

Expresión del ADN recombinante

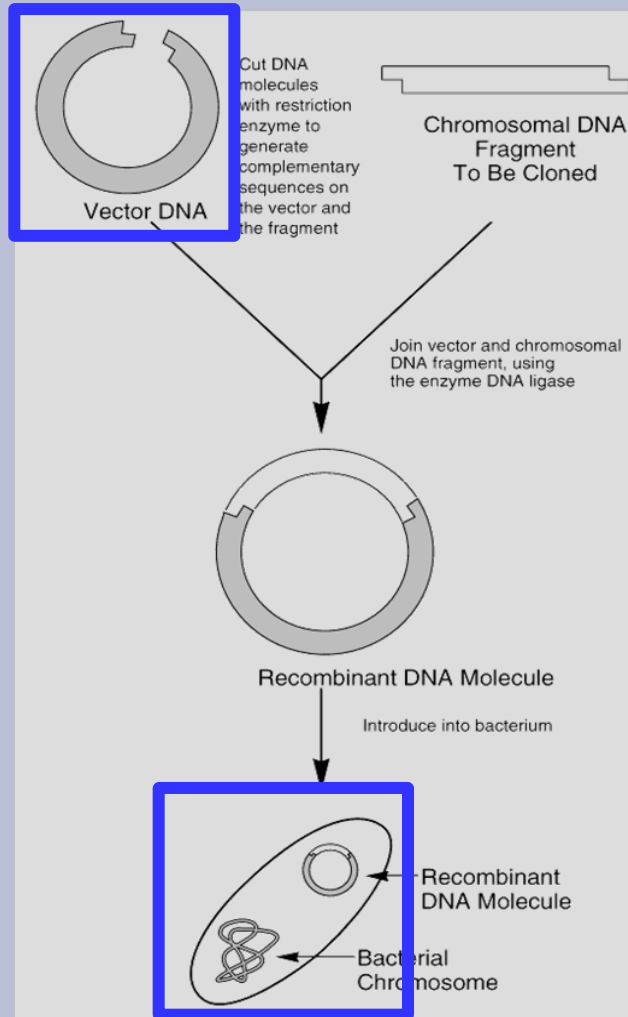
Biología Molecular

Facultad de Ciencias Bioquímicas y
Farmacéuticas - UNR

Lic. Darío Paladini

2026

Tecnología del ADN recombinante



Construcción del ADN recombinante

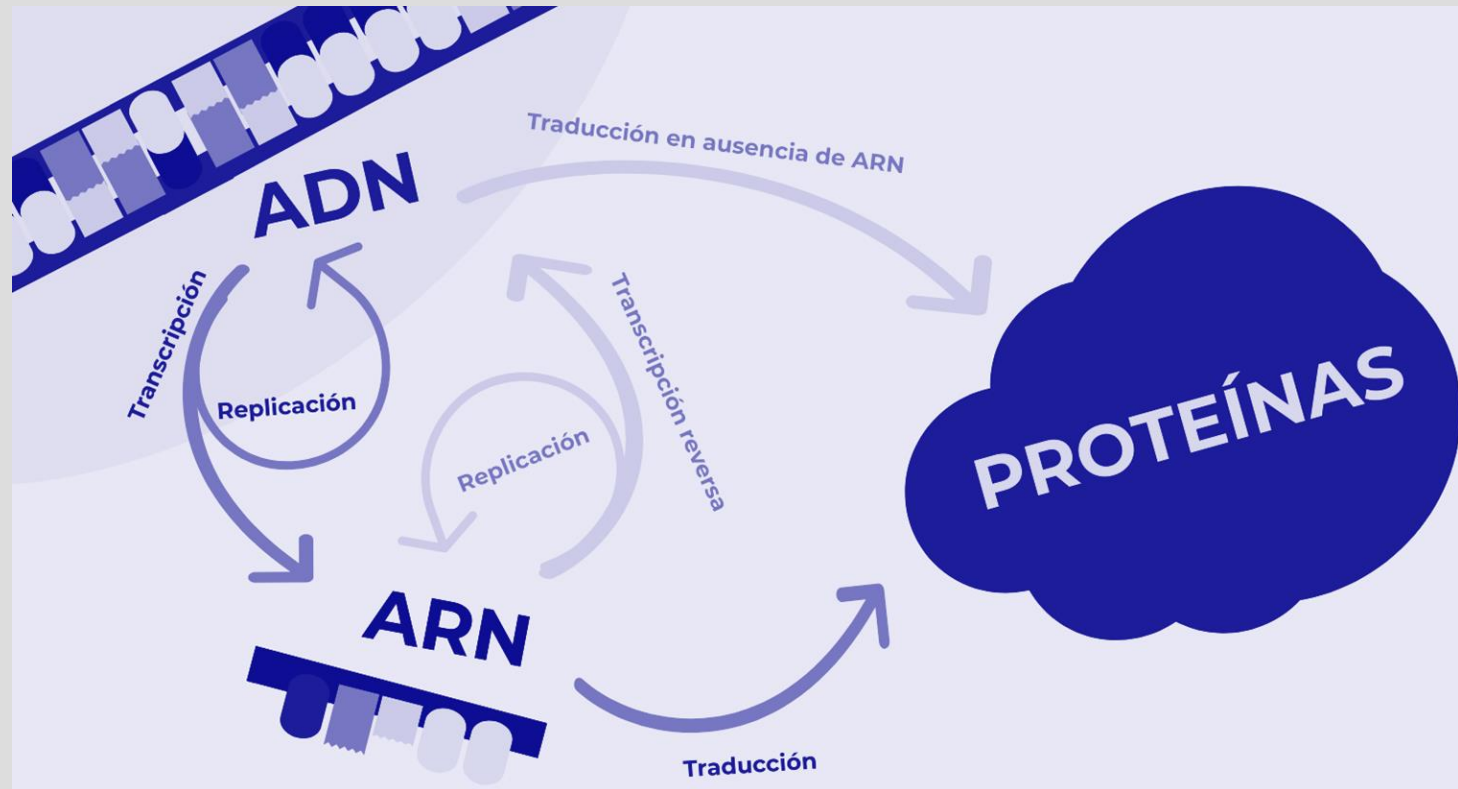
Vector - hospedador

Introducción de ADN recombinante en hospedadores

Expresión del ADN recombinante

Productos:

- Transcritos.
- Proteínas.



