

EXPRESION, PURIFICACION Y PLEGAMIENTO *in vitro* DE LA GLOBULINA 11S DE AMARANTO (AMARANTINA) EN *Escherichia coli*

Juan Alberto Osuna Castro y Octavio Paredes López

Depto. Biotecnología y Bioquímica, CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato, A.P. 629, Irapuato, Gto. 36500, México, Fax 462-62-459-96. oparedes@ira.cinvestav.mx

Palabras claves: *proteína de reserva, amarantina, plegamiento in vitro*

Introducción. El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) por sus sobresalientes características agroalimentarias y nutraceuticas ha sido denominado como "el grano alimentario del siglo XXI" (1). La globulina 11S, amarantina, descubierta en nuestro laboratorio, es una de las proteínas de reserva más importantes de este grano por su alto contenido de aminoácidos esenciales (2). La expresión de su cDNA en un sistema heterólogo permitiría obtener mayores cantidades en menor tiempo y en forma homogénea, facilitando su caracterización molecular y funcional y su rediseño mediante ingeniería de proteínas. En esta investigación se reporta la expresión de amarantina en *Escherichia coli*, su detección inmunológica, purificación, plegamiento *in vitro*, hidrofobicidad superficial y capacidad de ensamble.

Metodología. La cepa bacteriana de expresión BL21 (DE-3) transformada con el vector pT7-AMAR (conteniendo el cDNA de la amarantina sin péptido señal) se creció en medio líquido LB con carbenicilina, la expresión de la globulina se indujo con IPTG 0.4 mg/L. Las células inducidas se incubaron a 30 o 37 °C y 200 rpm. Se tomaron muestras a distintos intervalos de tiempo después de la inducción con la finalidad de optimar las condiciones de expresión. La identificación de la amarantina expresada se realizó mediante electroforesis en una dimensión y ensayos tipo western blot. La amarantina recombinante fue precipitada con sulfato de amonio y purificada a homogeneidad usando cromatografía de intercambio iónico y cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa. Posteriormente, la globulina recombinante purificada fue plegada *in vitro* por dos métodos: diálisis y dilución rápida. La proteína plegada *in vitro* se caracterizó determinando su capacidad de ensamble por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa y por cromatografía de filtración en gel en condiciones no desnaturantes; e hidrofobicidad superficial mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa

Resultados y discusión. Se optimaron las condiciones de expresión (incubación a 30 °C y 6 h postinducción), lográndose producir a altos niveles (32 mg/L de cultivo) como amarantina soluble en la cepa bacteriana. El análisis del patrón de proteínas en un gel de poliacrilamida desnaturante en una dimensión mostró una banda de 55 kDa que se

acumuló en el extracto proteínico soluble de la bacteria inducida, la cual está ausente en células microbianas control, y comigra con la amarantina nativa de la semilla. Con análisis western blot se obtuvo reacción cruzada tanto con la amarantina nativa y con la recombinante; esta señal no se presentó en células control (con pT7-7 vacío y con pT7-AMAR no inducidas).

Ambos métodos de plegamiento *in vitro* de la amarantina expresada rindieron idénticos resultados. Los anticuerpos policlonales antiamarantina (producidos contra la amarantina de la semilla de amaranto) usados como sondas moleculares, fueron capaces de discriminar la amarantina renaturalizada *in vitro* de la versión que había sido previa y completamente desnaturada y reducida.

También la proteína recombinante exhibió una hidrofobicidad superficial similar a la de la globulina 11S purificada de la semilla. Sin embargo, no se pudo confirmar que la amarantina recombinante presente la secuencia correcta en su amino terminal debido a que quizá se encuentra bloqueado. Los ensayos de autoensamble de la proamarantina plegada *in vitro* indicaron que dicha globulina presenta un estado cuaternario de naturaleza homotrimérica con un coeficiente de sedimentación de 7.8S y con un peso molecular de 155 kDa aproximadamente.

Conclusiones. Se probó la funcionalidad del cDNA de la amarantina en un sistema heterólogo de naturaleza microbiana, y ambas proteínas, recombinante y nativa, mostraron similitudes en sus propiedades electroforéticas, inmunológicas y de hidrofobicidad superficial. La amarantina recombinante se asoció molecularmente entre sí como trímeros de proglobulina, que corresponden a la mitad de la estructura cuaternaria de la globulina 11S nativa. Este tipo de tecnologías permitirá la producción en biorreactores de proteínas de alto valor.

Bibliografía.

1. Paredes-López, O. (1994). *Amaranth- Biology, Chemistry and Technology*. Boca Raton FL, USA: CRC Press LLC.
2. Barba de la Rosa, A.P., Herrera, A., Utsumi, S. y Paredes-López, O. (1996). Molecular characterization, cloning and structural analysis of a cDNA encoding an amaranth globulin. *J. Plant Physiol.* 149(5):527-532.