

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y tecnología

**PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)
Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I**



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

**4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Estandarización de las condiciones de cultivo de dos cepas de *E. coli* para la
obtención de una poliproteína multiepítipo en el Centro de Investigación y Asistencia
en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco sede Guadalajara**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, José Miguel González Cisneros

Profesor PAP: Dr. Ángel Hilario Álvarez Herrera & Q. F. B. Ana Cristina Domínguez
Hernández

Tlaquepaque, Jalisco, julio de 2023

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	4
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	4
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	5
1.2 Caracterización de la organización.....	7
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	8
1.4. Planeación de alternativa(s).....	9
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	12
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	27
1.7. Bibliografía y otros recursos	28
2. Productos	31
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	34
3.1 Sensibilización ante las realidades	34
3.2 Aprendizajes logrados	35

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El PAP “Estandarización de las condiciones de cultivo de dos cepas de *E. coli* para la obtención de una poliproteína multiepitopo” es parte de un proyecto que inició por mejorar el diagnóstico de las micobacterias patógenas para el ser humano y el bovino. Se abordó de objetivo lograr las condiciones óptimas de expresión de una proteína artificialmente diseñada mediante bioinformática para uso potencial en diagnóstico de la tuberculosis.

Se buscó utilizar y cultivar una cepa de *Escherichia coli* transformada con el gen expresante de la proteína recombinante. Optimizar las condiciones experimentales para producir la proteína en cultivos bacterianos a pequeña escala. Además, separar el producto de los cultivos y determinar la presencia de la proteína recombinante por su tamaño y un marcador de histidina.

Se trabajó con dos cultivos de *E. coli* expresantes de la proteína en dos vectores (pET-28a y pET-32), para determinar las mejores condiciones de expresión de la proteína. Se indujo la expresión de la proteína con diferentes temperaturas y tiempos de incubación. Se realizó el lisado y separación del producto a partir de los cultivos. Para observar la proteína, se hizo una electroforesis de proteínas complementada con una tinción con azul de Coomassie. Asimismo, se realizó una detección con anticuerpos específicos por medio de la técnica de Western blot.

La experimentación permitió elaborar una metodología con las mejores condiciones de inducción, visualizando una proteína soluble. Habiendo parte del producto en la fracción precipitada debido a una sobre producción por ello mal plegamiento de la proteína.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) cuenta con una línea de investigación dedicada a la biotecnología de productos biofarmacéuticos para la salud. Este departamento busca atender las problemáticas médicas y farmacéuticas del sector humano y pecuario de Jalisco a través de proyectos innovadores.

El CIATEJ desarrolla proyectos como la síntesis de proteínas recombinantes con interés biotecnológico y con potencial biomédico, entre ellos a la obtención de reactivos mejorados para el diagnóstico asertivo de la tuberculosis. El presente proyecto es una parte de un protocolo experimental encaminado a la obtención de la proteína de interés biotecnológico.

Objetivo general:

Determinar las condiciones óptimas para la expresión y posterior identificación de una proteína recombinante diseñada con características antigénicas optimizadas para el diagnóstico de la tuberculosis.

Objetivos específicos:

- Cultivar la cepa de *Escherichia coli* transformada con los plásmidos pET-28a y pET-32 e inducir la producción de la proteína recombinante.
- Obtener las fracciones subcelulares con proteína recombinante a partir de lisados bacterianos.
- Detectar la presencia de la proteína recombinante en las fracciones subcelulares de los cultivos de *E. coli*.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

El Dr. Robert Koch en 1882 anunció el descubrimiento de la bacteria causante de la tuberculosis (TB). La TB en humanos fue encontrada hace 9,000 años en personas y en animales se encontró en huesos de hace más de 17,000 años. No fue sino hasta 1890 que Robert Koch desarrolló un extracto de bacilos de la tuberculosis, en 1907 Clemens von Pirquet creó una prueba cutánea para medir la reacción del cuerpo humano a dicho extracto de bacilos, a lo que más tarde en 1908 Charles Mantoux actualizó el método con una jeringa al que se le conoce como prueba intradérmica de la tuberculina [1].

El diagnóstico de la tuberculosis es un tema vigente en la sociedad actual. La prueba oficial para el diagnóstico de la tuberculosis en la campaña contra la TB bovina en México es el método de Mantoux (tuberculina), con una sensibilidad de 40 a 80% y una especificidad de entre el 70 y 90% [2]. Para el desarrollo de las pruebas de tuberculina, suele usarse una mezcla compleja e inespecífica de antígenos celulares de *M. tuberculosis* para evaluar la respuesta inmune contra estos antígenos en la prueba de Mantoux [3], buscando que dicha mezcla genere una respuesta inmune celular de hipersensibilidad retardada tipo 4 detectable para el diagnóstico de la tuberculosis.

El diagnóstico confirmatorio de tuberculosis en la actualidad es mediante el cultivo y aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* con la confirmación de las lesiones pulmonares asociadas mediante una radiografía de tórax. Debido a que cada día mueren 4,500 personas en el Mundo por la TB se han desarrollado numerosas campañas de detección para el diagnóstico y prevención de esta enfermedad [2], y en México se ha registrado más de 28 mil casos de tuberculosis en el año 2022, y solo 70% conocía que era portador [4]. Por lo que un producto innovador que pueda agregar un valor diagnóstico superior en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis representa un beneficio para las personas en el sector médico y veterinario que son expuestas a personas o animales infectados de tuberculosis.

La obtención de una poliproteína optimizada de 33 kDa para el diagnóstico de la tuberculosis es posible debido al trabajo previo del diseño de la molécula desarrollado en el CIATEJ, a partir de la selección de las secuencias proteicas más antigénicas de 4 de las proteínas más caracterizadas para uso en diagnóstico molecular de la TB seleccionadas a partir de bases de datos para epítomos inmunes (IEDB) [5]. En estudios previos la evaluación de la respuesta inmune de péptidos sintéticos derivados de superficie de *M. tuberculosis* expone que sin modificaciones a dichos extractos estas secuencias no son reconocidas por el sistema inmune, por lo tanto, ha habido diversos ensayos para realizar cambios estructurales en péptidos capaces de generar una mejor presentación antigénica [6].

Además, gracias a la predicción *in silico* de la estructura molecular de la proteína y sus propiedades fisicoquímicas con la herramienta *ProtParam tool* de Expasy, el diseño de la proteína posee las características necesarias para su expresión optimizada de manera intracelular y solubilización en un medio acuoso. El diseño de la proteína recombinante tiene

dos patógenos como blancos infecciosos para detectar una respuesta inmune humoral y celular para el diagnóstico in vitro de la tuberculosis, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis*, dado que poseen una similitud genética del 99.95% [2].

1.2 Caracterización de la organización

El CIATEJ es un centro público de investigación (CPI) del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) encargado de llevar a cabo proyectos innovadores en las áreas de biotecnología vegetal, biotecnología industrial, tecnología ambiental, tecnología alimentaria y biotecnología médica y farmacéutica, para el desarrollo tecnológico y de investigación con el fin de dar soluciones a las problemáticas actuales del país [7]. Además, esta organización ofrece servicios de formación para maestrías, doctorados, capacitaciones, estancias y tesis de pregrado en las diversas áreas de trabajo ya mencionadas.

El personal de investigación del CIATEJ, expertos en sus áreas de trabajo, llevan a cabo la misión de la institución a través de proyectos y servicios en los diversos laboratorios y plantas de trabajo para generar nuevos conocimientos con la finalidad de mejorar procesos, productos y servicios para el desarrollo sostenible de la sociedad actual. La visión del CIATEJ es fomentar los conocimientos generados a través de las diversas investigaciones con ayuda de la colaboración del sector privado, público y redes internacionales [7]. El área de investigación de biotecnología médica y farmacéutica está ubicada en la sede de Guadalajara, su principal objetivo es atender problemáticas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas y animales [8].

El presente proyecto de tipo experimental es ejecutado por la estudiante de maestría en Innovación biotecnológica químico farmacobióloga Ana Cristina Domínguez Hernández y coordinado por el Dr. Ángel Hilario Álvarez Herrera perteneciente al sistema nacional de investigadores de nivel I, quien trabaja de manera independiente en el área de biotecnología médica y farmacéutica [9]. El principal interés en el área de trabajo es sintetizar proteínas recombinantes para el diagnóstico y prevención de enfermedades.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

De acuerdo con Jilani *et al.* [10], 8 millones de personas llegan a desarrollar tuberculosis activa en el mundo y el 25% muere debido a esta enfermedad al año. La tuberculosis consiste en una enfermedad multiorgánica, que se ubica principalmente en los pulmones, causada por una bacteria intracelular facultativa, *Mycobacterium tuberculosis*, patógeno exclusivo de seres humanos, y otras micobacterias, como por ejemplo *Mycobacterium bovis* presente en ganado bovino y otros animales. No cualquier organismo que presente la infección por bacterias de la tuberculosis desarrolla la enfermedad, ya que existe la versión latente y la versión activa del padecimiento [11].

En la actualidad, como infección crónica, es un desafío diagnosticar la TB en casos asintomáticos para evitar la persistencia y diseminación de la enfermedad. Una de las pruebas para el diagnóstico de *M. tuberculosis* es por la detección de los bacilos acidorresistentes (BAAR) en secreciones. Otra técnica de diagnóstico es mediante cultivos de micobacterias del esputo del paciente, aunque suelen ser muy tardados debido al tiempo de incubación necesario para realizar la confirmación de la bacteria [10]. También se realizan ensayos de liberación de interferón gamma (IGRA) de muestras sanguíneas y pruebas intradérmicas de tuberculina (TST), aunque estas pueden generar una gran cantidad de falsos positivos en el diagnóstico de la tuberculosis debido a la vacunación con la vacuna BCG previa contra la tuberculosis u a otras infecciones de micobacterias no tuberculosas [11].

La infección por tuberculosis no es exclusiva los seres humanos, también puede deberse por el contacto con animales, se registran 230 casos al año de tuberculosis por *M. bovis* en Estados Unidos. Actualmente los casos disminuyen debido a la pasteurización de alimentos provenientes del ganado bovino [12]. En Jalisco, de 133,778 pruebas realizadas para tuberculosis bovina, el 0.97% de los animales fueron reactivos, con una prevalencia promedio de 2.5% en el país sin contar cuencas lecheras [13].

En México las tasas más elevadas de infección por *M. bovis* se encuentran en cuencas lecheras, siendo que del 3 al 6% corresponden a heridas de animales en contacto con personas [2]. Dado que suele haber una infección asintomática entre granjeros, veterinarios y trabajadores expuestos al ganado infectado, como mataderos o carniceros, los cuales

terminan por desarrollar tuberculosis, estas personas representan una fuente de infección para otra gente en contacto con ellos. La detección correcta de micobacterias tuberculosas representa una gran ventaja para el diagnóstico y prevención de la enfermedad, evitando falsos positivos o negativos por pruebas ya existentes en el mercado actual.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Existen diversas metodologías para realizar la extracción de proteínas intracelulares. Por ejemplo, los métodos físicos (sonicación, homogenización y ciclos de congelado y descongelado) buscan mantener la viabilidad de las proteínas de interés. Los métodos químicos (choque osmótico, detergentes y enzimas) que dependen de reactivos y suelen ser complementados con métodos físicos de extracción [14]. En el presente PAP, las extracciones para la obtención de la proteína del citoplasma de las células son mediante una sonicación. Este método se basa en aplicar energía sonora para romper la membrana celular sin comprometer la proteína, y se complementa con el uso de un buffer de lisis Triton X-100 (detergente no iónico) para solubilizar el producto de interés, manteniendo su estabilidad.

