto del cultivo se realizaron extracciones plasmídicas, para verificar la presencia de plásmido.

2.4 Extracción de ADN plasmídico por el método de Birnboim y Doly.

La extracción del ADN plasmídico se hizo de acuerdo a una modificación del método descrito por Birnboim y Doly ⁽⁴³⁾ que se basa en una lisis alcalina.

Se centrifugó 1 mL de cultivo en un tubo Ependorff en una microcentrífuga durante 1 minuto a 10000 rpm. Posteriormente, se resuspendió el residuo en aproximadamente $\frac{1}{4}$ de volumen inicial del cultivo con Tris 50 mM, pH de 8.0, EDTA 10 mM y se centrifugo con las mismas condiciones del paso anterior.

Se resuspendieron las células en glucosa 50 mM, Tris 25 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM con agitación ligera en un Vórtex. Posteriormente se hizo el lisado de las células con 200 μ L de NaOH 0.2, SDS al 1% (preparada al momento) y se dejó reposar por 5 minutos a -4° C. Transcurridos los 5 minutos, se precipitaron las proteínas con 150 μ L de SDS con acetato de potasio 5 M, pH 4.8, y se dejó reposar de nuevo a -4° C por 5 minutos.

Posteriormente se centrifugó el precipitado por 1 minuto en microcentrífuga a 12000 rpm y se decantó el sobrenadante en un tubo limpio. Una vez vertido el sobrenadante, se precipitó el ADN con 270 μ L de isopropanol. Y se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Para recuperar el ADN, se centrifugó por 10 minutos a 12000 rpm y se decantó el sobrenadante, se hicieron dos lavados con Etanol al 75% y se dejó secar el tubo en una estufa a 37° C. Una vez evaporado el etanol, se procedió a resuspender el ADN con 30 μ L de agua desionizada estéril.

2.5 Análisis de las transformantes por PCR y restricción con HinfI

Una vez obtenido el plásmido purificado se verificó la presencia del vector dentro del plásmido y su orientación.

Esto se hizo por dos formas, una por PCR y por digestión enzimática con Hinf I. Para el caso de PCR, se realizaron 3 reacciones, dos para amplificar el inserto y así comprobar la presencia y otra para comprobar la orientación del mismo. En la primera reacción se emplearon los iniciadores proporcionados por el pBAD TOPO[®] TA Expression Kit, que alinean río arriba y río abajo según lo muestra el mapa de la

Figura 5B; en la segunda reacción los iniciadores sitio 1 y 2 que alinean sólo para amplificar el fragmento de interés y en la tercera reacción se emplearon el oligo sitio 1 con dirección río arriba y el iniciador del plásmido TOPO reverse que alinea río abajo.

Primera reacción

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 μ L que contenía: 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1 μ L de plásmido (5 μ g), 1.5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 2.7 μ L de topo forward, 2.7 μ L de topo reverse, mas 1.5 unidades de Taq Polimerasa recombinante de Invitrogen.

Segunda reacción

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 μ L que contenía: 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 2.4 μ L de sitio 1, .3 μ L de sitio 2, mas 1.5 unidades de Taq Polimerasa recombinante de Invitrogen.

Tercera reaccion

La amplificación se realizó en un volumen final de 50 μ L que contenía: 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 50 mM de KCl, 1.5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 2.4 μ L de sitio 1, 2.6 μ L de topo reverse, mas 1.5U de Taq Polimerasa recombinante de Invitrogen.

Para las tres reacciones se utilizó un termociclador Techne TC-512 con las siguientes condiciones de termociclado: Temperatura de desnaturalización inicial de 94° C durante 4 minutos, 35 ciclos que incluyeron: 94° C durante 1 minuto; 50° C durante 1 minuto, 72° C durante 1 minuto y extensión final de 10 minutos a 72° C.

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2.5% y observados en un fotodocumentador EpiChemi³.

2.6 Análisis de la molécula recombinante por digestión con Hinf I

La enzima Hinf I tiene 9 sitios de corte en el vector pBADTOPO, en las posiciones: 436, 1802, 2319, 2715, 2790, 3166, 3210, 3593 y 3864 ⁽⁴²⁾ (ver mapa de la figura 10); por lo que la digestión enzimática produce 9 fragmentos de: 1366, 672, 517, 396, 383, 376, 271, 75 y 44. De acuerdo al mapa genético y de corte, de existir

inserto se produciría un fragmento de alrededor de 1017 pb, debido a que el inserto se encuentra en el sitio de corte 3864 y 436.

La digestión enzimática se realizó con plásmido extraído de clonas recombinantes. En un tubo Eppendorf se colocaron 3 μ L de plásmido (15 μ g), 1.5 μ L de regulador de la enzima, 10 μ L de agua destilada estéril y 0.5 μ L de la enzima Hinf I. La mezcla, se incubó a 37°C durante 3 horas.

Las digestiones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

2.7 Expresión de la proteína

Con base a lo anterior, se seleccionó una clona, a la cual se comprobó la presencia y orientación adecuada de inserto. La clona se creció en 50 mL de medio LB con ampicilina a una concentración de 100 μ g/mL hasta alcanzar la mitad de la fase log del crecimiento bacteriano medido por un espectrofotómetro Jenway 6405UV/Vis hasta alcanzar un valor de absorbancia de alrededor de 0.5 a 600 nm. Posteriormente, se procedió a realizar la inducción de la proteína, para lo cual se prepararon tubos con 10 mL cada uno de medio LB con 0%, 0.002%, 0.02%, 0.2% y 2% de L-arabinosa, dejando incubar toda la noche a 37° C con agitación a 100 rpm en una incubadora Labcompanion SI-600. Como control, se usaron células TOPO crecidas sin ampicilina y sin inducción.

2.8 Análisis de proteínas por SDS-PAGE.

Se obtuvo el paquete celular por centrifugación de los tubos control, así como de los tubos con las diferentes concentraciones de L-arabinosa y se resuspendieron en 80 μ L de 2X SDS-PAGE.

Las muestras se analizaron por SDS-PAGE ^(44, 45)

Para realizar la técnica se hace lo siguiente: se ensamblan y nivelan los vidrios que formaron el gel y se colocan sobre la base cuidando que no existieran fugas de líquido. Se elabora el gel separador al 12% mezclando agua destilada, solución de acrilamida al 30% (29% de acrilamida y 1% de N,N'-metilen bisacrilamida), Tris 1.5 M

pH 6.8 y SDS al 10%. Se agregó persulfato de amonio al 10%, que se preparó justo antes de su utilización. Finalmente se adicionaron 0.004 ml de TEMED. Se mezcla cuidadosamente evitando la formación de burbujas y se vertió entre los vidrios ensamblados previamente para formar el gel. Se esperó la polimerización y se vertió gel concentrador al 5%. Se cargaron las muestras, las cuales fueron previamente resuspendidas en regulador 2X para PAGE-SDS (0.5 M de Tris pH 6.8, glicerol al 10%, SDS al 1% y cristales de azul de bromofenol) y sometidas a ebullición durante 10 minutos. Se utilizó una cámara Hoefer Scientific con regulador de corrimiento Tris Glicina 1x a una corriente eléctrica de 50 V para el gel concentrador y 100 V para el gel separador.

Los geles se fijaron y tiñeron mediante inversión y agitación suave en solución de azul de Coomassie R-250 al 50% en metanol con ácido acético al 10%.⁽⁴⁴⁾ Se hicieron lavados con solución de ácido acético al 10%. Alternativamente, se hicieron tinciones con plata, la cual se basa en la reducción diferencial de iones de plata, en una reacción similar a la usada para revelar fotografías. La tinción es de 100 a 1000 veces más sensible que la tinción por Coomassie⁽⁴⁴⁾ En este caso el método que se llevó a cabo es el procedimiento original de Sammons *et. al* 1981⁽⁴⁶⁾ el cual detecta de 0.5 a 2 ng de proteína. En la técnica se preparan los siguientes reactivos:

- **Solución fijadora:** etanol: ácido acético glacial:agua (50:30:20)
- **Sol. A:** 0.8 grs de nitrato de plata en 4 mL de agua.
- **Sol. B:** 21 mL de NaOH 0.36% +1.4 mL de hidróxido de amonio al 30% 14.8 M.
- **Sol. C:** Agregar la solución A a la solución B con agitación constante hasta que desaparezca el precipitado café formado.
- **Sol. D:** mezclar 0.5 mL de ácido cítrico 1% con 50 mL de formaldehído 38% y agua hasta 100 mL.

Para fijar las proteínas se sumergió el gel en la solución fijadora durante un lapso mayor a 1 hora, a temperatura ambiente con agitación moderada y con la precaución de usar guantes al manipular el gel para evitar que queden huellas dactiláres que pudieran ser reveladas durante el proceso. Se realizó un lavado con agua desionizada durante 20 minutos con 2 cambios de agua. Se prepararon las

soluciones A, B, se mezclaron para obtener la solución C. Se sumergió el gel en esta solución y se incubó a temperatura ambiente y con agitación constante durante 15 minutos, después de los cuales se realizó un lavado con agua desionizada durante 2 minutos agitando constantemente. Se agregó la solución D incubando el gel a temperatura ambiente con agitación moderada, observando cuidadosamente la aparición de las bandas, se continuó la incubación hasta que se hubo obtenido el contraste deseado, entonces se detuvo la reacción con solución de ácido acético al 1% y al final se enjuagó el gel en agua desionizada durante 1 hora con varios cambios de agua.

