

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

**Expresión recombinante de un dominio vNAR anti-EGFRvIII (Epidermal Growth
Factor Receptor) presente en células tumorales, PAP realizado en el CIATEJ**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología, Andrés Urzua Torres Septien

Profesor PAP: Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas

Tlaquepaque, Jalisco, Mayo 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.....	8
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	9
1.4. Planeación de alternativa(s).....	10
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	15
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	20
1.7. Bibliografía y otros recursos	21
1.8. Anexos generales.....	22
2. Productos	26
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	27
3.1 Sensibilización ante las realidades	34
3.2 Aprendizajes logrados	34

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

Este proyecto, denominado "*Expresión recombinante de un dominio vNAR anti-EGFRvIII (Epidermal Growth Factor Receptor) presente en células tumorales*", tiene como propósito general extraer y aislar una proteína específica (vNAR R426) con el fin de posteriormente como agente terapéutico contra los cánceres positivos para el receptor del factor de crecimiento epidérmico variante tres (EGFRvIII). La metodología consta de pocos procesos. Primero se realiza una recolección de las células de *E. coli* empleadas en la expresión heteróloga del dominio vNAR R426. Posteriormente, se realiza una lisis rompiendo las bacterias para liberar el contenido intracelular que contiene al dominio vNAR y se realiza una precipitación por centrifugación para eliminar los desechos bacterianos y otros contaminantes. Finalmente, se hace una purificación con cromatografía de afinidad a metales (IMAC) para lavar proteínas contaminantes y se realiza la caracterización donde se analiza el dominio vNAR purificado para confirmar su identidad y pureza. El alcance de este trabajo en el periodo escolar de participación será hasta la purificación de la proteína y su caracterización. Como resultado se mostrará el proceso para la purificación del dominio vNAR analizando geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) su identificación.

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 proyecto se desarrolla en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A. C. (CIATEJ), encontrándose dentro del ámbito de la biotecnología médica farmacéutica. Este proyecto se lleva a cabo de manera experimental en laboratorios del centro de investigación.

Objetivo general:

- Desarrollar un proceso confiable y eficiente en la producción recombinante de la proteína vNAR R426 para su uso en la investigación médica.

Objetivos específico:

- Determinar las propiedades fisicoquímicas de la proteína vNAR R426, como su peso molecular, punto isoelectrico y secuencia de aminoácidos.
- Realizar el proceso de producción de la proteína vNAR R426 mediante su expresión recombinante, extracción y purificación.
- Determinar la pureza de la proteína vNAR R426 después de cada paso de purificación utilizando electroforesis en gel.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

El cáncer es un problema significativo para la salud humana en todo el mundo, sus actuales opciones de tratamiento normalmente tienen varios efectos secundarios y una limitada eficacia. En los últimos años, ha habido un interés creciente en el uso de terapias dirigidas para el tratamiento del cáncer en México, con el objetivo de atacar selectivamente las células cancerosas y minimizar el daño a las células sanas [1].

Uno de los enfoques más prometedores para la terapia dirigida contra el cáncer implica el uso de fragmentos de anticuerpos, específicamente de dominio de cadena pesada, que se denominan dominios vNAR. Los dominios vNAR (variable New Antigen Receptor) son el dominio de inmunoglobulina más pequeño con capacidad de reconocimiento al antígeno. Se pueden aislar de una clase de anticuerpos denominados IgNAR los cuales se encuentran naturalmente en los tiburones. A diferencia de los anticuerpos de mamíferos, que se componen de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, los anticuerpos IgNAR (150 kDa) son estructuralmente más simples consistiendo de una sola cadena polipeptídica (Fig. 1). El vNAR (15kDa) representa el dominio más pequeño y con mayor estabilidad que se puede unir al antígeno [2]. Los dominios vNAR tienen una mayor especificidad y afinidad a su antígeno, son útiles en posibles terapias para enfermedades humanas, incluyendo el cáncer. Estos dominios tienen una estructura tridimensional simple, se pueden diseñar y optimizar

de manera más fácil que los anticuerpos de mamíferos, lo que les da una ventaja en adaptabilidad a necesidades específicas [2].

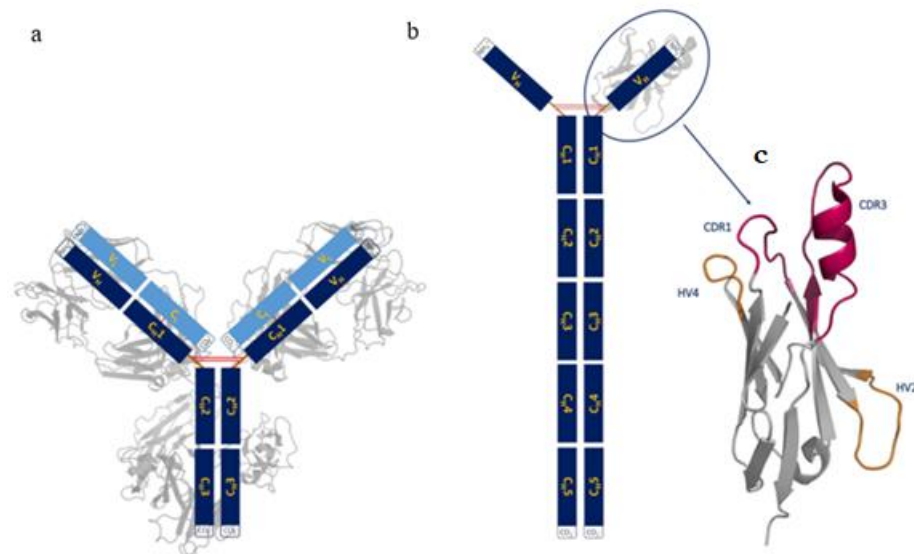


Figura 1. Comparación estructural de anticuerpo de mamífero (a) con una IgNAR aislada de tiburones (b) y un dominio vNAR (c) [3].

La proteína vNAR anti-EGFRvIII R426 es un dominio vNAR específico que se une a la variante EGFRvIII del receptor del factor de crecimiento epidérmico, que se sobreexpresa en una variedad de tipos de cáncer [4]. Para producir de forma recombinante al dominio vNAR, se puede operar un sistema de expresión bacteriano en un plásmido con el gen que la codifica. Utilizando un método de inducción de IPTG, se regula la síntesis de proteínas al desencadenar la transcripción del operón lac (Fig. 2). Evitando la unión de LacI a este sitio, se permite que la ARN polimerasa T7 exprese la polimerasa. Una vez expresada, la polimerasa se une a la secuencia promotora de T7 upstream del gen en el inserto del plásmido y se transcribe el gen, desencadenando la expresión de la proteína en las células bacterianas [5]. Seguidamente, las células se recogen y se lisan para liberar la proteína, que se puede purificar mediante un sistema marcado con histidina (HisTrap) de purificación por cromatografía de afinidad [4].

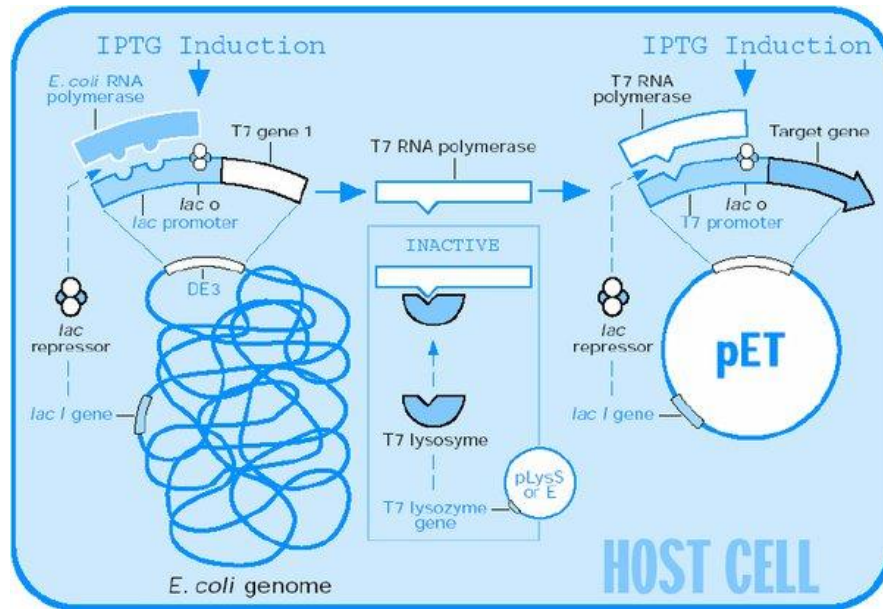


Figura 2. Método de inducción de IPTG [5].

HisTrap™ HP es una columna preempaquetada y lista para usar para la purificación preparativa de proteínas recombinantes marcadas con His mediante cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) usando Ni Sepharose High Performance precargada. El diseño especial de la columna, junto con la matriz de alto rendimiento, proporciona separaciones rápidas, sencillas y fáciles en un formato conveniente. Ni Sepharose High Performance tiene una baja pérdida de Ni²⁺ y es compatible con una amplia gama de aditivos utilizados en la purificación de proteínas [6]. Las columnas HisTrap HP (manual en el Anexo 1) pueden funcionar con una jeringa, una bomba peristáltica o un sistema de cromatografía líquida.

Existen varias formas de verificar la purificación de una proteína. Pero el método más común y práctico es la electroforesis en geles de poliacridamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). El procedimiento involucra la desnaturalización inicial de las proteínas componentes con un detergente aniónico que se une a ellas, impartiendo a todas las proteínas una carga negativa proporcional a su masa molecular. A este paso le sigue la electroforesis a través de una matriz de gel de acrilamida porosa que separa las proteínas con una resolución excelente en función de la masa molecular. Los métodos que utilizan SDS-PAGE son: la evaluación de la pureza de las muestras de proteínas,

la evaluación de la expresión de proteínas y la identificación y cuantificación inmunoquímica de proteínas (transferencia Western) [7].

Finalmente, también hay varios métodos para cuantificar proteínas, pero el más adecuado para microensayos, placas de pocillos múltiples y ensayos estándar es el método de Bradford (manual en el Anexo 2). El reactivo de Bradford se utiliza para determinar la concentración de proteínas en solución. El procedimiento se basa en la formación de un complejo entre el colorante Brilliant Blue G y las proteínas en solución, el complejo de proteína y colorante, llamado *protein dye*, provoca un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm y la cantidad de absorción es proporcional a la proteína presente. El reactivo de Bradford no requiere dilución. El rango de concentración lineal es de 0,1 a 1,4 mg/mL de proteína, utilizando BSA (albúmina bovina sérica) como proteína estándar [8].

En el presente Proyecto de Aplicación Profesional (PAP) se practicó el aislamiento del dominio vNAR anti-EGFRvIII R426 posterior a la inducción de la expresión génica, a partir de la expresión de proteínas y la purificación mediante el sistema HisTrap. Esta investigación comenzó en el año 2013 con la Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas y continúa hasta la actualidad [4].

