

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 II



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II

**Purificación de una poliproteína recombinante multiepítipo expresada en
Escherichia coli para evaluación de reactividad con anticuerpos dirigidos a
micobacterias tuberculosas en el CIATEJ, Guadalajara**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, José Miguel González Cisneros

Profesor PAP: Dr. Ángel Hilario Álvarez Herrera

Tlaquepaque, Jalisco, diciembre 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.....	6
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	7
1.4. Planeación de alternativa(s).....	8
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	13
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	20
1.7. Bibliografía y otros recursos	21
1.8. Anexos generales.....	21
2. Productos	27
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	29
3.1 Sensibilización ante las realidades	29
3.2 Aprendizajes logrados	30

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 “Purificación de una poliproteína recombinante multiepítipo expresada en *Escherichia coli* para evaluación de la reactividad con anticuerpos dirigidos a micobacterias tuberculosas” es parte de un proyecto iniciado el verano del 2023. Se abordó el objetivo de producir un reactivo molecular de nueva generación a partir de tecnología de proteínas recombinantes para valorar una posible respuesta inmune presente en sangre de bovinos infectados por micobacterias tuberculosas.

Se buscó producir y utilizar una cepa de *Escherichia coli* transformada con el vector pET-32a que expresa el gen de una proteína recombinante multiepítipo de cuatro de los principales antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*. Después de su expresión en un cultivo, se extrajo la proteína mediante una lisis celular y se determinó la presencia de la proteína recombinante por su peso molecular y también por la identificación de una etiqueta de histidina por medio de las técnicas de SDS-PAGE y Western blot a lo largo del proyecto.

Se purificaron los extractos totales de proteína bacteriana por medio de una cromatografía de afinidad a etiquetas de histidina. Posteriormente, se dializó las muestras purificadas para la eliminación de imidazol y se cuantificó la concentración total de proteínas presentes en el reactivo final estando entre una concentración de 9.27 y 20.2 $\mu\text{g/mL}$ en la suspensión. El procedimiento biotecnológico permitió la obtención de un nuevo reactivo basado en una proteína quimérica artificial con el potencial de ser utilizado para el diagnóstico de amplio espectro de infecciones provocadas por micobacterias tuberculosas en individuos humanos y animales.

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 desarrollo del presente PAP es llevado a cabo en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) que cuenta con diversas líneas de investigación dedicada a la biotecnología, como el desarrollo de productos biofarmacéuticos para la salud. El sector de Biotecnología Médica y Farmacéutica (BMF) es un departamento que busca atender las problemáticas en el área de la salud del sector humano y pecuario de Jalisco a través de proyectos innovadores.

El CIATEJ desarrolla diversos proyectos como la síntesis de proteínas recombinantes con interés biotecnológico para el diagnóstico de micobacterias tuberculosas. El presente PAP, que es continuación de un trabajo desarrollado en el verano del 2023, es parte de un protocolo experimental encaminado a la obtención de la proteína de interés biotecnológico.

Objetivo general:

Producir un reactivo a partir de tecnología de proteínas recombinantes para valorar una respuesta inmune de sangre bovina infectada por micobacterias tuberculosas y ser utilizado en el futuro para el diagnóstico de la tuberculosis.

Objetivos específicos:

- Cultivar la cepa de *Escherichia coli* transformada con el vector pET-32a e inducir la producción de la proteína recombinante.
- Purificar la proteína recombinante de interés mediante columnas de afinidad.
- Concentrar y cuantificar la cantidad de proteína recombinante expresada en los cultivos de *E. coli*.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

En el año de 1882 se hizo el descubrimiento de la bacteria que causaba la enfermedad de la tuberculosis (TB), *Mycobacterium tuberculosis*. En 1908 se desarrolló la prueba cutánea de tuberculina, la forma más común de diagnosticar tuberculosis, sobre todo en animales, por Charles Mantoux. La prueba consiste en la aplicación de un extracto derivados proteicos purificados y la medición de la respuesta inmune posteriormente. Sin embargo, esta forma

de diagnóstico, que sigue siendo utilizada en la actualidad, no posee la capacidad de distinguir entre una reacción por micobacterias tuberculosas o no tuberculosas [1].

Las pruebas de diagnóstico para la tuberculosis requieren del desarrollo de estrategias para aumentar la especificidad del diagnóstico y su rapidez, por este motivo se estudia la tecnología de producción de proteínas recombinantes antigénicas. Un ejemplo es el desarrollo de anticuerpos, a partir de proteínas recombinantes, con mayor capacidad de detectar múltiples antígenos exclusivos de micobacterias tuberculosas para su uso en pruebas de ELISA [2], o el desarrollo de una ELISA universal para el diagnóstico de la tuberculosis mediante una proteína recombinante con secuencias antigénicas de *M. tuberculosis* [3].

La OMS (Organización Mundial de la Salud) ha promocionado múltiples campañas para motivar a darle fin a la tuberculosis dado que se registran al día 4,500 personas en el mundo fallecidas por la TB [4]. Tan solo en México se han registrado más de 28 mil casos de TB en el año 2022, de los cuales el 30% no conocía su estado como portador de la enfermedad [5].

La proteína recombinante dirigida a una estrategia para diagnosticar tuberculosis es una proteína multiepitopo de 50 kDa diseñada en el CIATEJ, a partir de la selección de las secuencias proteicas más antigénicas de cuatro de las proteínas más caracterizadas en la base de datos para epítomos inmunes (IEDB) [6]. En estudios previos, la evaluación de la respuesta inmune de antígenos de *M. tuberculosis* expone que sin modificaciones estas secuencias no son reconocidas por el sistema inmune, por lo tanto, ha habido una mayor cantidad de enfoques para generar una mejor presentación antigénica y con ello una estrategia de diagnóstico de la enfermedad [7].

1.2 Caracterización de la organización

El presente PAP es llevado a cabo dentro del CIATEJ, un centro público de investigación que forma parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT). El CIATEJ posee diversas áreas para el desarrollo de proyectos de investigación en biotecnología vegetal, biotecnología industrial, tecnología ambiental, tecnología alimentaria y biotecnología médica y farmacéutica [8]. También ofrece los servicios de formación de posgrado como maestrías, estancias y doctorados, y tesis de pregrado.

Los investigadores que conforman el centro de investigación del CIATEJ son los encargados de llevar a cabo la misión de la institución a través de proyectos innovadores para generar nuevos conocimientos, con el fin de optimizar procesos, productos y servicios para un desarrollo sostenible. La visión del CIATEJ es dar a conocer los descubrimientos generados a través de las continuas investigaciones dentro de las diversas áreas de trabajo y la colaboración entre investigadores [8]. El área de investigación de biotecnología médica y farmacéutica, donde se realiza este PAP, tiene como principal objetivo enfocarse y resolver problemáticas para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas y animales con soluciones innovadoras [9].

El presente PAP es un proyecto de tipo experimental coordinado por el Dr. Ángel Hilario Álvarez Herrera perteneciente al sistema nacional de investigadores de nivel I, además, trabaja de manera independiente en el área de biotecnología médica y farmacéutica del CIATEJ [10]. El principal interés de esta área de trabajo es sintetizar y purificar proteínas recombinantes para el diagnóstico y prevención de enfermedades.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

Al año alrededor de 8 millones de personas suelen contraer un caso de tuberculosis activada, y se estima que solo es una décima parte de las personas que pueden desarrollar tuberculosis en su vida [1]. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tuberculosis representa una de las primeras diez causas de muerte en el mundo, en el 2019 se registró que América reporta casi el 3% de los casos de tuberculosis en el mundo y el 15% de las personas generalmente no logran ser tratadas con éxito [4].

