



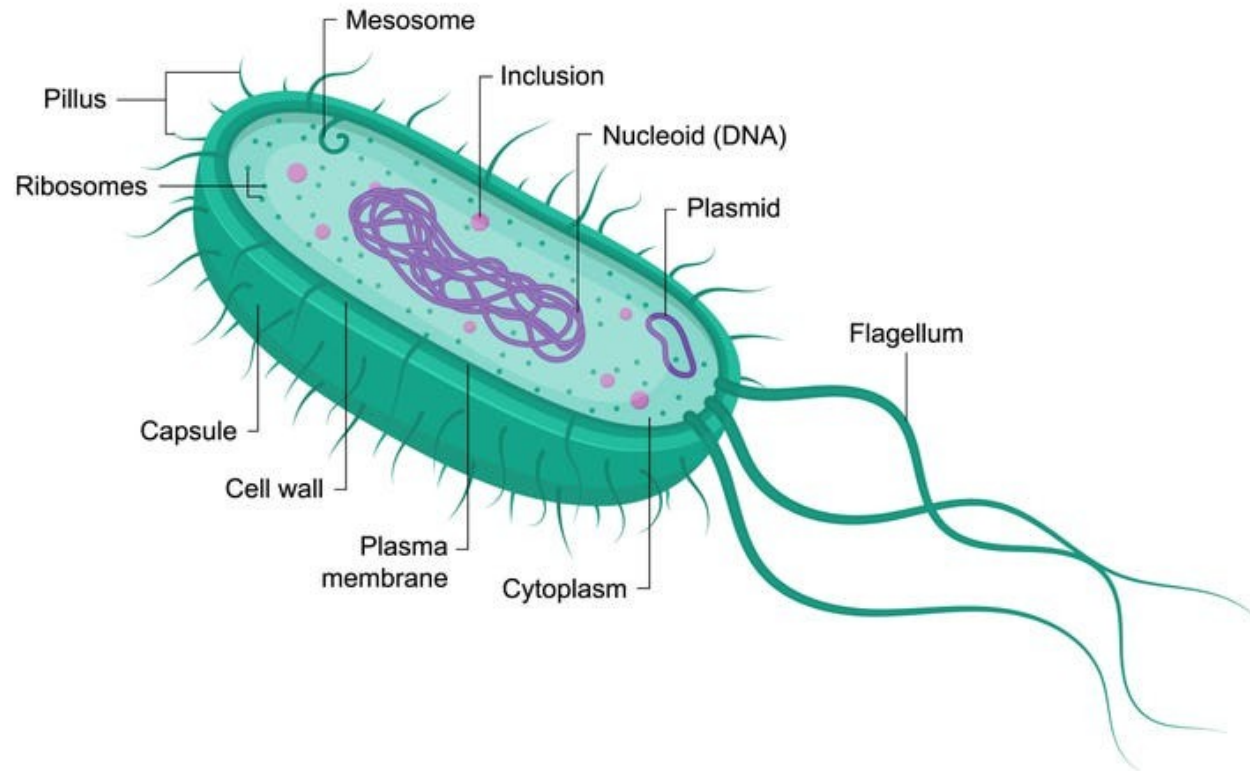
SOBREEXPRESIÓN DE UNA ENZIMA RECOMBINANTE

MSc Carlos Montejo Dávila

PROPÓSITOS

- Aprender método general de sobreexpresión de enzima recombinante (inductor).
- Aprender estrategia metodológica para extraer fracciones proteicas de cultivo bacteriano.
- Determinar la actividad de la enzima recombinante (parametros cinéticos)