1.2 Caracterización de la organización

El Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ) es un centro público adscrito al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). El CIATEJ es un centro interdisciplinario de investigación, desarrollo técnico e innovación que también brinda servicios tecnológicos y formación de recursos humanos de alto nivel. Muchos productos, como alimentos y medicamentos, aún se encuentran en las etapas de investigación y desarrollo, pero algunos están actualmente en el mercado. Sin embargo, los procedimientos regulatorios cada vez más complicados pueden obstaculizar los reclamos de comercialización. En este sentido, CIATEJ es un socio clave con profesionales expertos que pueden asesorar, producir y salvaguardar información de vanguardia mediante la producción de productos, procesos y servicios para ayudar a la industria a prosperar [9].

En la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica del CIATEJ, se llevan a cabo iniciativas de investigación y desarrollo, y también brinda servicios con un enfoque principal en satisfacer las necesidades de salud humana y animal del país mediante el uso de tecnología sofisticada. Los temas de estudio de la Unidad son amplios, pero todos se centran en cuatro ejes de investigación, desde cómo tratar o reparar una enfermedad, cómo identificarla rápidamente y cómo evitarla. Primero, se están desarrollando y evaluando vacunas e inmunomoduladores. Segundo, desarrollo y validación de pruebas de diagnóstico molecular. Tercero, desarrollo y evaluación de productos con potencial terapéutico. Cuarto, ingeniería de tejidos e ingeniería biomédica de productos farmacéuticos biotecnológicos [10].

Este proyecto PAP se hizo en colaboración con la investigadora en jefa PhD Tanya Amanda Camacho Villegas, quien es encargada de la supervisión del trabajo, y PhD Abel Gutiérrez Ortega como colaborador.

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

El cáncer es una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo, y aunque existen tratamientos para combatirlo, estos pueden tener efectos secundarios graves además de que no siempre son efectivos. Por ello, en este PAP se busca trabajar con la terapia de los dominios vNAR siendo estos una alternativa bastante prometedora, ya que se ha demostrado que tienen una alta especificidad y afinidad hacia ciertos tipos de células cancerosas. En este sentido, la optimización de la metodología para expresar y purificar la proteína vNAR se presenta como un desafío importante para el desarrollo de terapias más eficaces y accesibles dirigidas contra el cáncer [11]. Una de las principales problemáticas en el aislamiento de la proteína vNAR son sus bajos niveles de expresión en las células bacterianas, lo que dificulta la obtención de cantidades suficientes para su posterior estudio y desarrollo. Además, la complejidad y el tamaño de la proteína vNAR también pueden plantear dificultades en términos de purificación y estabilidad [11].

Asimismo, en la producción y purificación de proteínas pueden ocurrir errores atrazando el proceso, y este requiere de mucho tiempo debido a que hay varios pasos involucrados. Aunque se realice la purificación, es posible que queden proteínas contaminantes

remanentes, lo que implica que se deben llevar a cabo ajustes en el método de purificación para garantizar la calidad del producto final.

En cuanto a la disponibilidad de recursos, la producción y purificación de proteínas a menudo requiere equipos y reactivos especializados, que pueden no estar fácilmente disponibles. Esto podría limitar el alcance y la viabilidad de la investigación. Finalmente, puede que la investigación que involucra el uso de proteínas derivadas de animales genere inquietudes éticas. Es fundamental garantizar que la investigación se lleve a cabo de conformidad con las pautas éticas, que se minimice y justifique el uso de animales.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Para solucionar el desafío de los bajos niveles de expresión de la proteína vNAR en las células bacterianas, se realizará la optimización en las condiciones del cultivo bacteriano para aumentar la expresión de la proteína vNAR. Esto podrá implicar el ajuste de la composición del medio de cultivo bacteriano, la manipulación de las condiciones de crecimiento (como la temperatura y los niveles de oxígeno) y/o el uso de factores de crecimiento u otras moléculas de señalización para estimular la expresión de vNAR. Además, se realizó el proceso en varias ocasiones para conseguir la cantidad requerida de proteína purificada.

Los problemas técnicos de la purificación de proteínas como la proteínas contaminantes que permanecen en la muestra purificada se pueden resolver realizando una segunda purificación. Por consiguiente, la disponibilidad de recursos puede ser un factor limitante para realizar este proyecto. Para esto, se hacen los cálculos de todos los reactivos necesarios para la preparación de los recursos.

En cuanto a que las inquietudes éticas por investigaciones que involucran el uso de proteínas de origen animal, se asegura que sí se está llevando a cabo la conformidad de las normas y directrices éticas [4]. En última instancia, se puede garantizar que la investigación está justificada y tiene el potencial de beneficiar la salud humana.

Para llevar a cabo el proyecto conforme las actividades de la semana, se siguió el plan de trabajo del proyecto (Tabla 1). De igual forma, se presenta una serie de recursos dividido en

grupos que se utilizaron a lo largo del proyecto para cada actividad (Tabla 2). El tiempo requerido para cada proceso fue de 6 horas mínimo, por lo que se realizó uno por día. Siendo que el objetivo del proyecto es el aislamiento de la mayor cantidad de proteína vNAR R426, los procesos tienden a repetirse todas las semanas.

Tabla 1. Cronograma de procesos para realizar el proyecto.

		<i>Actividad</i>	<i>Grupo de Recursos</i>
Febrero	Semana 1	Reactivación de cepas	A,E
	Semana 2	Expresión de proteínas	B,E
	Semana 3	Lisis y Purificación	C,E
	Semana 4	Electroforesis y Cuantificación	D,E
Marzo	Semana 5	Reactivación de cepas	A,E
	Semana 6	Expresión de proteínas	B,E
	Semana 7	Lisis y Purificación	C,E
	Semana 8	Electroforesis y Cuantificación	D,E
Abril	Semana 9	Reactivación de cepas	A,E
	Semana 10	Expresión de proteínas	B,E
	Semana 11	Lisis y Purificación	C,E
	Semana 12	Electroforesis y Cuantificación	D,E
Mayo	Semana 13	Reactivación de cepas	A,E
	Semana 14	Expresión de proteínas	B,E
	Semana 15	Lisis y Purificación	C,E
	Semana 16	Electroforesis y Cuantificación	D,E

Nombre de la actividad	Grupo de 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
Planeación de actividades		1	X	X														
Reactivación de cepas	A E	1			X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Expresión de proteínas	B E	1			X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Lisis y Purificación	C E	1			X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Electroforesis y Cuantificación	D E	1			X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Presentar el avance 4 al director		1															X	
Presentación final oral		1																X

Tabla 2. Recursos del cronograma de actividades semanales para realizar el proyecto

Recursos Utilizados		
Grupos	Abreviatura	Significado
A	LB KN IPTG	LB Agar Kanamicina Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
B	BR BD	Buffer Renaturalizante Buffer Desnaturalizante
C	BS BU BL BE	Buffer de Sonicado Buffer de Unión Buffer de Lavado Buffer de Elución
D	B8 B6 AC PS TEMED BC CB MP AC BD	Buffer Tris-HCl/SDS pH 8.8 Buffer Tris-HCl/SDS pH 6.8 Acrilamida PSA 10% Tetramethylethylenediamine Buffer de Carga 4X Buffer de Corrida Marcador de Peso Molecular Dual Color Azúl de cromassie Buffer de Desteñido
E	EX I CH FC CE LG	Campana de extracción Incubadora Columnas Histrap FPLC Cámara de Electroforesis Lector de Geles

CÁLCULO DE REACTIVOS PARA LA PREPARACIÓN DE RECURSOS:

Tris-HCl 1M pH 8 (50mL): $M = \frac{mol}{L} \rightarrow 2.5M = \frac{mol}{.1L}$

$1M(0.05 L)=0.05 \text{ mol Tris-HCl}, (0.05 \text{ mol})\left(\frac{121.14g}{1mol}\right)= 6.057 \text{ g Tris-HCl}$

Se pesaron 6.057 g de Tris-HCl y se disolvió en 30 mL de agua destilada, llevandolo a pH 8 y aforando a 40 mL.

NaCl 2.5M (100 mL): $M = \frac{mol}{L} \rightarrow 2.5M = \frac{mol}{.1L}$

$2.5 M(0.1L)=0.25 \text{ mol NaCl}, (0.25 \text{ mol})\left(\frac{58.44g}{1mol}\right)= 14.61 \text{ g NaCl}$

Se pesaron 14.61 g de NaCl y se disolvió en 40 mL de agua destilada, aforando a 100 mL.

Imidazol 2M (50mL): $M = \frac{mol}{L} \rightarrow 2M = \frac{mol}{.05L}$

$$2(0.05L)=0.1 \text{ mol Imidazol, } (0.1 \text{ mol})\left(\frac{68.08g}{1mol}\right)= 6.808g \text{ imidazol}$$

Se pesaron 6.808 g de imidazol y se disolvió en 30 mL de agua destilada, aforando a 50 mL.

$$\text{Sulfato de Niquel NiSO}_4 + 6\text{H}_2\text{O (1 mL): } M = \frac{\text{mol}}{L} \rightarrow 0.1M = \frac{\text{mol}}{.001L}$$

$$0.01 \text{ mol NiSO}_4 + 6\text{H}_2\text{O, } (0.0001 \text{ mol})\left(\frac{262.85g}{1mol}\right)= 0.02628g \text{ NiSO}_4 + 6\text{H}_2\text{O.}$$

Se pesaron 0.02628 g y se disolvió en 1 mL de agua destilada.

$$\text{NaOH (30 mL): } M = \frac{\text{mol}}{L} \rightarrow 1M = \frac{\text{mol}}{.03L}$$

$$1(0.03L)=0.03 \text{ mol NaOH, } (0.03 \text{ mol})\left(\frac{39.997 g}{1 \text{ mol}}\right)= 1.1999 \text{ g NaOH}$$

Se pesaron 1.1999 g NaOH y se disolvió en 20 mL de agua destilada, aforando a 30 mL.

$$\text{IPTG 200mM (10mL): } M = \frac{\text{mol}}{L} \rightarrow 0.2M = \frac{\text{mol}}{.01L}$$

$$0.2(0.01 L)=0.002 \text{ mol IPTG, } (0.002 \text{ mol})\left(\frac{238.31g}{1mol}\right)= 0.4766g \text{ IPTG}$$

Se pesaron 0.4766 g IPTG y se disolvió en 10 mL de agua destilada. Se esterilizó con filtro de .22 μm en campana.

Buffer de Unión (50 mL): NaH_2PO_4 20 mM pH 7.4, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM.

- NaH_2PO_4 pH 7.4: $\frac{(50mL)(20mM)}{(1000mM)} = 1 \text{ mL}$
- NaCl 2.5 M: $\frac{(50 \text{ mL})(500 \text{ mM})}{(2500 \text{ mM})} = 10 \text{ mL}$
- Imidazol 2 M: $\frac{(50 \text{ mL})(10 \text{ mM})}{(2000 \text{ mM})} = 0.25 \text{ mL}$

Buffer de Elución (50 mL): NaH_2PO_4 20 mM pH 7.4, NaCl 500mM, Imidazol 500 mM.