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa multiorgánica, causada principalmente en humanos por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, y por otras micobacterias como *M. bovis*, *M. canettii*, *M. microti*, entre otras presentes en el ganado bovino y otros animales [1]. El diagnóstico de una micobacteria tuberculosa es de interés mundial ya que no todos los casos de la infección de tuberculosis presentan síntomas, debido a una versión latente del padecimiento [11]. Su principal método de propagación en humanos es por aire, es decir, cuando una persona tose o estornuda, además, las personas con el virus de inmunodeficiencia

humana (VIH) tienen hasta 30% más probabilidad de desarrollar síntomas de tuberculosis [1].

La tuberculosis es una enfermedad zoonótica, puede transmitirse entre animales y seres humanos, principalmente con el contacto de secreciones de animales. Una forma común de prevenir la infección utilizada en la actualidad es la pasteurización de alimentos provenientes del ganado [12]. Sin embargo, casi el 1% de las pruebas realizadas a más de 130,000 animales tuvieron un diagnóstico positivo para la tuberculosis en Jalisco, sin contar cuencas lecheras [13]. En México las cuencas lecheras son de gran interés debido a que constituyen una importante fuente de infección por tuberculosis, llegando a representar hasta el 6% de los casos de TB por contacto constante con el ganado [14].

La mayor problemática en el diagnóstico de las micobacterias tuberculosas es que no se ha encontrado un marcador antigénico que se exprese en todos los pacientes con tuberculosis. Por ello, se han realizado múltiples estudios para generar poliproteínas recombinantes como estrategia para el diagnóstico de la TB, principalmente con el objetivo de elaborar anticuerpos diseñados para reconocer la enfermedad [2]. En 2023 la OMS se ha fijado diversas metas para dar fin a la tuberculosis, declarando que es necesario llevar a cabo una mayor investigación para el diagnóstico y tratamiento de la TB en el mundo [15].

Las pruebas para el diagnóstico de *M. tuberculosis* se basan en la detección de los bacilos acidorresistentes (BAAR) en secreciones. Sin embargo, el cultivo del esputo de los pacientes es tardado debido al tiempo de crecimiento de una micobacteria [1] por lo que también se suelen realizar ensayos de liberación de interferón gamma (IGRA) y pruebas intradérmicas de tuberculina (TST).

1.4. Planeación de alternativa(s)

Este PAP tiene el propósito de producir un reactivo purificado de una proteína multiepitopo para el diagnóstico de micobacterias tuberculosas y evaluar su reactividad con anticuerpos pertenecientes a ganado bovino con tuberculosis. Dado que no se ha encontrado un solo antígeno que se reconozca de forma generalizada como biomarcador universal en todos los pacientes con tuberculosis, el diseño propuesto de una proteína con múltiples sitios de reconocimiento antigénico permite el desarrollo de nuevos reactivos biológicos mejorados

más sensibles para el diagnóstico de la TB [12]. En la actualidad, la Organización Mundial de la Salud, sigue insistiendo en la necesidad de impulsar avances para eliminar la enfermedad de la tuberculosis a nivel mundial, declarando en marzo del 2023 que es posible ponerle fin a la TB [15].

La producción de la proteína recombinante se realiza a partir de una bacteria transformada, *Escherichia coli*. La cepa utilizada en el PAP posee el vector pET-32a, un plásmido del tipo inducible que expresa una proteína fusionada de tiorredoxina que planea aumentar la solubilidad de la proteína [16]. Debido a que la proteína es un producto intracelular la extracción de la proteína consiste en una lisis celular, puede ser mediante métodos físicos de rompimiento de la membrana como sonicación, homogenización o ciclos de congelado o con métodos químicos como el uso de detergentes [17].

Las técnicas utilizadas para el reconocimiento de proteínas de interés en los cultivos inducidos de *E. coli*, y la purificación y concentración de la proteína, son electroforesis y Western blot. Las caracterizaciones de proteínas suelen usar geles de poliacrilamida dado que es una manera habitual de realizar el análisis de proteínas por su tamaño, además, la composición inerte del gel permite utilizar diferentes rangos de temperatura y pH [18].

La SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas desnaturalizadas donde se les da una carga negativa para facilitar su migración, utilizando dodecilsulfato sódico (SDS), a través de la matriz porosa del gel [19]. Debido a que la proteína de interés en el presente PAP es de 50kDa, es posible reconocer la expresión positiva del producto mediante esta técnica, que se complementa con una tinción del gel con azul de Coomassie y un marcador de peso molecular para identificar por tamaño la proteína luego de una electroforesis [18].

Otra manera de identificar la proteína recombinante es por Western blot, una técnica de electrotransferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa para ser tratada con anticuerpos y detectar la presencia de múltiples etiquetas de histidina (6xHis) (Fig. 1), lo que permite el monitoreo constante del producto a través de su bioseparación [19]. Debido a que la proteína de interés en el proyecto posee marcadores de histidina por la expresión del gen con el vector pET-32a, se emplea el anticuerpo anti-

His6x para realizar un reconocimiento definitivo de la proteína por una unión antígeno-anticuerpo, del resto de proteínas correspondientes a *E. coli*.

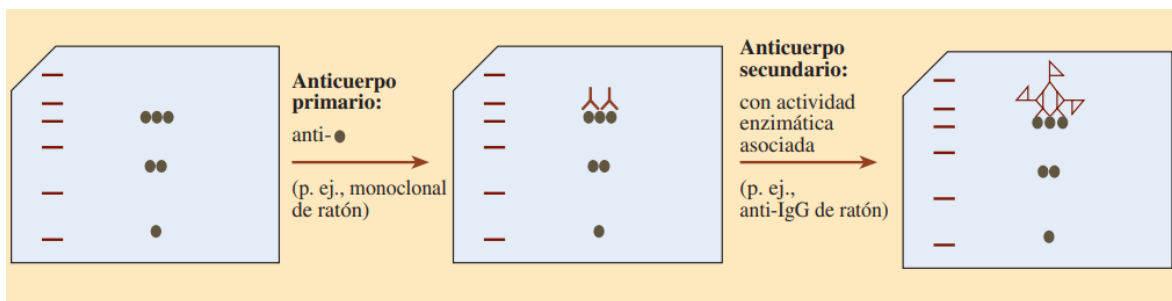


Figura 1. Representación esquemática de la inmunodetección de proteínas [19].

La purificación de proteínas suele realizarse mediante cromatografía, por afinidad y por hidrofobicidad [17]. En este PAP el extracto obtenido del cultivo, una vez identificada la presencia de la proteína, se purifica mediante una columna de afinidad de iones metálicos inmovilizados (Fig. 2), debido a que es el método disponible en el área de trabajo, que consta de una resina con un ligando quelante que está cargado con iones de Ni^{2+} , para retener proteínas marcadas con histidina [20]. La muestra se divide en fracciones al realizar lavados con soluciones a diferentes concentraciones de imidazol a lo largo del proceso y se realiza el reconocimiento de la proteína en las fracciones mediante SDS-PAGE y la calidad de la purificación por Western blot.