Expresión del ADN recombinante

Para qué?

- Estudiar efectos del producto en el hospedador.
- Localizar subcelularmente el producto en el hospedador.
- Estudiar de promotores y elementos regulatorios. Genes reporteros
- Producir proteínas a baja y mediana escala (estudios *in vitro*, cristalografía, espectroscopía, producción de anticuerpos, etc).
- Producir proteínas a gran escala (comercialización).
- Etc.

Expresión del ADN recombinante

Hospedadores:

- Para almacenamiento del ADN recombinante.

Mantienen ADN estable

Cepa	genotipo
DH5α	F ⁻ φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>
JM109	<i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi</i> <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>relA1</i> <i>supE44</i> λ- Δ(<i>lac-proAB</i>), [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI</i> ^q ΔM15]

- Para expresión.

Favorecen niveles de expresión alto (ej: BL21) o requerimientos especiales del sistema de expresión, del producto o del objetivo de la expresión

Cepa	genotipo
BL21	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i>
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)

Expresión del ADN recombinante

Pasos a seguir cuando el objetivo es producir una proteína purificada

- Elección de la secuencia a clonar.
- Elección del vector y hospedador adecuados.
- Elección de las condiciones de expresión de la proteína de interés.
- Preparación de extractos y clarificación.
- Esquema de purificación.
- Almacenamiento de la proteína purificada.

Sistemas de expresión

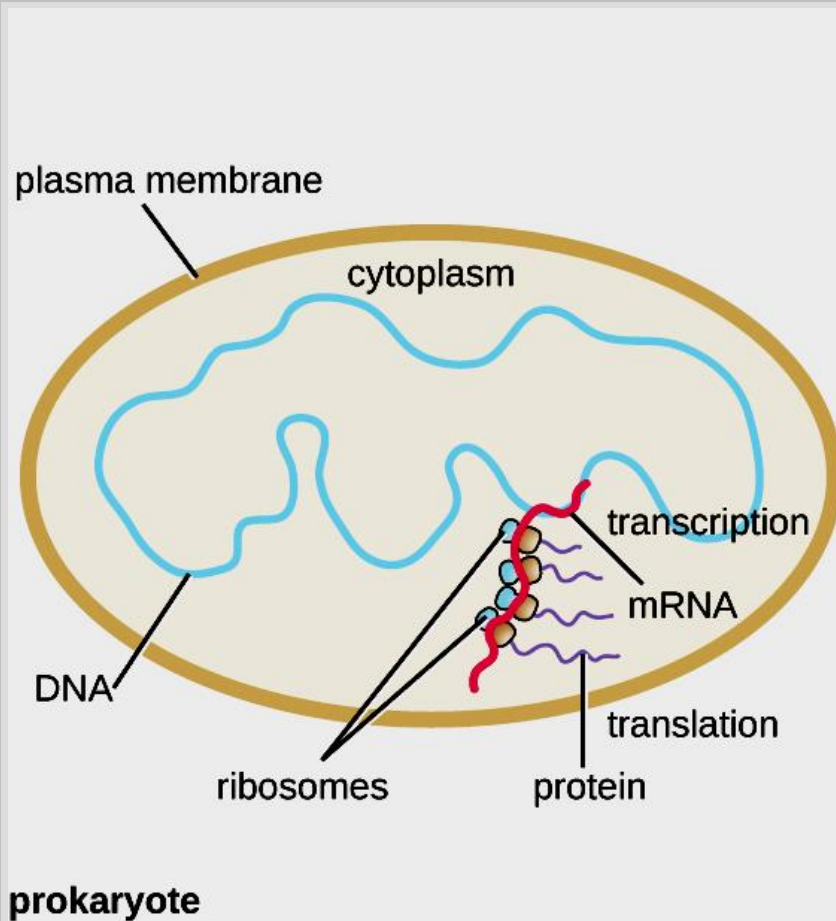
Procariotas

- ***Escherichia coli*.** Simple, barato y veloz. Muchos vectores y cepas comerciales.
- **Bacterias lácticas:** *Bacillus*. Ej: Inmunización oral