Puesto que es necesario determinar la presencia del producto de interés en los cultivos inducidos de *E. coli* para la expresión de la proteína, se realiza el reconocimiento mediante la separación del conjunto de proteínas de la bacteria y restos del lisado por electroforesis. Es decir, una técnica de migración de proteínas en respuesta de un campo eléctrico sobre una matriz porosa. Existen diversos tipos de electroforesis como la capilar, en papel, en gel de agarosa y en un gel de poliacrilamida. Las extracciones de proteínas suelen usar geles de poliacrilamida (PAGE), ya que son inertes y estables en diferentes rangos de temperatura y pH [15].

La electroforesis en gel de poliacrilamida puede ser con la proteína de manera nativa o desnaturalizada. Para correr un gel con la proteína desnaturalizada se utiliza un detergente (dodecilsulfato sódico, SDS) y la técnica es denominada SDS-PAGE en donde este reactivo, al unirse a las proteínas, proporciona la cualidad de cargar negativamente la muestra, encubriendo la carga nativa de la proteína, por lo que al correr el gel en la electroforesis se separa exclusivamente de acuerdo con el tamaño de la proteína [15]. Debido a que la proteína de interés en el presente PAP es de 33kDa, es posible reconocer la expresión positiva del

producto mediante esta técnica, que se complementa con la tinción del gel con azul de Coomassie y un marcador de peso molecular que sirve para realizar la comparación de tamaño para la identificación asertiva [16].

Al realizar la identificación de la proteína por su tamaño es posible que existan proteínas de tamaños similares, subproductos del lisado del cultivo. Por ello se puede optar por otro tipo de electroforesis, por ejemplo, la bidimensional que separa de acuerdo con el peso molecular y el punto isoeléctrico para visualizar una mayor cantidad de proteínas aisladas [17]. Sin embargo, se optó en este proyecto por complementar la SDS-PAGE con un Western blot, una técnica de electrotransferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa y que luego se utilizan anticuerpos para detectar la presencia específica de una proteína recombinante gracias a una etiqueta de histidinas 6xHis [14]. Debido a que la proteína de interés en el proyecto posee un marcador de histidina, se emplea el anticuerpo (anti-His6x) para realizar un reconocimiento definitivo de la proteína por una unión antígeno-anticuerpo.

En la tabla 1 se expone el plan de trabajo del presente proyecto para llevar a cabo los objetivos planteados. Se muestra una descripción de las actividades y se alinea con la semana dentro del programa de trabajo para la extracción de la proteína de interés y en la tabla 2 se observa los recursos necesarios.

Tabla 1. Cronograma de actividades previstas para la realización del PAP.

Nombre de la actividad	Recursos	Tiempo (días)	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8
Investigación y familiarización de los fundamentos sobre las metodologías planteadas para la experimentación del proyecto.	N. A.	2								
Práctica de inducción, separación, electroforesis con los vectores pET-	A. H. I. O. C. F. S. D. G. E.	5								

28a y pET-32 para la producción de la proteína.										
Entrega avance de rPAP 1.	N. A.	1								
Corrida 1 (inducción: @37°C x 4 h). Separación, electroforesis y Western blot, con los vectores pET-28a y pET-32 para la producción de la proteína.	T. P. I. O. C. F. S. D. G. E. W. B.	4								
Evaluación de avances y el desarrollo del trabajo por el coordinador del proyecto.	A. H.	1								
Corrida 2. (inducción: @37°C x 6 h). Separación electroforesis y western blot. con los vectores pET-28a y pET-32 para la producción de la proteína.	T. P. I. O. C. F. S. D. G. E. W. B.	4								
Entrega avance de rPAP 2.	N. A.	1								
Práctica de ELISA.	A. H.	1								
Clase sobre los fundamentos de la proteómica.	A. H.	1								
Asesoría para el avance del proyecto.	A. H.	1								
Corrida 3. (inducción: @37°C x 4 h). Separación electroforesis y western blot. con	T. P. I. O. C. F. S. D. G. E. W. B.	3								

los vectores pET-28a y pET-32 para la producción de la proteína.										
Entrega avance de rPAP 3.	N. A.	1								
Corrida 4. (inducción: @30°C x 4 y 8 h). Separación electroforesis y western blot. con el vector pET-28a para la producción de la proteína.	T. P. I. O. C. F. S. D. G. E. W. B.	3								
Entrega avance de rPAP 4.	N. A.	1								
Presentar avance 4 al director.	N. A.	1								
Entrega final de rPAP.	N. A.	1								
Presentación final oral.	N. A.	1								

Tabla 2. Abreviaturas de los recursos señalados en el cronograma de actividades.

Recursos utilizados	
Abreviatura	Significado
A. H.	Asesoría Dr. Ángel Hilario Álvarez Herrera
N. A.	No aplicable
T. P.	Trabajo personal
C. F.	Centrifuga
I. O.	Incubadora orbital
S. D.	Sonicador
G. E.	Mini-PROTEAN tetra vertical electrophoresis cell
W. B.	Mini Trans-Blot Cell

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Producción de una proteína recombinante mediante E. coli transformada

La generación de proteínas con el sistema de expresión de *E. coli* es una herramienta popular en la biotecnología que surgió hace más de 40 años, cuenta con diversas ventajas como la cantidad de vectores comerciales estandarizados, el rápido crecimiento en medios de cultivos

simples y el gran conocimiento del genoma, fisiología y metabolismo [18]. En este PAP, se utilizaron dos cepas transformadas de *E. coli* BL21 para producir la proteína de interés: una cepa con el vector pET-32 y otra con el vector pET-28a. Se realizaron cultivos preliminares de 10 mL de *E. coli* por cada vector en medio Luria-Bertani (LB), con un inóculo del 4% v/v a 250 rpm por 37°C hasta una OD₆₀₀ de entre 0.6 y 0.7.

El vector de expresión pET-32 (5,900 pb) está diseñado para la producción de proteínas, posee un gen de resistencia a ampicilina y diversas etiquetas, como una secuencia peptídica para la incorporación de tiorredoxina (109 aa y 12 kDa) y una secuencia de histidina (6xHis) [19]. Por otra parte, el vector pET-28a (5369 pb) cuenta con un gen de resistencia a kanamicina y también una etiqueta de histidina (6xHis) [20]. Es necesario que la inducción de ambos vectores para la producción de la proteína de interés sea mediante isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG), análogo de la lactosa para eliminar el represor del operador *lac* presente en pET-28a y pET-32 para inducir la expresión del plásmido que está basado en la transcripción de la RNA polimerasa del fago T7 como estrategia molecular del plásmido recombinante [19], [20]. Cuando en el presente PAP se logró la densidad óptica establecida, se procedió a separar la mitad del volumen del cultivo. Esta porción se indujo con IPTG a una concentración final de 1 mM. Se dejó induciendo la expresión de la proteína de interés de acuerdo con las condiciones correspondientes para cada corrida: a 37°C por 4 y 6 horas y 30°C por 4 y 8 horas.

Separación de proteínas

La síntesis de proteínas recombinantes comienza con el estudio de las características de la proteína de interés, incluyendo su ubicación dentro de un cultivo celular. Si la proteína se encuentra de manera intracelular, es necesario hacer la lisis y separación física de la proteína del resto de la célula [14]. El diseño *in silico* de la proteína presente en este PAP expone que es producida de manera intracelular y posee un tamaño de 33 kDa en el vector pET-28^a y 45 kDa en el vector pET-32, debido a la etiqueta de tiorredoxina, y además debe de ser soluble con marcador de histidina (6xHis) para su posterior purificación por afinidad e identificación.

Para la separación de proteínas, se realizó una centrifugación de los cultivos de *E. coli* durante 2 min a 8,000xg para luego desechar el sobrenadante correspondiente al medio de cultivo.

Posteriormente, se resuspendió la pastilla o pellet celular en un volumen de una décima parte del cultivo inicial con buffer de PBS + Tritón X-100 al 0.1%. Finalmente, se sonicó la suspensión a 10 Hz en hielo durante 45 min, como se muestra en la Figura 1, en intervalos de 30 seg de sonicación y 30 seg de descanso, para terminar con una centrifugación a las mismas condiciones y así evaluar la presencia de la proteína de interés en el sobrenadante del lisado (fracción soluble) y en el pellet (fracción precipitada o insoluble).



Figura 1. Uso de hielo para la lisis por sonicación de cultivos de *E. coli* transformados con pET-32 y pET-28^a.

Electroforesis mediante SDS-PAGE y Western Blot

La separación de proteínas cargadas negativamente con dodecilsulfato sódico (SDS) se puede realizar en respuesta a un campo eléctrico mediante una matriz porosa, como por ejemplo un gel de poliacrilamida. Para aumentar la resolución de una electroforesis de proteínas, en la actualidad se trabaja con dos secciones diferentes en un gel (electroforesis discontinua): un primer gel concentrador de poro grande seguido por un gel separador de mayor concentración para que las muestras se concentren en una zona estrecha antes de recorrer la matriz [21]. Por

lo tanto, se prepararon geles de poliacrilamida para realizar la electroforesis de proteínas, correspondientes al lisado de cultivos de *E. coli* obtenidos en el PAP, de acuerdo con la composición expuesta en las tablas 3 y 4 con ayuda del equipo de electroforesis Mini-PROTEAN tetra vertical electrophoresis cell (Fig. 2).

Tabla 3. Composición del gel separador de poliacrilamida al 12%.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida/Bis 30%	4 mL
4X Tris-HCl/SDS pH 8.8	2.5 mL
Agua destilada	3.4 mL
Persulfato de amonio (10%)	100 uL
N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED)	4 mL

Tabla 4. Composición del gel concentrador de poliacrilamida al 6%.