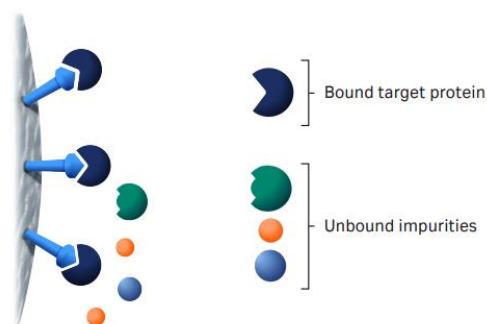


Figura 2. Representación esquemática de la cromatografía por afinidad [21].

La purificación por columna de afinidad requiere un tratamiento posterior de las muestras, debido al gran contenido de sales en las soluciones utilizadas para la cromatografía es necesario su remoción selectiva de impurezas y otros contaminantes [17]. La diálisis es una forma de filtración en donde se hace uso de membranas semipermeables sumergidas en soluciones para generar un gradiente negativo de concentración mediante ósmosis inversa,

hasta alcanzar un equilibrio entre el fluido externo e interno de la membrana sin permitir el paso de macromoléculas de mayor tamaño como la proteína purificada. Otra manera de eliminar impurezas provenientes de la purificación es mediante ultrafiltración con membranas y tubos para centrifugación modificados, los cuales, con ayuda de centrifugación, permiten la concentración de la muestra y su limpieza de forma forzada al atravesar de forma selectiva de acuerdo con el tamaño de poro de la membrana [22].

En la tabla 1 se expone el plan de trabajo del PAP para llevar a cabo los objetivos planteados. Se indican las actividades a realizar junto con la semana dentro del programa de trabajo y en la tabla 2 se observan los recursos necesarios para completar cada actividad.

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	Semana 9	Semana 10	Semana 11	Semana 12	Semana 13	Semana 14	Semana 15	Semana 16
Investigación sobre el fundamento de purificación mediante columna de afinidad. Y práctica de purificación.	NA	3																
Cultivo de cepa de <i>E. coli</i> para producir la proteína recombinante (37°C x 4 h).	TP IO	2																
Separación de la proteína recombinante intracelular.	CF SD	1																
SDS-PAGE y Western blot para detectar la presencia de una proteína recombinante.	GE WB TP	3																
Asesoría para el avance del proyecto.	AH	1																
Entrega avance 1 rPAP.	NA	1																
Preparación de soluciones de lavado para purificación.	TP	1																

Primera purificación.	TP CTH	1																
Segunda purificación.	TP CTH	1																
Análisis de las fracciones purificadas por SDS-PAGE y Western blot.	TP GE WB	3																
Tercera purificación.	TP CTH	1																
Preparación de soluciones de lavado para purificación.	TP	1																
Cuarta purificación.	TP CTH	1																
Análisis de las fracciones purificadas por SDS-PAGE.	TP GE	2																
Entrega avance 2 rPAP.	NA	1																
Investigación de la diálisis y concentración de muestras.	NA	3																
Diálisis de las muestras purificadas.	DIA	3																
Electroforesis de muestras purificadas.	GE	1																
Concentración de muestras.	CFV	1																
Entrega avance 3 rPAP.	NA	1																
Cuantificación de las muestras.	EM	1																
Repetición de la concentración de las muestras y análisis por medio de SDS-PAGE y Western blot.	CFV GE WB	4																
Entrega avance 4 rPAP.	NA	1																
Entrega final rPAP.	NA	1																
Presentación final oral del PAP.	NA	1																

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

Recursos utilizados	
Abreviatura	Significado
AH	Asesoría Dr. Ángel Hilario Álvarez Herrera
NA	No aplicable
TP	Trabajo personal

CF	Centrífuga
IO	Incubadora orbital
CTH	Columnas HisTrap™ FF
SD	Sonicador
GE	Mini-PROTEAN tetra vertical electrophoresis cell
WB	Mini Trans-Blot Cell
DIA	Membrana para diálisis
CFV	Centrífuga con vacío
EM	Espectrofotómetro de microplacas

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Cultivo de Escherichia coli e inducción del vector de expresión

Debido al amplio estudio que se ha hecho de la bacteria *E. coli*, este microorganismo fue seleccionado como la biofábrica por excelencia para la producción de la proteína recombinante de interés siendo una alternativa para generar productos sustentables [23]. El vector pET-32a fue seleccionado debido a su uso constante en la síntesis de proteínas quimera debido a la estabilidad y solubilidad que le proporciona la tiorredoxina fusionada a la proteína de interés dentro del diseño del constructo del plásmido [16]. Así, se utilizó la cepa de *E. coli* BL21 junto con el vector de expresión pET-32a para expresar la proteína recombinante multiepitopo de este PAP. Se cultivaron dos lotes de 200 mL de *E. coli* en caldo de medio Luria-Bertani (LB), con un inóculo al 4% v/v, en una agitación de 250 rpm a 37°C hasta una OD₆₀₀ de entre 0.6 y 0.7.

La inducción del vector para la expresión de la proteína recombinante fue activada mediante isopropil β-D-tiogalactósido (IPTG), análogo de la lactosa. Al llegar a la densidad óptica establecida se añadió IPTG para una concentración final de 1 mM dentro del cultivo. Se dejó incubando a 37°C por 4 horas más.

Separación de la proteína recombinante

La extracción de metabolitos intracelulares fue posible mediante métodos físicos y químicos del rompimiento de las membranas celulares. La sonicación, en combinación con un detergente no iónico, mantiene la estabilidad de la proteína y permite la manipulación con el producto [17]. Se realizó una centrifugación de los cultivos de *E. coli* durante 25 min a 4200 rpm para luego desechar el sobrenadante correspondiente al medio de cultivo. Después, se

resuspendió el pellet celular en un volumen de una décima parte del cultivo con buffer de PBS + Tritón X-100 al 0.1%. Se hizo una sonicación de las muestras a 10 Hz en hielo durante 45 min, y terminó con una centrifugación a las mismas condiciones previamente mencionadas y recuperación del sobrenadante con la fracción de la proteína soluble extraída del interior de la célula.

Identificación de la proteína recombinante

La caracterización de proteínas por electroforesis suele realizarse en su forma desnaturalizada (SDS-PAGE), al correr un gel de poliacrilamida en esas condiciones se asegura que únicamente el tamaño de la proteína influirá en la velocidad de migración a través de la matriz porosa, lo cual facilita la identificación de la proteína por medio de una tinción con azul de Coomassie [18]. Además, para complementar la electroforesis, Western blot representa un sistema sensible para la detección de proteínas mediante el reconocimiento antígeno y anticuerpo [19]. Por ello, se corrió una SDS-PAGE seguida de una Western blot para asegurar la presencia del producto de interés. Se preparó un gel de poliacrilamida para la electroforesis vertical de proteínas, correspondientes al lisado de cultivos de *E. coli*, de acuerdo con la composición de las tablas 3 y 4 expuestas en los anexos, con ayuda del equipo de electroforesis Mini-PROTEAN tetra vertical electrophoresis cell. Se corrió la electroforesis en buffer de corrida 1X (tabla 5 del anexo) a 160 V por 8 min y luego a 120 V por 1 hora.

Posteriormente, se transfirieron las proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa con un buffer de transferencia (Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM y metanol al 20% v/v). Se colocó el gel y la membrana de nitrocelulosa entre papel y almohadillas filtro especiales, y se sumergió en la cámara de electrotransferencia (kit Mini Trans-Blot Cell), a un voltaje constante de 100 V por una hora

La transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa se detectó con dos anticuerpos: Ac. anti-His6X y Ac. anti-IgG de ratón. El primer anticuerpo (Ac. anti-His6X) se incubó por dos horas para reconocer los sitios de etiquetas de histidina en la proteína recombinante y el segundo anticuerpo se incubó por otras dos horas para formar un complejo Ac-Ac revelador, reconociendo el primer anticuerpo unido a la proteína y así identificarlo en la membrana de nitrocelulosa. Se confirmó la presencia de la proteína recombinante (Fig. 3) en un tamaño

esperado cercano a 50 kDa y una inmunodetección de las etiquetas de histidina por una reacción colorimétrica llevada a cabo con la solución reveladora (tabla 6 del anexo).