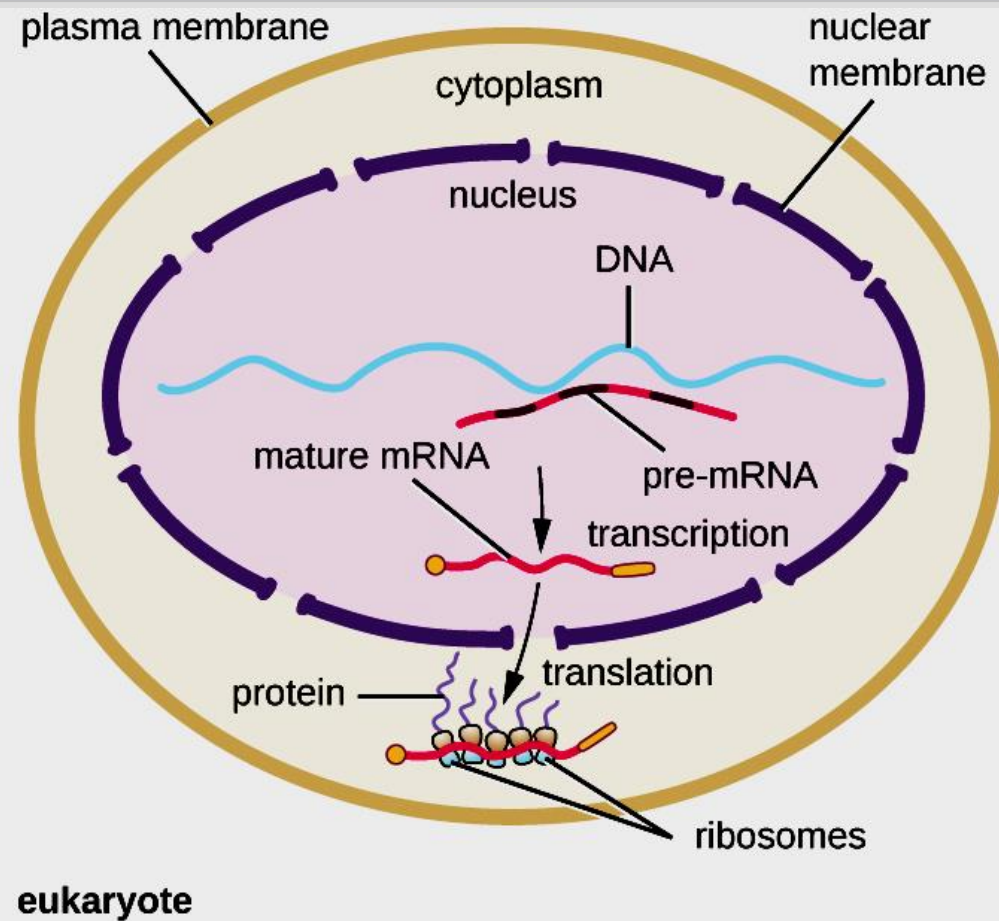
Eucariotas

- **Levaduras:** *Saccharomyces cerevisiae*.
- **Células de insecto:** Modificaciones post-traduccionales más complejas, mejor plegado.
- **Células de mamíferos:** Cultivo con muchos requerimientos.
- **Animales y plantas transgénicos.** Ej. Producción de proteínas en leche. Altamente costoso.

Expresión de proteínas



(a)



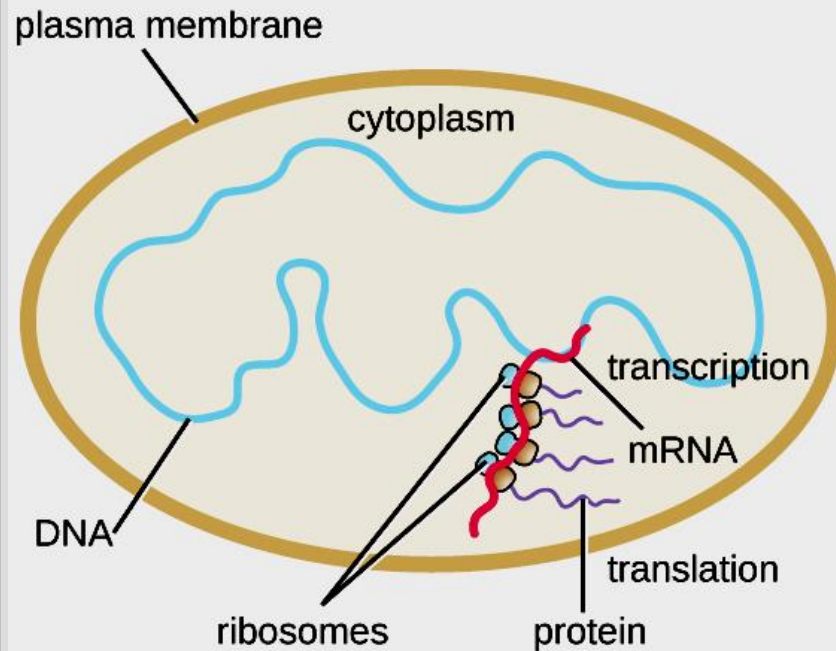
(b)

Elección del sistema

- **Tamaño:** las proteínas citoplasmáticas pequeñas (<100 aas.) y péptidos se expresan mejor en *E. coli* y como proteínas de fusión. Las >100 aas. son problemáticas en cualquier sistema. En *E. coli* suelen ser inestables y formar cuerpos de inclusión insolubles.
- **Cantidad:** Si se necesita mucha cantidad conviene explorar varias combinaciones de vector, hospedador, condiciones de inducción y esquema de purificación.
- **Actividad:**
 - **No requerida** (ej. producción anticuerpos): sirven los cuerpos de inclusión o las fusiones para purificación por afinidad.
 - **Requerida:** es importante mantener la actividad o re-establecerla; la facilidad de la purificación se vuelve secundaria.
- **Estudios estructurales:** Es mejor expresarla como proteína soluble (minimizar el mal plegamiento y la desnaturalización *in vitro*).

Characteristics	<i>E. coli</i>	Yeast	Insect cells	Mammalian cells
Cell growth	rapid (30 min)	rapid (90 min)	slow (18-24 h)	slow (24 h)
Complexity of growth medium	minimum	minimum	complex	complex
Cost of growth medium	low	low	high	high
Expression level	high	low - high	low - high	low - moderate
Extracellular expression	secretion to periplasm	secretion to medium	secretion to medium	secretion to medium
<i>Posttranslational modifications</i>				
Protein folding	refolding usually required	refolding may be required	proper folding	proper folding
N-linked glycosylation	none	high mannose	simple, no sialic acid	complex
O-linked glycosylation	no	yes	yes	yes
Phosphorylation	no	yes	yes	yes
Acetylation	no	yes	yes	yes
Acylation	no	yes	yes	yes
gamma-Carboxylation	no	no	no	yes

Expresión en *Escherichia coli*



prokaryote

Escherichia coli

No hay procesamiento de transcritos como capping, poliadenilación y splicing

Pocas modificaciones postraduccionales

Expresión en *Escherichia coli*

Gen recombinante de expresión.