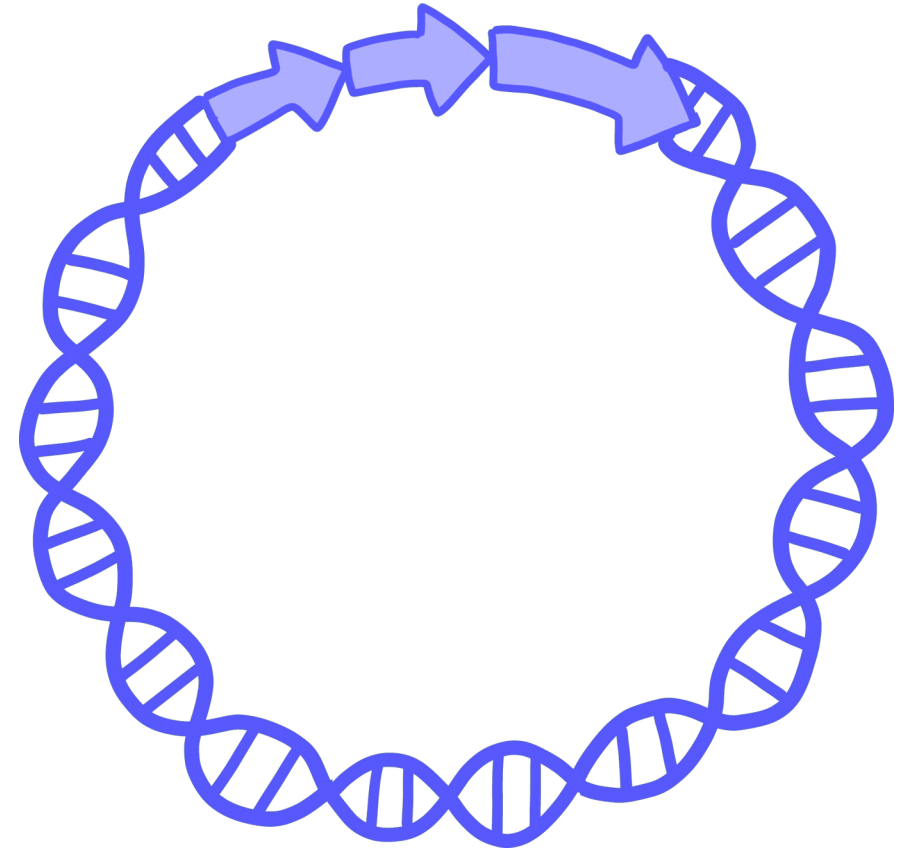
BACTERIAL CELL



Las bacterias poseen mecanismos naturales para intercambiar información genética, lo que favorece la rápida adquisición de ventajas evolutivas como la resistencia a antibióticos.

PLÁSMIDO

Moléculas pequeñas de ADN circular, independientes del cromosoma bacteriano, que se replican de manera autónoma y pueden transferirse entre bacterias



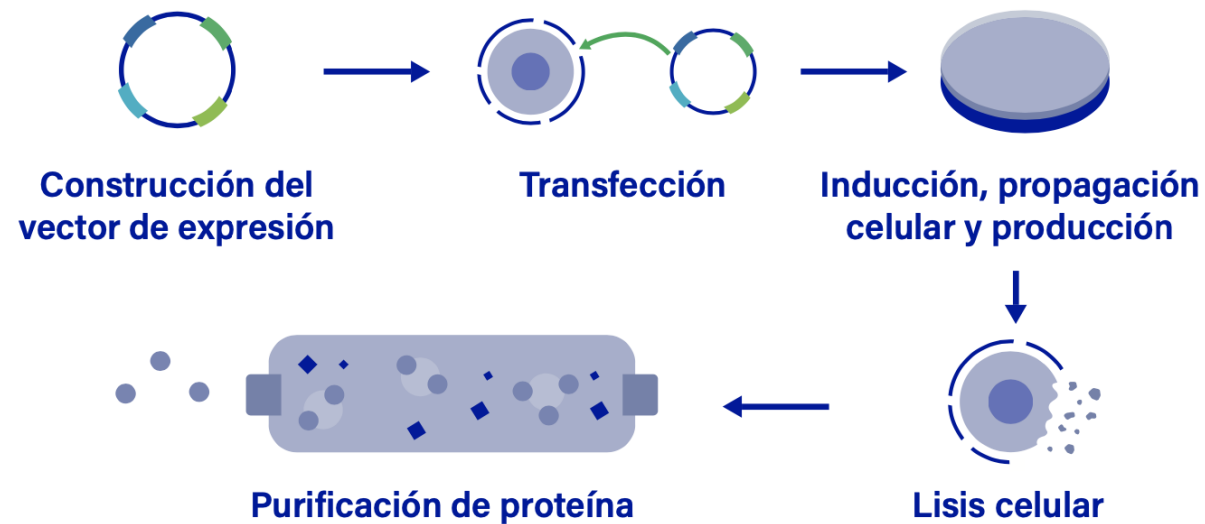
FUNCIONES DE LOS GENES EN PLÁSMIDOS

Resistencia a antibióticos: Algunos plásmidos contienen genes que confieren resistencia a antibióticos.

Degradación de sustancias tóxicas: Otros plásmidos pueden contener genes que permiten a las bacterias degradar sustancias tóxicas.