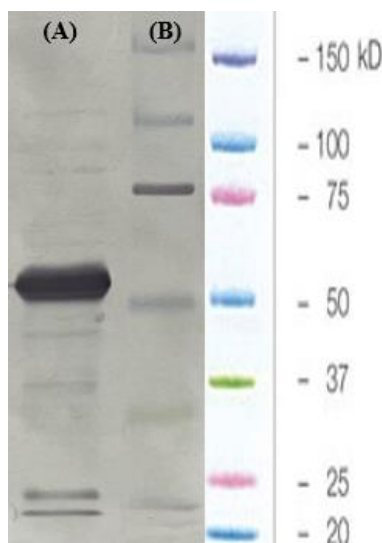


Figura 3. Revelación de Western blot. (A) 12 uL de la fracción soluble del lisado de *E. coli* con pET-32a inducido. (B) Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards.

Purificación, diálisis y concentración de la proteína recombinante

El método más usado para la purificación de proteínas es por medio de cromatografía de afinidad, que separa el objeto de interés de acuerdo con sus propiedades y el resto de las sustancias por una unión específica a ciertos ligandos [21]. La columna HisTrap™ FF que posee iones de níquel (Ni^{2+}) tiene una alta afinidad con las etiquetas de histidina hasta que se altera la unión por la presencia de imidazol con la protonación de aminoácidos involucrados en la unión con la columna [24], lo que permitió purificar las muestras obtenidas mediante cromatografía de afinidad, con la columna de 1 mL HisTrap™ FF. Se pasaron distintas soluciones de lavado con diferentes concentraciones de imidazol (tabla 7) a través de la columna siguiendo la metodología expuesta en la figura 4 (B), y únicamente se recuperaron los primeros cinco volúmenes de la etapa de elución en cada purificación. Se analizó cada fracción de elución recuperado por medio de SDS-PAGE, se tiñó con azul de Coomassie por 1 hora (Fig. 5), y se destiñó con solución desteñidora (tabla 8 del anexo), además, se realizó una inmunodetección por Western blot. Se obtuvo de dos lotes, de 200 mL de cultivo de *E. coli*, 12 mL viables de proteína purificada para posteriores tratamientos (Fig. 6 y 7).

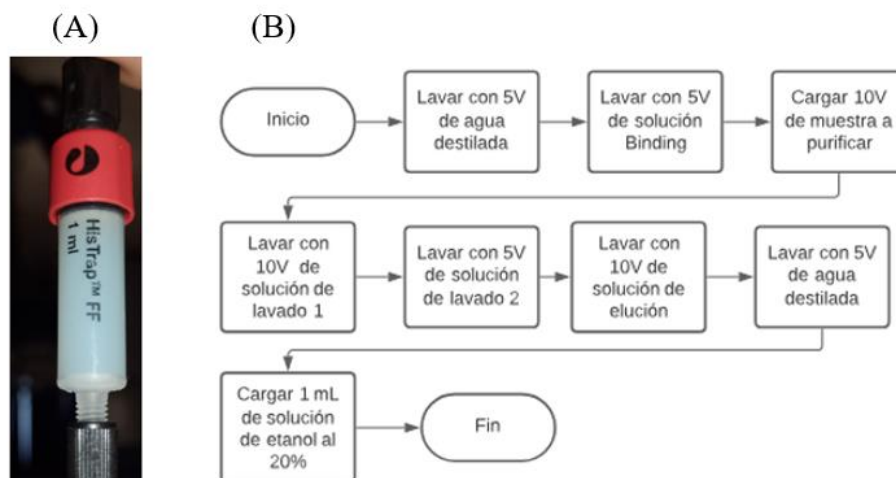


Figura 4. (A) Columna para cromatografía de afinidad de etiquetas de histidina en proteínas recombinantes. (B) Diagrama de flujo de la metodología seguida para la purificación de las muestras.

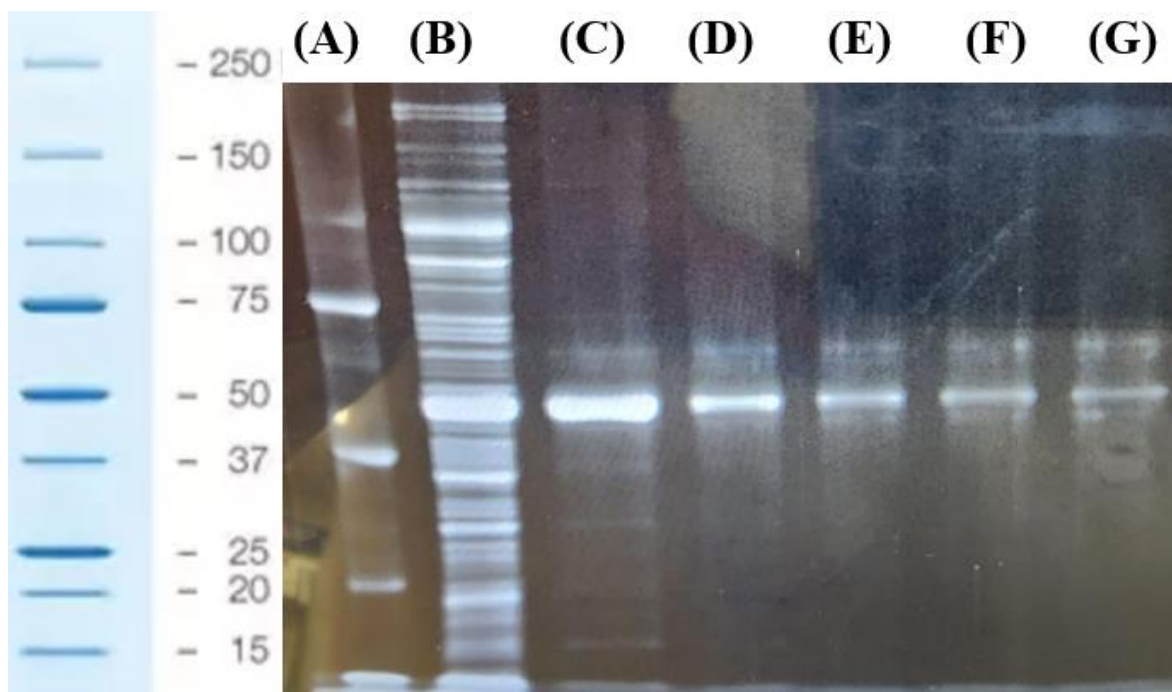


Figura 5. SDS-PAGE de la purificación del lisado de proteínas de *E. coli*. (A) Marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards. (B) proteínas totales del lisado del cultivo de *E. coli*. (C) Primer volumen de la etapa de elución de la purificación. (D) Segundo volumen de la etapa de elución de la purificación. (E) Tercer volumen de la etapa de elución de la purificación. (F) Cuarto volumen de la etapa de elución de la purificación. (G) Quinto volumen de la etapa de elución de la purificación.