- NaH_2PO_4 pH7.4: $\frac{(50mL)(20mM)}{(1000mM)} = 1 \text{ mL}$
- NaCl 2.5M: $\frac{(50mL)(500mM)}{(2500mM)} = 10 \text{ mL}$
- Imidazol 2M: $\frac{(50mL)(500mM)}{(2000mM)} = 12.5 \text{ mL}$

Buffer de Sonicado (100 mL): NaH₂PO₄ pH 7.4 20mM, NaCl 50 mM.

- NaH₂PO₄ pH 7.4 : $\frac{(100mL)(20mM)}{(1000mM)} = 2 mL$
- NaCl 2.5 M: $\frac{(50mL)(500mM)}{(2500mM)} = 2 mL$

Buffer de lavado 1 (200 mL): NaH₂PO₄ pH 7.4 20 mM, NaCl 200mM, Imidazol 50 mM.

- NaH₂PO₄ pH 7.4 : $\frac{(200mL)(20mM)}{(1000mM)} = 4 mL$
- NaCl 2.5M: $\frac{(200mL)(200mM)}{(2500mM)} = 16 mL$
- Imidazol 2M: $\frac{(200mL)(50mM)}{(2000mM)} = 4 mL$

Buffer Renaturalizante (1L) pH 8:

- Tris Base 50 mM
- Glicerol 50mM
- Glutation Oxidado 0.5mM

Buffer de lavado 1 (200 mL): NaH₂PO₄ pH 7.4 20 mM, NaCl 200 mM, Imidazol 50 mM.

- NaH₂PO₄ pH 7.4 : $\frac{(200mL)(20mM)}{(1000mM)} = 4 mL$
- NaCl 2.5M: $\frac{(200mL)(200mM)}{(2500mM)} = 16 mL$
- Imidazol 2M: $\frac{(200mL)(50mM)}{(2000mM)} = 4 mL$

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Preparación del antibiótico

Con el objetivo de preparar concentración de antibiótico para una posterior expresión recombinante empleando bacterias, se prepararon 10 mL de Kanamicina a 100mg/mL. Para ello, se pesó 1.0 g de sulfato de kanamicina: $[10mL \left(\frac{100mg}{1mL}\right) = 1000mg \text{ Kanamicina}]$. Se limpió la campana de extracción para posteriormente diluir la kanamicina en un ambiente estéril. Con una jeringa y un filtro, se filtró toda la kanamicina en tubos estériles (1mL por tubo). Se rotuló y se almacenó en congelador a -20°C.

Reactivación de cepas

Para la posterior expresión de proteínas, se prepararon 650 mL de medio (6.25g de Luria Broth Base + 3.75 g de agar enriquecido) y 100 mL de medio (2.5g de Luria Broth Base). Se esterilizaron ambos al autoclave. Una vez el medio estéril con agar, se colocó en cajas Petri y se agregaron 50 mg/L de kanamicina como antibiotico. Se reactivaron las cepas en las placas con el medio. Se utilizó la cepa: *Escherichia coli BL21-DE3* con el plásmido de expresión para subclonación y sobreexpresión de la proteína vNAR anti-EGFRvIII R426. Se dejó incubar por 16 h a 37 °C. Posteriormente se revisaron las placas con colonias reactivadas y se preparó un pre-inóculo agregando células congeladas al medio sin agar y se agregó kanamicina, dejándolo en agitación por 16 h a 37 °C. Las placas se mantuvieron en refrigeración a 4 °C para detener el crecimiento hasta su uso.

Expresión de proteínas

Se preparó y alistó la campana de extracción. Se colocaron 8 mL del pre-inóculo en 400 mL de medio LB estéril junto con 400 µL de kanamicina. Se colocó el pre-inóculo con agitación en la incubadora a 37 °C a 250 rpm hasta tener una absorbancia de 0.5 con densidad óptica de 600nm (se inició el monitoreo después de las 2 horas). Se agregó IPTG 1M y se dejó incubar por 5 horas a 37°C. Se centrifugó a 10,000 rpm/15 min/4 °C en cónicos de 50mL y se juntaron las muestras para tener pastillas de 100 mL en el menor numero de tubos. Se lavaron las pastillas con agua destilada y se centrifugaron nuevamente. Se almacenó a -20°C.

Extracción y purificación de proteínas

Para la extracción de la proteína vNAR se resuspendieron 5 mL de buffer de sonicated por cada 1g de pastilla. Se lisaron las células por sonicated 4 veces con pulsos de 500-600 W/10 seg con intervalos de descanso de 40 seg. Se centrifugó a 10,000 rpm/15 min/4 °C recuperando el sobrenadante (Fracción No Retenida). Se repitió todo el proceso anterior. Se resuspendió en de Buffer desnaturalizante por 1 g de pastilla. Se colocó en un agitador orbital 120 rpm/1 h 30min, se centrifugó a 10,000 rpm/30 min/20 °C. Se retiró el sobrenadante a tubos nuevos y se incubó en agitación 120 rpm/1 h 30min con glutatión reducido a una concentración de 60 mM. Se añadió sobrenadante a 320 mL de buffer renaturalizante y se dejó incubar en agitación magnética 16 h/4 °C.

Para la purificación de proteínas primeramente se limpió y recargó la columna His-Trap. Se lavó la columna con con 5 volúmenes del buffer recomendado, después con 5 volúmenes de buffer de unión y se terminó con 5 volúmenes de agua destilada. Se cargó 1 volumen de NiSO₄ 0.1 M con jeringa. Se lavó nuevamente con 5 volúmenes de agua destilada y posteriormente 5 volúmenes de Buffer de Unión. Se centrifugó la muestra con el Buffer Renaturalizante 2 veces a 10,000 rpm/8 min/4 °C. Se equilibró la columna His-Trap colocando 5 volúmenes de Buffer de Equilibrio a un flujo de 5 mL/ min y se cargó la muestra renaturalizada a un flujo de 2 mL/min. Se pasaron 10 volúmenes de Buffer de lavado y después 6 volúmenes de Buffer de Elución, colectando cada volumen de columna en tubos nuevos. Se lavó la columna con 5 volúmenes de agua destilada y 5 volúmenes de Buffer de Equilibrio. Se pasaron 3 volúmenes de etanol 28% para conservar y se almacenó la columna a -4 °C .

Electroforesis sds-page

Para preparar los geles de poliacrilamida, primero se armó el equipo de construcción de geles de poliacrilamida y se le agregó agua destilada en los cristales de 0.75 mm para verificar que no hubiera fugas. Se preparó el gel separador 14% en el siguiente orden H₂O, Buffer Tris-HCl pH 8.8/6.8, SDS 20%, Acrilamida, PSA 10%, TEMED (Tabla 8). Se colocó el gel separador inmediatamente en los cristales hasta la línea verde y se vertió agua destilada hasta el borde para remover burbujas. Se esperó a que se polimerizara y se vació el agua. Se preparó el gel concentrador 4% en el siguiente orden H₂O, Buffer Tris-HCl/SDS pH 6.8 e inmediatamente se colocó en los cristales hasta el borde (Tabla 3). Se colocó el peine sobre el gel inmediatamente cuidando de no dejar burbujas y se esperó a que polimerizara para retirar los cristales del equipo. Finalmente se removió el peine, y los cristales con el gel se trasladaron a la cámara de electroforesis.

Tabla 3. Preparación de geles en cristales de 0.75mm.

Reactivo	Gel Separador 12%	Gel Concentrador 4%
H ₂ O	1.1mL	1.1mL
Buffer Tris-HCl pH 8.8	1mL	0.0mL

Buffer Tris-HCl pH 6.8	0.0mL	187.5μL
Acrilamida/Bis	1.9mL	120μL
SDS 20%	20 μL	7.5μL
PSA 10%	44 μL	17μL
TEMED	5.5 μL	2μL

Antes de llevar a cabo la electroforesis SDS-PAGE, se configuró el Termoblock a 95 °C. Se prepararon las muestras con 30 μL de proteína y 10 μL de Buffer de carga 4X en tubos nuevos. Se colocaron las muestras en el Termoblock 5 min/ 95 °C. Se colocó buffer de corrida en los cristales hasta sobrepasar los pocillos y después se vertió el buffer de corrida reutilizado por fuera en la cámara hasta donde se indica. Se cargaron 20 μL de las muestras a los pocillos y se configuró la fuente de poder a 160 V/ 5 min y después a 120 V/ 65 min. Se retiró el gel y se colocó en azul de Commassie 30 min en agitador para tinción. Se colocó el gel en buffer de desteñido o agua destilada caliente por 40 min. Después se retiró el buffer de desteñido, se fotodocumentó y se almacenó en agua destilada.

Las imágenes fotodocumentadas de las purificaciones de proteínas realizadas durante las semanas 3 y 14, se pueden apreciar en la Figura 3 nombradas de A-L. Cada gel de poliacrilamida de la Figura 3 es el resultado de una purificación.

Se utilizó un marcador de peso molecular Dual Color para observar y comparar la identidad de tamaño de las bandas de proteínas (Primer carril en todos los geles que conforman la Figura 3). Según la literatura, la proteína de interés se encuentra por encima de los 13 kDa [4]. Teniendo en cuenta que las proteínas vNAR tienen un tamaño de aproximadamente 12-15 kilodaltones (kDa), es posible que las bandas abundantes con ese tamaño en los geles de poliacrilamida corresponden a las proteínas de interés. Los carriles en los geles corresponden a la fracción no retenida, lavados, y eluciones. Se marca con una flecha roja las bandas de la proteína de interés recolectadas en las eluciones de la purificación.

La presencia de más de una banda puede estar relacionada con dímeros o agregados de los dominios vNAR que se forman probablemente con el tratamiento reductor que permite un contacto e interacción entre los residuos de cisteínas presentes en la proteína y asociados al proceso de repliegamiento. La diferencia de peso respecto a lo esperado para un homodímero del dominio vNAR podría ser debido a la existencia de isoformas del mismo dominio que puedan ser expresadas erróneamente en el momento de la traducción. En los incisos E, F, G, F, I, J, K, se señala el dímero vNAR (de aprox. 15kDa), siendo que se purificó mejor que el monómero. Esto quiere decir que en algunas purificaciones se tiene mas vNAR en formato de dimero que en otras. Por el otro lado en los incisos D, H, L se señalan los monómeros vNAR.

Se observan bandas de proteínas contaminantes en los geles, lo que sugiere que no se pudo remover por completo las impurezas durante el proceso de purificación. Estas impurezas pueden ser el resultado de la interacción no específica de las proteínas con las columnas de cromatografía o con otros reactivos utilizados en el proceso de purificación. Para reducir la cantidad de contaminación proteica en futuros experimentos, se recomienda revisar y optimizar las condiciones de purificación, como la elección de los reactivos de purificación y los protocolos de lavado. Además, se debe considerar el uso de técnicas adicionales de purificación para reducir la contaminación proteica en las muestras finales.