Ej: pET-32a + *GSL1*

T7 promoter → lac operator Xba I rbs
 --- T AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA ATT GTG AGC GGA TAA CAA TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT

Trx tag Msc I His tag
 ATA CAT ATG AGC ... 315bp ... CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT CAT TCT TCT GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT
 M S ... 105aa ... L A G S G S G H M H H H H H S S G L V P R G S
thrombin site

S tag Bgl II Kpn I
 GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT GCT AAA TTC GAA CGC CAG CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC GAC GAC AAG
 G M K E T A A A K F E R Q H M D S P D L G T D D D D K
enterokinase site

ttc-GSL1-gaa

En fase con ATG

Nco I EcoRV BamHI EcoRI Sac I Sal I Hind III Not I Xho I His tag
 GCC ATG GCT GAT ATC GGA TCC GAA TTC GAG CTC CGT CGA CAA GCT TGC GGC CGC ACT CGA GCA CCA CCA CCA CCA CCA CTG AGA TCC GGC TGC TAA
 A M A D I G S E F E L R R Q A C G R T R A P P P P P L R S G C Stop

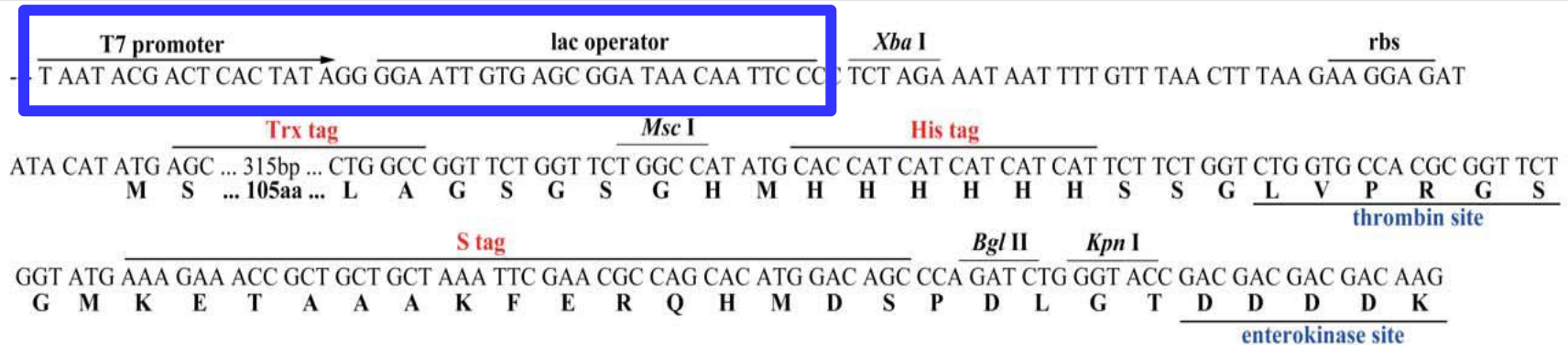
Blp I T7 terminator
 CAA AGC CC GAA AGG AAG CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAC TAG CAT AAC CCC TTG GGG CCT CTA AAC GGG TCT TGA GGG GTT TTT TG ---

Expresión en *Escherichia coli*

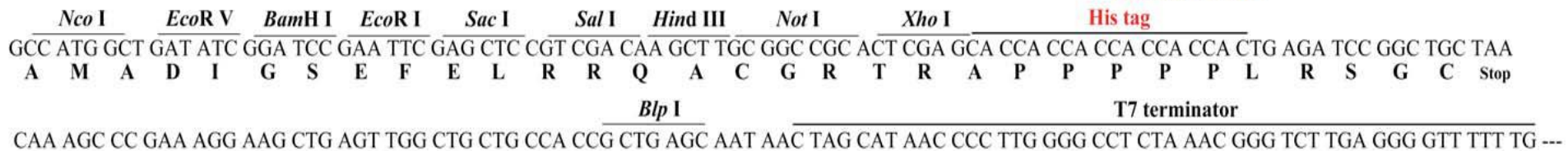
Transcripción

Inicio y frecuencia de transcripción: Promotor y secuencias reguladoras

Ej: pET-32a + *GSL1*



ttc-GSL1-gaa



Expresión en *Escherichia coli*

Transcripción

Terminación de la transcripción: terminadores

Ej: pET-32a + *GSL1*

T7 promoter → lac operator Xba I rbs
 --- T AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA ATT GTG AGC GGA TAA CAA TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT

Trx tag Msc I His tag
 ATA CAT ATG AGC ... 315bp ... CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT CAT TCT TCT GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT
 M S ... 105aa ... L A G S G S G H M H H H H H S S G L V P R G S
 thrombin site
S tag Bgl II Kpn I
 GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT GCT AAA TTC GAA CGC CAG CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC GAC GAC AAG
 G M K E T A A A K F E R Q H M D S P D L G T D D D D K
 enterokinase site