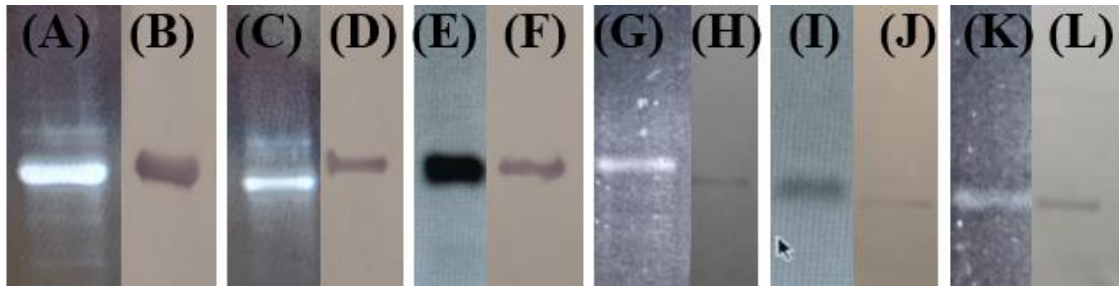


Figura 6. Purificaciones realizadas y aceptadas para su diálisis del primer lote realizado. Grupos de fracciones recolectadas de las etapas de elución de varias purificaciones (muestra 1 A y B; muestra 2 C y D; muestra 3 E y F; muestra 4 G y H; muestra 5 I y J; muestra 6 K y L). (A, C, E, G, I, J) muestras purificadas de 1 mL vistas por tinción con azul de Coomassie. (B, D, F, H, J, L) inmunodetección por Western blot de la proteína recombinante.

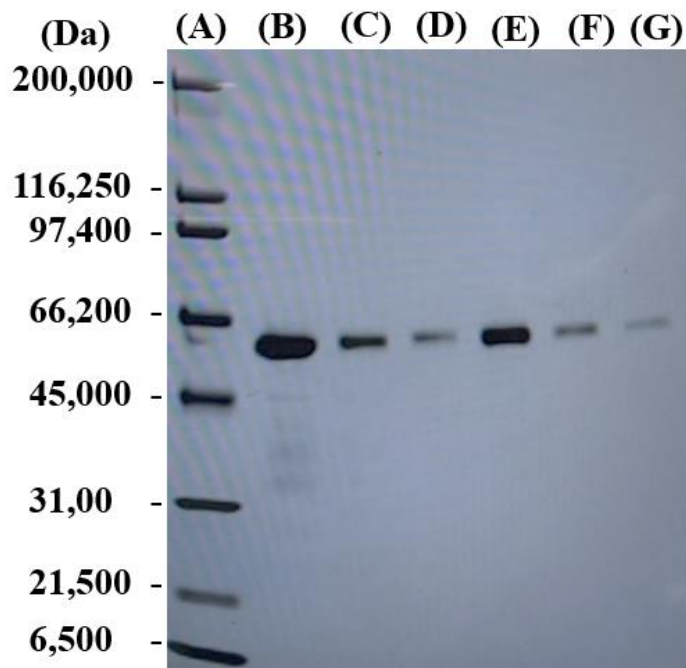


Figura 7. Purificaciones realizadas y aceptadas para su diálisis del segundo lote cultivado. Grupos de fracciones recolectadas de las etapas de elución de dos purificaciones. (A) marcador de peso molecular. (B) primer volumen de elución de la primera purificación. (C) segundo volumen de elución de la primera purificación. (D) tercer volumen de elución de la primera purificación. (E) primer volumen de elución de la segunda purificación. (F) segundo volumen de elución de la segunda purificación. (G) tercer volumen de elución de la segunda purificación.

El método utilizado para dializar el producto de interés es por medio de tubos de membrana de diálisis sumergidas en un amortiguador, en donde el movimiento de las moléculas pequeñas fluirá de mayor a menor concentración hasta alcanzar el equilibrio, con el fin de eliminar el exceso de impurezas [25]. Se estabilizaron tubos de membrana de celulosa para diálisis avg. flat width 10 mm en un buffer de HEPES (tabla 9 del anexo) hasta separar las membranas y generar un espacio entre ellas, se cerró con pinza un extremo de la membrana

y se cargaron las muestras purificadas entre ambas membranas. Se selló con otra pinza el tubo de membrana y se sumergió en agitación las muestras en buffer HEPES, desechando y cambiando cada 4 horas el volumen de buffer HEPES durante 2 días. Finalmente, se realizó una SDS-PAGE para corroborar el estado de la proteína luego de la diálisis (Fig. 8).

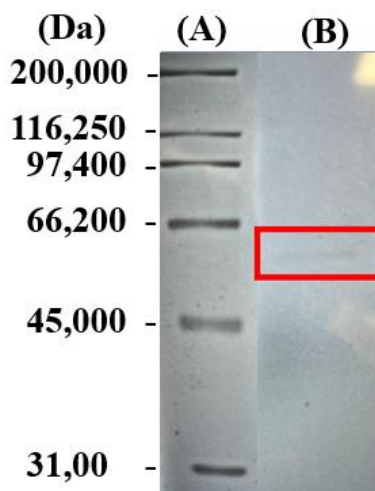


Figura 8. (A) marcador de peso molecular. (B) proteína recombinante dializada.

Debido a la baja intensidad de banda detectada en la SDS-PAGE (Fig. 8), luego de dializar las purificaciones se optó por tratar las muestras con una centrifuga incorporada con vacío, especializada en soluciones acuosas con productos termosensibles, para aumentar la concentración para futuros análisis [26]. La concentración se llevó a cabo a 1000 rpm por 90 minutos a 30°C en muestras separadas de 1 mL de la proteína recombinante, hasta haber eliminado la mitad del solvente de las muestras por vacío.

Se realizaron las cuantificaciones de las muestras purificadas, dializadas y concentradas de los dos lotes elaborados en el presente PAP por medio del método de Bradford en microplaca. Esta metodología se basa en la propiedad del tinte azul de Coomassie para unirse a todas las proteínas y la absorción del color resultante en la interacción con la muestra a una absorbancia de 595 nm sirve como magnitud de medición para la concentración de proteínas por medio de una curva de calibración con un estándar de proteína conocida [27]. Para ello, se mezclaron en una microplaca, con agitación orbital por 30 segundos, 250 uL de reactivo de Bradford y 50 uL de muestras a analizar (muestras de proteína recombinante y estándares de suero de albumina bovina (BSA) con concentraciones conocidas), luego se dejó reaccionar

por 5 min en completa oscuridad para leer su absorbancia a 595 nm, y calcular la concentración de las muestras problemas en base a los estándares de BSA. Para el primer lote se registró 3.25 mL de reactivo de proteína recombinante con una concentración de 9.27 ug/mL y del segundo lote 2.5 mL con una concentración 20.2 ug/mL en base a una curva de calibración con un coeficiente de correlación del 0.95.

Con el fin de realizar una evaluación de la reactividad de la proteína recombinante con anticuerpos dirigidos a micobacterias tuberculosas es necesario obtener una banda concentrada y definida en el gel de poliacrilamida, para realizar una membrana preparativa por electrotransferencia para la evaluación con anticuerpos y la posibilidad de su unión con una proteína multiepitopo diseñada para ser reconocida estos. La tinción con azul de Coomassie posee una sensibilidad de 50 ng para ser visualizada en un gel de poliacrilamida [18], así que se prepararon pozos correspondientes a una SDS-PAGE luego de la cuantificación para cargar el máximo posible de proteína total (más de 100 ng en 30 uL de muestra) en un gel. Del primer lote se cargó con 195 ng los pozos de un gel de poliacrilamida al 12 %, mientras que del segundo lote se depositó 424 ng (Fig. 9). Sin embargo, la intensidad de las bandas no resultó satisfactoria para una evaluación con anticuerpos hasta aumentar su concentración mediante disminución del volumen por evaporación u obteniendo mayor cantidad por medio de otra purificación.