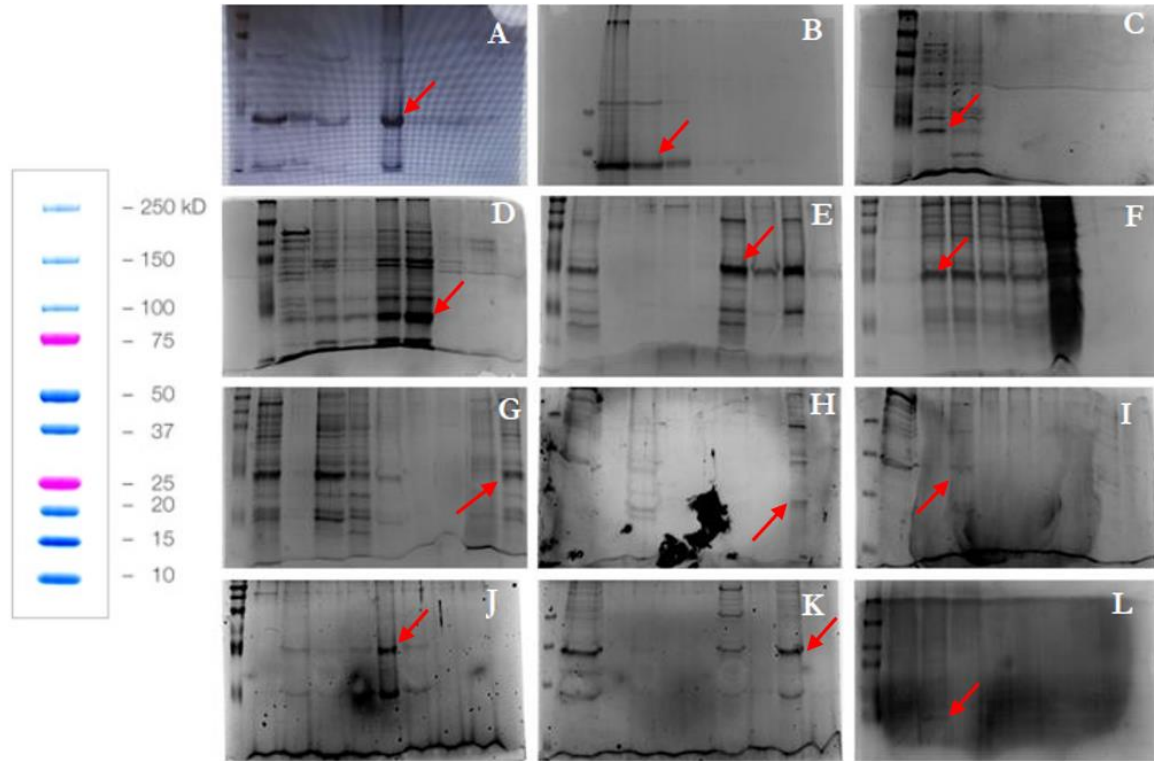


Figura 3. Fotodocumentación de cada electroforesis de la purificación de proteínas vNAR realizada A-L).

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

Por medio de las experimentaciones se logró hacer un protocolo completo de purificación que permite una gran reducción de la concentración de las proteínas contaminantes de vNAR pero disminuye la concentración de bandas accesorias. La apariencia de las bandas en estos geles puede verse afectada por varias razones. Se observan menos bandas accesorias en algunos geles en comparación con otros, es posible que haya diferencias en las condiciones de la corrida del gel o en la preparación de la muestra. Otras posibles explicaciones pueden ser la concentración de proteína en la muestra, el pH de los buffers y el tratamiento de la muestra antes de la carga en el gel. Si se cargaron diferentes concentraciones de proteína en diferentes geles, esto puede afectar el número y la intensidad de las bandas que se observan. Finalmente, si la muestra se trató de manera diferente antes de la carga en el gel, como la adición de agentes reductores o detergentes, esto puede afectar la apariencia de las bandas.

Se recomienda que en proyectos posteriores se siga evaluando la actividad biológica de las proteínas vNAR purificadas y su posible uso en aplicaciones terapéuticas. Es importante destacar que el proceso de purificación de proteínas es crucial en la investigación biológica y en la producción de proteínas para aplicaciones terapéuticas. La presencia de impurezas puede afectar significativamente la función y eficacia de las proteínas de interés, y también puede provocar reacciones adversas en los pacientes. Por lo tanto, es fundamental contar con protocolos de purificación rigurosos y eficientes para garantizar la alta calidad y pureza de las proteínas producidas. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que el protocolo de purificación desarrollado es un buen punto de partida para la producción de proteínas vNAR purificadas de alta calidad.

En conclusión, los resultados obtenidos a través de la experimentación muestran un progreso significativo en la purificación de proteínas vNAR y sugieren que estas proteínas pueden ser una prometedora herramienta en aplicaciones terapéuticas. Se recomienda continuar con la evaluación de la actividad biológica de las proteínas vNAR purificadas y su posible uso en terapias futuras.

1.7. Bibliografía y otros recursos

- [1] D. Millán, Efecto de un VNAR anti-VEGF165 en el tratamiento del cáncer, Ensenada, Baja California, México: Centro de Investigación Científica y de Educación, 2018, pp. 20-50.
- [2] J Wesolowski, V Alzogaray, J Reyelt et al., Ingle domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity, *Med Microbiol Immunol*, 2009, pp. 157-174.
- [3] C. S. P. Q. ML Fernández, Shark Antibody Variable Domains Rigidify Upon Affinity Maturation—Understanding the Potential of Shark Immunoglobulins as Therapeutics, Department of General, Inorganic and Theoretical Chemistry, Center for Molecular Biosciences Innsbruck (CMBI), University of Innsbruck, Innsbruck, Austria, 2021.
- [4] TC Villegas, TM Gonzalez, JP Solis, E Sanchez, A Licea, Human TNF cytokine neutralization with a vNAR from *Heterodontus francisci* shark: A potential therapeutic use, *mAbs*, 2013, pp. 80-85.
- [5] A Marbach, K Bettenbrock, lac operon induction in *Escherichia coli*: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA, *Journal of Biotechnology*, 2012, pp. 82-88.

- [6] HiTrap, Manual HisTrap HP 1mL y 5mL Instructions.
- [7] BA Nowakowski, JW William, DH Petering, Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic, Metallomics, 2014.
- [8] A. SIGMA, Bradford Reagent B6916, 2022, pp. 3-4.
- [9] A Espinosa, Z Yunuen, G Hugo, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C, Catalogo nacional, 2016.
- [10] AG Ortega, FY Flores, MA Flores Valdez, Temas de interés en Salud Humana que se están abordando en la Unidad de Biotecnología Médica y Farmacéutica del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C., 2019.
- [11] D. Li, A novel PD-L1-targeted shark VNAR single domain-based CAR-T strategy for treating breast cancer and liver cancer, CSH, 2021.
- [12] O. Bernal, Generación y caracterización de tres bibliotecas sintéticas de, Centro de Investigación Científica y de Educación, 2019.
- [13] NIH, Anticuerpo, 2022.

1.8. Anexos generales

Anexo 1. Manual HisTrap HP 1mL y 5mL

instructions

HiTrap

Caution!

Contains nickel.
May produce an allergic reaction.

HisTrap HP, 1 ml and 5 ml

HisTrap affinity columns

HisTrap™ HP is a prepacked, ready-to-use column for the preparative purification of His-tagged recombinant proteins by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using precharged Ni Sepharose™ High Performance.

The special design of the column, together with the high performance matrix, provides fast, simple and easy separations in a convenient format.

Ni Sepharose High Performance has a low Ni²⁺ leakage and is compatible with a wide range of additives used in protein purification.

HisTrap HP columns can be operated with a syringe, peristaltic pump or liquid chromatography system such as ÄKTA™ design or FPLC™ System.

Code No.	Designation	No. supplied
17-5247-01	HisTrap HP 1 ml	5 x 1 ml
17-5247-05	HisTrap HP 1 ml	100 x 1 ml*
17-5248-01	HisTrap HP 5 ml	1 x 5 ml
17-5248-02	HisTrap HP 5 ml	5 x 5 ml
17-5248-05	HisTrap HP 5 ml	100 x 5 ml*
Connectors		
	Luerlock female/M6 male	1
	Luerlock female/M6 female	1
	Tubing connector flangeless/M6 male	1
	Tubing connector flangeless/M6 female	1
	Union M6 female/1/16" male	1
	Union 1/16" female/M6 male	1
	Domed nut	2 or 5
	Instruction manual	1

* Special pack delivered on specific customer order.

Description

Medium properties

HisTrap HP 1 ml and 5 ml columns are packed with 1 ml and 5 ml of Ni Sepharose High Performance, respectively. Ni Sepharose High Performance consists of highly cross-linked agarose beads to which a chelating group has been immobilized. The metal ion nickel (Ni²⁺) has then been coupled to the chelating matrix.

Several amino acids, for example histidine, form complexes with many metal ions. Ni Sepharose High Performance selectively binds proteins if suitable complex-forming amino acid residues are exposed on the protein surface. Tagging proteins with additional histidines, like (His)_n, increases the affinity for Ni²⁺ and generally makes the His-tagged protein the strongest binder among other proteins, in *e.g.*, an *E. coli* extract.

Table 1 summarizes product characteristics.

Table 1. HisTrap HP characteristics.

Matrix	Highly cross-linked spherical agarose, 6%
Mean particle size	34 µm
Metal ion capacity	~15 µmol Ni ²⁺ /ml medium
Dynamic binding capacity*	At least 40 mg (His) ₆ -tagged protein/ml medium 1 ml or 5 ml
Column volumes	1 ml or 5 ml
Column dimensions	i.d. x h: 0.7 x 2.5 cm (1 ml) 1.6 x 2.5 cm (5 ml)
Recommended flow rate	1 and 5 ml/min for 1 and 5 ml column respectively
Max. flow rates	4 and 20 ml/min for 1 and 5 ml column respectively
Max back pressure**	0.3 MPa, 3 bar
Compatibility during use	Stable in all commonly used buffers, reducing agents, denaturants and detergents. See Table 2 for details.
Chemical stability***	0.01 M HCl, 0.1 M NaOH. Tested for 1 week at 40 °C. 1 M NaOH, 70% acetic acid. Tested for 12 hours. 2% SDS. Tested for 1 hour. 30% 2-propanol. Tested for 30 min.
Avoid in buffers	Chelating agents, e.g. EDTA, EGTA, citrate (see Table 2)
pH stability***	short term (≤ 2 hours): 2-14 long term (≤ 1 week): 3-12
Storage	20% ethanol
Storage temperature	+4 to +8 °C

* Dynamic binding capacity conditions:

Sample:	1 mg/ml (His) ₆ -tagged pure protein (M _r 28 000 or 43 000) in binding buffer (Q _{8,100} determination) or (His) ₆ -tagged protein bound from <i>E. coli</i> extract
Column volume:	0.25 ml or 1 ml
Flow rate:	0.25 ml/min or 1 ml/min
Binding buffer:	20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, pH 7.4
Elution buffer:	20 mM sodium phosphate, 0.5 M NaCl, 0.5 M imidazole, pH 7.4

Note: Dynamic binding capacity is protein dependent.

** H₂O at room temperature

*** Ni²⁺-stripped medium

The coupling technique used gives both high capacity and high performance. The medium is stable over the pH range 3–12.