2.9 Caracterización por Western Blot

La expresión de la proteína recombinante se detectó por medio de la prueba inmunológica Western blot, la cual se emplea para identificar y medir el tamaño de antígenos macromoleculares que reaccionan con un anticuerpo específico. ⁽⁴⁶⁾ Las proteínas primero fueron separadas por SDS-PAGE y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa de 10x10 cm con tamaño de poro de 0.45 μm . Se utilizó una cámara de electrotransferencia con 200 mL de regulador de transferencia y una corriente de 100 mA, de esta manera las proteínas cargadas migraron del gel hacia la membrana manteniendo la organización que tenían dentro del gel. Como resultado las proteínas quedaron expuestas sobre una superficie delgada para su detección. La unión de la proteína a la membrana se basa en las interacciones hidrofóbicas así como en las interacciones de carga entre la membrana y la proteína. La membrana fue sumergida en regulador de bloqueo durante 1 hora a 37° C para favorecer la adhesión de la proteína blanco a la membrana en todos los lugares donde no estaba adherida. Después de bloquear, se sumergió la membrana en una solución diluida (1:50) del anticuerpo primario Anti V5 (entre 0.5 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en solución salina y se dejó a 37° C en agitación moderada durante 1 hora y durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, se enjuagó la membrana con PBS-T 0.1% 7 veces durante 1 minuto cada vez para remover el anticuerpo primario, y posteriormente se expuso a una dilución del anticuerpo anti anti V5 HRP (1:1000 en regulador de bloqueo) A 37° C

durante 1 hora. El anti-anticuerpo va dirigido a porciones específicas del anticuerpo primario, es conocido como anticuerpo secundario y está unido a, fosfatasa alcalina que a través de un agente luminiscente el producto de reacción produce luminiscencia en proporción a la cantidad de proteína. Se realizaron 7 lavados de 1 minuto cada uno con PBS-T y después 5 lavados con PBS sin Tween. Se agregaron 2 mL del sustrato de la peroxidasa y se incubó durante 10 min. Se enjuagó y se dejó secar. La reacción se observó empleando un fotodocumentador de imágenes EpiChemi³. (47, 48, 49)

2.10 Purificación de proteínas recombinantes en columna de Níquel ácido-nitril-triacético (Ni-NTA).

La resina es una sefarosa acoplada con ácido iminodiacético que está cargado con iones Ni²⁺, la partícula de resina es de 90 microns. La resina tiene una carga neta positiva por lo tanto las proteínas cargadas negativamente y que contiene His6 tag se unirán a la resina. La capacidad de unión de la resina es de 1 mg de proteína recombinante por mL.

Para llevar a cabo la lisis celular se descongeló el paquete bacteriano de la inducción con arabinosa al 2%, manteniéndolo en hielo, se resuspendió en 1 mL de regulador de lisis, adicionando lisozima (1 mg/mL) y se incubó en hielo durante 30 minutos. Manteniéndolo en hielo se sometió a un proceso de ruptura en un sonicador a 200 watts durante dos minutos con pulsos de 15 segundos y pausas de 10 segundos. Se adicionó RNasa (10 µg/mL), DNasa (5 µg/mL) y se incubó en hielo de 10 a 15 minutos. El sonicado se centrifugó a 5000 rpm por 30 min a 4° C para precipitar los detritus celulares almacenando el sobrenadante a -20° C.

Para la cromatografía de afinidad se empleo una columna con resina de níquel ácidonitriltriácético (Ni-NTA). Para ello se lavó la resina con 750 µL de regulador de lisis, se centrifugó a 2500 rpm durante 1 min, se resuspendió y se adicionó la misma cantidad de regulador de lisis dejando reposar 5 minutos a 4° C. Posteriormente se centrifugó durante 1 minuto y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 1 mL de regulador de lisis para resuspender la resina y utilizarla de esta manera.

Se adicionó 1-1.5 mL de resina (50%) para 4-5 mL del extracto soluble del sonificado y se mezcló cuidadosamente por agitación (200 rpm en agitador rotatorio) a una temperatura de 4° C durante 60 minutos. Se vació la mezcla del lisado-resina dentro de una columna (cerrada) jeringa de 3 mL., se lavó dos veces con 4 mL de regulador de lavado para eliminar el resto de la proteína que no se unieron a la columna y se colectaron 8 fracciones de 500 µL cada una. Posteriormente se fluyó la proteína de la columna 4 veces con 0.5 mL de regulador de elusión, colectando 6 fracciones de eluido de 500 µL cada una en tubos eppendorf.

La presencia de proteínas en las fracciones recuperadas durante el lavado y la elusión se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida teñido por plata.

2.11 Determinación de la concentración de proteínas por el método de Lowry

Se determinó la concentración de proteínas de las muestras eluidas mediante el método de Lowry (1951).⁽⁵⁰⁾ El principio del método se basa en la reactividad del péptido nitrógeno con cobre bajo condiciones alcalinas y la subsiguiente reducción del Folin-Ciocalteu y el ácido fosfomolibdico fosfotúngstico. El método tiene una sensibilidad entre 0.10-2 mg según Dunn⁽⁵¹⁾ aunque, Price⁽⁵²⁾ sugiere concentraciones de 0.005-0.10 mg de proteína/mL.

Reactivos

- A. Na₂CO₃ al 2% en NaOH 0.1 N.
- B. Tartrato de NaK 1% en H₂O.
- C. CuSO₄.5 H₂O al 0.5% en H₂O
- D. 48 mL de A, 1 mL de B, 1 mL de C.
- E. Reactivo fenol- 1 parte de folin-fenol 2 N: 1 parte de agua.
- F. Solución de albúmina bovina estándar- 1 mg/mL.

Se construyó una curva tipo, para lo cual se prepararon 11 soluciones con 2 mL cada una de la solución D y 0,10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µL de solución

de albúmina bovina, se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 0.2 mL de solución de Folin-fenol a cada tubo y, se incubaron nuevamente ahora por 30 minutos a temperatura ambiente. Después se midió la absorbancia a 600 nm. y se graficó para obtener la curva estándar.

Se realizó el mismo procedimiento para las eluciones obtenidas en la purificación de la proteína, sólo que ahora utilizando 30 μ L de cada elusión, se determinó absorbancia y mediante la interpolación de los valores de absorbancia de la muestra en la curva tipo, se obtuvo la concentración de la muestra.

2.12 Pruebas de digestibilidad *in vitro*

Se determinó la digestibilidad de la proteína recombinante por medio de la técnica multienzimática reportada de la AOAC Métodos Oficiales de la AOAC, 1998).⁽⁵³⁾ La técnica se basa en imitar el medio estomacal del humano, para ello, se emplea una mezcla de enzimas digestivas (tripsina, quimiotripsina, peptidasa y proteasa bacterina) en condiciones de pH y temperatura adecuadas para una correcta degradación de las proteínas.⁽⁵⁴⁾

Reactivos

Solución A: 17.29 mg de tripsina, 36.4 mg de quimiotripsina y 5.09 mg de peptidasa ajustando a un pH de 8.0 a 37° C.

Solución B: proteasa equivalente a 65 unidades de proteasa/10 mL de agua destilada a pH 8.0 a 37° C.

A cada una de las muestras y al control (caseína) se agregó 1 mL de la solución A las mezclas se colocaron en agitación constante en un baño termostático (VELP SCIENTIFICA, Europa) a temperatura constante de 37° C durante 10 minutos, después se agregó 1 mL de la solución B e inmediatamente se colocaron en un baño de agua (SHEL LAB, USA) a 55°C durante 19 minutos; posteriormente las muestras se cambiaron al baño estático de 37° C y se tomaron valores de pH del hidrolizado enzimático.

La digestibilidad de la muestra se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de digestibilidad} = 234.84 - 22.56 (x),$$

donde:

x = valor de pH, después de 20 minutos de incubación.

2.13 Análisis de la secuencia proteica

Se analizó la secuencia de la proteína empleando herramientas computacionales del Instituto Suizo de Bioinformática contenidas en el sitio web <http://www.expasy.org>

La herramienta **ProtParam** se usó para la obtención de varios parámetros físicos y químicos, en función del análisis de la secuencia proteica. Los parámetros computados Incluyeron: peso molecular, pI teórico, coeficiente de extinción molar, estimación de la vida media, índice de inestabilidad e hidroacidez.

La herramienta **ProtScale** se usó para construir un perfil de hidropaticidad de la proteína sintética, bajo el algoritmo desarrollado por Kyte & Doolittle, 1982. ⁽⁵⁵⁾

VI. RESULTADOS

La construcción del gen sintético se realizó por PCR bajo las condiciones según Rojo, 2007. El producto esperado de aproximadamente 345 pb fue corroborado por electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la Figura 6.

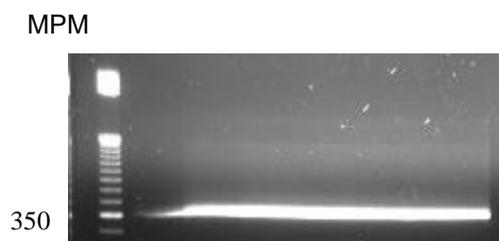


Figura 6. Amplificación del gen sintético. Amplificación del gen sintético con peso molecular al esperado (345pb).

1. PURIFICACIÓN DEL GEN SINTÉTICO

La Figura 7 muestra el producto de PCR purificado sometido a electroforesis en gel de agarosa. Como se observa, hay una banda única e intensa de mismo peso molecular, lo que demuestra que el producto está puro.