ttc-GSL1-gaa

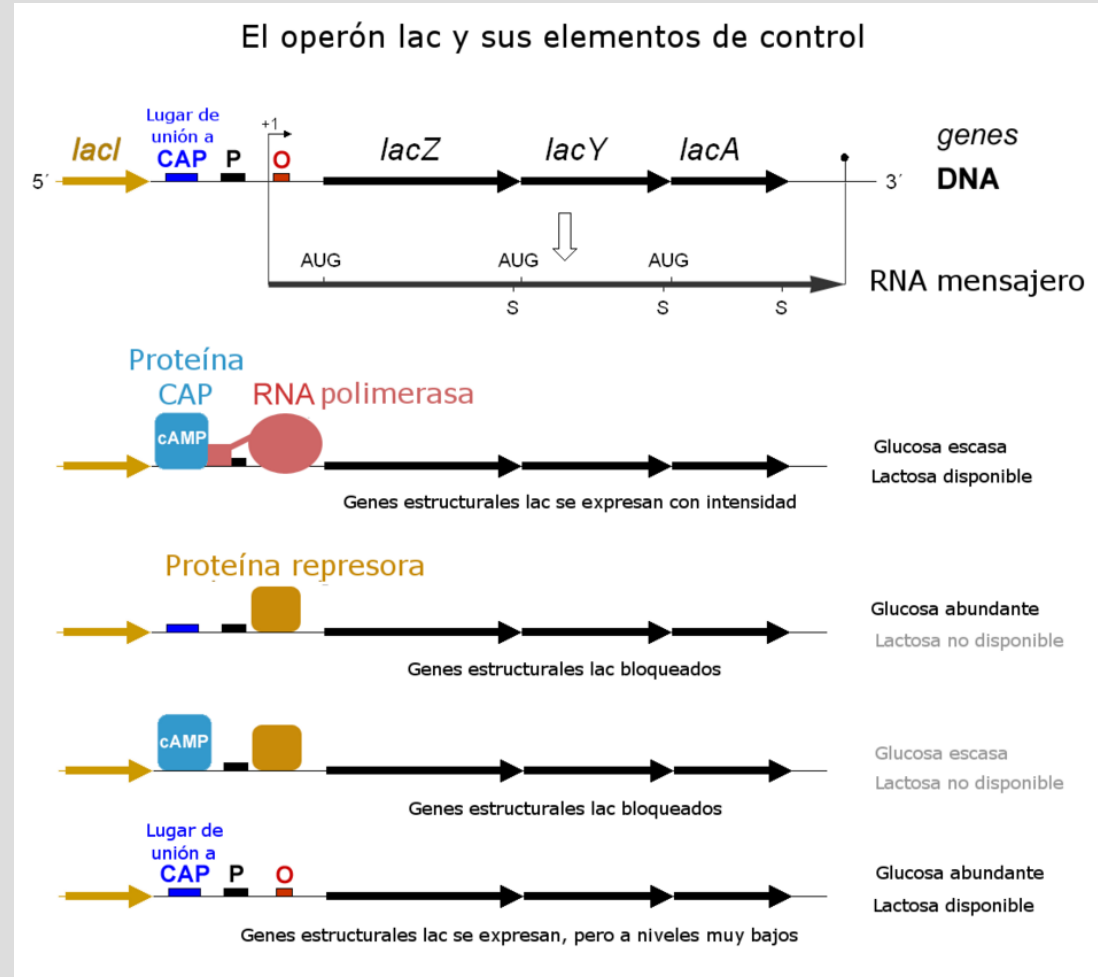
Nco I EcoRV BamHI EcoRI Sac I Sal I Hind III Not I Xho I His tag
 GCC ATG GCT GAT ATC GGA TCC GAA TTC GAG CTC CGT CGA CAA GCT TGC GGC CGC ACT CGA GCA CCA CCA CCA CCA CCA CTG AGA TCC GGC TGC TAA
 A M A D I G S E F E L R R Q A C G R T R A P P P P P L R S G C Stop

Blp I T7 terminator
 CAA AGC CC GAA AGG AAG CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT A C TAG CAT AAC CCC TTG GGG CCT CTA AAC GGG TCT TGA GGG GTT TTT TG -

Expresión en *Escherichia coli*

Promotores

- Fuerza.
- Regulación (inductores, transcripción en ausencia de inductor (leaky)).



Expresión en *Escherichia coli*

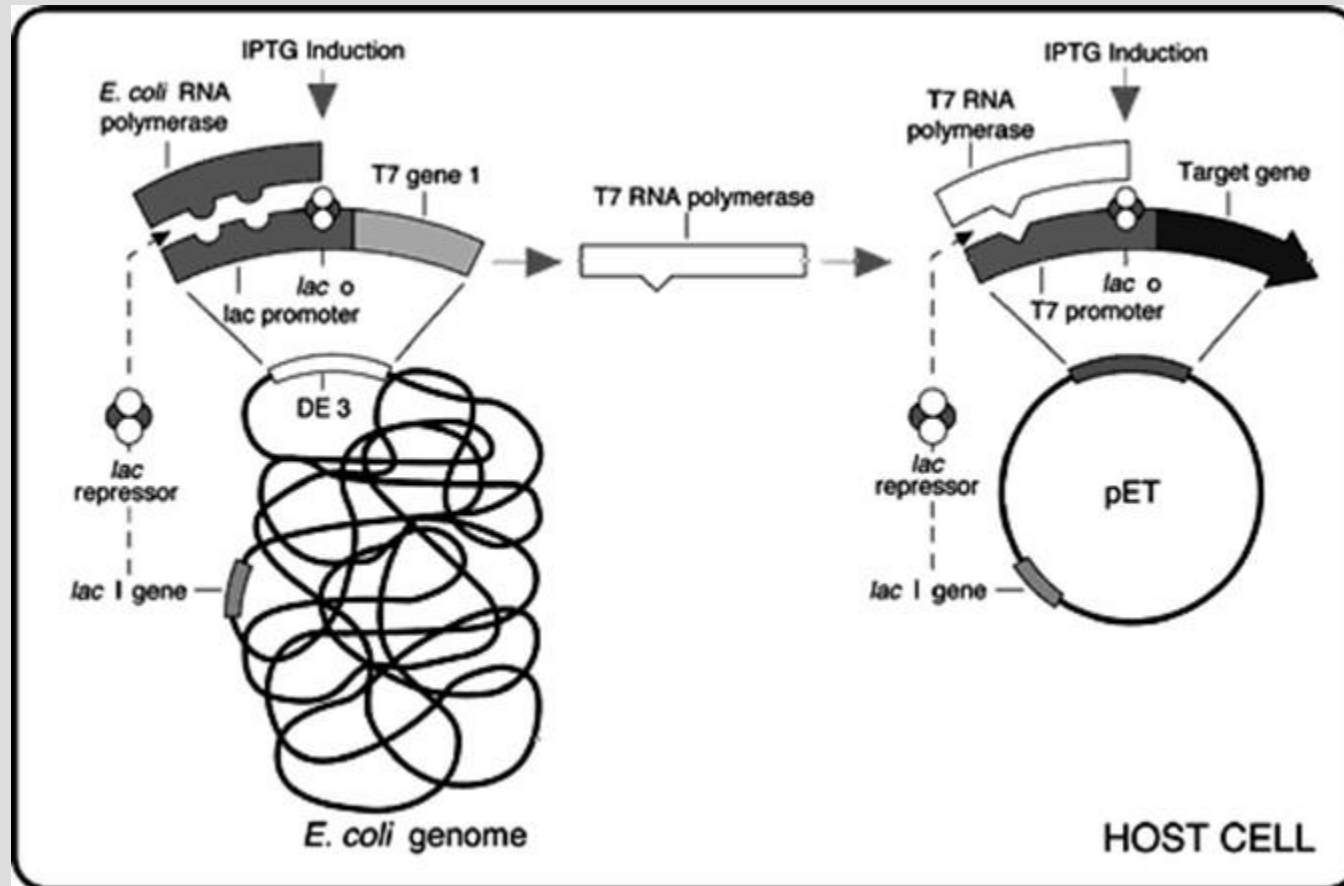
Promotor	Regulación	Observaciones	Ej . de vectores
lac (lacUV5)	lacO/LacI Inductores: IPTG, lactosa	No muy fuerte, pero si el nº de copia es alto se logran expresiones considerables. Presente en vectores de selección blancas/azules	pUC pTZ pSK pBluescript pGEM
tac y trc	lacO/LacI Inductores: IPTG, lactosa	Fuerte. Fusión entre regiones de los promotores trp y lac.	pTrcHis-TOPO pGEX