Nevertheless, it is not always possible to predict which metal ion will be best for a given protein. The strength of binding between a protein and a metal ion is affected by several factors, including the length, position and exposure of the affinity tag on the protein, the type of ion used, and the pH of buffers, so some proteins may be easier to purify with ions other than Ni²⁺.

A quick and effective way to test this possibility and optimize separation conditions is to use HisTrap Chelating HP 1 ml columns, which are packed with Chelating Sepharose High Performance (not metal ion charged). Each column can be charged with different metal ions, e.g. Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ or Fe²⁺, allowing rapid and convenient comparison of the protein purification. Instructions are included with each column.

A study to compare the purification of six (His)₆-tagged recombinant proteins, including three variants of maltose binding protein, with different metal ions has indicated that Ni²⁺ generally gives best selectivity between His-tagged and non-tagged host cell proteins. (Data available in Application Note 18-1145-18).

Troubleshooting

The following tips may be of assistance. If you have any further questions about your HisTrap HP column, please visit www.hitrap.com or contact our technical support or your local Amersham Biosciences representative.

Note: When using high concentrations of urea or guanidine hydrochloride, protein unfolding generally takes place. Refolding on-column (or after elution) is protein dependent.

The Ni²⁺ charged medium tolerates all commonly used aqueous buffers, reducing agents, denaturants such as 6 M guanidine hydrochloride and 8 M urea, and a range of other additives (see Table 2).

Table 2. Ni Sepharose High Performance is compatible with the following compounds, at least at the concentrations given.

Reducing agents	5 mM DTE 5 mM DTT 20 mM β-mercaptoethanol 5 mM TCEP 10 mM reduced glutathione 8 M urea*
Denaturing agents	6 M guanidine hydrochloride*
Detergents	2% Triton™ X-100 (non-ionic) 2% Tween™ 20 (non-ionic) 2% NP-40 (non-ionic) 2% cholate (anionic) 1% CHAPS (zwitterionic)
Other additives	500 mM imidazole 20% ethanol 50% glycerol 100 mM Na ₂ SO ₄ 0.5–1.5 M NaCl 1 mM EDTA** 60 mM citrate**
Buffer substances	50 mM sodium phosphate, pH 7.4 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 100 mM Tris-HCl, pH 7.4 100 mM Tris-acetate, pH 7.4 100 mM HEPES, pH 7.4 100 mM MOPS, pH 7.4 100 mM sodium acetate, pH 4

* Tested for 1 week at +40 °C.

** The strong chelator EDTA has been used successfully in some cases, at 1 mM. Generally, chelating agents should be used with caution (and only in the sample, not the buffer). Any metal ion stripping may be counteracted by addition of an excess of MgCl₂. Note that stripping effects may vary with applied sample volume.

Tips: Samples containing urea can be analyzed directly by SDS-PAGE whereas samples containing guanidine hydrochloride must be buffer-exchanged to a buffer with urea before SDS-PAGE.

The column has clogged:

- Cell debris in the sample may clog the column. Clean the column according to the section Cleaning-in-place.
- It is important to filter the sample through a 0.22 µm or a 0.45 µm filter, see Sample preparation.

The sample is too viscous:

- If the lysate is very viscous due to the presence of a high concentration of host nucleic acid, continue sonication until the viscosity is reduced, and/or add DNase I to 5 µg/ml, Mg²⁺ to 1 mM, and incubate on ice for 10–15 min. Alternatively, draw the lysate through a syringe needle several times.

The protein is difficult to dissolve or precipitates during purification:

- The following additives may be used: 2% Triton X-100, 2% Tween 20, 2% NP-40, 2% cholate, 1% CHAPS, 1.5 M NaCl, 50% glycerol, 20 mM β-mercaptoethanol, 1–3 mM DTT or DTE (up to 5 mM possible but is protein dependent), 5 mM TCEP, 10 mM reduced glutathione, 8 M urea or 6 M guanidine hydrochloride. Mix gently for 30 minutes to aid solubilization of the fusion protein. Note that Triton X-100 and NP-40 have a high A₂₈₀ value but the A₂₈₀ value for Tween is low. Furthermore detergents cannot be easily removed by buffer exchange.

No His-tagged protein in the purified fractions:

- **The elution conditions are too mild (His-tagged protein still bound):** Elute with an increasing imidazole gradient or decreasing pH to determine the optimal elution conditions.
- **The protein has precipitated in the column:** Decrease amount of sample or decrease protein concentration by eluting with linear imidazole gradient instead of imidazole steps. Elute under denaturing (unfolding) conditions (add 4–8 M urea or 4–6 M guanidine hydrochloride).
- **Non-specific hydrophobic or other interaction:** Add a non-ionic detergent to the elution buffer (e.g. 0.2% Triton X-100) or increase the NaCl concentration.
- **The concentration of imidazole in the binding buffer is too high:** The protein is found in the flow-through material. Decrease the imidazole concentration in the binding buffer.
- **His-tag may be insufficiently exposed:** The protein is found in the flow-through material. Perform purification of unfolded protein in urea or guanidine hydrochloride as for inclusion bodies. To minimize dilution solid urea or guanidine hydrochloride can be added to the sample.
- **The buffer/sample composition is incorrect:** The protein is found in the flow-through material. Check pH and composition of sample and binding buffer. Ensure that chelating or strong reducing agents are not present in the sample at too high concentration, and that the concentration of imidazole is not too high.

SDS-PAGE analysis of samples collected during the preparation of the bacterial lysate may indicate that the majority of the

His-tagged protein is located in the post-lysis pellet. Possible causes and solutions are:

- **Sonication may be insufficient:** Cell disruption may be checked by microscopic examination or monitored by measuring the release of nucleic acids at A_{260} . Addition of lysozyme (up to 0.1 volume of a 10 mg/ml lysozyme solution in 25 mM Tris-HCl, pH 8.0) prior to sonication may improve results. Avoid frothing as this may denature the fusion protein. Over-sonication can also lead to co-purification of host proteins with the fusion protein.
- **The protein may be insoluble (inclusion bodies):** The protein can usually be solubilized (and unfolded) from inclusion bodies using common denaturants such as 4–6 M guanidine hydrochloride, 4–8 M urea or strong detergents.
Prepare buffers containing 20 mM sodium phosphate, 8 M urea or 6 M guanidine hydrochloride, and suitable imidazole concentrations, pH 7.4–7.6. Use these buffers for sample preparation, as binding buffer and as elution buffer. For sample preparation and binding buffer use 20 mM imidazole or the concentration selected during the optimization trials (including urea or guanidine hydrochloride).

The protein is collected but is not pure (multiple bands on SDS-PAGE):

- **Partial degradation of tagged protein by proteases:** Add protease inhibitors (use EDTA with caution, see Table 2).
- **Contaminants have high affinity for nickel ions:** Elute with a stepwise or linear imidazole gradient to determine optimal imidazole concentrations to use for binding and for wash. Add imidazole to the sample in the same concentration as the binding buffer. Wash before elution with binding buffer containing as high concentration of imidazole as possible,

Anexo 2. Manual de usuario Bradford Reagent B6916

Product Information

Bradford Reagent

Catalog Number **B6916**
 Storage Temperature 2-8 °C

TECHNICAL BULLETIN

Product Description

The Bradford Reagent can be used to determine the concentration of proteins in solution. The procedure is based on the formation of a complex between the dye, Brilliant Blue G, and proteins in solution. The protein-dye complex causes a shift in the absorption maximum of the dye from 465 to 595 nm. The amount of absorption is proportional to the protein present.¹ The Bradford Reagent requires no dilution and is suitable for micro, multiwell plate, and standard assays. The linear concentration range is 0.1-1.4 mg/ml of protein, using BSA (bovine serum albumin) as the standard protein.

The Bradford Reagent is compatible with reducing agents. Reducing agents are often used to stabilize proteins in solution. Other protein assay procedures (Lowry and BCA) are not compatible with reducing agents. The Bradford Reagent should be used in place of these protein assays if reducing agents are present. However, the Bradford Reagent is only compatible with low concentrations of detergents (see compatibility chart). If the protein sample to be assayed has detergent(s) present in the buffer, it is suggested to use the BCA protein determination procedure.

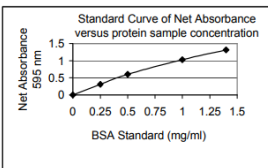
Reagent

The product consists of Brilliant Blue G in phosphoric acid and methanol. The 500 ml package is sufficient to perform at least 160 standard 3.1 ml assays.

Reagents and Equipment Required Depending on Assay Format Used

- Spectrophotometer capable of measuring absorbance in the 595 nm region.
- 96 well plates, Catalog Number CLS9017
- 96 well plate sealing film, Catalog Number Z369667
- Test tubes, 13 x 100 mm, Catalog Number CLS980013
- 3 ml Disposable Plastic Cuvettes, Catalog Number C5291
- 1 ml Disposable Plastic Cuvettes, Catalog Number C5416

Graph 1.
 Standard Curve produced from Assay Data



The standard curve indicates the unknown protein sample in test tube 6 (Net A_{595} = 0.811) contains 0.75 mg/ml of protein.

The total concentration of protein present in the original unknown protein solution is calculated as follows:

(mg/ml unknown protein sample) times (Dilution Factor)
 (0.75 mg/ml) x (2) = 1.5 mg/ml of protein

B. Micro 2 ml Assay Protocol

(1 ml of a 0.1-10 µg/ml protein sample is used)
 The micro assay is used when a large volume (at least 1 ml) of a dilute sample is available for testing. The linear concentration range of this assay is lower than the standard or multiwell plate assays, (1-10 µg of total protein in 1 ml).

1. Gently mix the Bradford Reagent in the bottle and bring to room temperature.
2. Prepare protein standards in buffer ranging from 1-10 µg/ml using a BSA standard or an equivalent protein standard.
3. Add 1 ml of each protein standard to separate tubes. To the tube used as the blank, add 1 ml of buffer.
4. Prepare the unknown sample(s) with an approximate concentration between 1-10 µg/ml. Add 1 ml of each sample to separate tubes.
5. To each tube, add 1 ml of the Bradford Reagent and mix.
6. Let the samples incubate at room temperature for 5-45 minutes.
7. Transfer samples into cuvettes.

- Protein Standard (BSA) Solution, (2 mg/ml), Catalog Number P0834
- Protein Standard (BSA) Solution, (1 mg/ml), Catalog Number P0914, if lower concentrations of protein are to be measured.

Precautions and Disclaimer

This product is for R&D use only, not for drug, household, or other uses. Please consult the Material Safety Data Sheet for information regarding hazards and safe handling practices.

Storage/Stability

The product is stored at 2-8 °C. It is stable at 2-8 °C in an unopened container for at least 1 year.

Procedure

The standard 3.1 ml Bradford assay consists of mixing 1 part of the protein sample with 30 parts of the Bradford Reagent. The sample may be a blank, a protein standard, or an unknown sample. The blank consists of buffer with no protein. The protein standard consists of a known concentration of protein, and the unknown sample is the solution to be assayed.

Bradford assays are routinely performed at room temperature. Color development begins immediately. The absorbance at 595 nm is recorded and the protein concentration is determined by comparison to a standard curve.