Reactivo	Cantidad
Acrilamida/Bisacrilamida 30% (29%/1%)	600 uL
4X Tris-HCl/SDS pH 6.8	750 uL
Agua destilada	1620 uL
Persulfato de amonio (10%)	30 uL
N, N, N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED)	2.4 uL

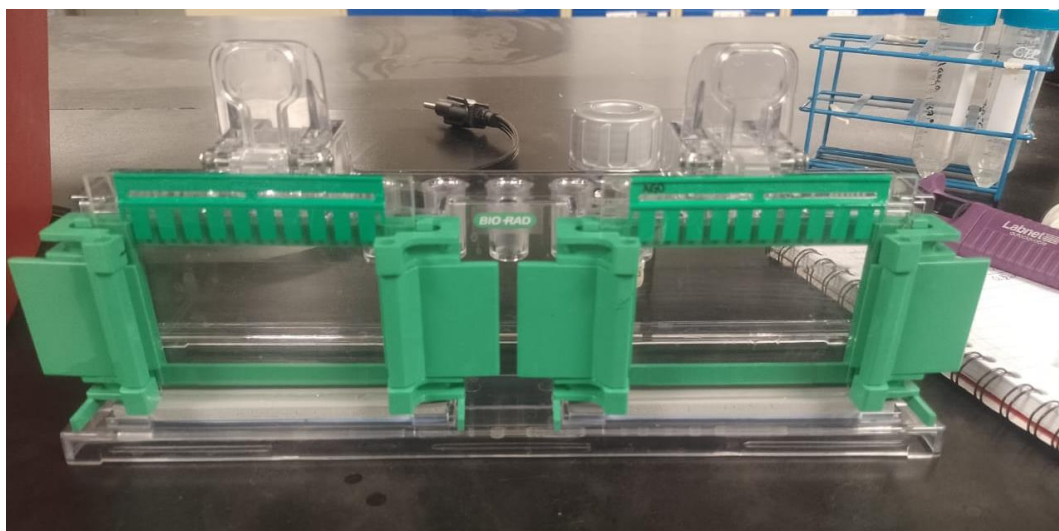


Figura 2. Preparación de geles de poliacrilamida. Gel separador con concentración del 12% y gel concentrador al 6%.

En una electroforesis discontinua se cambia la velocidad cuando las muestras que recorran el gel concentrador lleguen a la interfase entre geles, antes del gel separador, por la diferencia

que existe de pH y la concentración entre los geles. Es necesario para el desarrollo de esta técnica ajustar el voltaje de acuerdo con la posición de las muestras en el gel de poliacrilamida para aumentar la resolución del resultado [21]. En las separaciones por electroforesis del presente PAP se corrió cada gel de poliacrilamida en buffer de corrida 1X (tabla 5) a 160 V durante 5 minutos o hasta que se visualizó una línea continua trazada por el buffer de carga sobre el gel y luego a 120 V por 1 h y media o hasta separar completamente el marcador de peso molecular (Fig. 3).

Tabla 5. Composición del buffer de corrida 5X.

Reactivo	Cantidad
Tris base	15.1 g
Glicina	72 g
SDS	5 g
dH ₂ O	1000 mL

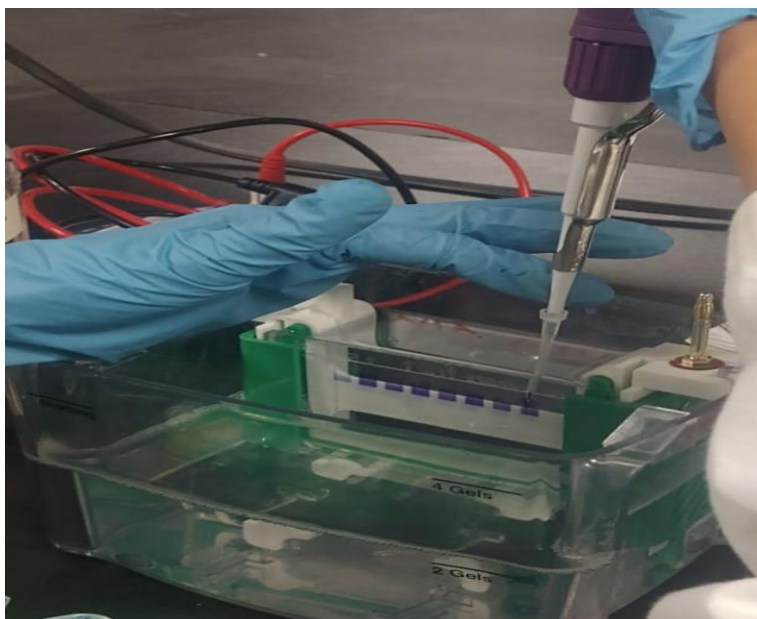


Figura 3. Preparación de los pocillos para la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas pertenecientes al lisado de cepas de *E. coli* transformadas con el vector pET-28a y pET-32.

Las proteínas separadas en una electroforesis pueden ser visualizadas para determinar su peso molecular, y por ende su identificación parcial, con una tinción de azul de Coomassie que tiene una sensibilidad de hasta 50 ng [15]. Al terminar la SDS-PAGE se extrajo el gel de poliacrilamida de entre las placas de vidrio, se tiñó con azul de Coomassie (Figura 4) durante

toda la noche y posteriormente se lavó con solución desteñidora (Tabla 6) hasta que se visualizaron bandas correspondientes a la separación de proteínas sobre el gel.

Tabla 6. Composición de solución desteñidora.

Reactivo	Cantidad
Ácido acético	100 mL
Metanol	400 mL
dH ₂ O	500 mL

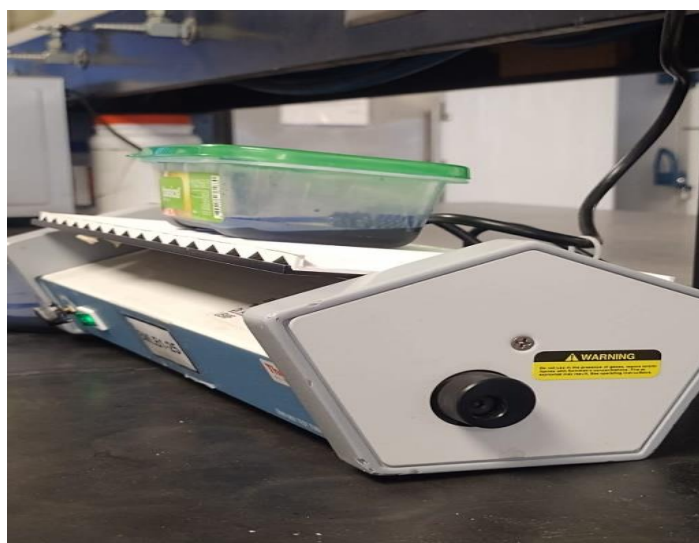


Figura 4. Tinción con azul de Coomassie de gel de poliacrilamida.

El objetivo de la tinción de geles luego de una SDS-PAGE es determinar la presencia de una proteína desnaturalizada cargada negativamente debido al compuesto dodecilsulfato sódico en una muestra desconocida [15]. La primera inducción de la síntesis de la proteína recombinante de interés, realizada a 37°C por 4 h (Figura 5) no presenta una banda sobresaliente, teñida con azul de Coomassie, en ninguno de los carriles que evidencie la expresión de la proteína de interés ya sea de 33 kDa al usar pET-28a o de 45 kDa para pET-32. El sexto carril de la electroforesis, correspondiente a la fracción insoluble del lisado, muestra una banda de un tamaño acorde a lo esperado en la síntesis con el vector pET-28a (33 kDa), lo cual puede indicar que la proteína de interés para el PAP se fue a cuerpos de inclusión debido a una sobreexpresión provocando su precipitado [22].

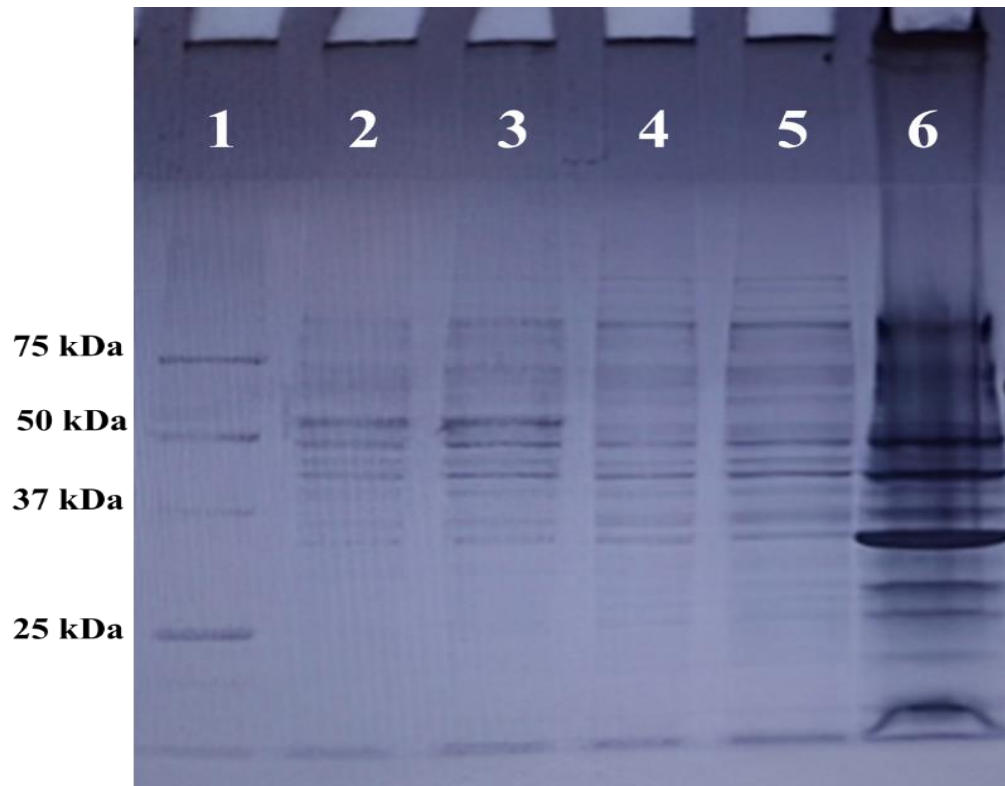


Figura 5. Separación de proteínas del lisado de *E. coli* transformada con los vectores pET-32 (proteína de interés con un tamaño de 45 kDa debido a la integración de tiorredoxina) y pET-28a (proteína de interés con un tamaño de 33 kDa) en gel de poliacrilamida en una inducción de 37°C por 4 horas con IPTG. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards; Carril 2: 5 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 3: 10 uL del sobrenadante lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 4: 5 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 5: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 6: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido.

En la segunda inducción (Figura 6), se añadieron controles no inducidos del cultivo de *E. coli* para replicar la corrida realizada a 37°C por 4 h. No se observó una diferencia significativa en la tinción entre los carriles correspondientes al cultivo pET-28a con las fracciones solubles e insolubles de un cultivo inducido con IPTG a uno no inducido, lo cual puede indicar que no se expresó la proteína de interés, o si lo hizo posee una concentración muy baja y, por lo tanto, las condiciones de la inducción no son favorables para el vector en cuestión. Por otro lado, el sexto carril de la Figura 6 revela una clara banda sobresaliente, correspondiente a la expresión de la proteína con el vector pET-32 en la fracción soluble del lisado, del tamaño esperado de 45 kDa, que no está presente en los carriles del mismo cultivo no inducido.