Expresión en *Escherichia coli*

Promotor	Regulación	Observaciones	Ej . de vectores
T5 lacO	lacO/LacI Inductores: IPTG, lactosa	Promotor fuerte. Por sí mismo es constitutivo pero la presencia de lacO permite su regulación por IPTG y lactosa	pQE
T7 (T7 lacO)	T7ARNpol (T7ARNpolT7/lacO/LacI) Inductores: IPTG, lactosa	Requiere T7ARNpol, esta es muy activa y específica de los promotores T7. Uso de cepas que expresan ARNpolT7 bajo el promotor lac (ej. BL21(DE3))	pET

Expresión en *Escherichia coli*

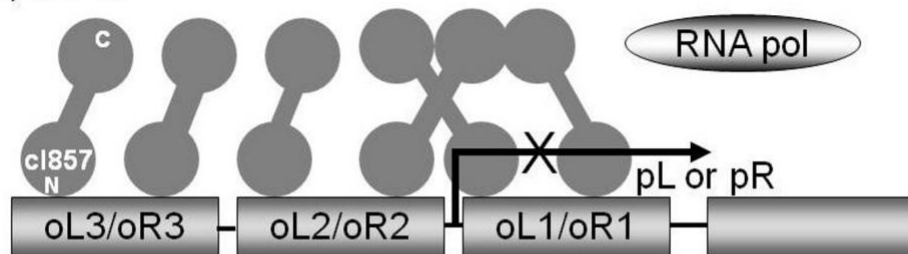
Sistema BL21(DE3)/pET



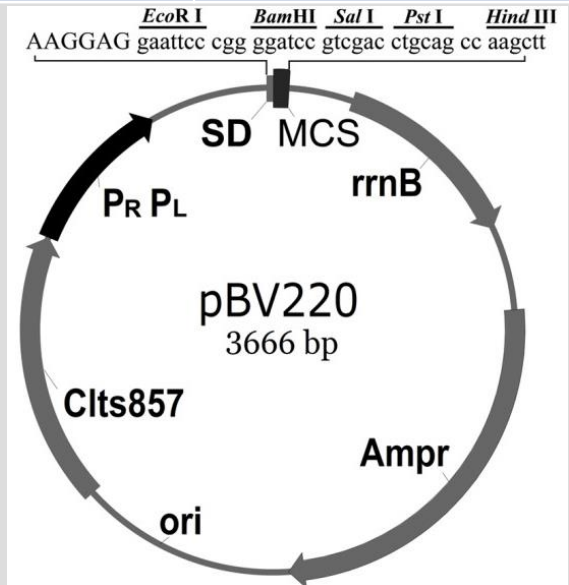
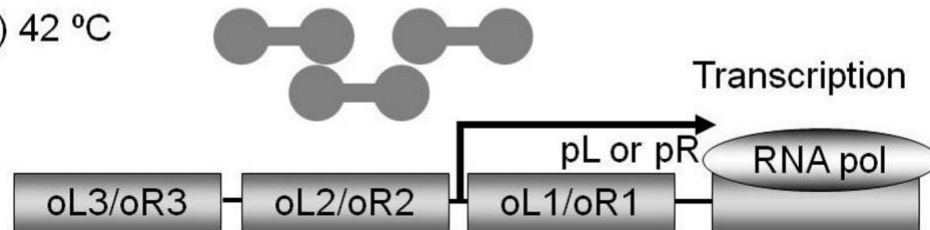
Expresión en *Escherichia coli*