There are three protocols and it is suggested a new user try the standard 3.1 ml assay protocol first. The micro assay is for samples with low protein concentrations. The 96 well plate assay is for those who wish to perform the Bradford assay in plate format.

8. Measure the absorbance at 595 nm. The protein-dye complex is stable up to 60 minutes. The absorbance of the samples must be recorded before the 60 minute time limit and within 10 minutes of each other.
9. Plot the net absorbance vs. the protein concentration of each standard.
10. Determine the protein concentration of the unknown sample(s) by comparing the Net A_{595} values against the standard curve.

C. 96 Well Plate Assay Protocol

(5 µl of a 0.1-1.4 mg/ml protein sample is used)
 This assay is performed in a 96 well plate. With this assay it is possible to quickly assay multiple protein samples, while using a small sample volume (5 µl). It is also possible to automate your protein determination with this multiwell plate assay.

1. Gently mix the Bradford Reagent in the bottle and bring to room temperature.
2. Prepare protein standards in buffer ranging from 0.1-1.4 mg/ml using a BSA standard or an equivalent protein standard.
3. Add 5 µl of the protein standards to separate wells in the 96 well plate. To the blank wells, add 5 µl of buffer.
4. Prepare the unknown sample(s) with an approximate concentration between 0.1-1.4 mg/ml.
5. To each well being used, add 250 µl of the Bradford Reagent and mix on a shaker for ~30 seconds.
6. Let the samples incubate at room temperature for 5-45 minutes. Then measure the absorbance at 595 nm. The protein-dye complex is stable up to 60 minutes. The absorbance of the samples must be recorded before the 60 minute time limit and within 10 minutes of each other.
7. Plot the net absorbance vs. the protein concentration of each standard.
8. Determine the protein concentration of the unknown sample(s) by comparing the Net A_{595} values against the standard curve.

A. Standard 3.1 ml Assay Protocol

(1 ml of a 0.1-1.4 mg/ml protein sample is used)
 This assay is performed in test tubes. The assay uses 0.1 ml of the protein sample and 3 ml of the Bradford Reagent per tube. It is possible to do an assay directly in a cuvette by adding just 1.5 ml of Bradford Reagent to 0.05 ml of sample.
Note: It is necessary to create a standard curve during each assay, regardless of the format used.

1. Gently mix the Bradford Reagent in the bottle and bring to room temperature.
2. Prepare protein standards of appropriate concentrations in the same buffer as the unknown samples. The standards should be created by serially diluting either the 2 mg/ml or 1 mg/ml BSA protein standard (Table 1). Deionized water may be substituted for the buffer, but any interference due to buffer components will not be compensated for in the protein standards. The protein standards can range from 0.1-1.4 mg/ml. Create a standard assay table similar to Table 1.

Table 1.

Example of Standard Assay Set Up Table

For protein samples with unknown concentrations, it may be necessary to prepare a dilution scheme to ensure the concentration is within the linear range of 0.1-1.4 mg/ml. Tube 6 represents an unknown sample with a 2-fold dilution. Researchers must determine their own dilution schemes based on their estimation of the concentration of each unknown sample.

Tube No.	Sample (ml)	[BSA] protein standard (mg/ml)	Bradford Reagent (ml)
1	0.1	0	3
2	0.1	0.25	3
3	0.1	0.5	3
4	0.1	1.0	3
5	0.1	1.4	3
6	0.1	(unknown)	3

Use either the 1 mg/ml standard (Catalog Number P0914) or the 2 mg/ml standard (Catalog Number P0834) to create the protein standards. Each tube should contain 0.1 ml of a known standard, blank (buffer only), or unknown sample.

Compatibility Chart

The concentration listed below is the maximum amount of material, which can be present in the protein sample without causing interference in the standard or 96 well plate assay protocols. Since a larger volume of protein sample is used in the micro assay, the micro assay is compatible with amounts lower than those listed below.

Incompatible Substances	Amount Compatible
Buffer Systems	
ACES, pH 7.8	100 mM
N-Acetylglucosamine in PBS, pH 7.2	100 mM
Bicine, pH 8.4	100 mM
Bis-Tris, pH 6.5	100 mM
Calcium chloride in TBS, pH 7.2	10 mM
CellLytic [®] Reagent	no undiluted
CHES, pH 9.0	100 mM
Cobalt chloride in TBS, pH 7.2	10 mM
EPPS, pH 8.0	100 mM
Ferric chloride in TBS, pH 7.2	10 mM
Glycine	100 mM
HEPES, pH 7.5	100 mM
Imidazole, pH 7.0	200 mM
MES (0.1 M), NaCl (0.9%), pH 4.7	undiluted
MES, pH 6.1	100 mM
MOPS, pH 7.2	100 mM
Nickel chloride in TBS, pH 7.2	10 mM
PBS; Phosphate (0.1 M), NaCl (0.15 M), pH 7.2	undiluted
PIPES, pH 6.8	100 mM
Sodium acetate, pH 4.8	180 mM
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200 mM
Sodium chloride	0.1 M
Sodium citrate (0.6 M), MOPS (0.1 M), pH 7.5	undiluted
Sodium phosphate	0.1 M
TBS; Tris (25 mM), NaCl (0.15 M), pH 7.6	undiluted
Tricine, pH 8.0	100 mM
Traethanolamine, pH 7.8	100 mM
Tris	2.0 M
Tris (25 mM), Glycine (192 mM), pH 8.0	undiluted
Tris (25 mM), Glycine (192 mM), SDS (0.1%), pH 8.3	1:2 dilution
Zinc chloride in TBS, pH 7.2	10 mM

3. After adding 3 ml of Bradford Reagent to each tube, they should be vortexed gently for thorough mixing. The total liquid volume in each tube is 3.1 ml.
4. Let the samples incubate at room temperature for 5-45 minutes.
5. Transfer the samples into cuvettes.
6. Measure the absorbance at 595 nm. The protein-dye complex is stable up to 60 minutes. The absorbance of the samples must be recorded before the 60 minute time limit and within 10 minutes of each other.
7. Determine the protein concentration by comparison of the unknown samples to the standard curve prepared using the protein standards (Table 2 and Graph 1).

Table 2.

Example of Assay Data Table

Create a table with the absorbance results obtained from the assay.

Note: The data below should not be used as a replacement of a standard curve. The absorbance of the BSA protein standards (Tubes 1-5) in each assay will differ from those presented here.

Tube No.	A_{595}	Net A_{595}	[Protein] per Assay (mg/ml)	Dilution Factor
1	0.433	0	0	1
2	0.742	0.308	0.25	1
3	1.036	0.602	0.5	1
4	1.463	1.029	1.0	1
5	1.750	1.316	1.4	1
6	1.245	0.811	0.75	2

After obtaining the results, create a standard curve to determine the protein concentration in the unknown sample. Plot the Net Absorbance at 595 nm versus the protein standard concentrations (Tubes 1-5).

Incompatible Substances (Continued)	Amount Compatible
Buffer Additives	
Ammonium sulfate	1.0 M
Aprotinin	10 mg/L
Asparagine	10 mg/L
Calcium bicarbonate	0.1 M
Glucose	1.0 M
Glycerol	10%
Guanidine-HCl	3.5 M
Hydrochloric Acid	0.1 M
Imidazole, pH 7.0	200 mM
Leupeptin	10 mg/L
Phenol Red	0.5 mg/ml
PMSF	1 mM
Sodium azide	0.5%
Sodium chloride	5.0 M
Sodium Hydroxide	0.1 M
Sodium orthovanadate in PBS,	1 mM
Thimerosal	0.01%
Sucrose	10%
TLCK	0.1 mg/L
TPCK	0.1 mg/L
Urea 3.0 M	3.0 M
Detergents	
BRU-35	0.125%
BRU-52	0.031%
CHAPS	5%
CHAPSO	5%
Deoxycholic acid	0.050%
Nonidet P-40 (IGEPAL [®] CA-630)	0.5%
SB3-14	0.125%
Detergents	
Octyl β-glucoside	0.5%
Octyl β-thioglycopyranoside	3%
SDS	0.125%
SPAN [™] 20	0.5%
TRITON [™] X-100	~0.1%
TRITON X-114	0.125%
TRITON X-305	0.5%
TRITON X-405	0.5%
TWEEN [™] 20	0.062%
TWEEN 60	0.1%
TWEEN 80	0.062%

Incompatible Substances (Continued)	Amount Compatible
Chelating agents	
EDTA 100 mM	100 mM
EGTA 2 mM	2 mM
Sodium citrate, pH 4.8 or pH 6.4	200 mM
Reducing & Thiol Containing Agents	
2-Mercaptoethanol	1.0 M
Ascorbic acid	50 mM
Cysteine	10 mM
Dithioerythritol (DTE)	1 mM
Dithiothreitol (DTT)	5 mM
Potassium thiocyanate	3.0 M
Solvents	
Acetone	10%
Acetonitrile	10%
DMF	10%
DMSO	10%
Ethanol	10%
Methanol	10%

Notes: This is not a complete compatibility chart. There are many substances that can affect different proteins in different ways. One may assay the protein of interest in deionized water alone, then in buffer with possible interfering substances. Comparison of the readings will indicate if an interference exists. Refer to the literature for additional information on interfering substances.¹⁻⁷

Reagents that change the pH of the assay or contains high levels of detergents will interfere with the Bradford assay.

Troubleshooting guide

The absorbance of the unknown protein sample is too high.

1. Make sure there are no interfering substances present in the buffer. Test this by diluting the standard protein samples in the same buffer as the unknown samples.
2. The concentration of protein in the unknown sample may be too high. Dilute the unknown sample(s), accordingly
3. If the volume of the protein sample is small, try using the micro assay procedure or use the QuantiPro™ BCA assay kit (Catalog Number QPBCA).

The protein sample contains incompatible substance(s).

1. If the concentration of the protein sample is high enough, dilute the sample to reduce the level of the interfering substance.

Technical Tips

1. Make sure the glassware being used has been cleaned well.
2. Make sure that the Bradford Reagent is at room temperature when performing the assay. Also make sure that the Bradford Reagent is gently mixed.
3. Consider a different protein assay procedure. If certain incompatible substance(s) cannot be removed from the assay, consider the use of the BCA Assay (Catalog Number BCA1).
4. If levels of your protein are too low, try using the QuantiPro BCA Kit (Catalog Number QPBCA).

2. Productos

El producto principal de aportación que se alcanzó se entregó al investigador. La entrega de un reporte redactado con cada procedimiento realizado para brindar un estructura ordenada del proyecto y observaciones de procedimientos.

- Ficha descriptiva del producto elaborado.

Nombre y código del PAP	4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externo II
Nombre del proyecto	Expresión recombinante de un dominio vNAR anti-EGFRvIII (Epidermal Growth

	Factor Receptor) presente en células tumorales , PAP realizado en el CIATEJ
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Seguimiento de expresar proteínas vNAR. Se realizó para la investigadora Tanya Camacho.
Autor:	Andres Urzua Torres Septien

- Ficha descriptiva del producto elaborado - Bitacora.