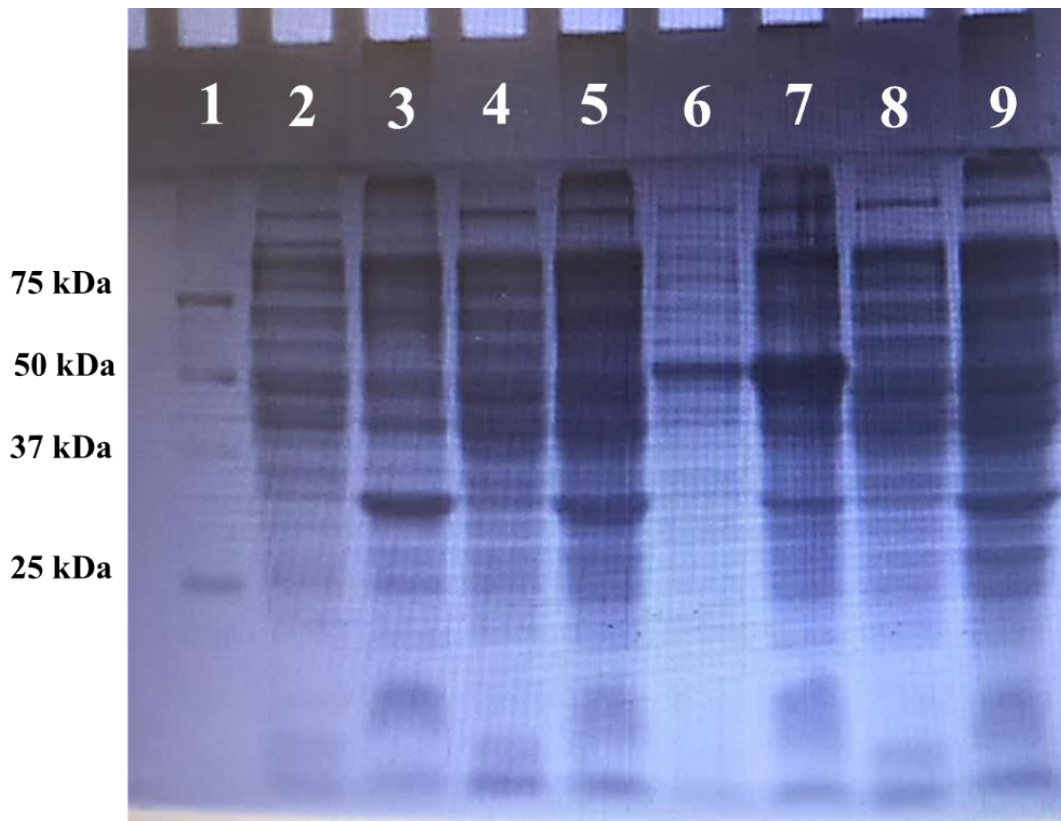


Figura 6. Separación de proteínas del lisado de *E. coli* transformada con los vectores pET-32 (proteína de interés con un tamaño de 45 kDa debido a la integración con tiorredoxina) y pET-28a (proteína de interés con un tamaño de 33 kDa) en gel de poliacrilamida en una inducción a 37°C por 4 horas con IPTG. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards; Carril 2: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 3: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 4: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a no inducido; Carril 5: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a no inducido; Carril 6: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 7: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 8: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 no inducido; Carril 9: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 no inducido

En la corrida correspondiente a la Figura 7 se realizó una inducción a 37°C en 6 h. En la imagen se volvió a encontrar la expresión de la proteína con el uso del vector de pET-32 de forma soluble y precipitada, sin embargo, no se encontró evidencia con la tinción de la expresión génica con el vector pET-28a en los carriles correspondientes al sobrenadante.

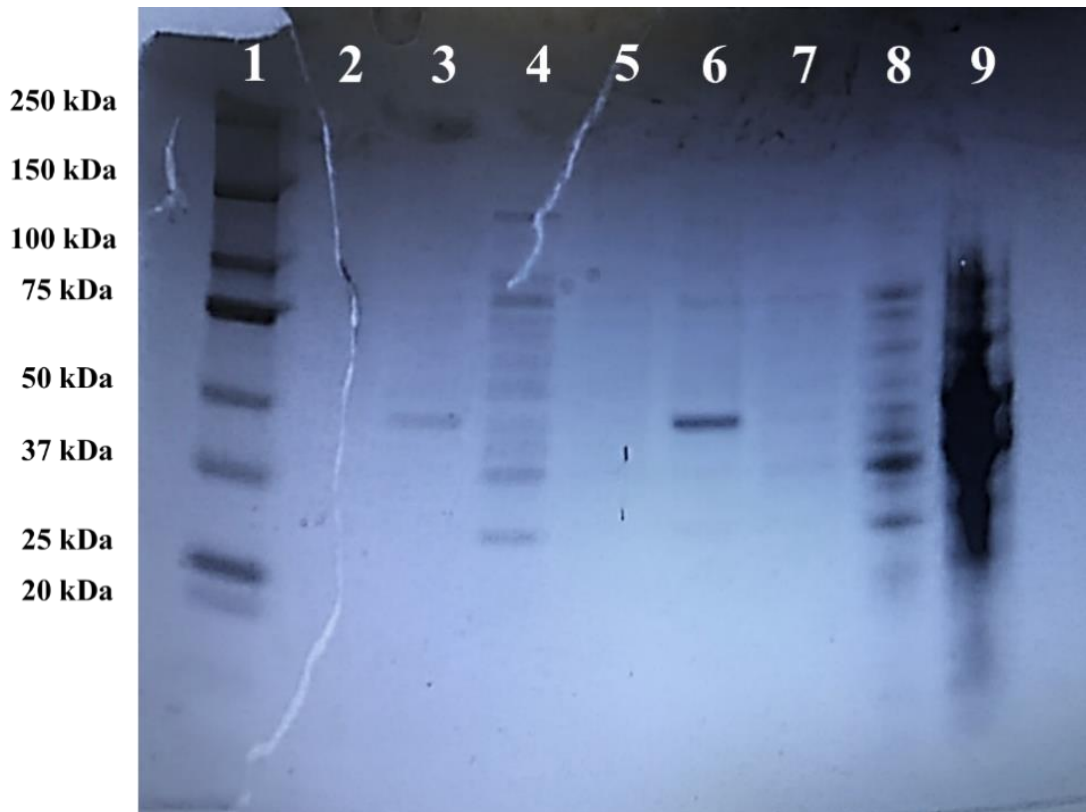


Figura 7. Separación de proteínas del lisado de *E. coli* transformada con los vectores pET-32 (proteína de interés con un tamaño de 45 kDa debido a la integración de tiorredoxina) y pET-28a (proteína de interés con un tamaño de 33 kDa) en gel de poliacrilamida en una inducción a 37°C por 6 horas con IPTG. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards; Carril 2: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 3: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 4: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 5: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a no inducido; Carril 6: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 7: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 no inducido; Carril 8: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a no inducido; Carril 9: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 no inducido.

Debido a la detección constante de la proteína de interés con el vector pET-32 en las condiciones previas de inducción, las siguientes corridas se realizaron solo para obtener mejores resultados en las tinciones con azul de Coomassie en la cepa de *E. coli* transformada con pET-28a y ver una expresión considerable en la fracción soluble del lisado. Se realizaron inducciones para la cepa de pET-28a con IPTG a 30°C por 4 y 8 h. En el segundo carril de la Figura 8 se observó finalmente una banda teñida con azul de Coomassie correspondiente al tamaño deseado de 33 kDa de la proteína inducida por 4 h y presente de manera soluble.

Mientras que el cuarto carril, con 8 h de inducción, no se detectó la proteína soluble de interés mediante la técnica de tinción con azul de Coomassie.

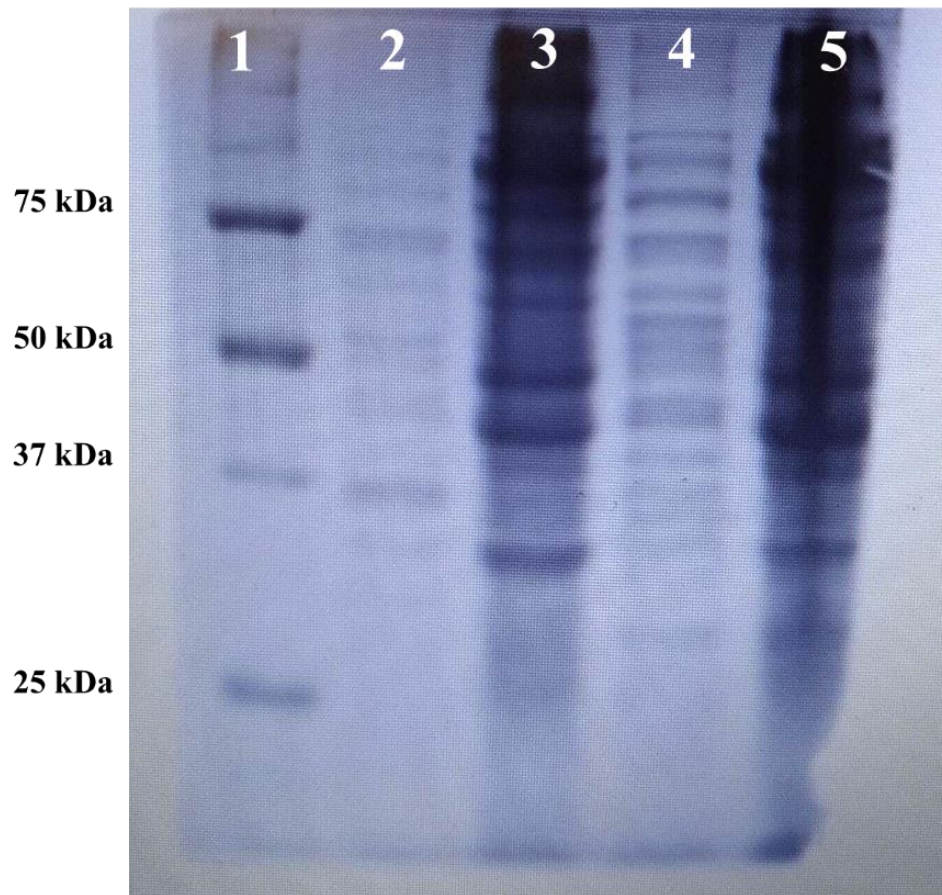


Figura 8. Separación de proteínas del lisado de *E. coli* transformada con el vector pET-28a (proteína de interés con un tamaño de 33 kDa) en gel de poliacrilamida en una inducción a 30°C por 4 y 8 horas con IPTG. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards; Carril 2: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido por 4 horas; Carril 3: 10 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido por 4 horas; Carril 4: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido por 8 horas; Carril 5: 10 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido por 8 horas.