Virulencia: Algunos plásmidos pueden contener genes que aumentan la virulencia de las bacterias.

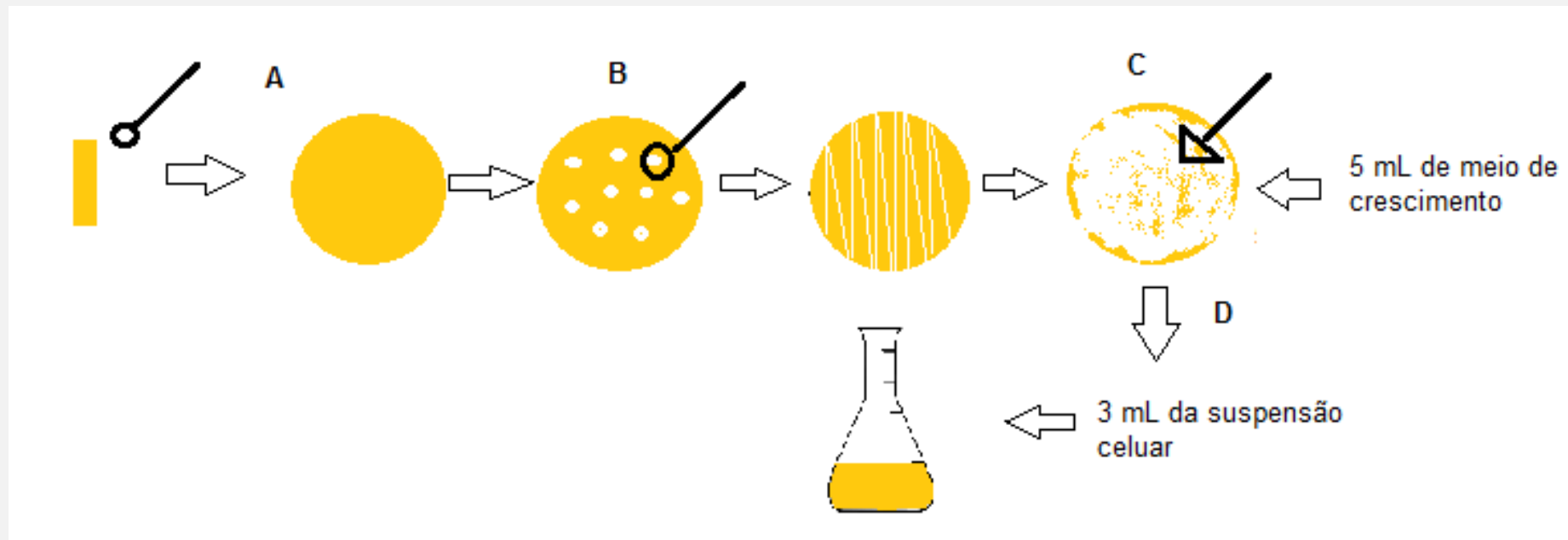
INTRODUCCIÓN



- La obtención de enzimas recombinantes ofrece ventajas sobre fuentes naturales: sobreexpresión controlada e ingeniería genética para facilitar detección, extracción, purificación y caracterización.

IMPORTANCIA

- Vectores: Los plásmidos se utilizan como vectores para introducir fragmentos de ADN en bacterias, facilitando la clonación y expresión de genes.
- Manipulación de genes: Permiten la manipulación y estudio de genes, así como la producción de ADN plasmídico



SOBRE-EXPRESIÓN DE LA ENZIMA RECOMBINANTE

- Preparar un día antes de la práctica un preinóculo de 10 mL (para todo el grupo) de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3) en LB líquido con kanamicina (30 $\mu\text{g/mL}$), de una clona transformada con el vector pET28b-EcLDH, en tubo de 50 mL.

- Incubar toda la noche a 37 °C con agitación a 225 rpm.