Promotor	Regulación	Observaciones	Ej . de vectores
λ pL/pR	oLs/oRs/cl857 Inductor: altas temperaturas	Fuerte. Represor termosensible clts857 reprime a bajas temperaturas (30°C) pero no a altas (42°C). Muy poca expresión a bajas temperaturas	pBV220

a) 30 °C

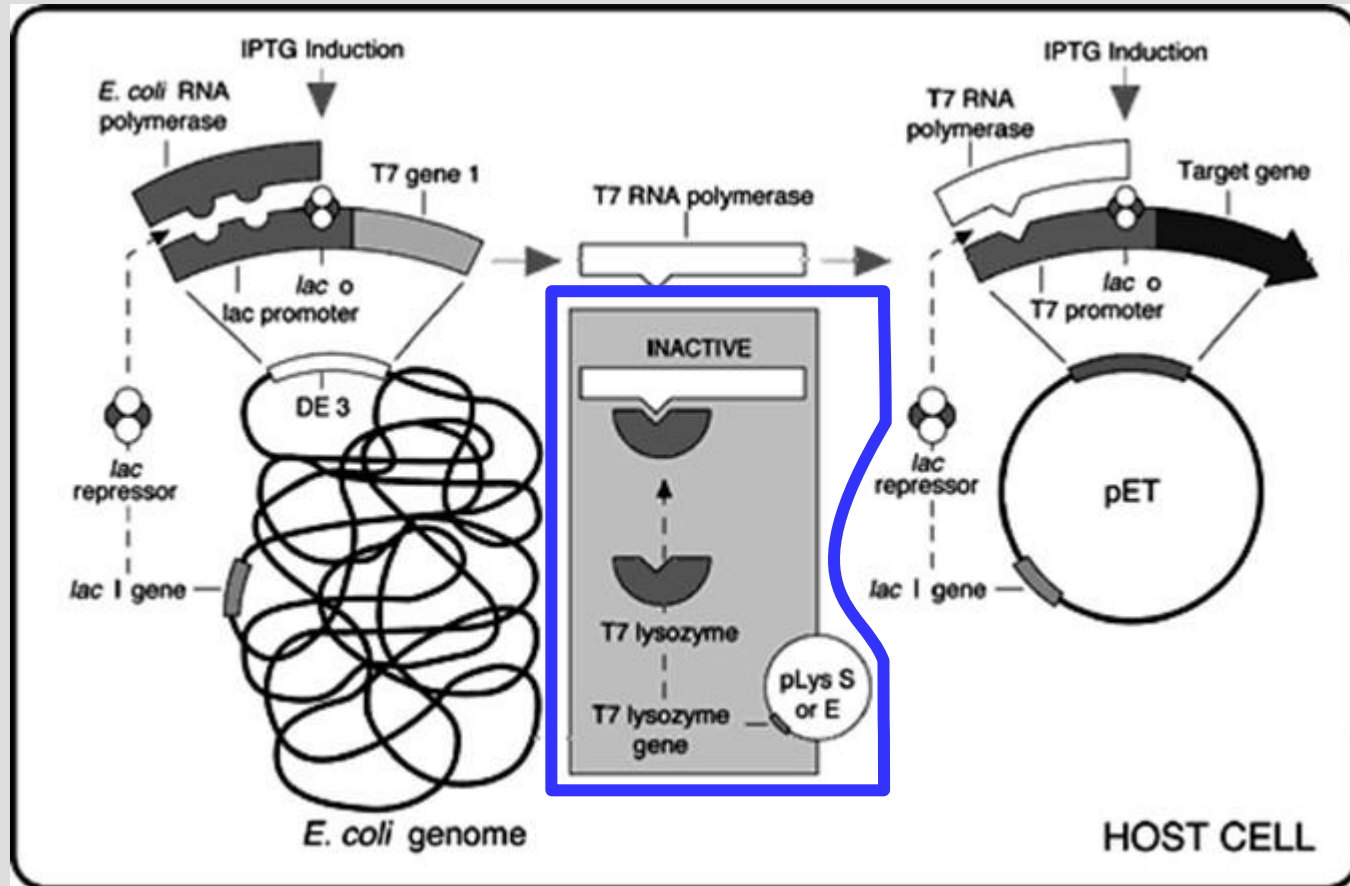


b) 42 °C



Expresión en *Escherichia coli*

Sistema BL21(DE3)/pET/pLys

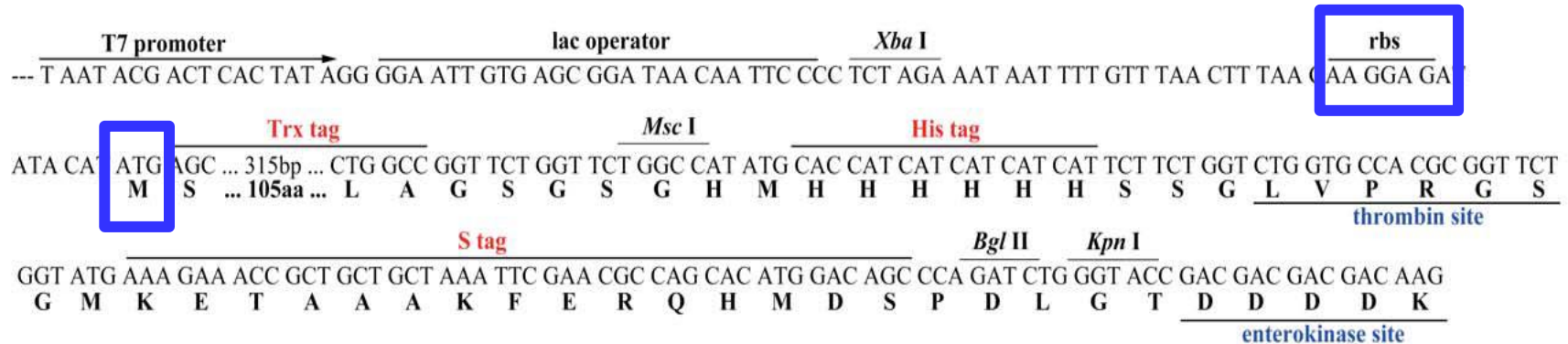


Expresión en *Escherichia coli*

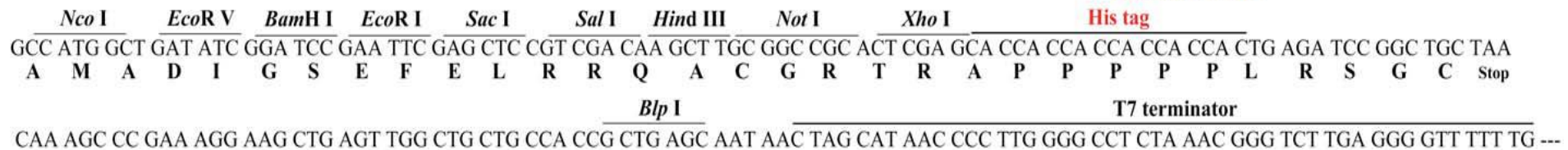
Traducción

Inicio de la traducción: Sitio de unión a ribosoma y ATG de inicio

Ej: pET-32a + *GSL1*



ttc-GSL1-gaa



Expresión en *Escherichia coli*

Traducción

Fin de la traducción: codón de terminación

Ej: pET-32a + *GSL1*

T7 promoter → lac operator Xba I rbs
--- T AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGA ATT GTG AGC GGA TAA CAA TTC CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT

Trx tag Msc I His tag
ATA CAT ATG AGC ... 315bp ... CTG GCC GGT TCT GGT TCT GGC CAT ATG CAC CAT CAT CAT CAT CAT TCT TCT GGT CTG GTG CCA CGC GGT TCT
M S ... 105aa ... L A G S G S G H M H H H H H S S G L V P R G S
thrombin site

S tag Bgl II Kpn I
GGT ATG AAA GAA ACC GCT GCT GCT AAA TTC GAA CGC CAG CAC ATG GAC AGC CCA GAT CTG GGT ACC GAC GAC GAC GAC AAG