La electroforesis (SDS-PAGE) puede ser seguida y complementada con otra técnica, una Western blot o electrotransferencia, para una detección más específica de una proteína mediante anticuerpos. Este método consiste en poner en contacto el gel de poliacrilamida con una membrana de nitrocelulosa para transferir las proteínas y detectar una banda única por una reacción química que detecta la unión del antígeno con el anticuerpo, como una secuencia de múltiples Histidinas (6xHis), con un anticuerpo y posteriormente detectar esa unión

antígeno-anticuerpo con un segundo anticuerpo de revelado [14]. En este PAP, después de la electroforesis realizada con un buffer de transferencia (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM y metanol al 20%v/v), se colocó el gel de poliacrilamida entre papel filtro y almohadillas de filtro en donde se añadió una membrana de nitrocelulosa encima del gel, se montó en la cámara de electrotransferencia (kit Mini Trans-Blot Cell), y se sumergió el gel y la membrana con buffer de transferencia a un voltaje constante de 100 V por una h (Figura 9).

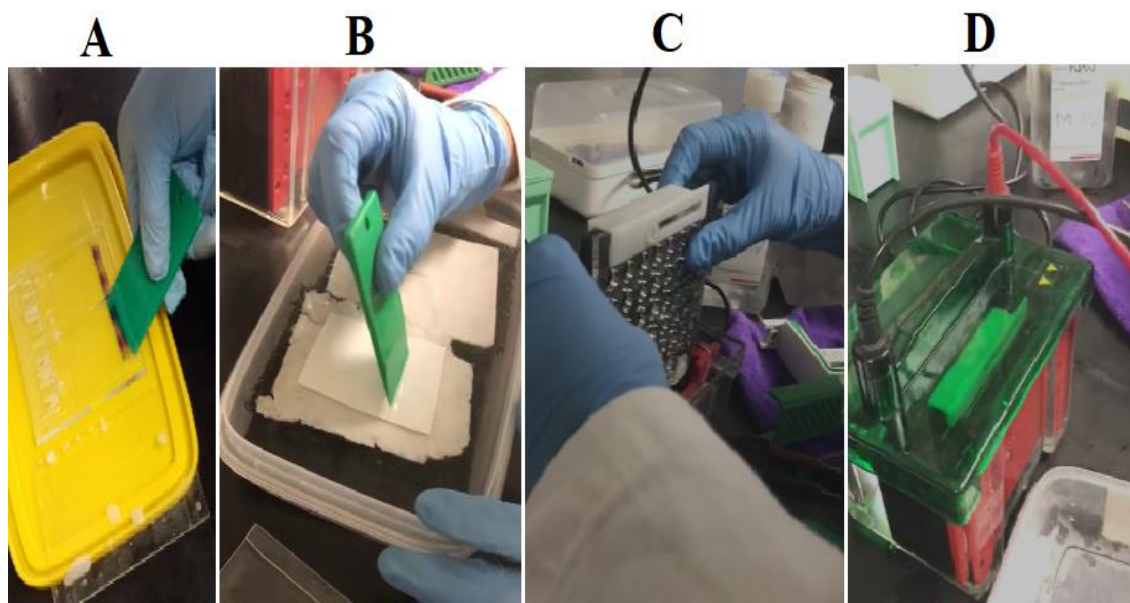


Figura 9. Electrotransferencia de proteínas en gel de poliacrilamida a membrana de nitrocelulosa. A) recolección de gel luego de la SDS-PAGE; B) Empaquetamiento del gel con la membrana de nitrocelulosa entre papel filtro y almohadillas de filtro; C) Colocación del sándwich en buffer de transferencia; D) Electrotransferencia a 100 V por 1 hora.

Después de la electrotransferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa, se incubó por 1 h la membrana con las proteínas transferidas en buffer PBS-Tween 20 al 0.1% (buffer PBS-T) con leche en polvo descremada (Svelty) al 5%. El propósito de utilizar leche en polvo es prevenir la unión inespecífica del anticuerpo al área de la membrana que no posee proteínas transferidas, con las proteínas no reaccionantes de la leche, evitando falsos positivos [23]. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces con buffer PBS-T y se incubó por 2 h con el anticuerpo monoclonal anti-His6x (1:2000) en buffer PBS-T 0.05% + 5% de leche Svelty en agitación ligera, para luego volver a lavar con buffer PBS-T por 15 min.

Después, se volvió a incubar la membrana ahora con el anticuerpo Anti-IgG de ratón-POD (1:2000) en buffer PBS-T 0.05% + 2.5% de leche Svelty. Finalmente se lavó en 3 ocasiones con buffer PBS-T y se le añadió solución reveladora (Tabla 7).

Tabla 7. Composición de la solución revelador. Se mezcla la solución A y B justo antes de usar.

Reactivo	Cantidad
Solución A	
Sustrato de HRP (sustrato de transferencia colorimétrica)	0.015 g
MeOH frío (-20°C)	5 mL
Solución B	
Buffer PBS	25 mL
Peróxido de hidrógeno al 30%	30 uL

Se detectó por medio de anticuerpos la producción de la proteína recombinante en los cultivos de *E. coli* transformada con los vectores pET-28a y pET-32. La Figura 10 muestra los resultados de la Western blot en los cultivos inducidos a 37°C con 4 h de inducción. En los carriles correspondientes a los cultivos con pET-28a, con un tamaño de producción de 33 kDa, se aprecia poca concentración de la proteína en comparación con los resultados expuestos en los carriles cultivados con pET-32, lo cual indica que las condiciones de inducción no favorecen aún la expresión por el vector pET-28a; en ambos casos existe una fracción de proteína soluble y otra insoluble. La Figura 11 corresponde a una réplica de las condiciones de inducción mencionada con anterioridad, sin embargo, se expone la nula expresión de la proteína de estudio en los carriles cultivados con pET-28a y la expresión de una proteína soluble de 45 kDa con el uso del vector pET-32.

En los resultados correspondientes a la inducción de la expresión de la proteína recombinante con *E. coli* a 37°C por 6 h (Figura 12), se detectó la producción del producto de interés con el vector pET-28a de manera soluble. Pero no se observó ningún resultado en la tinción con azul de Coomassie (Fig. 7) de la proteína de interés en el carril correspondiente a la fracción soluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a, lo cual indica una baja concentración de la proteína en el sobrenadante del lisado y la ausencia de expresión en el precipitado (carril 3, Figura 12). Además, los carriles correspondientes a la expresión del vector pET-32 a 37°C

por 6 h exponen resultados positivos y una banda pronunciada en la fracción soluble del lisado.

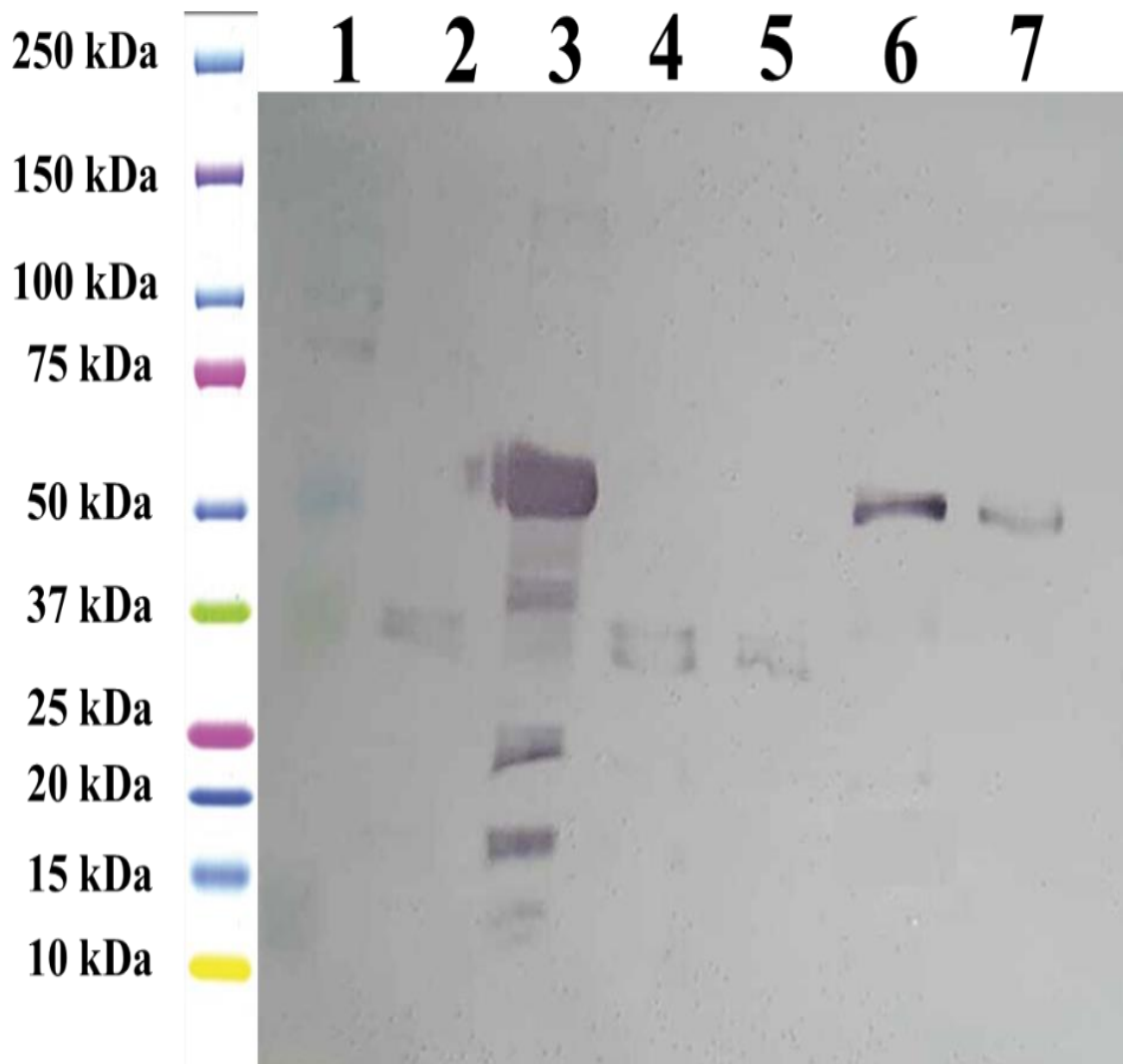


Figura 10. Análisis de la expresión de la proteína recombinante de interés por medio de una etiqueta de Histidinas (6xHis) por Western blot en cultivo de *E. coli* inducido a 37°C por 4 horas. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards; Carril 2: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 3: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 4: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 5: 5 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 6: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 7: 5 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido