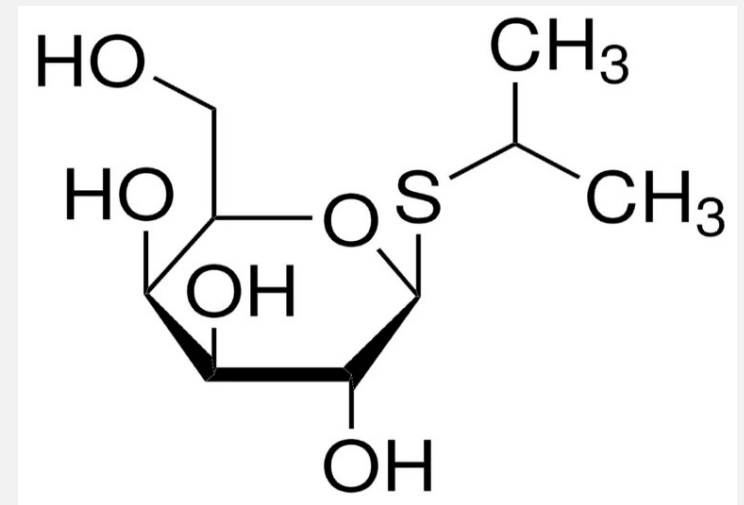
A la mañana siguiente escalar 500 μ L de cultivo en 15 mL de cultivo LB-kanamicina estéril y fresco.



- Incubar a 37 °C con agitación a 225 rpm por un período de 2 horas o hasta que se alcance una densidad óptica a 600 nm de 0.5.



- Agregar al cultivo IPTG a una concentración final de 100 μM , 1.5 μL al cultivo de 15 mL.
- El IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) es un compuesto químico que se utiliza en biología molecular. Se usa para inducir la expresión de proteínas recombinantes en E. coli





Incubar a 37 °C con agitación a 225 rpm por un período de 4 horas, el cultivo resultante después de esta incubación, es el que se usará el día y hora de la práctica.



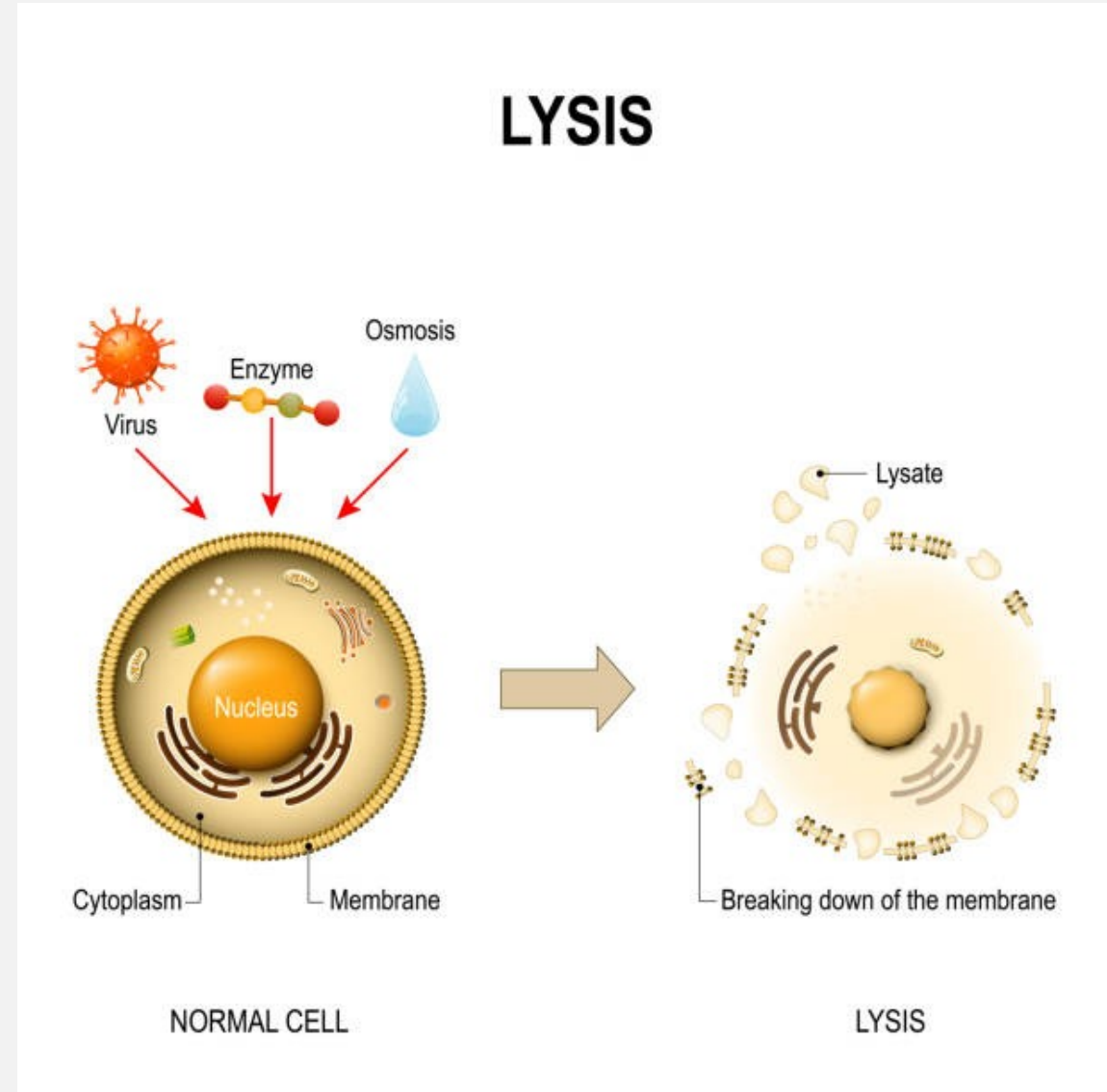
Colocar otro tubo en el que no se le agrega IPTG, para comparar con el tubo en donde sí se sobreexpresa la enzima.