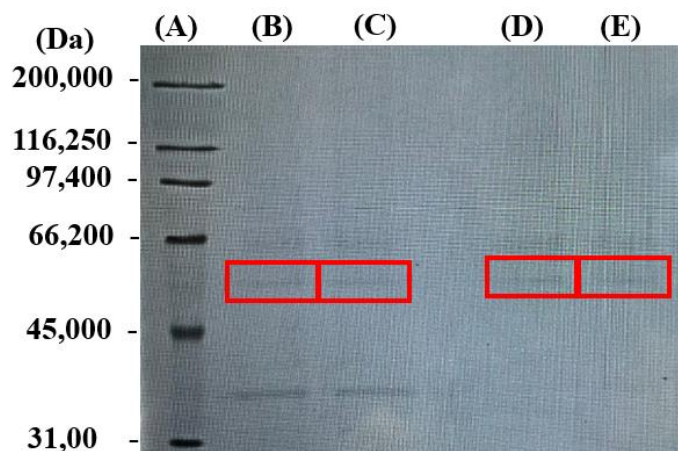


Figura 9. SDS-PAGE de las muestras producidas de proteína recombinante de dos lotes de cultivo en *E. coli* purificada, dializada, concentrada y cuantificada. (A) marcador de peso molecular. (B) Muestra de proteína recombinante del segundo lote. (C) Replica de la muestra del segundo lote. (D) Muestra de proteína recombinante del primer lote. (E) Replica de la muestra del primer lote.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

La detección de los antígenos buscando la respuesta inmune de memoria contra micobacterias tuberculosas es una estrategia muy utilizada para el diagnóstico de la infección, y el uso de proteínas recombinantes multiepítipo es una nueva tecnología para aumentar la capacidad antigénica para la búsqueda de anticuerpos reactivos por medio de una sola proteína de fusión diseñada como inmunógeno. En la literatura se han documentado múltiples estudios para la elaboración de una ELISA universal por medio de una poliproteína [3], o para la producción de anticuerpos reactivos de reconocimiento [2]. Uno de los principales problemas es la estabilidad de una construcción quimérica, la mayoría de las proteínas recombinantes pueden precipitarse debido a cuerpos de inclusión, la selección del vector pET-32a con la adición de la tiorredoxina parece favorecer la mejor producción de la proteína recombinante al ser una alternativa para mejorar el rendimiento y estabilidad tratándose de una sobreexpresión artificial alterando la fisiología del sistema de expresión proteico bacteriano [16].

El principal inconveniente en la experimentación del presente proyecto fue la cantidad de proteína resultante del proceso de extracción, purificación y acabado. Es común que las proteínas sufran algún tipo de degradación proteolítica o exista pérdida de proteína entre cada tratamiento para su refinamiento [28]. Por lo que una alternativa a considerar, además del escalamiento del cultivo mediante fermentadores controlados, es cambiar el tipo de purificación a realizar minimizando el número de pasos para la purificación de la muestra, como otros estudios exponen, ya sea por electroelución directa del gel de poliacrilamida [29] o purificación por exclusión molecular, además de la adición de inhibidores de proteasas [17].

La expresión de la proteína recombinante con una etiqueta de tiorredoxina mantuvo una gran estabilidad para su extracción y posteriores tratamientos para su aislamiento, debido a la baja precipitación de la proteína durante la experimentación. Se logró obtener un producto lo suficientemente claro para realizar una posterior evaluación de su inmuno reactividad, debido a que puede realizarse mediante una electrotransferencia de un gel de poliacrilamida a una membrana la cantidad de bandas presentes en la muestra final permite distinguir de manera

clara si existirá una unión antígeno anticuerpo mediante una reacción de coloración con la proteína multiepitopo.

Durante la producción de una proteína recombinante es muy común que durante el proceso de purificación y análisis posteriores se vaya alterando su rendimiento debido a factores extrínsecos como la manipulación o intrínsecos como degradación proteolítica. Por estos motivos, se hizo falta de una mayor cantidad de proteína recombinante con fines de evaluación, las muestras con menor concentración tuvieron una mayor purificación aparente, mientras que, las de mayor concentración de proteína total mostraron una mayor cantidad de proteínas contaminantes, sin embargo, la caracterización y análisis durante la experimentación permitirá evaluar cuáles fracciones de proteína se elegirán para el reconocimiento inmunológico de forma más específica.

Entre los aspectos que no se pudieron alcanzar a realizar en el presente PAP, fue la evaluación de reactividad mediante suero de individuos con tuberculosis para verificar la utilidad final de la proteína. Como futuras actividades del proyecto se realizará una evaluación de reactividad con la proteína recombinante en una membrana preparativa de nitrocelulosa y anticuerpos. Paralelamente, se podría comparar la afinidad del diseño de la misma proteína sin la etiqueta de tiorredoxina utilizando su producción con otro vector de expresión como el vector pET-28a.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] T. N. Jilani, A. Avula, A. Z. Gondal y A. H. Siddiqui. “Active Tuberculosis - StatPearls - NCBI Bookshelf”. National Center for Biotechnology Information. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513246/>
- [2] Z. Dai et al., “A multiple-antigen detection assay for tuberculosis diagnosis based on broadly reactive polyclonal antibodies”, Iranian J. Basic Med. Sci., vol. 20, n.º 4, pp. 360–367, 2017. Accedido el 26 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2017.8575>.
- [3] L. Sun et al., “Serological detection of Mycobacterium Tuberculosis complex infection in multiple hosts by One Universal ELISA”, PLOS ONE, vol. 16, n.º 10,

- 2021, art. n.º e0257920. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257920>
- [4] Organización Mundial de la Salud, “Informe mundial sobre la tuberculosis 2020: Sinopsis”, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 2021. Accedido el 26 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://iris.who.int/handle/10665/340396>
- [5] Secretaría de Salud. “079. En 2022 se registran más de 28 mil casos de tuberculosis en México”. gob.mx. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://www.gob.mx/salud/prensa/079-en-2022-se-registran-mas-de-28-mil-casos-de-tuberculosis-en-mexico>
- [6] R. Vita et al., “The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update”, *Nucleic Acids Res.*, vol. 47, n.º D1, pp. D339—D343, octubre de 2018. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1006>
- [7] S. L. Espejo Villalobos, “EVALUACIÓN DE RESPUESTA INMUNE PROTECTIVA 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, Univ. Nac. Colomb., Bogotá, 2018. [En línea]. Disponible: <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/64758/1032439713.2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [8] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. “Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible”. CIATEJ. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://ciatej.mx/el-ciatej/quienes-somos>
- [9] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. “Biotecnología Médica y Farmacéutica”. CIATEJ. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-medica>
- [10] Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. “Ángel Hilario Álvarez Herrera”. CIATEJ. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://ciatej.mx/investigacion/investigador/dr-angel-hilario-alvarez-herrera>
- [11] Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. “Infección de tuberculosis latente y enfermedad de tuberculosis”. Centro para el Control y la Prevención de