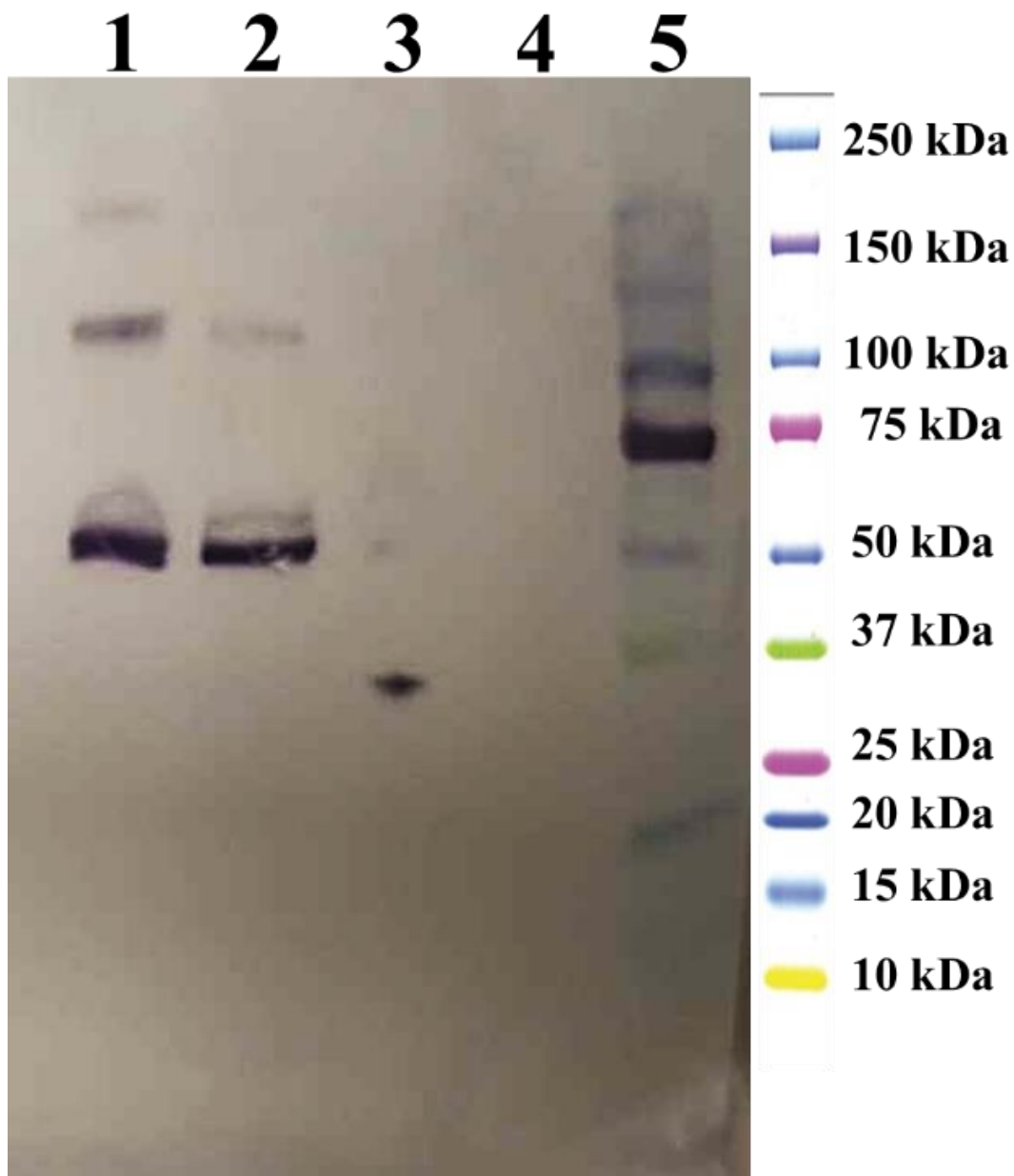


Figura 11. Análisis de la expresión de la proteína recombinante de interés por medio de una etiqueta de Histidinas (6xHis) por Western blot en cultivo de *E. coli* inducido a 37°C por 4 horas. Carril 1: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 2: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 3: 3 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 4: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 5: marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards.

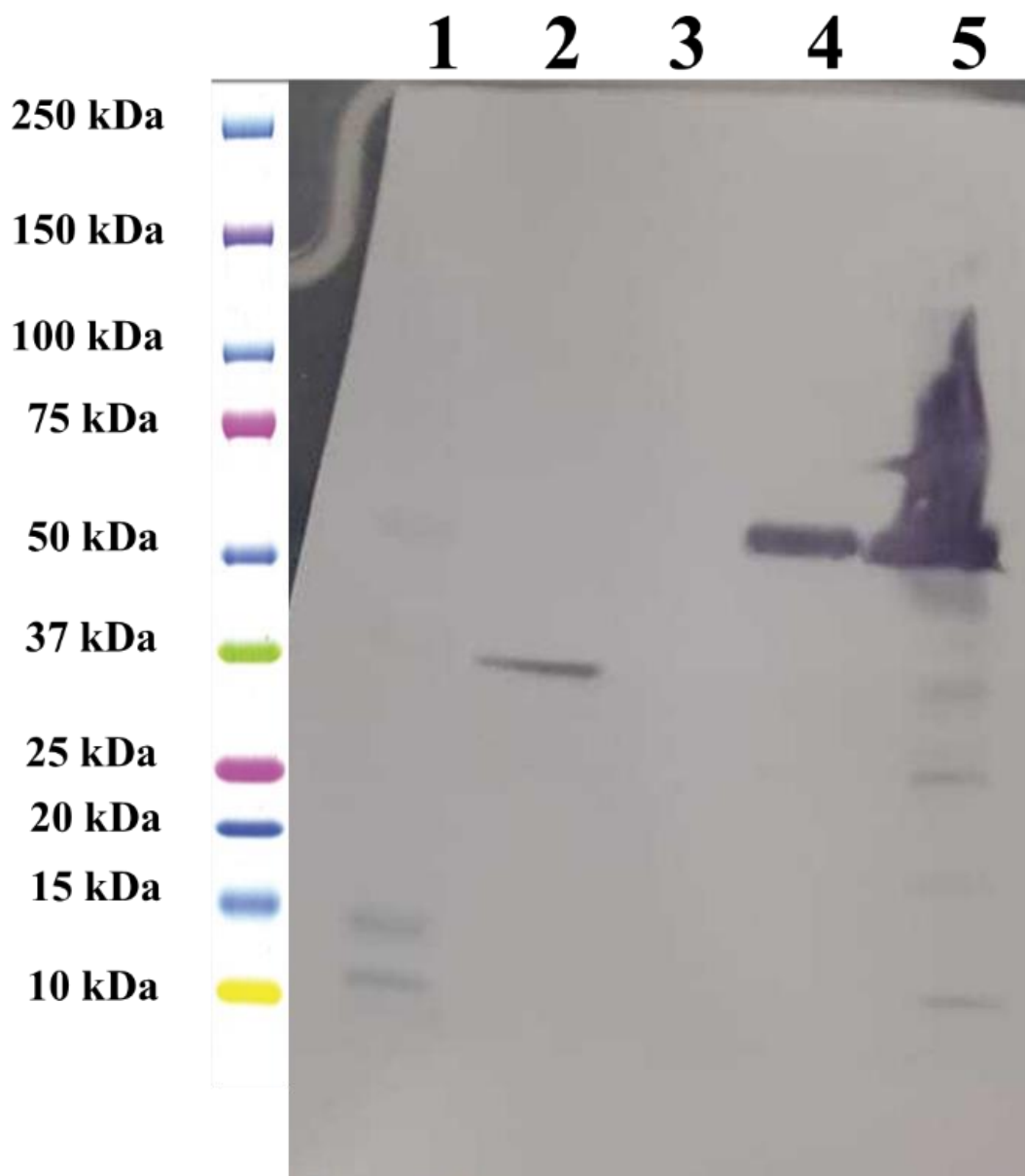


Figura 12. Análisis de la expresión de la proteína recombinante de interés por medio de una etiqueta de Histidinas (6xHis) por Western blot en cultivo de *E. coli* inducido a 37°C por 6 horas. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards; Carril 2: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 3: 10 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido; Carril 4: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido; Carril 5: 10 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-32 inducido.

Finalmente, en un análisis final que corresponde a una inducción de la cepa de pET-28a por 4 y 8 h resultó en la detección positiva con los anticuerpos en todas las muestras (Figura 13).

La proteína se expresó tanto de manera soluble como insoluble en todos los carriles presentes en la membrana de nitrocelulosa con el tamaño esperado de 33 kDa.

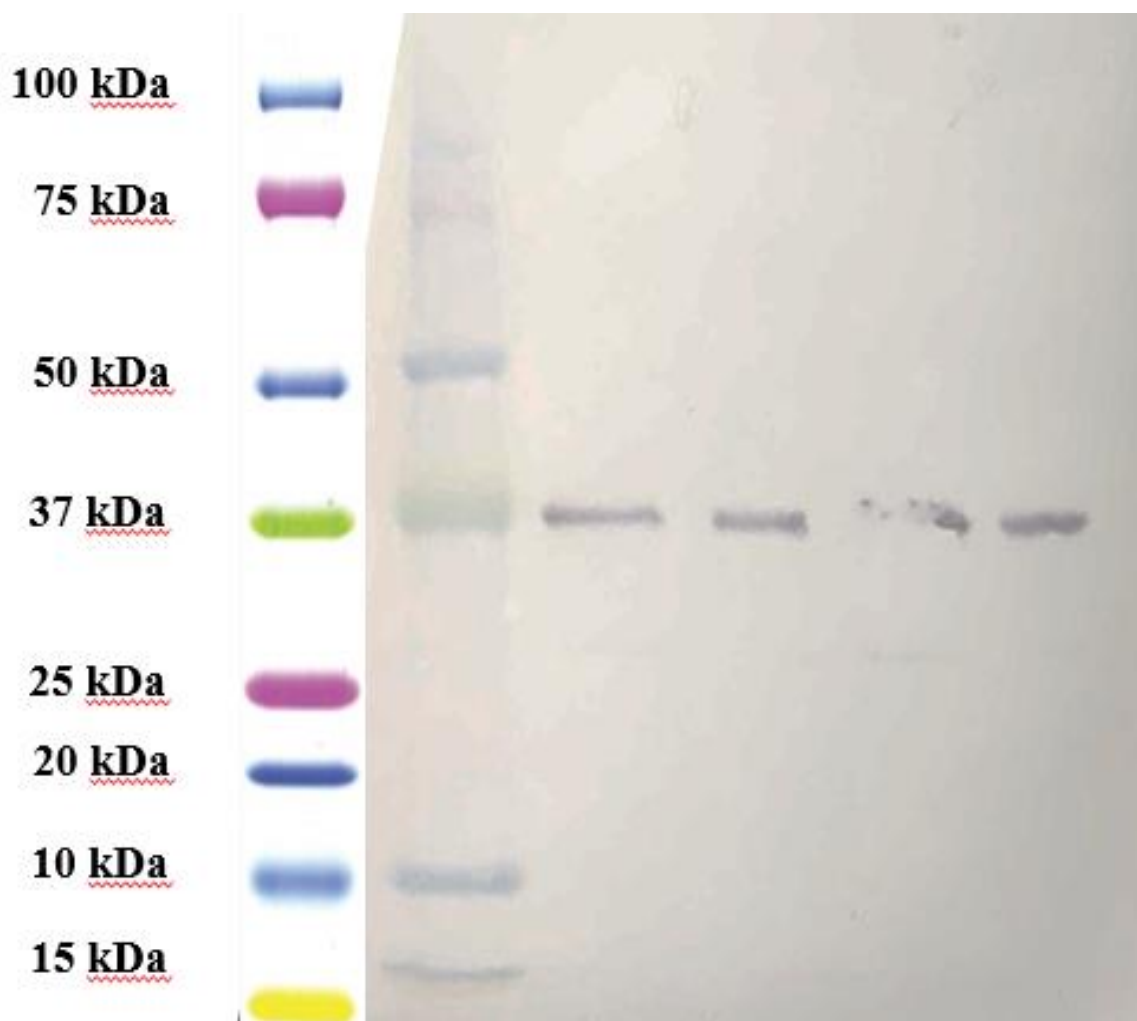


Figura 13. Análisis de la expresión de la proteína recombinante de interés por medio de una etiqueta de Histidinas (6xHis) por Western blot en cultivo de *E. coli* inducido a 30°C por 4 y 8 horas. Carril 1: marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards; Carril 2: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido por 4 horas; Carril 3: 10 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido por 4 horas; Carril 4: 10 uL del sobrenadante del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido por 8 horas; Carril 5: 10 uL de la fracción insoluble del lisado de *E. coli* transformada con pET-28a inducido por 8 horas.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Los resultados correspondientes a la Figura 6 exponen que para la expresión de la proteína recombinante con el vector pET-32 se requiere de un cultivo a 37°C por 4 h, obteniendo una proteína soluble en una temperatura controlable con poco tiempo de inducción. Mientras que

