



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## OBTENCIÓN DE LACTOFERRINA BOVINA RECOMBINANTE EN *E. coli*

Isui Abril García Montoya<sup>1</sup>, Sigifredo Arévalo Gallegos<sup>1</sup>, José Salazar Martínez<sup>2</sup>, Jesús Bojorquez<sup>2</sup>, Rocío Infante Ramírez<sup>1</sup>, Quintín Rascón-Cruz<sup>1</sup>. 1. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Químicas. Circuito No 1, Nuevo Campus Universitario. Chih. Chihuahua. C.P. 31125. Tel. (01 614) 236-6000 [grascon@uach.mx](mailto:grascon@uach.mx) 2. Muu-Technologies, Gómez Palacio, Dgo. Mexico

*Palabras clave:* Lactoferrina, clonación, proteína recombinante.

**Introducción.** La lactoferrina (Lf) es una glicoproteína monomérica no hemica de unión a hierro perteneciente a la familia de las transferrinas producida por diversas especies animales mamíferos. Se ha identificado lactoferrina en secreciones de glándulas exocrinas y neutrófilos estando presente en suero y plasma<sup>(1,2)</sup>. Es una proteína de 80 kDa, tiene 700 aminoácidos siendo similar entre especies. Está formada por dos lóbulos (N y C). El lóbulo N contiene los aminoácidos del 1-332 y el lóbulo C está formado por los aminoácidos 334-703<sup>(3)</sup>. La lactoferrina es reconocida como una proteína multifuncional con aplicaciones biológicas, farmacológicas y nutracéuticas por lo que es de gran interés industrial<sup>(4)</sup>.

**Metodología.** A partir de tejido de ubre bovino de la raza Holstein se realizó una extracción de RNA total y mediante RT-PCR se obtuvo el cDNA de bLf. Se realizaron 2 estrategias de clonación, la primera clonación se realizó en el vector pCR2TOPO, y se llevó a cabo una subclonación en *E. coli* como sistema de expresión. Se llevó a cabo una caracterización con las enzimas de restricción EcoRV y Sac I. La expresión de la rbLf se llevó a cabo mediante el uso de IPTG. Para proceder al análisis de la expresión de mRNA mediante ensayos de Northern Blot, así como la identificación de la proteína mediante análisis de SDS-PAGE, Western Blot y dot Blot con anticuerpos específicos, finalmente se llevó a cabo la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a Níquel utilizando el sistema de Probond (Invitrogen). Se realizaron ensayos de zona de inhibición para corroborar su actividad antimicrobiana con diferentes bacterias gram positivas y gram negativas.

**Resultados.** A partir de tejido de ubre bovino raza Holstein se obtuvo el cDNA que codifica para la lactoferrina bovina (bLf). Se clonó el cDNA de bLf en el vector pCR2.1TOPO obteniendo los plásmidos pCRbLf53 y pCRbLf35. La secuencia del gen clonado fue caracterizada *in silico* y registrada en la base de datos del NCBI con el número de acceso EU812318. La expresión de la bLf fue posible mediante su fusión con la tiorredoxina en el vector de expresión pET-32a e introducido en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) produciendo el plásmido pET32bLf-2\*1. A partir de las clonas obtenidas que contenían el vector de expresión de la bLf se comprobó la expresión de la proteína bLf-Trx por

medio de un SDS-PAGE al 12% observando una proteína que corresponde al peso esperado de 96 kDa, para la realización del Western blot se llevó a cabo una transferencia de 12 horas pudiendo observar detección con el anticuerpo pudiendo así seleccionar las clonas que expresan la rbLf-Trx y el ensayo por dot blot con anticuerpo anti-Lf se pudo observar que se encuentra presente en forma insoluble. Se analizó con un Northern blot la presencia de mRNA pudiendo observar el tamaño esperado de 2500 pb. La proteína de fusión bLf-Trx expresada fue purificada del resto de las proteínas de *E. coli* por cromatografía de afinidad a Níquel, recuperándola con 99% de pureza. Durante el análisis de la expresión se determinó que la bLf-Trx es expresada en *E. coli* logrando tener 19% de bLf-Trx del total de las proteínas a las 4 horas después de la inducción.

**Conclusiones.** Mediante RT-PCR fue posible clonar el gen de la lactoferrina bovina con un tamaño de 2200 pb. Con la subclonación en el vector de expresión pET32a se obtuvo la construcción de plásmidos que contienen el gen bLf y fue introducido en la cepa de *E. coli* BL21(DE3). Se cuenta con 3 clonas que expresan lactoferrina bovina. El análisis de los mRNA se puede observar que su presencia difiere en cada una de las construcciones y que hay mayor acumulación de mRNA a las 4 horas de inducción independiente de la clona a estudiar.

Se puede afirmar que hay expresión de lactoferrina bovina recombinante y que de forma preliminar se encuentra mayormente como proteína no soluble. Se espera continuar con esta caracterización y encontrar las condiciones óptimas de expresión, al igual que realizar pruebas antibacterianas.

**Agradecimiento.** A la empresa Muu-Tecnologies por su apoyo financiero. A CONACYT por su beca para el desarrollo de estudio posgrado. A la UACH por su apoyo y financiamiento.

### Bibliografía.

1. Drago M.E. (2007) *Rev. Mex. De Ciencias Farmacológicas*. 38:30-38.
2. Adlerova L., Bartoskava A., Faldyna M. (2008) *Veterinari Medicina*. 53:457-468.
3. González-Chávez S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. (2009) *IJAA*. 33:301e1-301e8.
4. Brock J.H. (2002) *Biochem. Cell Biol.* 80:1-6