- Enfermedades. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://www.cdc.gov/tb/esp/topic/basics/tbinfectiondisease.htm>
- [12] Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. “Mycobacterium bovis (tuberculosis bovina) en seres humanos”. Centro para el Control y Prevención de Enfermedades. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: https://www.cdc.gov/tb/esp/publications/factsheets/pdf/M-bovis_Spanish_mcb.pdf
- [13] Productora Nacional de Biológicos Veterinarios. “Tuberculosis bovina en México”. gov.mx. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://www.gob.mx/pronabive/articulos/tuberculosis-bovina-en-mexico>
- [14] Á. H. Álvarez Herrera. “La tuberculosis latente y su impacto en salud pública”. CIATEJ. Accedido el 26 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://ciatej.mx/el-ciatej/comunicacion/Noticias/La-tuberculosis-latente-y-su-impacto-en-salud-publica/317>
- [15] Organización Mundial de la Salud. “Día Mundial de la Tuberculosis 2023: ¡Sí! ¡Podemos poner fin a la TB!” World Health Organization (WHO). Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://www.who.int/es/news-room/events/detail/2023/03/24/default-calendar/world-tb-day-2023#:~:text=El%20año%202023%20es%20clave,mejorar%20las%20inversiones%20al%20respecto>
- [16] H. Heydari Zarnagh, K. Hassanpour y M. J. Rasaei, “Constructing Chimeric Antigen for Precise Screening of HTLV-I Infection”, Iranian j. allergy, asthma, immunol., vol. 14, n.º 4, pp. 427–436, 2015. [En línea]. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26547711/>
- [17] S. Ramírez-Carretero, B. Miranda-Zaragoza y C. Rodríguez-Almazán, “Purificación de proteínas”, Mens. Bioquim, vol. 45, pp. 35–47, 2021. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <http://bq.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2021/06/7-Rodriguez-Purificacion.pdf>
- [18] A. M. Maldonado Alconada y 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, Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba. Accedido el 27 de octubre de

2023. [En línea]. Disponible: <https://www.uco.es/organiza/departamentos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>
- [19] 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 e193.394.
- [20] Cytiva. “HisTrap FF - Cytiva”. Cytiva. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/shop/chromatography/prepacked-columns/affinity-tagged-protein/histrap-ff-p-00251>
- [21] Cytiva, Strategies for protein purification. Cytiva, 2021. [En línea]. Disponible: https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-15680-pdf?_gl=1*_je4dl4*_gcl_au*ODcwNzc3MTIyLjE2OTI4MTE1ODE.
- [22] L. Amorós et al., “Diálisis y Ultrafiltración”, *Bioquim. I*, pp. 1–5, 2013. [En línea]. Disponible: <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/Dialisis%20y%20ultrafiltracion.pdf>
- [23] G. Gosset, “Los microbios como biofábricas”, *Cienc. Mex. Cienc.*, vol. 68, n.º 2, pp. 44–49, 2017. [En línea]. Disponible: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_2/PDF/Microbiosbiofabricas.pdf
- [24] Cytiva, Purification of histidine-tagged Maltose Binding Protein with Ni Sepharose 6 Fast Flow - method optimization and scale-up. Cytiva, 2020. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-14001-pdf?_gl=1*_1khkqs0*_gcl_au*ODcwNzc3MTIyLjE2OTI4MTE1ODE.
- [25] Thermo Fisher Scientific Inc. “Dialysis Methods for Protein Research | Thermo Fisher Scientific - DE”. Thermo Fisher Scientific - DE. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/dialysis-methods-protein-research.html>

- [26] Eppendorf SE. “Concentrator plus”. Laborgeräte, Zubehör & Service - Eppendorf Deutschland. Accedido el 27 de octubre de 2023. [En línea]. Disponible: <https://www.eppendorf.com/es-es/Tienda-virtual-y-Productos/Centrifugación/Concentrador/Concentrator-plus-p-PF-25748>
- [27] Sigma-Aldrich. “Bradford-Reagenz for 0.1-1.4 mg/ml protein | Sigma-Aldrich”. Merck | Germany. Accedido el 22 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible: https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/b6916?gclid=Cj0KCQiA6vaqBhCbARIsACF9M6nYoktH-Z37gpL4u25iIxbbcNd9Fws0j16NhQqxZQOJdRvy3cwCm7MaAinXEALw_wcB
- [28] M. Samaniego Hernández, ““Clonación, sobre-expresión y purificación de las proteínas NSP5 y NSP6 de rotavirus en Escherichia coli””, tesis doctoral, INST. POTOS. INVESTIG. CIENT. TECNOL., A.C., San Luis Potosí, 2007. [En línea]. Disponible: <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/1186/1/TDIPICYTS3C52007.pdf>
- [29] J. H. Monjardín Heráldez, “Aislamiento de bandas electroforéticas de un extracto de E. histolytica por electroforesis e electroelución continua”, Tesis de maestría, Univ. Auton. Nuevo Leon, 2002. [En línea]. Disponible: <https://eprints.uanl.mx/23170/1/23170.pdf>

1.8. Anexos generales

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

Reactivo	Cantidad
Acrilamida/Bis 30% (29%/1%)	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

Tabla 5. Composición del buffer de corrida 5X. Se diluyen 200 mL para preparar 1 L al 1X.

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

Tabla 6. Composición de la solución reveladora. 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

Tabla 7. Preparación de 50 mL de soluciones de lavado para la purificación de las muestras.

Solución	Imidazol	KCl	KH ₂ PO ₄	pH
1.- Binding buffer	0.068 g	1.8625 g	0.1361 g	7.4
2.- Buffer de lavado 1	0.1702 g	1.8625 g	0.1361 g	7.4
3.- Buffer de lavado 2	0.2383 g	1.8625 g	0.1361 g	7.4
4.- Buffer de elución	1.702 g	1.8625 g	0.1361	7.4

Tabla 8. Composición de solución desteñidora.

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

Tabla 9. Composición para 1 L de buffer HEPES pH de 7.5.

Reactivo	Cantidad
HEPES	3.5745 g
Cloruro de sodio	0.5844 g
Glicerol	10 mL
Agua destilada	Aforar a 1 L

2. Productos

Se utilizó la experimentación realizada en este PAP para desarrollar un reactivo con tecnología de proteínas recombinantes para el diagnóstico de micobacterias tuberculosas, y una metodología para la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad. Dicho producto fue obtenido mediante la extracción y purificación de diferentes cultivos inducidos de *E. coli* para la expresión de la proteína multiepitopo.

Tabla 10. Ficha descriptiva.

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II
Nombre del proyecto	Purificación de una poliproteína recombinante multiepitopo expresada en <i>Escherichia coli</i> para evaluación de reactividad con anticuerpos dirigidos a micobacterias tuberculosas en el CIATEJ, Guadalajara
Descripción	Es un documento que describe la experimentación realizada para expresar una proteína recombinante multiepitopo dirigida al diagnóstico de la tuberculosis. Además, se describe la purificación y acabado de la proteína para evaluar su reactividad como parte de un proyecto más amplio de un estudiante de maestría, mediante el cultivo de <i>E. coli</i> transformada con el vector pET-32a con fines diagnósticos contra la TB en muestras clínicas sospechosas
Autor	José Miguel González Cisneros

Producto:

“Protocolo de purificación de proteína recombinante en *E. coli* BL21 con el vector pET-32a en una columna HisTrap™ FF”

Purificación:

1. Lavar la columna con agua destilada, pasando 5 veces el volumen de la columna (VC).
2. Equilibrar la columna con binding buffer, pasando 5 veces VC.