fue necesario disminuir la temperatura a 30°C por 4 horas para observar una expresión con el vector pET-28a en la Figura 8 de la proteína de interés para el estudio. El tiempo y temperatura optimizados para la inducción de la proteína y su solubilidad puede contribuir a aumentar el rendimiento de extracción para la posterior purificación y su uso como una proteína para el diagnóstico de la tuberculosis.

Se determinó que modificar las condiciones de inducción de la proteína altera la concentración del producto de manera soluble e insoluble, lo cual permite concluir que la cepa de *E. coli* transformada con pET-28a requiere condiciones diferentes de inducción y genera mayormente una sobreproducción con un producto precipitado, además, la presencia de la tiorredoxina en la proteína de interés, por el uso del vector pET-32, facilita la inducción al ser una proteína presente en *E. coli*. Por lo tanto, se estableció qué condiciones serán evaluadas para la purificación y cuantificación, para ahorrar tiempo en la extracción y producción de la proteína recombinante.

Se tienen contempladas varias etapas posteriores seguidas luego de determinar las mejores condiciones para la expresión de la proteína de interés. Primero, la purificación y cuantificación de la proteína producida con las cepas de *E. coli* con pET-28a y pET-32. Posteriormente, pruebas con la proteína purificada para medir la cantidad de interferón gamma producida en sangre bovina o humana.

1.7. Bibliografía y otros recursos

[1] Centers for Disease Control and Prevention (s.f.). "Historia del Día Mundial de la Tuberculosis". CDC. [Online]. Disponible en: https://www.cdc.gov/tb/esp/worldtbday/history_es.htm#print (accedido el 1 de junio de 2023).

[2] Á. H. Álvarez Herrera. "La tuberculosis latente y su impacto en salud pública". CIATEJ. [Online]. Disponible en: <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/La-tuberculosis-latente-y-su-impacto-en-salud-publica/317> (accedido el 1 de junio de 2023).

[3] A. Ramos Carmena, "Nuevas estrategias para el diseño de vacunas frente a *Mycobacterium tuberculosis*", Trabajo de grado, FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE, España, 2016. Accedido el 1 de junio de 2023. [Online]. Disponible en: <https://docta.ucm.es/entities/publication/74f62bf8-9b68-46cb-b14f-f85da65dc1e6>

[4] Secretaría de Salud (2023, marzo 22). “079. En 2022 se registran más de 28 mil casos de tuberculosis en México”. Gobierno de México. [Online]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/079-en-2022-se-registran-mas-de-28-mil-casos-de-tuberculosis-en-mexico>

[5] R. Vita, S. Mahajan, J. A. Overton, S. K. Dhanda, S. Martini, J. R. Cantrell, D. K. Wheeler, A. Sette & B. Peters. “The Immune Epitope Database (IEDB)”. *Nucleic Acids Res.* 2018 Oct 24. doi: 10.1093/nar/gky1006.

[6] S. L. Espejo Villalobos, "Evaluación de respuesta inmune protectora de péptidos sintéticos derivados de proteínas de superficie de mtb h37rv en un modelo murino para el diseño de una vacuna contra tuberculosis", Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 2018. Accedido el 1 de junio de 2023. [Online]. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/64758/1032439713.2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

[7] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (s.f.). “Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible”. CIATEJ. [Online]. Disponible en: <https://ciatej.mx/el-ciatej/quienes-somos>

[8] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (s.f.). “Biotecnología Médica y Farmacéutica”. CIATEJ. [Online]. Disponible en: <https://ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-medica>

[9] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (s.f.). “Ángel Hilario Alvares Herrera”. CIATEJ. [Online]. Disponible en: <https://ciatej.mx/investigacion/investigador/dr-angel-hilario-alvarez-herrera>

- [10] T. N. Jilani, A. Avula, A. Zafar Gondal, *et al.* "Active Tuberculosis". (2023, enero 26). In: StatPearls [Online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Enero. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513246/>
- [11] Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (2016, mayo 13). "Tuberculosis (TB) – Español". CDC. [Online]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/tb/esp/default.htm>
- [12]. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (2013, agosto). "Mycobacterium bovis (tuberculosis bovina) en seres humanos". CDC. [Online]. Disponible en: https://www.cdc.gov/tb/esp/publications/factsheets/pdf/M-bovis_Spanish_mcb.pdf
- [13] Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. (2018, octubre 15). "Tuberculosis bovina en México". Gobierno de México. [Online]. Disponible en: <https://www.gob.mx/pronabive/articulos/tuberculosis-bovina-en-mexico>
- [14] S. Ramírez-Carreto, B. Miranda-Zaragoza, & C. Rodríguez-Almazán. "Purificación de proteínas". Mens. Bioquim. 45 (2021): 35-47. Disponible en: <http://bq.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2021/06/7-Rodriguez-Purificacion.pdf>
- [15] A. M. Maldonado Alconada, J. V. Jorrín Novo. "Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de *Arabidopsis thaliana*". Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. (2001), 1-16. Disponible en: <https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>
- [16] J. G. Carrillo Soto. "Evaluación de Procedimientos de Tinción para el Análisis de Proteínas por Electroforesis (SDS-PAGE)", Tesis de Licenciatura, Universidad de Sonora, 2012. Accedido el 2 de julio de 2023. [En línea]. Disponible en: <http://hdl.handle.net/20.500.12984/2145>
- [17] G. A. Villegas-Rivera, M. C. Torres-Madronero, S. Röthlisberger-Booth, E. Delgado-Trejos. "Procesamiento de imágenes de electroforesis bidimensional: una revisión". Universidad Tecnológica de Pereira, Scientia Et Technica, vol. 24, núm. 1, pp. 76-84, 2019. [Online]. Disponible en:

<https://www.redalyc.org/journal/849/84959429008/html/#:~:text=La%20electroforesis%20bidimensional%20es%20una,o%20etapas%20consecutivas%20%5B34%5D.>

[18] A. R. Lara. "Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*". Rev. Mex. Ing. Quím [Online]. 2011, vol.10, pp.209-223. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1665-2738.

[19] L., Zhi-Qiang, and Y. Ping-Chang. "Construction of pET-32 α (+) Vector for Protein Expression and Purification." North American journal of medical sciences vol. 4,12 (2012): 651-5. doi:10.4103/1947-2714.104318

[20] MilliporeSigma (Novagen) (s.f.). "pET-28a(+)". [Online]. Disponible en: [https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_\(novagen\)/pET-28a\(%2B\)](https://www.snapgene.com/plasmids/pet_and_duet_vectors_(novagen)/pET-28a(%2B))

[21] H. M., García Pérez. "Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia". Univ Diag, 1(2), 31-41, 2000. Disponible en: https://www.u-cursos.cl/faciqyf/2012/2/FBQI4204/1/material_docente/bajar?id_material=638201

[22] S. Ventura y A. Villaverde, "Protein quality in bacterial inclusion bodies", TRENDS Biotechnol., vol. 24, n.º 4, abril de 2006. Accedido el 2 de julio de 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.02.007>

[23] A. de la Fuente González, J. Rodríguez Lozano y E. Fonseca Capdevila, "Análisis de proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot)", Piel, vol. 22, n.º 5, 2007, art. n.º 193.394.

2. Productos

Se utilizó la experimentación realizada en este PAP para desarrollar una metodología para la inducción y separación de una proteína recombinante expresada mediante dos vectores (pET-28a y pET-32) y su posterior identificación mediante las técnicas de SDS-PAGE y Western blot. Dicha información fue obtenida mediante múltiples ensayos con diferentes condiciones de temperatura y tiempo de inducción con IPTG.

Tabla 8. Ficha descriptiva.

Nombre y código del PAP:	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I.
Nombre del proyecto:	Estandarización de las condiciones de cultivo de dos cepas de <i>E. coli</i> para la obtención de una poliproteína multiepítopo
Descripción:	Es un documento para expresar la proteína recombinante multiepítopo dirigida para el diagnóstico de la tuberculosis como parte de un proyecto más amplio de un estudiante de maestría, mediante el cultivo de dos cepas de <i>E. coli</i> transformadas con los vectores de pET-28a y pET-32 y su detección por tamaño de proteína y anticuerpos. Está siendo realizado como parte inicial de un desarrollo con fines diagnósticos contra la TB en muestras clínicas sospechosas.
Autores:	José Miguel González Cisneros.

Producto:

“Protocolo de inducción de proteína en *E. coli* BL21 con el vector pET-28a y pET-32”

1. Cultivo e inducción:

- Preparar un pre-inóculo de la cepa recombinante BL21 (pET-28a o pET-32) en 5 mL de caldo de medio LB estéril e incubar por 18 horas a 37°C y 250 rpm.
- Adicionar volumen suficiente del pre-inóculo a nuevo caldo de cultivo LB estéril, para una concentración final de 4% v/v.
- Cultivar a 250 rpm por 37°C hasta una OD₆₀₀ de entre 0.6 y 0.7.
- Adicionar IPTG a una concentración final de 1 mM (usar una solución de 100 mM de IPTG)

E. coli transformada con p ET-32

- Incubar por 4 h más a 37°C y 250 rpm.
- Congelar el cultivo a -20°C hasta su uso.

E. coli transformada con p ET-32

- Incubar por 4 h más a 30°C y 250 rpm

-Congelar el cultivo a -20°C hasta su uso.

2. *Lisis celular y separación:*

-Descongelar medios previamente cultivados e inducidos de *E. coli*.

-Centrifugar a $8,000\times g$ por 2 min y desechar sobrenadante.

-Resuspender la pastilla celular en una décima parte del volumen del cultivo con buffer de PBS + Tritón X-100 al 0.1%.