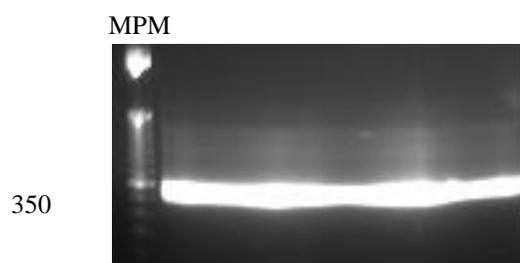


Figura 7. Purificación del gen sintético. Se aprecia una banda de amplificación con peso molecular al esperado. El producto está puro, puesto que se trata de una sola banda de intensidad destacada.

2. CLONACION DEL GEN SINTÉTICO EN EL VECTOR

La clonación del fragmento de PCR en el vector pBAD-TOPO® (figura 5A) se llevó a cabo según se describió en la sección de materiales y métodos, empleando el sistema de clonación y expresión kit TOPO® TA Cloning Expresión (Invitrogen). La extracción plasmídica de las 10 clonas seleccionadas al azar, se muestra en la Figura 8. Se aprecia en todas las clonas presencia de plásmido.

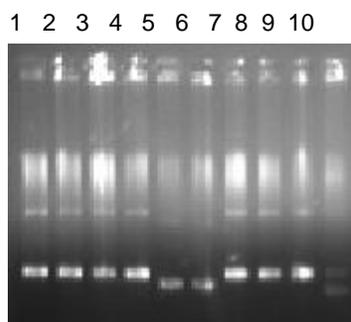


Figura 8. Extracción plasmídica después de la clonación. Se observa la presencia del plásmido en las 10 clonas que fueron seleccionadas al azar, el plásmido corresponde a las bandas más intensas ubicadas en la parte inferior. El último carril correspondiente a la clona 10 presenta una banda más tenue, sin embargo, está presente el plásmido.

3. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y ORIENTACIÓN DEL INSERTO DENTRO DEL VECTOR POR PCR Y POR DIGESTIÓN CON HINFI

Conociendo la alta eficiencia de clonación de estos productos en el vector TOPO® TA ^(35,56), se escogió al azar una clona como candidata. Para comprobar la presencia del inserto y su orientación del mismo dentro del vector se realizaron 3 reacciones de PCR.

Dos primeras reacciones fueron para amplificar el inserto y con ello comprobar la presencia del inserto; en una reacción se emplearon los iniciadores del Kit pBAD forward priming site y pBAD reverse priming site con la finalidad de amplificar parte de la secuencia del vector incluyendo el inserto, en la segunda reacción se emplearon los iniciadores Sitio 1 y Sitio 2; con la finalidad de amplificar sólo el inserto y una tercera reacción empleando la combinación de iniciadores sitio 1 con el pBAD reverse priming site. Empleando esta combinación de iniciadores se

esperaban productos de 683, 345 y 489 pb respectivamente. La Figura 9 muestra el resultado de las 3 amplificaciones, en todas ellas se observan bandas con los tamaños esperados, lo que demuestra que la clona tiene el inserto del tamaño esperado y la orientación adecuada.

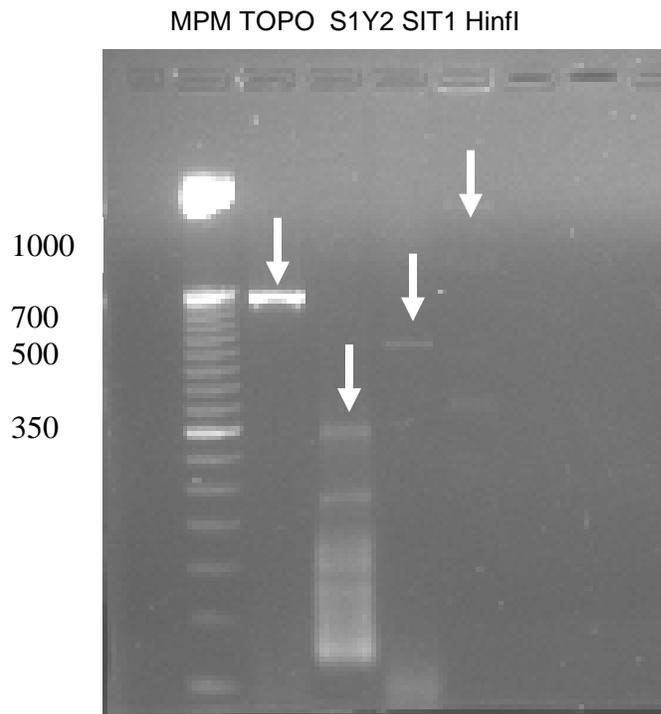


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de las reacciones de PCR del gen clonado. De acuerdo a la combinación de los iniciadores empleados, se obtuvieron bandas de amplificación de tamaño al esperado, 683 (carril 2), 345 (carril 3) y 489 (carril 4).

La enzima de restricción Hinf I tiene nueve sitios de corte en el vector (Figura 10), por lo tanto, después de someter a la molécula recombinante a digestión con dicha enzima se esperan 10 fragmentos de 1366pb, 517pb, 436pb, 396pb, 383pb, 376pb, 271pb, 236pb, 75pb y 44pb. Sin embargo, en la Figura 9 se muestra una banda de aproximadamente 1000 pb, que corresponde a la banda de tamaño esperado (1017), comprobándose que el inserto está en lugar indicado, puesto que de acuerdo con las Figuras 5B y 10 el sitio de clonación está entre el sitio de corte 436 y 3864.

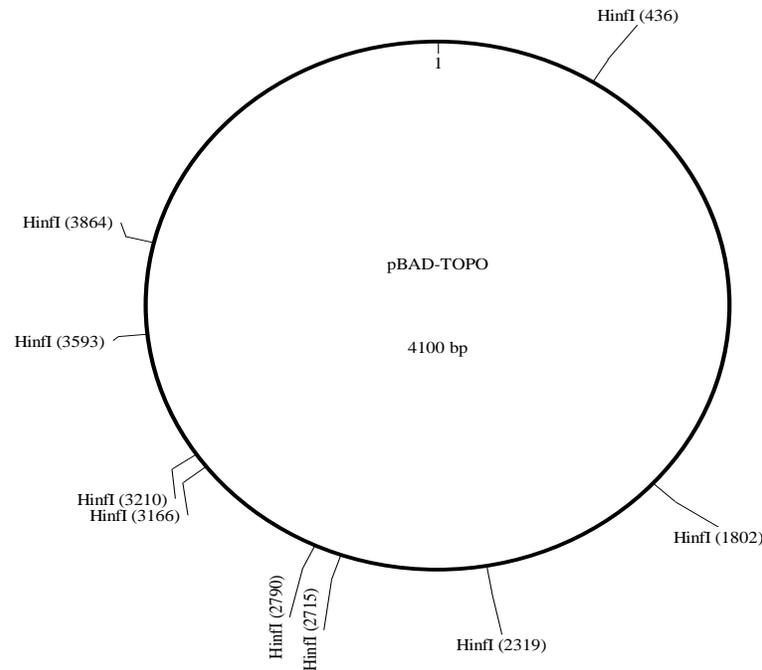


Figura 10. Sitios de corte del plásmido pBAD-TOPO. Se muestra la región de clonación del fragmento de interés.

4. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA A NIVEL PILOTO EN ESCHERICHIA COLI POR INDUCCIÓN CON L-ARABINOSA

Comprobada la presencia y orientación del inserto dentro del vector se procedió a realizar la expresión de la proteína a nivel piloto en *Escherichia coli* por inducción con L-arabinosa. Las expresiones se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida y se tiñeron con azul de Comassie y alternativamente con plata. En la Figura 11 se muestra la fotografía de un gel de las células inducidas con diferentes concentraciones de arabinosa. En ella se observa una banda tenue de 16.4 kDa en las células que fueron inducidas con arabinosa. Por lo que se presume se puede tratar de la proteína de interés. Sin embargo no se obtuvieron resultados reproducibles, como se muestra en la Figura 12, en donde el patrón de bandas tanto en células inducidas como no inducidas es similar

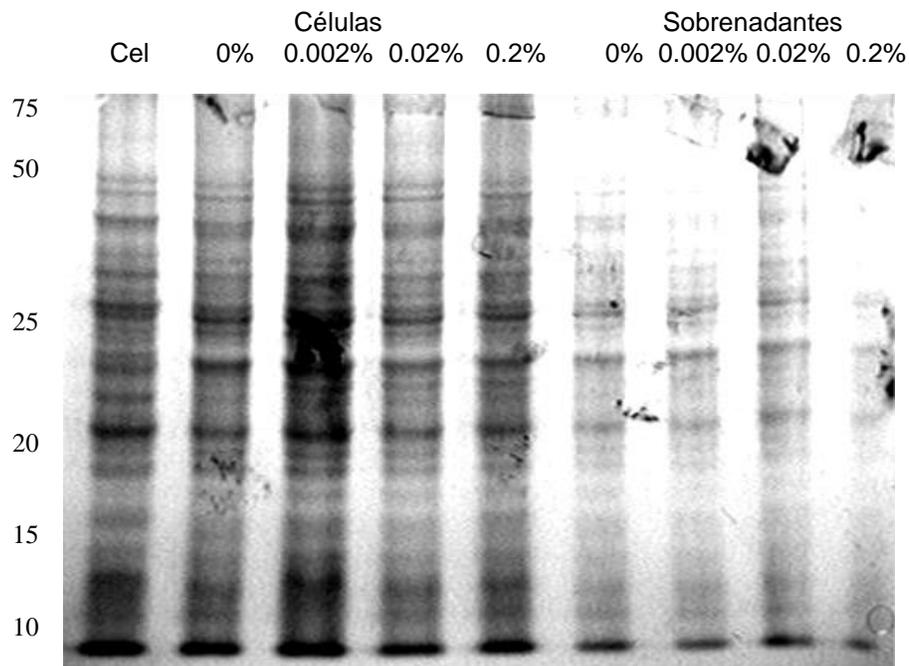


Figura 11. Análisis de la expresión de la proteína por inducción con L-arabinosa por SDS-PAGE teñido por plata (primera inducción). En el carril no.1 se muestran a las células sin transformar, en los siguientes 4 carriles se muestran las concentraciones crecientes de L-arabinosa: 0%, 0.002%, 0.02% 0.2%, y los últimos 3 carriles corresponden a los sobrenadantes obtenidos después de obtener el pellet por centrifugación. En los carriles correspondientes a las células transformadas con L-arabinosa se observa una banda muy tenue cercana a los 16.4KDa que probablemente sea la proteína recombinante.