16/02/23

POLYACRYLAMIDE GEL PROTOCOL

Objetivo: Form 5.25ml running gel made with a 40% liquid acrylamide/Bisacrylamide solution.

1. Amount of Acrylamide: Acrylam/Bis \rightarrow 1.66ml of 40%
 Acrylamide \times (5.25ml) (12%) = 63g Water \rightarrow 3.589ml

2. Amount of Bisacrylamide: Bisacrylamide \times (0.63g) (1/4) = 0.016g
 SDS 10% \rightarrow 5 μ l APS 10% \rightarrow 5 μ l TEMED \rightarrow 5 μ l

3. Amount of acrylamide/Bisacrylamide solution needed:
 Total volume of solution = (0.63g + 0.016g) / 0.4g/ml = 1.661ml

4. Calculate amount for 5.25ml:
 Water = 5.25ml - 1.661ml = 3.589ml

5. Calculate volume Tris-HCl buffer:
 Tris-HCl = (5.25ml) (12%) (V10) = 0.063ml

6. Calculate SDS:
 SDS = (5.25ml) (0.1%) = 0.005ml \approx 5 μ l

7. Calculate APS 10%
 APS = (5.25ml) (0.1g/ml) (0.1%) = 0.005g \approx 5 μ l

8. Calculate TEMED
 TEMED = (5.25ml) (0.1ml/ml) (0.1%) = 0.005ml \approx 5 μ l

09/02/23

LIMPIAR Y RECARGAR COLUMNA DE GRAVEDAD

Objetivo:

Previamente: Poner a secar la resina a la columna hasta 1.6ml

1. SVC Buffer Recomendado (NaPO₄ 20mM, NaCl 0.5M, EDTA 50mM, pH 7.4)
2. SVC Buffer de Unión (20mM NaPO₄, 0.5M NaCl, 20mM Imidazol, pH 7.4)
3. SVC Agua Destilada
4. SVC NaSO₄ 0.1M
5. SVC Agua Destilada
6. SVC Buffer de Unión (20mM NaPO₄, 0.5M NaCl, 20mM Imidazol, pH 7.4)
7. SVC Etanol 20% (Si se purifican no usar etanol).

PURIFICACION DE PROTEINAS POR GRAVEDAD

Objetivo:

Previamente:

1. Colocar 7ml de resina por cada 7ml de muestra.
2. Vaciar muestra en columna recuperando en un tubo (3 veces).
3. 5VC Buffer de Lavado (50mM NaPO₄, 300mM NaCl, 50mM Imidazol) y recuperar.
4. 2.5ml Buffer de Elución (50mM NaPO₄, 0.5M NaCl, 50mM Imidazol) y recuperar.
5. Los decenas y lavados se guardan a -20°C.

Notas:
 Se colocaron 2.5ml de Buff. de unión.

08/02/23

EXPRESSION DE PROTEINAS

Objetivo: Expresión proteínas de las células BL21.

Previamente:

1. Preparar y calentar la campana. 15min UV.
2. Colocar el pre-inóculo en el medio LB. 8ml
3. Colocar 400 μ l de transformación para los 400ml de medio LB.
4. Colocar en la incubadora 37°C a 250rpm por hasta tener una absorbancia de 0.5 con densidad óptica de 600nm. Se inicia el crecimiento después de las 2 horas.
5. Se agrega el IPTG 1M.
6. Incubar por 5 horas.
7. Centrifugar en falones de 50ml, se le agrega más y repetir para tener pellet de 100ml. 10,000rpm x 15min a 4°C.
8. Lavar el pellet con agua dest. y centrifugar 10,000rpm x 15min a 4°C.
9. Almacenar a -20°C.

Notas:
 Hacer 3 veces y hacer 0.7 de Abs.

07/02/23

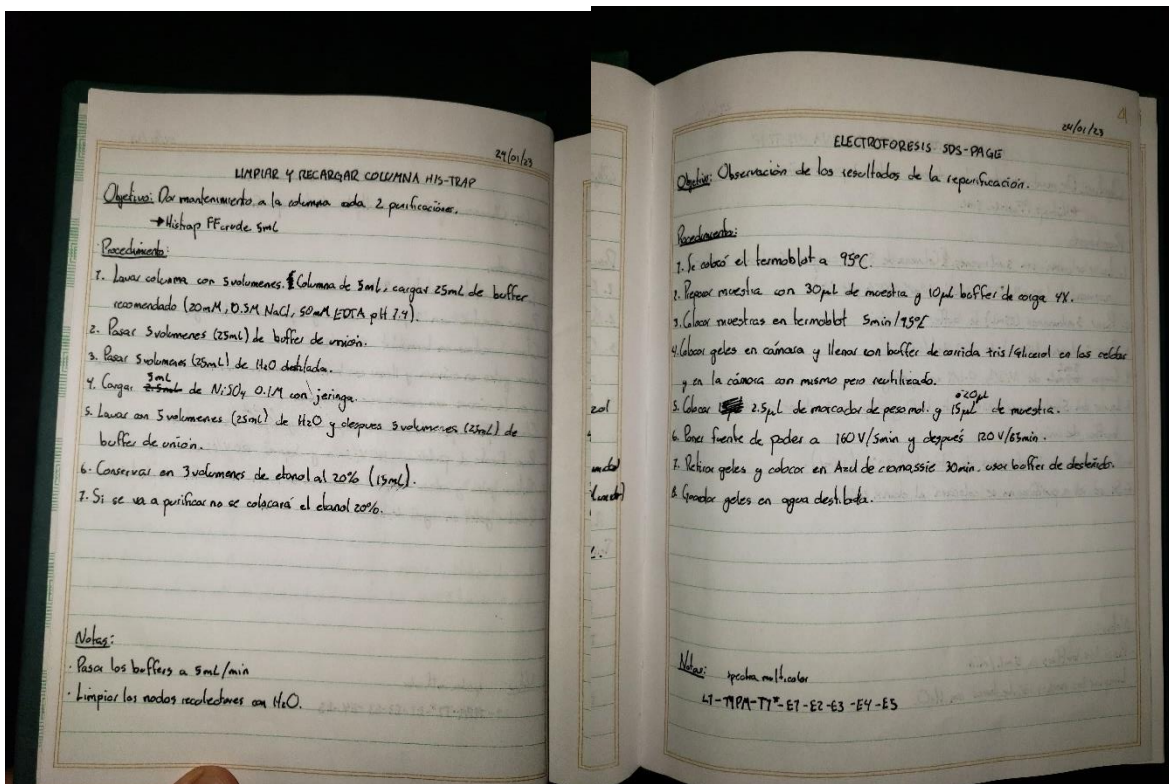
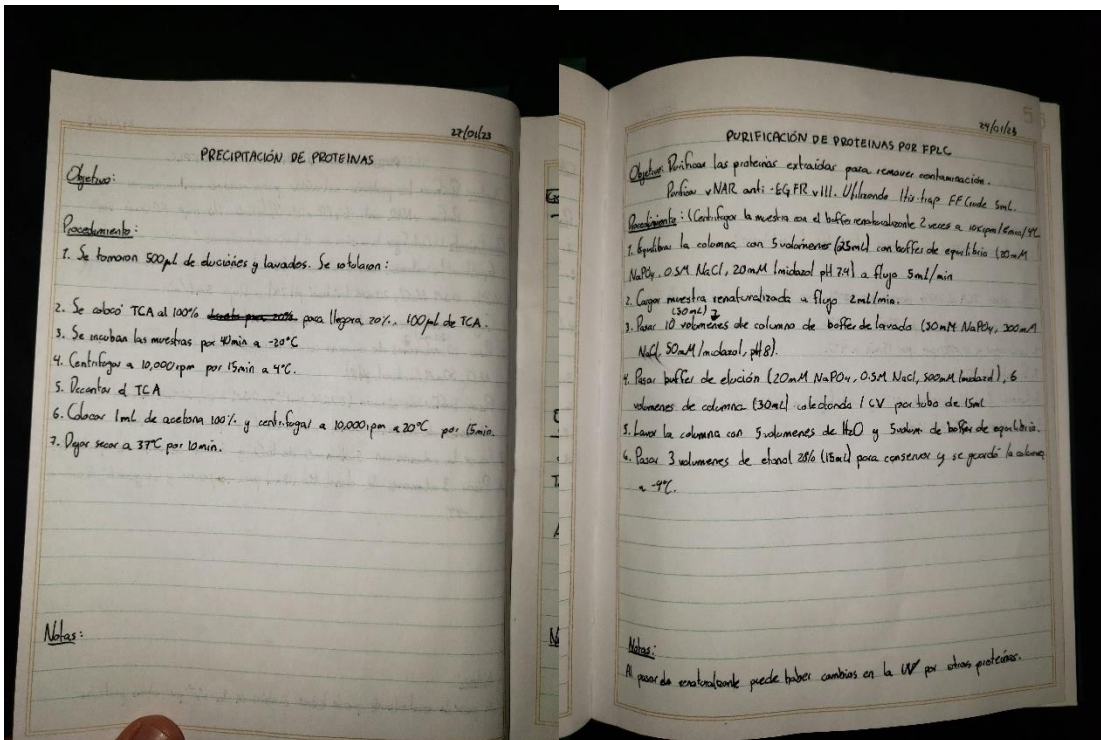
PREPARACION DE MATERIAL PARA EXPRESION

Objetivo: Preparar todos los materiales y medio para la expresión de proteínas.

Previamente:

1. Preparar 250ml de medio LB \rightarrow 6.25g de Levin Broth base + Agua evaporado 3.75g
2. Preparar 100ml de medio LB \rightarrow 2.5g de Levin Broth base
3. Preparar el autoclave 15min.
4. Se resaca en agua pechis de un medio solo ya preparado.
5. Dejar incubador 37°C por 16h.
6. Tomar con el asa y colocar en el pre-inóculo.
7. Dejar en gelación 16horas a 37°C. (Shaker)

Notas:



24/01/23

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Objetivo: Obtener proteínas purificadas para posteriores ensayos.

Procedimiento:

- En batch, se agrega el sobrenadante reanquestrado 1.5ml de resina His-Por Ni-NTA e incuba con agitación magnética 16h a 4°C.
- Se recupera toda la resina del paso anterior y se coloca en una columna para purificación con gravedad.
- Con la compactación de la resina se continúa con lavado.
- Se pasan 10ml de buffer de lavado I (50mM NaPO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazol pH8), seguido de un segundo lavado con (50mM imidazol).
- Se colocan 1.5ml de buffer de elución (50mM NaPO₄, 300mM NaCl, 100mM imidazol pH8). Seguido de 2ml de buffer de dución (30mM NaPO₄, 300mM NaCl, 250mM urea).
- Incubar 60min a temperatura ambiente entre cada dución.
- Las duciones con 100mM de imidazol se almacenarán 750µl en tubos de 2ml. Las duciones con 200mM de imidazol se almacenarán en 2 tubos de 2ml.

Notas:

23/01/23

PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA

Objetivo: Construcción de un gel de poliacrilamida para la electroforesis de la proteína purificada y repurificada.