-Sonicar la suspensión a 10 Hz en hielo durante 45 min en intervalos de 30 seg de sonicación y 30 seg de descanso hasta notar un aclaramiento de la suspensión de células.

-Centrifugar por 2 min a $8,000\times g$. Guardar el sobrenadante y desechar el resto (proteína soluble).

3. *SDS-PAGE:*

-Preparar gel de poliacrilamida (Gel concentrador al 6% y gel separador al 12%) en placas de vidrio.

-Colocar gel de poliacrilamida en cámara de electroforesis de proteínas (Mini-PROTEAN tetra vertical electrophoresis cell). Llenar cámara interior con buffer de corrida 1x y exterior de la cámara interior de acuerdo con la cantidad de geles utilizados.

-Preparación de muestras: añadir partes iguales de muestra y buffer de carga y calentar en baño maría por 5 min.

-Cargar gel de poliacrimida con las muestras tratadas y marcador de peso molecular.

-Correr a 160 V por 5 min o hasta que se visualice una línea continua trazada por el buffer de carga sobre el gel y luego a 120 V por 1 hora y media o hasta separar completamente el marcador de peso molecular.

4. *Tinción con azul de Coomassie:*

-Después de la electroforesis. Sacar el gel de poliacrilamida de entre los vidrios.

-Colocar sobre un recipiente el gel y sumergir en colorante de azul de Coomassie.

-Dejar reposar 24 h.

-Retirar o recuperar colorante y enjuagar con agua el gel de poliacrilamida.

- Añadir solución desteñidora hasta sumergir el gel. Dejar reposar hasta ver saturada la solución y retirar.
- Seguir añadiendo solución desteñidora hasta visualizar bandas correspondientes a proteínas en el gel de poliacrilamida.

5. *Western blot:*

- Después de la electroforesis. Sacar el gel de poliacrilamida de entre los vidrios.
- Colocar gel de poliacrilamida entre papel filtro y almohadillas de filtro en donde se añade una membrana de nitrocelulosa encima del gel. Montar en la cámara de electrotransferencia de proteínas (Mini Trans-Blot Cell). Llenar la cámara con buffer de transferencia y correr a un voltaje constante de 100 V por lo menos una hora.
- Después de la electrotransferencia. Incubar por 1 h la membrana con las proteínas transferidas en buffer PBS-Tween 20 al 0.1% (buffer PBS-T) con leche en polvo descremada (Svelty) al 5%.
- Lavar la membrana 3 veces con buffer PBS-T.
- Incubar por 2 h con el anticuerpo Anti-6xHis (1:2000) en buffer PBS-T 0.05% + 5% de leche Svelty en agitación ligera.
- Lavar con buffer PBS-T por 15 min y 2 veces por 5 min.
- Incubar la membrana ahora con el anticuerpo Anti-IgG de ratón (1:2000) en buffer PBS-T 0.05% + 2.5% de leche Svelty.
- Lavar con buffer PBS-T por 15 min y 2 veces por 5 min.
- Añadir solución reveladora, esperar máximo 30 min. Secar membrana y guardar en un sobre de papel.

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

Me impactó saber que la tuberculosis (TB) es un problema aún en la actualidad, que no es solo exclusiva de los seres humanos y que inclusive existe una versión latente de la

enfermedad. El riesgo que representa una *Mycobacterium bovis* en ganado bovino para el ser humano fue una verdadera sorpresa, dado que no existe un canal de comunicación para exponer cualquier sintomatología para diagnosticar enfermedades en animales por lo que solo se cuenta con los métodos actuales, como la prueba intradérmica de tuberculina que no es capaz de distinguir entre micobacterias tuberculosas y no tuberculosas, para corroborar una infección. Fue alarmante que no solo los médicos están en riesgo de un contagio de tuberculosis, los ganaderos y personal de mataderos o cuencas lecheras también son propensos a una infección, y me di cuenta de que es necesario una investigación exhaustiva abordando ideas innovadoras para proponer nuevas formas de diagnóstico para la TB.

En mi contexto social, la tuberculosis se presenta como una enfermedad que posee bastante antigüedad que rara vez se puede padecer, lo cual me generó una creencia que es una infección con un simple diagnóstico y solo necesita tratarse con antibióticos. Es emocionante que, gracias a mi formación profesional, tengo los conocimientos necesarios para impulsar la propuesta de una proteína con mayor precisión para el diagnóstico de las micobacterias tuberculosas. Tener la capacidad de expresar una proteína recombinante es relevante por ser una idea innovadora para cuidar la salud de los sectores de la población que trabajan cerca de fuentes potenciales de contagio de esta enfermedad, como por ejemplo el sector ganadero y médico.

3.2 Aprendizajes logrados

Al comienzo del PAP tuve que enfrentar mi desconocimiento de las técnicas relacionadas con los geles de poliacrilamida y la separación de proteínas, como la SDS-PAGE, Western blot y la tinción con azul de Coomassie. A lo largo del trabajo que se realizó, investigué y aprendí el fundamento teórico de todas las técnicas mencionadas anteriormente, e inclusive tuve la oportunidad de conocer algunos consejos prácticos en clases de biología molecular impartidas a estudiantes de maestría en el CIATEJ. En un principio necesité de guías y supervisión para desarrollar las actividades en el PAP, y por prueba y error, practiqué hasta que logré trabajar de manera independiente.

Debido al riesgo que presentaban algunos reactivos, tomé en cuenta los protocolos de seguridad y aprendí la necesidad de trabajar de manera segura, como empleando el uso de

guantes y cubrebocas. Además, aprendí acerca del acondicionamiento previo que tenían todos los insumos utilizados en el desarrollo del PAP, y consideré las consecuencias de los residuos generados para desechar de forma correcta cada material y reactivo empleado. Son aprendizajes que comencé a tomar en consideración para mi desarrollo profesional en proyectos futuros dentro del laboratorio.

3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

Tabla 12. Inventario de competencias inicial e inventario de competencias final.

Competencia		Evidencia	Relevancia/Fortaleza	Competencias Nuevas	Competencias potencializadas
Conocimientos	Principios de la bioseparación de productos.	Diseñé un protocolo de manera teórica para la separación de colagenasa. Además, realizar la separación, concentración y purificación de astaxantina	Puedo aportar ideas para realizar la separación de una proteína. U optimizar los métodos y protocolos ya existentes.	Estudí los principios de la proteómica y separación de proteínas mediante electroforesis.	Mejoró mi conocimiento de bioseparación de productos proteicos.
	Funcionamiento y necesidades de diversos equipos en el laboratorio.	Trabajé por un año de becario en el laboratorio de química del ITESO, donde utilicé diversos modelos de equipos utilizados comúnmente.	Tengo experiencia utilizando muchos equipos para la separación de productos celulares y puedo servir de consulta para recordar las necesidades del correcto uso de estos. Además, exponer sus mayores beneficios para el proyecto.	Estudí los fundamentos de una nueva técnica de lisado de cultivos celulares, mediante un sonicador.	Se diversificó mis conocimientos sobre el funcionamiento de los equipos dentro del laboratorio.
	Técnicas de transformación celular.	Transformé a la bacteria <i>E. coli</i> con el vector pGLO para la producción de la proteína GFP.	Puedo realizar la transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido del proyecto si es necesario obtener más cultivos y obtener una mayor producción de la proteína de interés.	Investigué el fundamento para el desarrollo de la técnica de Western blot para identificación de proteínas.	
	Principios de biología celular y molecular para la expresión de genes.	He cultivado varios tipos de bacterias para la obtención de productos celulares y realicé una	Puedo analizar las posibles razones de la inexpressión de la proteína en los medios de cultivo.		

		mutagénesis sitio dirigida para cambiar el color de la proteína GFP a azul.			
Habilidades	Cultivo de bacterias en medios líquidos	He realizado proyectos con diversas cepas de bacterias, como <i>E. coli</i> y <i>L. plantarum</i> , para obtener biomasa y productos de interés.	Puedo preparar medios de cultivo y realizar un cultivo de las bacterias seleccionadas para la expresión de la proteína de interés en el proyecto.	Elaboré múltiples geles de poliacrilamida y desarrollé su tinción para exponer los resultados.	Mejoró mi percepción sobre las necesidades y requisitos de los cultivos celulares en medio líquido.
	Análisis del estado de un cultivo de bacterias.	Registré el crecimiento de varias cepas a lo largo del tiempo y el estado del medio, para determinar la estancia del crecimiento bacteriano en un determinado momento.	Lograr detectar posibles contaminaciones del medio y tener información acerca del momento crítico para detener el crecimiento normal bacteriano e inducir la producción de la proteína de interés.	Trabajé realizando múltiples SDS-PAGE y Western blot para la separación e identificación de proteínas.	
	Separación de productos a partir de cultivos.	Realicé la separación de astaxantina, ácidos nucleicos y otros metabolitos a partir de levaduras y bacterias.	Puedo separar productos de interés a partir de un caldo de cultivo.		
Actitudes	Paciente al trabajar con procesos de grandes periodos de tiempo.	He trabajado con metodologías prolongadas para el cultivo y la inducción de un producto, manteniendo la calidad del trabajo.	Hay diversos procesos que requieren una manipulación constante y por un periodo largo de tiempo para realizar la separación de un producto celular.	Trabajé de manera colaborativa con diversas recomendaciones para realizar las actividades y presentarlas de la mejor manera posible.	Mejoró mi capacidad para atender órdenes y anticipar posibles necesidades durante la elaboración de cada actividad realizada.
	Poseo ingenio para trabajar con diversos protocolos en diversos ambientes.	Me adapte a trabajar sin los equipos por excelencia en un proceso a lo largo de mi formación académica.	Si se carece de algún material, equipo o reactivo puedo ser capaz de sobrellevar el trabajo y sacar adelante el proceso, con alternativas ingeniosas.		

	Facilidad para delegar trabajos o por el contrario para acatar órdenes.	He realizado proyectos siendo la cabecilla del grupo y he participado como un trabajador proactivo como becario.	Puedo dar o seguir órdenes de manera rápida y concisa representando una ventaja para aumentar el rendimiento y aprovechamiento del tiempo en el desarrollo del proyecto.		
	Facilidad para mantener comunicación con todos los involucrados en el proyecto.	Trabajé con una gran cantidad de personas en diversos proyectos por lo cual mantuve un canal de comunicación eficiente y claro.	Puedo evitar cualquier equivocación por falta de comunicación o no atender correctamente las indicaciones.		

La tabla 12 expone las competencias presentadas al inicio del PAP que validan mi valor en la participación en el proyecto, y al final de este. Las competencias finales son enfocadas a la extracción de proteínas y colaboración en las actividades para llevar a cabo los objetivos descritos a lo largo del PAP. Desde los fundamentos necesarios para realizar su inducción mediante vectores de expresión, seguido de su separación física del medio celular y finalmente su identificación. Remarcando que los mayores aprendizajes fueron relacionados a las técnicas de SDS-PAGE y Western blot.