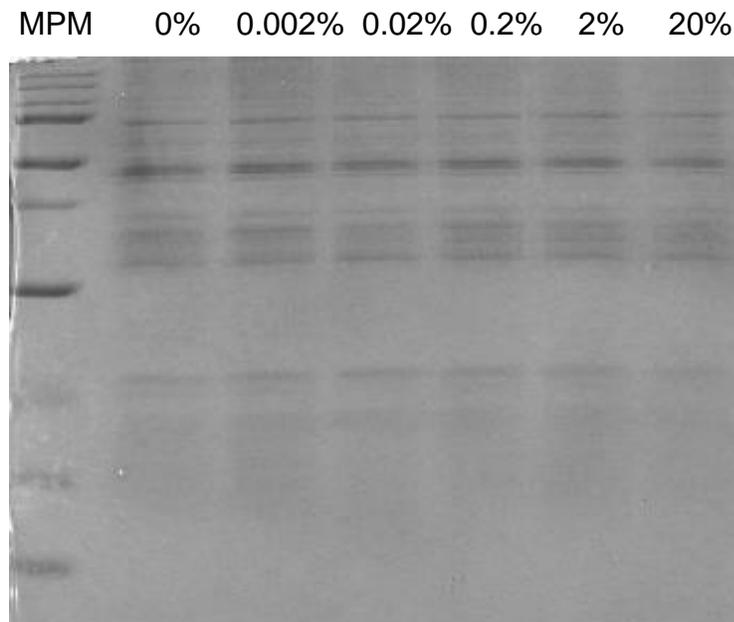


Figura 12. Análisis de la expresión de la proteína por inducción con L-arabinosa por SDS-PAGE teñido por Coomassie. De derecha a izquierda se muestran en los carriles las concentraciones crecientes de L-arabinosa: 0%, 0.002%, 0.02% 0.2%, 2% y 20%, en todos los casos, no se observa la presencia de la banda esperada de 18.6KDa que corresponde a la proteína recombinante.

5. DETECCIÓN DE LA PROTEÍNA POR WESTERN BLOT

Al no observarse la expresión en SDS-PAGE, se realizó la detección por Western Blot. Esto se decide hacer, pensando en que el ensayo es más sensible. La Figura 13 corresponde a la detección por Western Blot, en este caso se pueden apreciar señales quimiluminiscentes en todos los carriles donde hubo inducción con arabinosa, cabe mencionar que la señal más intensa fue con L-arabinosa al 0.002%. Con este resultado se comprueba que la proteína si se expresa aunque en cantidades pequeñas.

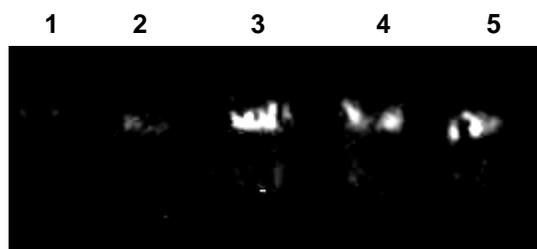


Figura 13. Análisis de la expresión de la proteína por Western Blot. Carriles: 1. Células sin transformar; 2 Células transformadas no inducidas; 3, 4 y 5 células transformadas e inducidas con 0.002, 0.02 0.2% de L-arabinosa respectivamente. Interesantemente, en el carril 3 (0.002% de L-arabinosa) se observó la mayor intensidad.

Con este resultado se comprobó que la proteína si es expresada pero en cantidades pequeñas.

6. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA POR COLUMNA DE NÍQUEL ÁCIDO-NITRIL-TRICÉTICO (NNTA GIBCO).

Siguiendo el protocolo señalado en la sección de materiales y métodos, las fracciones de lavado y elusión se analizaron por PAGE-SDS.

Con respecto a los lavados la Figura 14 muestra fotografías de las fracciones de los lavados teñidos con azul de Coomassie y plata. Como se aprecia en ambas tinciones, el número de bandas de proteínas disminuye conforme aumenta el número de lavados. Asimismo, como se esperaba, la tinción con plata reveló mayor número de bandas que la tinción con Coomassie, debido a que es más sensible.

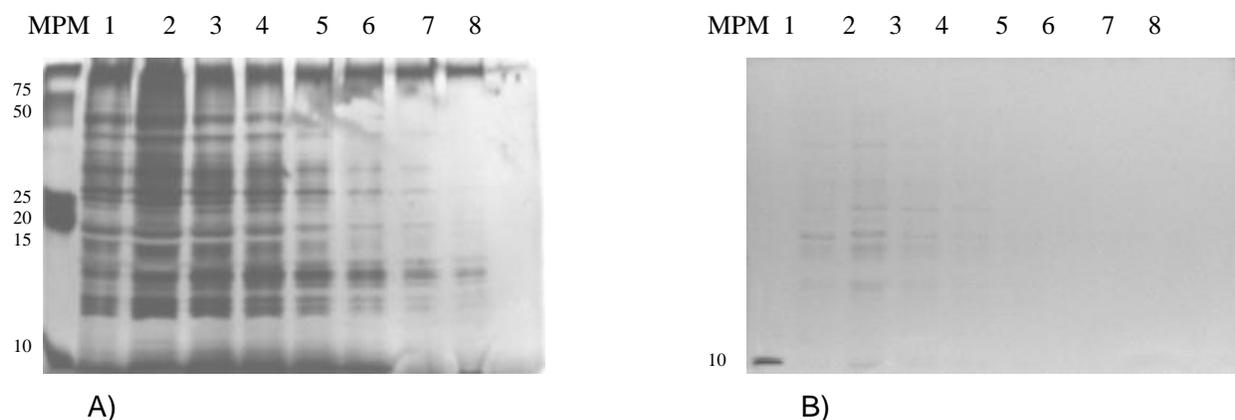


Figura 14. Análisis de las fracciones de lavados por SDS-PAGE al 12%. A) Tinción por Coomassie y B) Tinción con plata. En ambas fotos se observa la presencia de una gran cantidad de proteínas y que ésta disminuye conforme aumenta las fracciones.

En las eluciones que corresponde a la Figura 15B se observa un patrón de bandas en todas las eluciones analizadas, aunque el marcador de peso molecular no es claro, se observa en las tres primeras eluciones bandas intensas que desaparecen en la elusión E4.

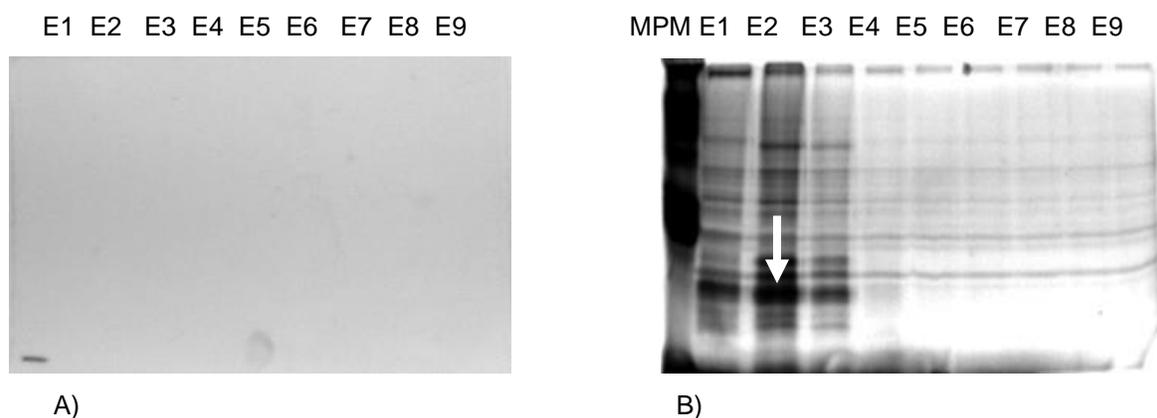


Figura 15. Análisis de las eluciones por SDS-PAGE al 12%.A) Tinción por Coomassie y B) Tinción con plata. No se observa bandas en el gel teñido por Coomassie; sin embargo, en el gel teñido por plata, se observa un patrón de bandeo que es más intenso en las primeras eluciones.

Dado esto las eluciones E1 a la E3 se juntaron y se pasaron nuevamente por la columna. En este caso, el resultado fue un poco diferente (Figura 16), debido a que apenas se aprecia una banda de peso molecular esperado en la elusión E2 que

presumiblemente es la banda de interés, aunque existe aún la presencia de otras bandas.