Procedimiento:

- Alinear el equipo y colocar H₂O para ver fugas en los cilindros.
- Se prepara el gel separador 12% en el orden H₂O, Buffer, Tris, Acr., PSA, TEMED.
- Colocar el gel separador líquido a la primera línea verde y colocar H₂O para remover burbujas hasta arriba. Esperar a que se polimerice y se retira el H₂O.
- Preparar gel concentrador 4%. No colocar el PSA 10% y TEMED, hasta que el separador haya polimerizado. Colocar el gel hasta arriba y el peine.

Gel separador al 12%		Gel concentrador al 4%	
Acr/Bis	4.4ml	Acr/Bis	250µl
Tris 1M pH 8.8	1.5ml	Tris 1M pH 6.8	500µl
H ₂ O dest.	2.7ml	H ₂ O dest.	1.2ml
PSA 10%	1.8µl	PSA 10%	10µl
TEMED	3.75µl	TEMED	2µl

Notas:
Corregir las cantidades de los geles.

23/01/23

PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

Objetivo: Precipitar proteínas para identificarlas en gel de poliacrilamida.

Procedimiento:

- Se toman 100µl de las eluciones y 500µl del lavado y el FNR.
E1-E2-E3-E4-E5-E6-E7-E8-E9-E10
- Se coloca ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Si son 100µl se coloca 20µl TCA.
- Se incuban las muestras por 40min a -20°C.
- Centrifugar a max velocidad por 15min. 10,000rpm a 4°C.
- Decantar el TCA.
- Colocar 1000µl de Acetona 100% y volver a centrifugar a max vel. y a 20°C.
- Dejar secar a 37°C (3-10min).
-

Notas:

23/01/23

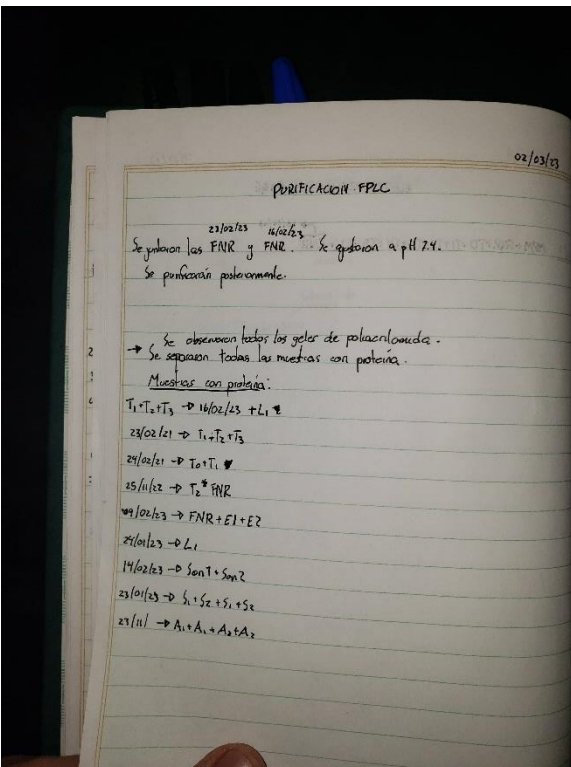
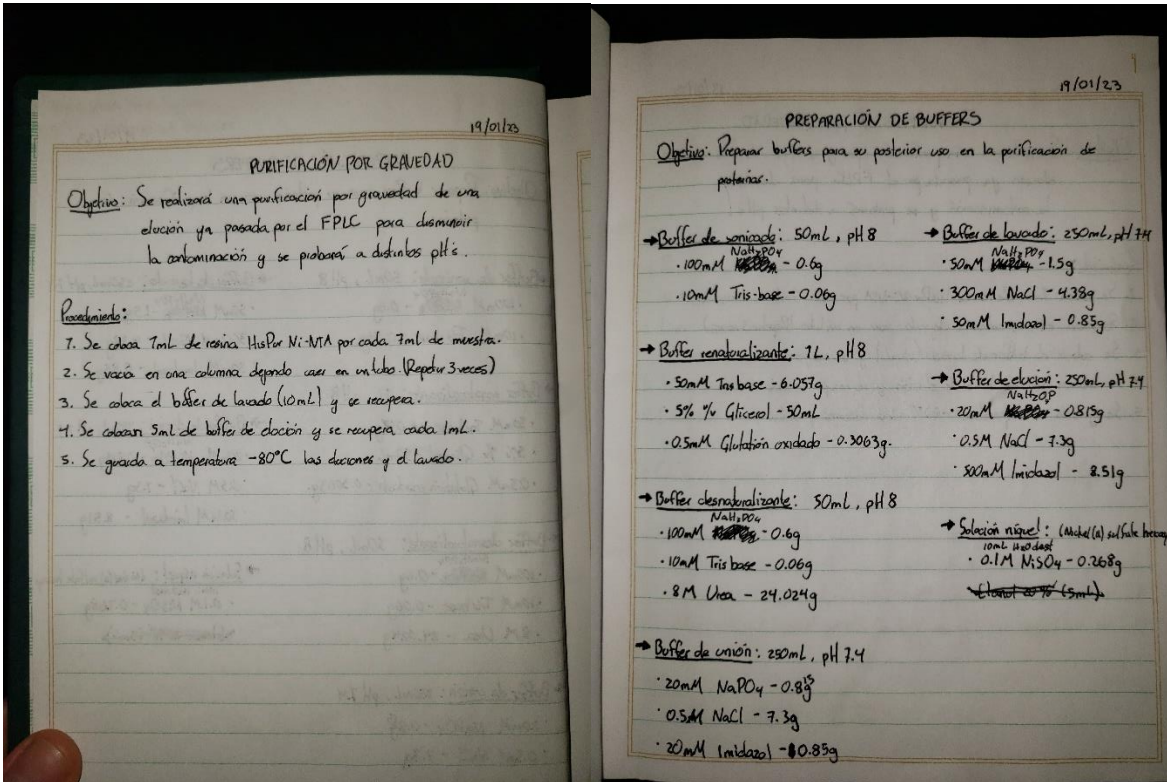
EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Objetivo: Obtener las proteínas dadas y expresadas con el plásmido pET-28a+.

Procedimiento:

- Resaca el sobrenadante de recuperación 5ml de Buffer de sonicado (500mM NaPO₄, 10mM Tris base pH 8) por cada 1g de pellet.
- Lisar las células por sonicado con pulsos a 500-600W por 10s. con intervalos de 30s, 4 veces. Seguido de centrifugación 10,000rpm por 15min a 4°C.
- Se espala el poco anterior. Se recuperan los sobrenadantes de ambos pasos.
- Recuperar el pellet en 4ml por 1g con Buffer desnaturalizante (100mM NaPO₄, 10mM Tris base, 8M urea pH 8).
- Colocar en agitación 120rpm en agitador orbital por 1h30min y centrifugar a 10,000rpm por 30min a 20°C.
- Pelizar sobrenadante a tubos nuevos e incubar en agitación a 120rpm por 1h30 con glutatión reducido (GSHT) a una concentración de 60mM. Añadir sobrenadante a 320µl de Buffer desnaturalizante (50mM Tris base, 5% 70 de glicérol, 0.5mM glutatión oxidado (GSOG) pH 8) e incubar con agitación magnética 16h a 4°C.

Notas:
Muestras sonadas: 51-52
51-52



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

Reflexiones éticas en los diferentes momentos del proyecto:

- Me fui posicionando frente a la realidad de un entorno en donde personas trabajan profesionalmente.
- Me involucré con las personas del laboratorio y sus problemáticas, socialicé con ellos a un punto de conocerlos. Los sentimientos que despertó en mí la experiencia fue la felicidad y el orgullo de trabajar con personas de tan alto nivel.

3.2 Aprendizajes logrados

En el presente proyecto adquirí varios aprendizajes, como por ejemplo; conseguir información por medio de investigación en artículos; elaborar protocolos por investigación de manuales de usuario y metodologías utilizadas; comprensión general de la bioquímica de los compuestos. Las competencias disciplinares que logré durante este proyecto fueron mantener un orden en la mesa de trabajo como en el inventario de materiales y llevar una bitácora a detalle de todos los procesos utilizados diariamente. Las competencias sociales que logré fue poder establecer una buena comunicación y un vínculo de confianza con el personal del mismo laboratorio y con la doctora que supervisó el trabajo. Las competencias universitarias alcanzadas fueron 320 horas de experiencia en un laboratorio de investigación. Profesionalmente aprendí a utilizar y familiarizarme con los equipos, los materiales y los reactivos del laboratorio.

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

Coconocimiento Habilidad	Competencia		Evidencia		Relevancia/Fortaleza*	
	Inicial	Nueva	Inicial	Nueva	Inicial	Nueva
Conocimientos	Principios de técnicas de laboratorio.	Utilización de equipos, variedad de	Se diseñaron varias prácticas de laboratorio	Se perfeccionó el uso de todos los equipos y	Me es conocido el equipo del	Se puede utilizar el equipo sin supervisión.

		reactivos. técnicas avanzadas de laboratorio	con casos de técnicas aplicadas a la electroforesis.	materiales del laboratorio llevando horas de practica.	laboratorio y su función.	
	Análisis y síntesis de la literatura científica aplicable a la biotecnología farmacéutica.	Mejor análisis de síntesis de la literatura científica aplicable a la biotecnología farmacéutica.	Lectura de los artículos científicos escritos por el investigador en relación con el proyecto actual.	Lectura de los más artículos científicos y manuales metodológicos.	Mejor comprensión teórica del trabajo practico en el proyecto.	Comprensión total de la metodología aplicada en el proyecto.
Habilidades	Organización y planificación.	Organización y planificación.	Experiencia redactando en bitácoras y planificando prelaboratorios.	Redacción en bitácora de laboratorio profesional.	Permite una mejor optimización de tiempo y calidad en el trabajo.	Organización de actividades y evidencia.
	Habilidad para la investigación y razonamiento.	Habilidad para la investigación y razonamiento.	Haber redactado teóricamente varios reportes de laboratorio y haber presentado resultados.	Redactar un reporte tipo tesis.	Poder entender dudas del proyecto. capacidad de investigar y entender para un razonamiento y redactar resultados.	Presntar resultados.
	Buenas prácticas de laboratorio	Buenas prácticas de laboratorio	Varias practicas supervisadas con un maestro calificado que corrige los malos hábitos.	Practicas profesionales supervisadas por un doctor.	Utilizar el equipo y material de manera correcta.	Utilizar el equipo y material de manera correcta.
Actitudes	Disponibilidad para horarios extraoficiales.	Disponibilidad para horarios extraoficiales	Aptitud para trabajar horas extra si es necesario.	Aptitud para trabajar horas extra si es necesario.	Mayor experiencia laboral.	Mayor experiencia laboral.

- Síntesis de lo significativo de este análisis:

Hay que manifestar en la práctica los diferentes aprendizajes, satisfaciendo de esta manera las necesidades y los retos que tienen que afrontar en los diferentes contextos donde interactúo. Hay que saber que hacer en situaciones concretas que requieren la aplicación creativa, flexible y responsable de conocimientos, habilidades y actitudes. Aprendí a conocer,

aprendí a hacer y a convivir llevándome a descubrir, despertar e incrementar mis posibilidades creativas.