

## EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE DIFERENTES FRAGMENTOS DE LA ALBÚMINA 2S DE SOYA

Javier David Vega Arroy, Ramón Maldonado Torres, Silvia Luna Suárez, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Instituto Politécnico Nacional, Tepetitla, Tlaxcala C.P. 90700, silvials2004@yahoo.com.mx

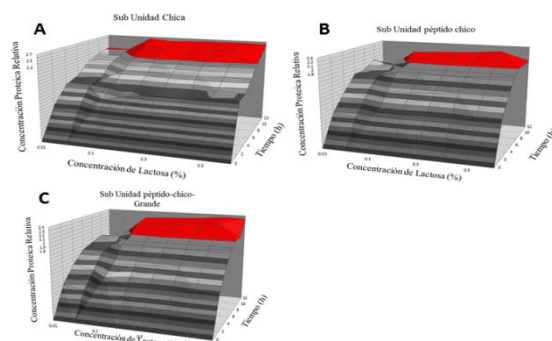
*Palabras clave: Lunasina, SDS-PAGE, Cromatografía*

**Introducción.** La Biotecnología ocupa un lugar primordial en la producción de proteínas recombinantes; gracias a las técnicas de ADN recombinante, con el objetivo de producir sustancias destinadas al diagnóstico, prevención y/o tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas. La albumina 2S de soja es una proteína constituida por 158 aminoácidos, y está formada por: un péptido señal, una sub unidad chica (péptido Lunasina) y una sub unidad grande. Se ha reportado que la sub unidad chica tienen propiedades anticancerígenas [1].

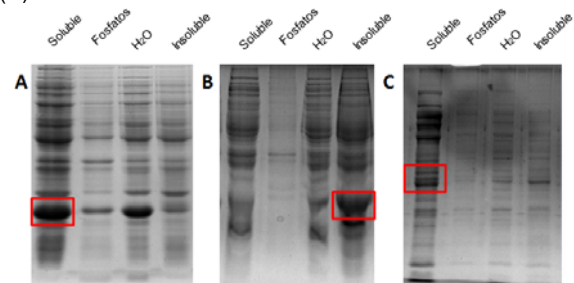
El objetivo del presente trabajo se enfoca en la expresión y purificación de la Albumina 2S de soja (pep-ch-Gde) y de sus subunidades; la sub unidad chica (sub-ch) y el péptido señal unido a la sub-ch (pep-ch).

**Metodología.** Se utilizaron los cDNAs de la albumina 2S y sus subunidades clonados en el plásmido pET32b+, con los cuales se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 Codonplus de acuerdo con los protocolos estándar [2]. En una primera etapa se realizaron cinéticas durante 12 horas en medio de cultivo LB y se recolectaron muestras cada 2 horas para posteriormente analizar a expresión proteica mediante electroforesis SDS-PAGE, la inducción se realizó con lactosa (0.01, 0.1, 0.3 y 0.5%). La purificación se obtuvo mediante cromatografía de intercambio iónico (CII) y cromatografía de afinidad a níquel (CAN). La identidad de los tres péptidos se corroboró por western blot y el porcentaje de pureza alcanzado se evaluó mediante SDS-PAGE.

**Resultados.** Durante las cinéticas de crecimiento se observó que la expresión proteica no se ve afectada por la concentración de lactosa como inductor cuando se utilizó 0.1, 0.3 y 0.5%; sin embargo, la expresión de las proteínas recombinantes se vio afectada cuando se utilizó 0.01% de lactosa como inductor, **figura 1**. Los resultados mostraron que sub-ch y pep-ch-Gde se encontraron en la fracción soluble mientras que el pep-ch se extrajo mayormente en la fracción insoluble **figura 2**. La proteína sub-ch fue purificada usando una combinación de dos tipos de cromatografía en columna: intercambio iónico y afinidad a níquel logrando un porcentaje de pureza del 93%. Las proteínas pep-ch-Gde y pep-ch fueron purificadas usando como método de purificación solamente CAN obteniendo una pureza del 88% y 90.3% respectivamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA. ( $\alpha=0.5$ )



**Fig. 1.** Expresión proteica a diferentes condiciones tiempo/concentración de inductor de la sub-ch (A), pép-ch (B) y pép-ch-Gde (C).



**Fig. 2.** Análisis SDS-PAGE de la sub-ch (A), pép-ch (B) y pép-ch-Gde (C).

**Conclusiones.** No hubo efecto estadístico significativo sobre la concentración de lactosa como inductor sobre la variable de respuesta cuando se indujo con 0.1%, 0.3% y 0.5%, obteniendo una buena expresión proteica. Sin embargo, cuando se utilizó 0.01% de lactosa como inductor la expresión proteica es menor. La sub-ch alcanzan un porcentaje de pureza mayor al resto (>90%) combinando métodos cromatográficos (intercambio iónico & afinidad).

**Agradecimientos.** Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

### Bibliografía.

- 1 De Lumen, B. O. (2005). Lunasin: a cancer-preventive soy peptide. *Nutrition reviews*, 63(1), 16-21.
2. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.