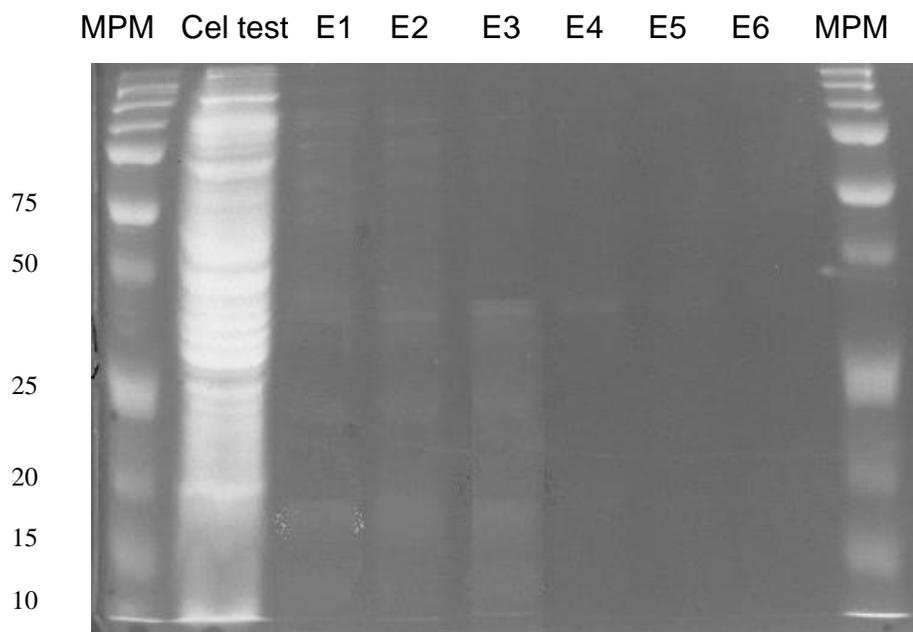


Figura 16. Análisis de las eluciones E1, E2, E3 por SDS-PAGE al 12% teñido con plata. Es apreciable sobretodo en la elución E3 la banda del tamaño esperado. Notar la presencia de otras bandas de diferente peso molecular.

7. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

A partir de las fracciones colectadas, se hizo la cuantificación de proteínas por el método de Lowry, se determinó la concentración por regresión lineal según muestra la siguiente tabla.

Tabla 5. Concentración de proteína de las fracciones eluidas durante la cromatografía

Fracción	Concentración de proteína (mg/ml)
1	0.439
2	0.463
3	0.507

8. DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LA PROTEÍNA

Utilizando las 3 primeras fracciones se realizó una prueba de digestibilidad *in Vitro* utilizando como control una muestra de caseinato de calcio grado alimentario. Los ensayos se hicieron por duplicado obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 6. Porcentaje de digestibilidad de proteína de las fracciones eluidas durante la cromatografía

Muestra	Digestibilidad
Fracción 1	58.19
Fracción 2	60.22
Fracción 3	60.22

9. ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LA SECUENCIA PROTEICA

En la Tabla 7 se muestran los resultados de los análisis computacionales teóricos obtenidos tanto para la secuencia de la proteína sintética no fusionada y fusionada con el epítipo y cola de histidinas.

Tabla 7. Análisis computacional de la secuencia de la proteína sintética no fusionada y fusionada con el epítipo y cola de histidinas.

Parámetros	Secuencia de la proteína sintética ¹	Secuencia la proteína sintética + epítipo V5 + secuencia de histidinas ²
Número de aa	107	135
Peso Molecular (Daltones)	13,312.7	16,452.2
pI	9.95	9.81
Coefficiente de extinción molar	48470	48470
Estimación de la vida media	>10 h en <i>Escherichia coli in vivo</i>	>10 h en <i>Escherichia coli in vivo</i>
Índice de inestabilidad	Valor 51.31 clasifica a la proteína como inestable	Valor 40.52 clasifica a la proteína como inestable
Promedio de hidropaticidad	-0.192	-0.373

¹MARNDCEQGHILKMFPSTWYVRHIFKPSRQQGQLFTWYAVQCNDVEDCNWAEMLKHGIIYTPSWRIHLWVTMKFHLITVRWFKMVWRHTIFLQKMVFWTRLHINMRV

²MARNDCEQGHILKMFPSTWYVRHIFKPSRQQGQLFTWYAVQCNDVEDCNWAEMLKHGIIYTPSWRIHLWVTMKFHLITVRWFKMVWRHTIFLQKMVFWTRLHINMRV**KGELEGKPIPNLLVLDSTRTGHHHHHH**

Mediante la aplicación del algoritmo predictivo de Kyte-Doolittle ⁽⁵⁵⁾ fue posible reconstruir un perfil de la hidropaticidad de la proteína. Éste definió el dominio central como altamente hidrofílico, en contraste con el extremo amino en el que predominó la secuencia de aminoácidos hidrofóbicos. Los valores se muestran en las siguientes figuras:

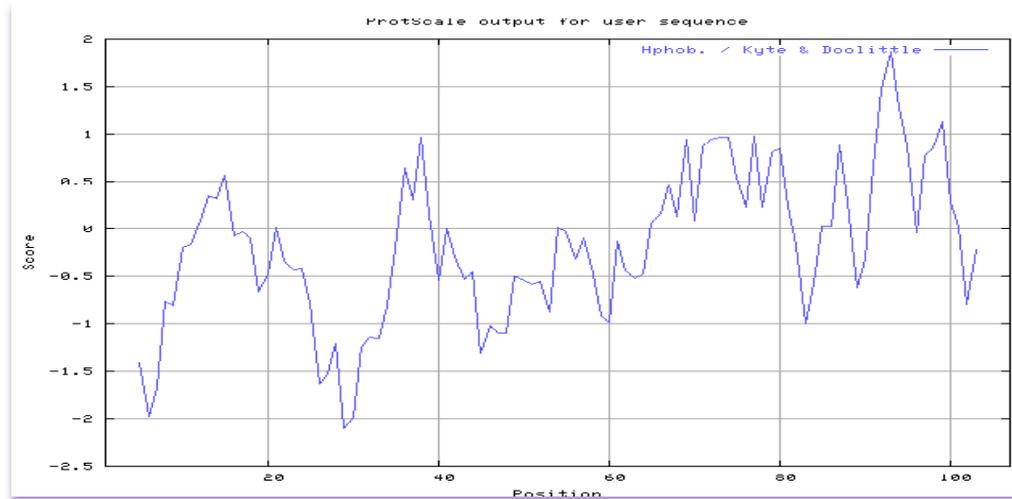


Fig 17. Perfil de hidropaticidad de proteína nativa (sin región de epítipo y de his).
 MARNDCEQGHILKMFPSTWYVRHIFKPSRQQGQLFTWYAVQCNDVEDCNWAEMLKHGIIYTPSWRIH
 LWVTMKFHLITVRWFKMWRHTIFLQKMVFWTRLHINMRV
 Fuente: <http://www.expasy.org>

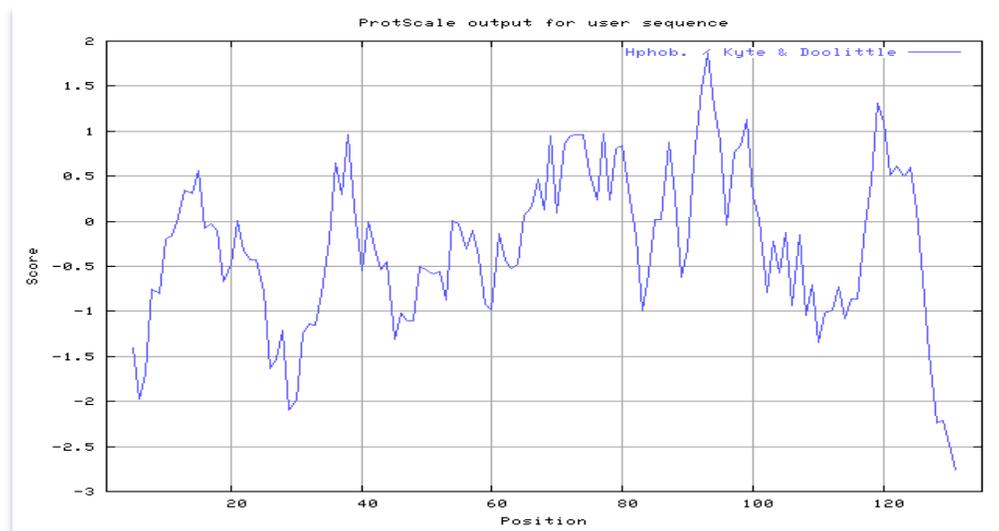


Fig 18. Perfil de hidropaticidad de proteína nativa con región de epítipo y de his.
 MARNDCEQGHILKMFPSTWYVRHIFKPSRQQGQLFTWYAVQCNDVEDCNWAEMLKHGIIYTPSWRIH
 LWVTMKFHLITVRWFKMWRHTIFLQKMVFWTRLHINMRV**KGELEGKPIPPLLVDSTRTGHHHHH**
 Fuente: <http://www.expasy.org>

VII. DISCUSION

Previo al presente trabajo, se demostró la construcción por PCR y la clonación de un gen sintético; no obstante, la expresión de la proteína quedó por comprobarse. Por lo que el objetivo principal de este trabajo fue demostrar si el gen se expresa o no. Inicialmente se trabajó con la cepa transformada y se comprobó la presencia del inserto en el plásmido pBAD TOPO[®], con la finalidad de cerciorar que la cepa de la bacteria no hubiera perdido el plásmido, puesto que la cepa no se había trabajado por algún tiempo, para ello se realizó la extracción del plásmido y se verificó en electroforesis en gel de agarosa, esto comprobó que la cepa no sólo contuvo el plásmido sino que es estable con él.