3. Pasar 10 veces VC de la muestra a purificar.
4. Realizar el primer lavado de la muestra con buffer de lavado a una concentración de 50 mM de imidazol. Pasando el volumen de 10 veces la columna.
5. Realizar el segundo lavado de la muestra con buffer de lavado a una concentración de 70 mM de imidazol. Pasando el volumen de 5 veces la columna.
6. Eluir la columna con el buffer de elución y recuperando las fracciones correspondientes de esta etapa, por lo menos 5 veces VC.
7. Pasar solución de etanol al 20% y guardar la columna de afinidad a 4°C.

Diálisis:

1. Estabilizar tubos de membrana de celulosa para diálisis avg. flat width 10 mm en buffer HEPES en agitación hasta generar un espacio entre las membranas.
2. Colocar las fracciones de elución recuperadas de la purificación dentro de las membranas.
3. Sumergir en buffer HEPES y dejar en agitación por lo menos 4 horas.
4. Hacer cambios de buffer HEPES hasta un máximo de 4 veces.
5. Extraer el contenido interior de las membranas y guardar a -20°C.

El producto final fue un reactivo elaborado de dos lotes que contienen 3.25 mL de proteína recombinante a una concentración de 9.27 ug/mL y 2.5 mL de proteína recombinante a una concentración 20.2 ug/mL (Fig. 10).

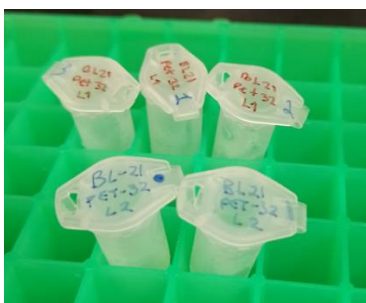


Figura 10. Producto obtenido de una proteína multiepítipo para futuras evaluaciones de reactividad.

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

Este proyecto fue dirigido para la creación de nuevas formas de diagnosticar una enfermedad de interés mundial, la tuberculosis. Al existir diversas maneras de contraer este padecimiento que, inclusive puede desarrollar la versión latente, ha causado aún mayor interés para combatir y acabar con la mayor cantidad de casos posibles. Por ello, es necesario la alteración de los sistemas biológicos, a pesar de la manipulación genética y metabólica que eso conlleva, ya que puede ser una estrategia viable para prevenir la tuberculosis, con el uso responsable de la tecnología, su regulación, consideración al medio ambiente y previniendo el contagio de personas sanas en contacto con individuos infectados.

Al tener la formación académica de ingeniero en biotecnología tuve la oportunidad de implementar varios de mis conocimientos para la continuidad de la experimentación a lo largo del proyecto, al tener un conocimiento de la transformación de bacterias y la separación de metabolitos celulares. Esto resultó en una gran satisfacción, debido a la necesidad que existió para superar las barreras e inconvenientes existentes durante el trabajo y finalmente su resolución gracias a las soluciones creativas que se idearon. Sin haber tenido la oportunidad previa de trabajar en un proyecto dirigido a una problemática del mundo actual, fue gratificante apreciar que los conocimientos que he adquirido pudieron aportar un grano de arena para después poder llegar a una solución real. Finalmente, el trabajo de investigación y los productos pasaron a otras manos para plantear y completar nuevos objetivos.

3.2 Aprendizajes logrados

Con este PAP tuve la oportunidad de entender la necesidad de generar nuevos métodos para el diagnóstico de enfermedades, y que estos son posibles con mi formación académica y la colaboración de varios individuos para lograrlo. A nivel profesional, tuve la oportunidad de aprender a organizar un proyecto de producción, purificación y acabo de proteínas recombinantes en *E. coli*, además, a colaborar con diferentes expertos en la materia para alcanzar mis objetivos teniendo las consideraciones necesarias para organizar un plan de trabajo semestral de experimentación.

A lo largo de la experimentación, me encontré con el reto que la mayoría de las metodologías sugeridas para mi experimentación requerían de reactivos, materiales o equipos a los que no tenía acceso o desconocía su uso. Sin embargo, al investigar a fondo diversas alternativas a cosas faltantes se tuvo la oportunidad de sobrellevar los problemas e inclusive probar cosas totalmente nuevas, que tal vez no llegué a registrar en este reporte, pero me llevaré a mi formación académica. Personalmente, obtuve la experiencia de saber que las mejores colaboraciones pueden surgir simplemente llevándose bien con los compañeros a tu alrededor.

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

Tabla 11. Inventario de competencias.

	Competencia		Evidencia	Relevancia/ Fortaleza*	Competencias nuevas	Competencias potencializadas
	Categoriza las competencias en conocimientos, habilidades y actitudes. Escribe la o las	Conocimientos	Principios de la bioseparación de productos.	Realicé la separación, concentración y purificación de astaxantina. Y genere un protocolo de inducción de una proteína recombinante.	Puedo aportar ideas para realizar la separación de una proteína. U optimizar los métodos y protocolos ya existentes.	Métodos de purificación de proteínas y eliminación de impurezas.
	Principios de la proteómica y separación de proteínas		Investigué los fundamentos necesarios para realizar SDS-PAGE y	Identificación de proteínas mediante su tamaño molecular o		

evidencias de cada competencia y su relevancia.		mediante electroforesis.	tinción de geles de poliacrilamida.	por medio de anticuerpos para su identificación cualitativa por western blot.		
		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.	Inmunodetección de proteínas. Y técnicas de tinción de proteínas en gel de poliacrilamida y membrana de nitrocelulosa.	Aumente mis saberes de equipos para cuantificación de proteínas y cromatografía.
		Fundamento para el desarrollo de la técnica de Western blot para identificación de proteínas.	Realicé la identificación de una proteína recombinante por medio de anticuerpos en membranas de nitrocelulosa.	Observar la correcta inducción de un cultivo bacteriano para identificar la producción de una proteína recombinante.		
	Habilidades	Cultivo de bacterias en diversos medios.	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.		
		Elaboración de geles de poliacrilamida para electroforesis de proteínas.	En el diseño de un protocolo para inducir una proteína recombinante	Identificar una proteína presente en un medio de cultivo para su posterior		

			elaboré los geles necesarios para su identificación por SDS-PAGE y Western blot.	concentración y purificación.		
		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.	Preparación de planes de trabajo para la experimentación de proyectos.	
		Separación de bioproductos 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.		
		Poseo ingenio para trabajar con diversos protocolos en diversos ambientes.	Me adapté 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	Tuve la oportunidad de mejorar mis cualidades para delegar tareas y aumentar la cantidad de	

				proceso, con alternativas ingeniosas.		trabajo a realizar.
		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.	Exposición de conocimientos de manera simple para dar a conocer mis ideas y trabajos a otras personas con mayor facilidad.	
		Estoy dispuesto a trabajar de manera colaborativa con diversas recomendaciones para realizar las actividades y presentarlas de la mejor manera posible.	Tuve la oportunidad de colaborar con un estudiante de maestría para desarrollar un protocolo de inducción de una proteína recombinante.	Se puede realizar una gran cantidad de experimentos a lo largo de un corto periodo de tiempo y perfeccionar las técnicas empleadas durante un proyecto.		

Al finalizar este PAP, terminé por conocer más acerca de la obtención de proteínas recombinantes y el trabajo en equipo. Aunque desarrollé un proyecto individual, me encontré trabajando con más personas en paralelo con sus proyectos individuales, y el apoyo que recibí de ellos, de los asesores e investigadores, me permitió finalizar este trabajo. Desarrollé nuevas competencias expuestas en la tabla 11, y mejoré algunas que ya poseía.