



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE UNA ISOPEROXIDASA DE NABO Y PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE

Norma Azucena Rodríguez-Cabrera, Blanca E. García-Almendárez, Carlos Regalado. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, PROPAC, Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro, C.U. Cerro de las Campanas s/n, Querétaro, Qro. 76010, México. [carlosr@uaq.mx](mailto:carlosr@uaq.mx)

*Palabras clave: expresión, peroxidasa.*

**Introducción.** Las peroxidasas son oxidoreductasas que catalizan la reacción entre  $H_2O_2$  y varios compuestos reductores. Las peroxidasas de plantas pertenecen a la clase III, y se usan ampliamente en síntesis orgánica, tratamiento de aguas residuales, ensayos quimioluminiscentes e incluso en terapia contra el cáncer (1). El nabo (*Brassica napus*) es una buena fuente de peroxidasas y nuestro grupo ha caracterizado diferentes isoenzimas, algunas de las cuales son capaces de polimerizar compuestos fenólicos de aguas residuales facilitando su remoción, ya sea en forma nativa o modificadas químicamente (2).

El objetivo de este trabajo fue la construcción de un sistema de expresión del gen que codifica para una isoperoxidasa de nabo usando *E. coli* Rosetta, así como su purificación para obtener la proteína recombinante.

**Metodología.** El fragmento que codifica para una isoperoxidasa de nabo (NCBI No. AY423440) se clonó en el vector de expresión bacteriano pET-28a(+), el cual contiene una secuencia que codifica para una cola de histidinas en el extremo amino de la proteína. La proteína de fusión se expresó en *E. coli* Rosetta y se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel inmovilizado (IMAC). Las fracciones eluidas de la columna (0.5 mL) se recolectaron y se graficó su absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) contra el volumen. La pureza de la proteína se analizó mediante SDS-PAGE y se realizó un análisis densitométrico de la proteína purificada (Fig. 1).

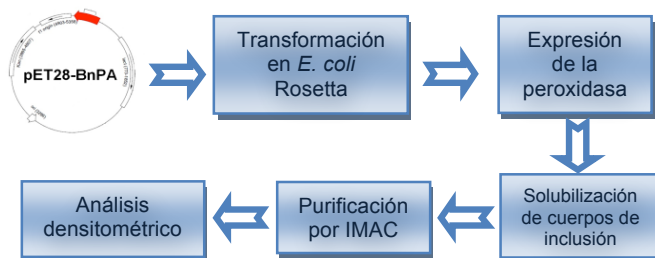


Fig. 1. Estrategia general para la expresión de una isoperoxidasa de nabo recombinante.

**Resultados.** La proteína de fusión se solubilizó de cuerpos de inclusión con urea 8 M (carril 1, Fig 2). La peroxidasa solubilizada se inyectó en una columna de afinidad a níquel y se lavó con quince volúmenes de columna, sin que se observara pérdida de la proteína de interés (carril 2). La elución se observa en diferentes

fracciones (F) siendo las 2 y 3 las más concentradas (Fig 2). En la gráfica de  $A_{280}$  de cada fracción contra el volumen se observa un pico de elución cuyo máximo corresponde a F2 (Fig 3.).

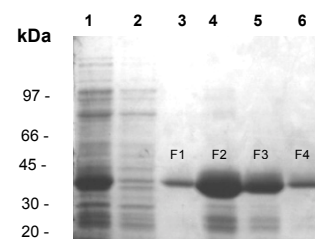


Fig. 2. Perfil electroforético del proceso de purificación de la peroxidasa recombinante. Carriles: 1, cuerpos de inclusión solubilizados; 2, primer lavado de la columna; 3-6, fracciones (F1-F4) eluidas de la columna de afinidad.

El análisis densitométrico de la proteína purificada indicó una pureza del 94% obtenido en un solo paso de purificación y con un rendimiento de 29 mg/L de cultivo. Este valor de rendimiento es 337 veces mayor que el obtenido para la peroxidasa de rábano picante (HRP) recombinante expresada en *E. coli* (3).

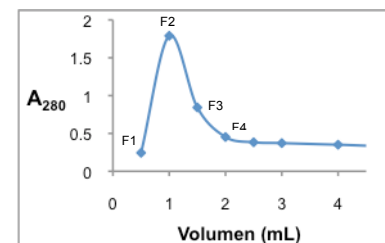


Fig. 3. Gráfica de absorbancia de las fracciones eluidas contra volumen. F1-F4 corresponden a las fracciones del gel de la Fig 2.

**Conclusiones.** Se logró la expresión y purificación de una isoperoxidasa de nabo recombinante mediante IMAC con una pureza aproximada del 94%.

**Agradecimiento.** Se agradece la beca CONACYT 167074 a NARC y el apoyo otorgado por CONCYTEQ.

### Bibliografía.

1. Ngo, T.T (2010). *Anal. Lett.* 43: 1572-1587.
2. Quintanilla-Guerrero F., Duarte-Vázquez MA., García-Almendárez BE., Tinoco R., Vazquez-Duhalt R., Regalado C. (2008). *Bioresource Technol.* 99 (18): 8605-11.
3. Ryan, B.J.; O'Fágáin, C. (2008). *Biochimie.* 90, 1414-1421.