Partiendo de la idea que la proteína pudiera expresarse en pequeñas cantidades, se construyó el mismo gen excepto sin codón de terminación. Esta idea surgió para aprovechar las características del vector (ver Figura 5A) que permite obtener la proteína fusionada; es decir, con la secuencia de aminoácidos deseada y con la región de 14 aminoácidos del epítipo V5 de las proteínas PV del paramixovirus SV5 con una secuencia final de polihistidinas en el extremo 3'. Esto permite en primera parte, detectar la proteína por ensayo de Western blot empleando anticuerpos dirigidos contra el epítipo V5, y también puede purificarse la proteína mediante la utilización de columnas de Ni que pueden quelar los grupos de las histidinas.

Como se esperaba, se logró amplificar el gen utilizando el nuevo oligonucleótido iniciador sin el codón de término. Realizada la clonación y transformación de las células con el gen, se realizó la extracción de plásmido y se procedió a analizar la presencia y orientación del plásmido en las células transformadas por PCR y restricción con enzima Hinf III. El análisis por estas dos vías se efectuó para tener una doble comprobación, debido a que aunque la reacción de PCR normalmente es específica existe la posibilidad que se puedan dar productos inespecíficos con tamaños parecidos a los esperados. ^(57, 58) El análisis por PCR que se muestra en la figura 9, demuestra primeramente, que el inserto está dentro del plásmido, ya que en una primera reacción, se amplificó parte de la secuencia del plásmido que flanquean

al inserto y el fragmento completo que conforma el gen con un tamaño de amplificado de aproximadamente 650 pb (carril 1 de la Figura 9); de no haber fragmento de interés, entonces el producto esperado debería ser cercano a 338pb el cual resulta de la amplificación de secuencias del plásmido pero sin el inserto. Adicionalmente como prueba confirmatoria para demostrar la presencia del inserto se realizó una reacción de PCR empleando como molde el ADN plasmídico y los dos iniciadores que delimitan el tamaño del gen sintético (sitio 1 y sitio 2), en la misma figura pero en el carril 2 se observa un producto de amplificación cercano a los 345 pb, que corresponde al tamaño deseado. Con esto sin embargo, no se sabe si el inserto está orientado correctamente en el marco de lectura. Para ello se realizó una tercera reacción de PCR en donde se empleo como iniciadores, el oligo sitio 1 con dirección río arriba y el iniciador del plásmido TOPO reverse que alinea río abajo, el producto de PCR tiene el tamaño aproximado al esperado, con esto se demuestra que el plásmido además de tener el inserto está orientado correctamente para ser traducido por la célula, ya que si el inserto estuviese orientado en forma inversa se obtendrían productos de tamaños diversos. No obstante, para tener un argumento más sólido de esto último, se realizó un análisis de restricción con la enzima Hinf I que de acuerdo con el sitio de corte mostrado en la figura 10, el plásmido tiene 9 sitios de corte para esta enzima dando como resultado los siguientes fragmentos 1366, 517, 436, 396, 383, 376, 271, 236 ,75 y 44pb. Al analizar los resultados de corte del plásmido con inserto (Figura 9) se logra apreciar claramente la presencia de 2 bandas por arriba del marcador de 800 pb, lo cual comprueba que el plásmido tiene el inserto, debido a que sólo se esperaría un fragmento de 1366 en caso de no haberlo. De acuerdo al mapa de clonación, el inserto estaría entre los sitios de corte 3864 y 436 pb por lo que después del corte y en caso de no tener inserto se esperaría un fragmento de 672 pb y en caso de tenerlo de 1077, como fue el caso. Con este análisis se confirmó que el plásmido contiene el inserto en la posición y tiene la orientación esperada.

En trabajos anteriores, no se demostró la expresión de la proteína en análisis en geles SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie y plata, esto nos lleva a proponer que una de las posibles explicaciones fue la expresión de la proteína en cantidades

pequeñas que fueron indetectables por SDS-PAGE, por lo que se optó hacer el análisis de la expresión de la proteína por ensayo Western Blot, el cual es reportado en la literatura por ser más sensible.⁽⁴⁷⁾ Para este caso, fue necesario el uso de anticuerpos Anti-V5 y antianticuerpos Anti-V5-HRP, los cuales permiten la detección de 14 aminoácidos del epítipo de las proteínas PV del paramixovirus SV5 ⁽³⁹⁾ por lo que la proteína de interés está fusionada con esta fracción del epítipo. Los resultados del ensayo de Western Blot en la Figura 13 , muestran señales que indican la detección de la proteína en los diferentes carriles donde se llevó a cabo la inducción con L- arabinosa (inductor de expresión), especialmente se tiene mayor señal de detección donde L-arabinosa fue probada a una concentración final de 0.002%. Cabe mencionar que también se apreciaron señales de fondo que son probablemente debidas a otras proteínas de la misma bacteria así como codificadas por el plásmido y que por lo tanto también son inducidas por la L-arabinosa.

El análisis por este método, comprueba la hipótesis en el sentido que la proteína de interés se expresa, pero en cantidades pequeñas que no son detectables por SDS-PAGE.

Como se mencionó arriba, la proteína blanco está fusionada con el epítipo V5 y contiene en el extremo N-terminal una secuencia de poli-histidinas, tal y como se mencionó en la sección de materiales y métodos, esta última característica se aprovechó para purificar a la proteína por cromatografía utilizando columnas Ni-NTA, las cuales son columnas compuestas por resinas de sefarosa acoplada con grupos de ácido iminodiacético. El ácido iminodiacético está cargado con iones Ni^{2+} y unido a Ni^{2+} por 3 sitios de coordinación. La resina tiene una carga neta positiva esto provoca la unión de la proteína a través de las cargas negativas del grupo imidazol a pH empleado de la histidina, con la carga positiva del Ni. Las proteínas unidas a la resina posteriormente pueden ser eluidas.

Antes de proceder con la purificación, se hizo un corrimiento electroforético de la inducción de la expresión con L-arabinosa, como se esperaba, el patrón electroforético de las proteínas es muy similar en todos los carriles al compararse con el testigo de células (Figura 11). Un resultado un tanto diferente se obtuvo después de efectuada la purificación con la columna Ni-NTA, en este caso se obtuvo

que después de analizar las eluciones por SDS-PAGE (Figura 16) se observa primeramente que pocas proteínas quedaron unidas a la resina, esto se puede ver si se compara con el lisado celular total (carril 2), también es posible apreciar que las fracciones 1, 2 y 3 se observa una banda que corresponde al tamaño esperado de la proteína siendo más intensa en la fracción número 2. Sin embargo, es importante notar que existen otras especialmente de mayor peso molecular a la buscada, la explicación de esto se encontró en la literatura en donde se señala que los resultados no son totalmente sorprendidos. Esto se basa en que la bacteria tiene muchas proteínas (transportadoras de metales, chaperonas de metales, etc) que pueden asociarse con la resina de la columna de níquel, debido principalmente a interacciones iónicas; ya que tienen sitios de unión a metales de transición como hierro, cobre, zinc y otros. ^(59,60) La gran mayoría de estas proteínas tienen residuos de cisteínas e histidinas que se pueden asociar al Ni. ⁽⁶¹⁾ De estas proteínas, existe una en particular, la *SlyD*, la cual está presente a niveles suficientes para provocar dificultad en la purificación, debido a que tiene varias histidinas en el carboxilo terminal. *Sly D* es fácil de reconocer porque tiene un peso molecular de 29 kDa. ^(62,63)

Una vez hecha la purificación se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry, como era de esperarse, se estimó que la cantidad de proteínas por este método fue muy bajo, donde se encontró que la fracción 1 fue de 425 ng/μL, mientras que en el carril no. 2 fue de 625 ng/μL. Esto confirma que la expresión fue muy pobre, ya que normalmente se esperarían concentraciones de

Para finalizar se realizó un ensayo de digestibilidad de proteínas que se basó en el desdoblamiento de la proteína con enzimas digestivas, en el cual se obtuvieron porcentajes de digestibilidad cercanos al 60%, resultados, que, comparados con la digestibilidad de algunos alimentos como el huevo o la leche es relativamente baja (ver Tabla 3). Estos valores de digestibilidad bajos señalan que la proteína es poco absorbible, por lo tanto poco nutritiva. No obstante, la digestibilidad podría aumentar al adicionarse a algún alimento y sometida entonces a procesos térmicos y/o de refinación. ⁽¹⁸⁾

Por último de acuerdo con el análisis computacional el valor de índice de inestabilidad, el cual se basa en valores asignados a dipéptidos encontrados en

proteínas inestables de secuencia conocida ⁽⁶⁴⁾ clasifica tanto a la proteína nativa como fusionada en inestables. Asimismo, la estimación media es de 10 h en *E. coli* ambos datos podrían en parte explicar los bajos rendimientos en la obtención de la proteína.

Por otra parte para construir el perfil de hidropaticidad y calcular los valores de hidropaticidad se aplicó el algoritmo desarrollado por Kyte & Doolittle, 1982. ⁽⁵⁵⁾

Las Figuras 17 y 18 muestran el perfil hidropático de la proteína nativa como fusionada, los valores indican que la proteína es hidrofílica con una estrecha región de aminoácidos hidrofóbicos hacia el extremo NH₂ terminal (región de 70 a 100).

