

CONSTRUCCIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN CBD-GFP PARA EVALUAR UN SISTEMA DE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD A MEMBRANAS DE CELULOSA.

Marisa Sámano*, Beatriz Xoconostle C., Roberto Ruíz M. Jaime Ortega López. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Av. IPN # 2508, fax 57473313. msamano@mail.cinvestav.mx

Palabras clave: Membranas de Afinidad, Dominio de Unión a Celulosa (CBD), Proteína Verde Fluorescente (GFP)

Introducción. La producción de proteínas recombinantes es de gran importancia debido a su actividad enzimática, a sus interacciones específicas de reconocimiento o acciones terapéuticas, tales como: enzimas, anticuerpos monoclonales, hormonas, vacunas, citocinas, enzimas industriales y productos de diagnóstico (1). Por lo general las proteínas se extraen de caldos biológicos complejos en donde se encuentran en forma diluida y para la mayoría de sus aplicaciones deben tener un alto grado de pureza (2). La purificación de proteínas presenta una secuencia de etapas de separación que incrementan considerablemente el costo de producción. La cromatografía de afinidad a membranas es un nuevo enfoque que explota las interacciones específicas entre proteínas y ligandos para una purificación eficiente (3). La purificación de proteínas en fusión traduccional con un Dominio de Unión a Celulosa (CBD) es una alternativa viable y con ventajas económicas potenciales para la purificación de proteínas recombinantes a nivel preparativo. En este trabajo se obtuvo la proteína de fusión, proteína verde fluorescente (GFP) con el CBD Cex de *Cellulomonas fimi* para facilitar la determinación de la eficiencia de un sistema de cromatografía de afinidad a membranas de celulosa.

Metodología. Para la construcción de la proteína de fusión CBD-GFP, se partió de un plásmido que contiene el gen que codifica para la GFP y se subclonó en el vector de expresión *pET 38b (+)* que contiene al CBDcex de *C. fimi*. Se diseñaron oligonucleótidos específicos que flanquean los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante de la GFP a las cuales se les adicionó el sitio de restricción para las enzimas *BamHI* en el extremo 5' y *Hind III* en el extremo 3'. Se realizó la amplificación de DNA de la secuencia que codifica para la GFP mediante la reacción en cadena de la polimerasa y posteriormente se ligó el fragmento amplificado en el vector *pET 38b (+)*. Se seleccionaron y analizaron las clonas candidatas y finalmente se transformaron células competentes de *E.coli BL21plys*. Se realizó la inducción de la proteína de fusión PET-GFP a partir de un cultivo de 250 ml de medio TB con kanamicina a una concentración de 30 µg/ml en agitación constante a 37°C cuando el cultivo alcanzó una O.D._{600nm} de 0.6, se adicionó IPTG a una concentración final de 1mM y después de 4 h se centrifugó para separar el paquete celular. Se realizó el rompimiento celular para obtener el extracto crudo que se purificó primeramente por cromatografía de afinidad a níquel, para posteriormente utilizar la columna con membranas de celulosa

Resultados y discusión. Se obtuvieron 10 clonas candidatas de las cuales se escogió una clona correspondiente a CBD-

GFP denominada PET-GFP, que al ser analizada mediante una digestión secuencial con las enzimas *BamHI* y *Hind III* se liberó el fragmento esperado de 720 pb, mientras que con *EcoRI* se comprobó que la subclonación se encuentra en la posición del vector que se esperaba. En la inducción de la proteína recombinante se obtuvo un polipéptido del tamaño esperado que se encontró tanto en forma soluble como en cuerpos de inclusión. La fracción soluble se purificó por afinidad a níquel y se utilizará para determinar la constante de disociación y capacidad máxima de adsorción de las membranas de celulosa.

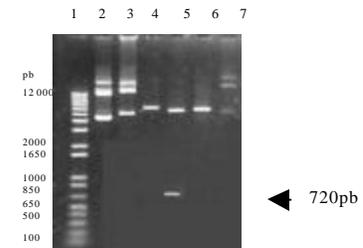


Fig. 1. Perfil electroforético del análisis por restricción de la clona PET-GFP. 1. Marcadores de peso molecular de 1Kb plus DNA ladder. 2 y 3. Plásmidos pET38 b+ y PET-GFP sin digerir. 4. PET-GFP digerido con BamHI. 5. PET-GFP digerido con BamHI y HindIII. 6. pET 38b+ digerido con EcoRI. 7. PET-GFP digerido con EcoRI.

Conclusiones. Se obtuvo la proteína de GFP en fusión traduccional con el CBD que contiene la clona denominada PET-GFP, cuya emisión de fluorescencia facilitará el monitoreo y la determinación de los parámetros requeridos para la validación de la columna de afinidad a membranas de celulosa. Se realizó la inducción de la proteína de fusión con IPTG 1 mM, de donde se obtuvo un extracto que se purificó por afinidad a níquel.

Agradecimiento. Este trabajo es financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto 40387 y con la beca 165528 a M.S..

Bibliografía.

1. Clonis, Y.D. (1990). *Separation Processes in Biotechnology*, J.A. Asenjo (Ed.), Marcel Dekker, New York, 401.
2. Tejeda –Mansir A, Ortega J, Magaña I, Guzmán R (2000) Analysis and design of frontal protein affinity chromatographic columns. *Recent Res. Devel. Biotech. & Bioen.* 3: 33-46
3. Kochan, J. E; Wu, Y. (1996). Purification of bovine immunoglobulin G via protein A affinity membrane. *Ind. Eng. Chem. Res.* 35: 1150-1155.