COSECHA Y LISIS DE LAS CÉLULAS

Parecido a la extracción de proteína total soluble que hemos hecho en las prácticas anteriores en donde usamos matrices vegetales

Centrifugar a 6,000 rpm por 15 minutos los tubos que contienen los 15 mL de cultivo de la actividad anterior (con IPTG y sin IPTG).

Retirar el sobrenadante sobre un vaso de precipitados conteniendo una solución de hipoclorito de sodio al 4 %, para eliminar las bacterias que quedan en este.



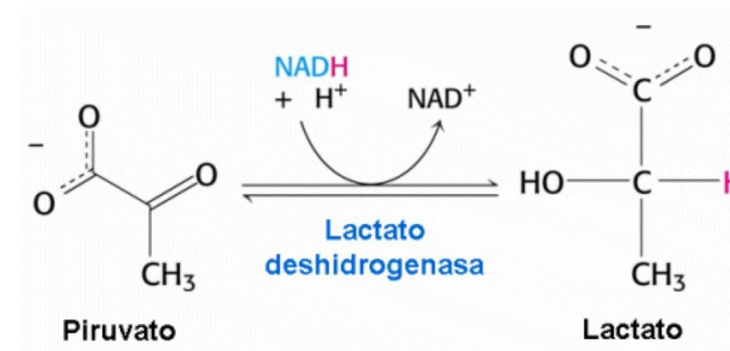
- Resuspender el precipitado (células) en 500 μ L de PBS.
- Agregar 0.5 mg de lisozima a la suspensión celular e incubar el tubo en hielo por 15 minutos, con agitación.
- Sonicar la suspensión celular 1 minuto a máxima potencia. Centrifugar a 10,000 rpm por 25 minutos.
- Recuperar el sobrenadante en tubos limpios y rotulados como extracto soluble libre de células.
- Reservar en hielera hasta su uso en la siguiente actividad.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA LACTATO DESHIDROGENASA Y PARAMETROS CINÉTICOS

- Determinar la actividad de dicha enzima como se ha realizado en protocolos anteriores y obtener parametros cineticos como la V_0 , K_m y V_{max}

GENERALIDAD DEL LDH

La lactato deshidrogenasa es una enzima intracelular que cataliza la interconversión del lactato y piruvato, usando la coenzima NAD^+ .



Enzima tipo : **OXIDOREDUCTASA**

¿QUÉ ES EL LDH ?

El lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima distribuida por todo el cuerpo humano , las mayores concentraciones se encuentran en :



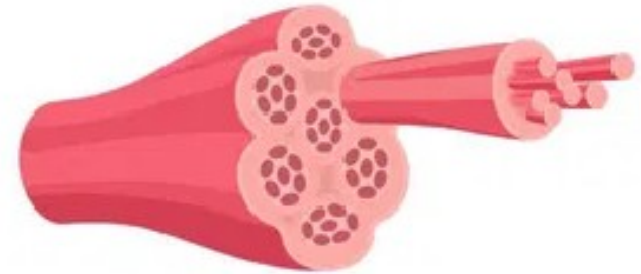
riñón



Hígado



Corazón



**musculo
esqueletico**

ACTIVIDAD

Hacer un mapa mental a mano de los conceptos clave de la sobreexpresión de una enzima recombinante

Qué es un plásmido

Importancia de la expresión de proteínas recombinantes

Importancia de kanamicina en la correcta expresión de plásmido de interés

Inductor de proteínas recombinantes

Lisis celular bacteriana

LDH y su importancia biológica

pasos previos a la expresión de una proteína recombinante, desde el diseño del constructo hasta la transformación y selección de colonias.