VIII. CONCLUSIONES

- La proteína de fusión en estudio se logró expresar a niveles bajos que sólo fueron detectados por Western Blot.
- No se obtuvo una purificación al 100% de la proteína después de someterla a una columna de níquel debido a que se encontraron otras bandas al realizar SDS-PAGE.
- La digestibilidad enzimática de la proteína en estudio fue baja (60%) por lo que quizá no sea apta para consumo humano.
- El análisis virtual de la proteína mostró que ésta es principalmente hidrofílica aunque presenta una estrecha región de aminoácidos hidrofóbicos en el extremo amino terminal.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matews, C. K., van Holde, K. E., Ahern, K.G. 2002. Introducción a las proteínas, nivel primario de la estructura proteica. En: *Bioquímica*. 3ª Edición. Addison Wesley, España. pp: 141-180.
2. Guyton, A. C. 2000. Aparato digestivo y metabolismo. En *Fisiología Humana*. 6ª Edición. Mc Graw- Hill Interamericana, México. pp: 494-550.
3. Thornton, M.R. y Neilson, B.R. 1976. Biomoléculas. En: *Química orgánica*. 3ª Edición. Fondo Educativo Interamericano, España. pp:1081-1193.
4. Anderson, S. C., Cockayne, S. 1995. Proteínas. En: *Química Clínica*. Mc Graw-Hill Interamericana, México. pp: 190-212.
5. Pacheco, L. D. 2006. Estructura y función de aminoácidos y proteínas. En: *Bioquímica médica*. Limusa, México. pp: 95-156.
6. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/x8200s/x8200s00.htm
Acceso: 22/03/06
7. Caballero, B. 2002. Global patterns of child health: the role of nutrition. *Annals of Nutrition and Metabolism* 46: 3–7.
8. Kaufer, H. M. 2001. La Nutrición en México en los albores del siglo XXI. En: *Nutriología médica*. 2ª Edición. (ed) Casanueva, E., Kaufer, H. M., Pérez-L, A. B. y Arroyo, P. Médica Panamericana, México. pp: 21-40.
9. Gómez, F., Ramos, G. R., Cravioto, J. y Frenk, S. 2003. Desnutrición de tercer grado en México (Kwashiorkor en África). En: *La desnutrición infantil en México. Antología*. 1ª Edición. México. pp: 243-248.
10. Olaiz, F. G., Rivera D. J., Shamah, L. T., Rojas, R., Villalpando, H. S., Hernández, A. M. y Sepúlveda, A. J. 2006. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006*. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

11. Comisión Económica para América Latina y el Caribe determinación de las Necesidades de Energía Y Proteínas para la Población de diez Países Latinoamericanos. (1991). *Este documento corresponde al Anexo 2 del libro "Magnitud de la Pobreza en América Latina en los Años Ochenta", CEPAL, LC/G.1653-P.*
12. Thornton, M.R. y Neilson, B.R. 1976. Aminoácidos y proteínas. En: *Química orgánica*. 3ª Edición. Fondo Educativo Interamericano, España. pp:1160-1192
13. Pacheco, L. D. 2006. Principios bioquímicos de nutrición. En: *Bioquímica médica*. Limusa, México. pp: 527-570
14. Roach, B. 2005. Metabolismo de las proteínas. En: *Lo esencial en metabolismo y nutrición*. 2ª edición. Mosby, España. pp: 83-106
15. Raina, A. y Datta, A. 1992. Molecular cloning of a gene encoding a seed-specific protein with nutritionally balanced amino acid composition from *Amaranthus*. *Plant Biology*. 89: 11774-11778.
16. Laguna, J. y Piña, G. E. 2002. Funciones de las proteínas. En: *Bioquímica de Laguna*. 5ª Edición. Manual Moderno, México. pp: 153-182
17. Bourges, H. Las leguminosas en la alimentación humana (2da. Parte). *Cuadernos de Nutrición*. 1987; 10 (2): 17-32
18. Fennema, R. O. 2000. Aminoácidos, péptidos y proteínas. En: *Química de los alimentos*. 2ª Edición. (ed) Damodaran S. Acribia, España. pp: 383-512.
19. Kuenzi, M. 1985. Safe biotechnology: General considerations, *Appl. Microbiol.*:21
20. Crueger, W. y Crueger, A. 1989. Introducción a la biotecnología. En: *Biotecnología. Manual de microbiología industrial*. 3ª edición. Acribia, España. pp: 1-3.
21. Eveleigh, D. E. 1981. The Microbiological production of industrial chemicals. *Scientific American*. 245(3): 154-178.
22. Kelly, T. J. Jr. y Smith, H. O. 1970. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae* II. *J. Mol. Biol.* 51(2):393-409.
23. Prescott, M. L., Harley, P. J. y Klein, A. D. 1999. Genética microbiana. En *Microbiología*. 4a Edición. Mc Graw Hill-Interamericana, España. pp: 263-346.

24. Welch, R. M. y Gram, R. D. 2003. Genetics of Plant Mineral Nutrition: Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *J. Exp. Bot.* 55(396): 353-364.
25. Bouis, H. E. 2000. Enrichment of food staples through plant breeding: a new strategy for fighting micronutrient malnutrition. *Nutrition* 16: 701–704.
26. Graham, R. D., Welch, R. M. y Bouis, H. E. 2001. Addressing micronutrient malnutrition through enhancing the nutritional quality of staple foods: principles, perspectives and knowledge gaps. *Adv. Agron.* 70: 77–142.
27. Schnepf, H.E., Crickmore, N., Van Rie, J., Dereclus, J., Baum, J., Feitelson, D., Zeigler, R. y Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
28. Garzon, T. J. 1997. Aplicación de la biotecnología en el cultivo de la papa. I Simposium Internacional de la papa. México.
29. Quijano, M. 2002. Los alimentos transgénicos. *Rev. Fac. Med. UNAM.* 45(4): 158-160
30. AgBioWorld. The 'golden rice' tale.
<http://www.agbioworld.org/biotech-info/topics/goldenrice/tale.html>.
Acceso: Junio de 2006
31. Gura, T. 1999. New genes boost rice nutrients. *Science.* 285: 994–995.
32. Lucca, P., Hurrell, R. y Potrykus, I. 2002. Fighting iron deficiency anaemia with iron-rich rice. *Journal of the American College of Nutrition.* 21:184S–190S.
33. PIFB (Pew Initiative on Food and Biotechnology). 2001. Harvest on the horizon: future uses of agricultural biotechnology. PIFB, Washington, DC, September 2001.
34. WHO (World Health Organization). 2000. Turning the tide of malnutrition: responding to the challenge of the 21st century. WHO, Geneva, Document WHO/NHD/00.7.
35. Rojo, L. M. 2006. Construcción de un gen sintético por PCR que codifique para una proteína con alto valor biológico, su clonación y expresión en *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*. Tesis profesional. Mexico.
36. Evaluación de la alergenicidad de los alimentos modificados genéticamente Informe de una Consulta FAO/OMS de Expertos sobre alergenicidad de los

- alimentos obtenidos por medios biotecnológicos
<http://www.fao.org/docrep/007/y0820s/y0820s01.htm#TopOfPage> 22 - 25 de enero de 2001 Acceso: julio 2006
37. Taylor, S. L. 1997. Food from genetically modified organisms and potential for food allergy. *Environ Toxicol Pharmacol.* 4: 121-126
 38. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 1998. *Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares. 1996.* México: INEGI.
 39. Dillon, P. J. y Rosen, C. A. 1993. Use of polymerase chain reaction for the rapid construction of synthetic genes. En *Methods in molecular biology (PCR protocols: Current methods and applications)*. (ed.) B.A. White. Humana Press, Totowa, NJ. pp: 263-268.
 40. Southern, J. A., Young, D. F., Heaney, F., Baumgartner, W., and Randall, R. E. 1991. Identification of an Epitope on the P and V Proteins of Simian Virus 5 That Distinguishes Between Two Isolates with Different Biological Characteristics. *J. Gen. Virol.* 72, 1551-1557.
 41. Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. Gel electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis. En: *Molecular Cloning: A Laboratory manual.* 1^a ed. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA. pp: 5.1-5.90
 42. Manual de Invitrogen: pBad- TOPO ® TA Expression kit: Five Minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products for regulated expression in E. coli. Version N. 13, April 2004, Carlsdab, California.
 43. Birnboim, H. C. y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523.
 44. Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins En: *Molecular Cloning: A Laboratory manual.* 3^a ed. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA. pp: A8.40-A8.49
 45. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685
 46. Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. Detection systems. En: *Molecular Cloning: A Laboratory manual.* 3^a ed. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA. pp: A9.1-A9.49

47. Burnette, W. N. 1981. Western blotting: Electroforetic transfer of proteins from sodium dodecil sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 112: 195-203
48. van Oss, C.J., Good, R.J., and Chaudhury, M.K. 1987. Mechanisms of DNA (Southern) and protein (Western) blotting on cellulose nitrate and other membranes. *J. Chromatogr.* 391:53-65
49. Thompson, D. and Larson, G. 1992. Western blots using stained proteins gels. *Biotechniques.* 12: 656-658.
50. Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
51. Dunn, M. J. 1992. Protein determination of total protein concentration. En: *Protein Purification Methods: A practical approach.* (ed) Harris, E.L.V y Angal, S. Oxford: IRL Press, Oxford. pp: 10-17
52. Price, N.C., 1996. Proteins, Labfax, Oxford: Academic Press.
53. (AOAC) Oficial Methods of Analysis of Chemistry International 16 th edition, 1998.
54. Hsu, H., Vavak, D., Satterlee, L., Miller, G.A. 1977. Multienzyme technique for estimating protein digestibility. *J Food Sci.* 42: 1269-1279.
55. Kyte, J. and Doolittle, R.F. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
56. Martínez, C. D. 2008. Cambio del aminoácido triptófano 505 por leucina del dominio N de la ATPasa de H⁺ de *Kluyveromyces lactis*. Tesis profesional. México.
57. White, B. A. 1993. Use of the polymerase Chain Reaction for the rapid construction of synthetic genes. En *Methods in Molecular Biology, PCR Protocols: Current methods and Applications.* 15a Edición. Humana Press Inc, Totowa, NJ. pp: 263-268
58. Watson, J. D., Gilman, M. Witkowski, J Y Zoller, M. 1992. The polymerase Chain Reaction. En: *Recombinant DNA.* 2a. Edición. Scientific American Books, New York. pp: 79-98.

59. Bolaños-García, V.M. and Davies, O. R. 2006. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 1304–1313.
60. Howell, J.M., Winstone, T.L., Coorsen, J. R. and Turner, R. J. 2006. An evaluation of in vitro protein-protein interaction techniques: assessing contaminating background proteins. *Proteomics*. 6, 2050–2069.
61. GrÅslund, S., Nordlund, P., Weigelt, J., Bray, J., Gileadi, O., Knapp, S., Oppermann, U., Arrowsmith, Ch., Hui, R., Ming, J., dhe-Paganon, S., Park, H., Savchenko, A., Yee, A., Edwards, A., Vincentelli, R., Cambillau, Ch., Kim, R., Kim, S., Rao, Z., Shi, Y., Terwilliger, T., Kim, Ch., Hung, L., Waldo, G. S., Peleg, Y., Albeck, S., Unger, T., Dym, O., Prilusky, J., Sussman, J. L., Stevens, R. C., Lesley, S. A., Wilson, I. A., Joachimiak, A., Collart, F., Dementieva, I., Donnelly, M. I., Eschenfeldt, W. H., Kim, Y., Stols, L., Wu, R., Zhou, M., Burley, S. K., Emtage, J. S., Sauder, J. M., Thompson, D., Bain, K., Luz J., Gheyi. T., Zhang, F., Atwell, Sh., Almo, S. C., Bonanno, J. B., Fiser, A., Swaminathan, S., Studier, F. W., Chance, M. R., Sali, A., Acton, T. B., Xiao, R., Zhao, L., Ma, L. Ch., Hunt, J. F., Tong, L., Cunningham, K., Inouye, M., Anderson, S., Janjua, H., Shastry, R., Ho, Ch. K., Wang, D., Wang, H., Jiang, M., Montelione, G. T., Stuart, D. I., Owens, R. J., Daenke, S., SchÅtz, A., Heinemann, U., Yokoyama, S., BÅssow, K., Gunsalus, K. C. 2008. Protein production and purification. *Nature Methods*. 5(2):135 – 146.
62. Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O., Akiyama, T. 2000. Asef a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science*. 289(5482):1194-1197.
63. Harlow, E. and Lane, D. 1988 *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
64. Guruprasad, K., Reddy, B. V., Pandit, M.W. 1990 Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng*. 4(2):155-61.

X. ANEXOS

Medio Lb:

Bacto-peptona 10 g, Bacto yeast-ext 5 g, NaCl10g y Bacto agar 15 grs

Soluciones para SDS-PAGE

- 2X para PAGE-SDS:
- 1x Tris glicina buffer para electroforesis:
- 25mM Tris base
- 250mM glicina (pH 8.3)(grado electroforesis)
- 0.1% SDS

Preparar una solución stock 5x de buffer para electroforesis por disolución de 15.1 g de tris base y 94 grs de glicina en 900 mL de agua desionizada. Entonces agregar 50 mL de solución de SDS al 10% y agregar agua hasta ajustar el agua a 1000 mL.

1XSDS BUFFER DE CORRIMIENTO

- 50 Mm Tris-Cl (pH6.8)
- 100 mM ditiotreitól (antes de usar)
- 2% SDS
- 0.1% de azul de bromofenol
- 10% de glicerol

Solución metanol: ácido acético: Combinar 900 mL de metanol: H₂O (500 mL de metanol y 400 mL de H₂O) y 100 mL de ácido acético glacial.

Solución de monómeros de acrilamida: 29,2 g acrilamida; 0,8 g bis-acrilamida; disolver en agua desionizada y aforar a 100 mL. Filtrar y guardar en botella ámbar de vidrio, en refrigeración (<1 mes).

Amortiguador del gel separador (inferior): 18,15 g Tris; disolver en 60 mL de agua, ajustar a pH 8,8 con HCl, aforar a 100 mL. Guardar en refrigeración.

Amortiguador del gel compactador (superior): 3,0 g Tris; disolver en 60 mL de agua, ajustar a pH 6,8 con HCl, aforar a 100 mL.

Amortiguador de la cámara (solución concentrada 10x): 12 g Tris; 57,6 g glicina; 4 g SDS; disolver en 300 mL de agua. El pH debe quedar entre 8,3-8,4 si las pesadas son correctas (debe evitarse el ajuste del pH para no alterar la fuerza iónica de esta solución). Aforar a 400 mL. Guardar a temperatura ambiente. Diluir 10 veces al momento de utilizar.

Persulfato de amonio: Preparar al momento una solución al 10%. Este reactivo es muy higroscópico

Solución de SDS: 1,0 g duodecilsulfato de sodio; disolver en 10 mL de agua. Guardar en botella de vidrio a temperatura ambiente.

Amortiguador de muestras no reductor (solución concentrada 2x): 10.0 mL amortiguador del gel superior; 16,0 mL solución de SDS; 50 mg azul de bromofenol; 12.0 mL glicerol; 4.0 ml agua; mantener a temperatura ambiente.

Amortiguador de muestras reductor (solución concentrada 2x): El mercaptoetanol es inestable en esta solución, por lo que se prepara una pequeña cantidad del reactivo para una semana. Agregar 0.2 mL de 2-mercaptoetanol a 4.2 mL del amortiguador no reductor. Guardar a temperatura ambiente.

Soluciones para tinción de Coomassie:

Fijador: 500 mL metanol; 70 mL ácido acético glacial; 430 mL agua; guardar a temperatura ambiente en recipiente hermético. *Importante:* Evitar el contacto y la inhalación de vapores de metanol.

Colorante Coomassie Blue R-250:

0,25 g Coomassie blue R-250; 225 mL metanol; 46 mL ácido acético; 230 mL agua; disolver el colorante en el metanol, luego agregar el ácido, y finalmente el agua.

Mezclar durante 15 minutos, filtrar y guardar a temperatura ambiente. Aunque el colorante puede ser reusado varias veces para ciertos fines, la sensibilidad declina (usualmente es del orden de 0,5 g de proteína), por lo que se prefiere usar una pequeña cantidad y descartarla cada vez. Otro tipo de Coomassie, el G-250, puede ser utilizado como colorante para geles, aunque su sensibilidad es menor.

Decolorador:

200 mL metanol; 100 mL etanol; 50 mL ácido acético; 650 mL agua; guardar a temperatura ambiente.

Reactivos para WesterBlot**PARA LA ELECTROTRANSFERENCIA***1.- Regulador de transferencia*

(Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, Ph 8.3, metanol 20% vo)

Trizma base	9.07 grs
Glicina	43.2 grs
H ₂ O bidestilada	2400 mL.

PARA LA INMUNODETECCION*1.- PBS 10X, pH 7.4*

NaCl	80 grs
KH ₂ PO ₄	2 grs
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	29 grs
KCl	2 grs
H ₂ O bidestilada	900 mL y ajustar a 1L

2.- Regulador de bloqueo pH 7.3

Albúmina de suero bovino al 5% (BSA) o leche en polvo sin grasa al 0.5% ^(43,44) con 0.05% de detergente Tween 20

A)

Gelatina	6.25 grs disuelta en 250 mL de H ₂ O caliente
EDTA tetrasódico	5.2 grs
EDTA disódico	4.54 grs
PBS 10X	250 µL
Tween20	2.5 µL
H ₂ O bidestilada	1.5 L y aforar a 2.5 L

B)

Leche Svelty	3 grs
PBS	100 mL

3.- *Muestra problema.*

4.- *IgG anti-innumoglobulinas de caballo, conjugadas a peroxidasa diluída en regulador de bloqueo*

5.- *Regulador de lavado PBS-TWEEN20 0.1%*

PBS	100 mL
Tween20	1 mL
H ₂ O bidestilada	900 mL

6.- *Sustrato para la peroxidasa*

4 cloro 1 naftol	30 mg
Metanol absoluto	10 mL
PBS 1X	50 mL
H ₂ O ₂ 30%	50 µL

Reactivos para Purificación de proteínas recombinantes en columna de Níquel ácido-nitril-tri-acético (Ni-NTA).

Regulador de lisis. 50 mM Na₂PO₄ (pH=8-8.5), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5 mM de 2- mercaptoetanol, 1 Mm PMSF

Regulador de lavado. 50 mM Na₂PO₄ (pH=8-8.5), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10% de glicerol, 5 mM de 2- mercaptoetanol.

Regulador de elucion. 50 mM Na₂PO₄ (pH=8-8.5), 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 10% de glicerol, 5 mM de 2- mercaptoetanol. (4 mL)