G M K E T A A A K F E R Q H M D S P D L G T D D D D K
enterokinase site

...secuencia codificante...

Nco I EcoRV BamHI EcoRI Sac I Sal I Hind III Not I Xho I His tag
GCC ATG GCT GAT ATC GGA TCC GAA TTC GAG CTC CGT CGA CAA GCT TGC GGC CGC ACT CGA GCA CCA CCA CCA CCA CCA CTG A G A TCC GGC TGC TAA
A M A D I G S E F E L R R Q A C G R T R A P P P P P L R S G C Stop

Blp I T7 terminator
CAA AGC CC GAA AGG AAG CTG AGT TGG CTG CTG CCA CCG CTG AGC AAT AAG TAG CAT AAC CCC TTG GGG CCT CTA AAC GGG TCT TGA GGG GTT TTT TG ---

Expresión en *Escherichia coli*

Traducción

Diferencia en uso de codones

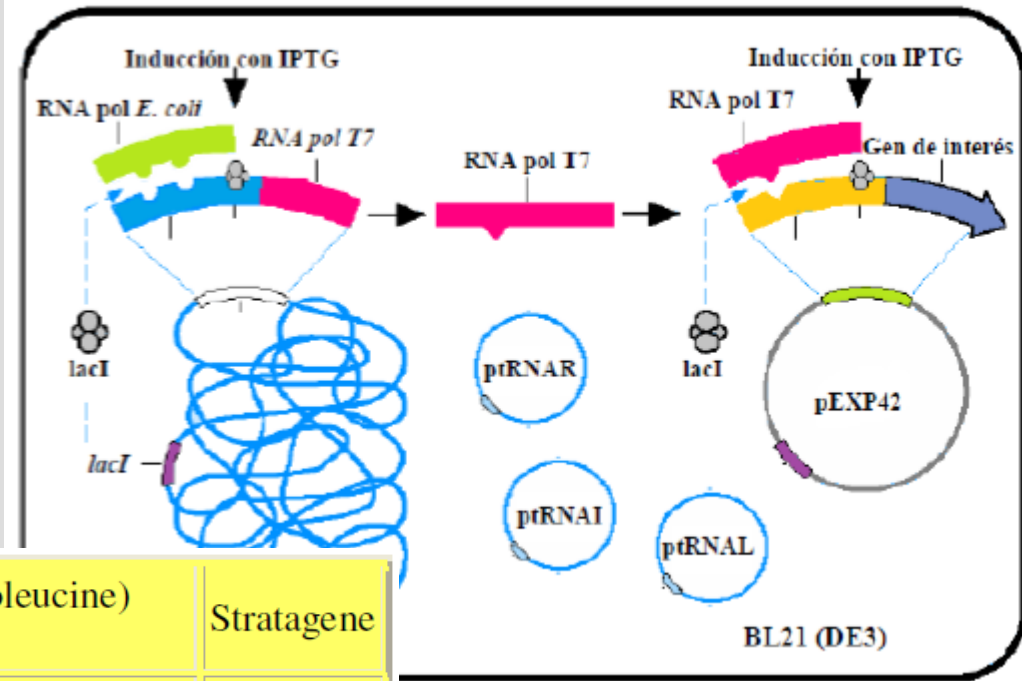
La presencia de codones raros, especialmente en el extremo 5' de la secuencia codificante de la proteína (aminoterminal en el polipéptido) pueden generar problemas en la expresión, como variantes truncadas o mal plegadas

Soluciones:

- Modificar la secuencia clonada reemplazando los codones raros por otros de mayor frecuencia que codifiquen el mismo aminoácido
- Utilizar cepas especiales que expresen ARNt para estos codones raros

Expresión en *Escherichia coli*

Cepas comerciales para ampliar el uso de codones



BL21 (DE3)
CodonPlus-RIL

AGG/AGA (arginine), AUA (isoleucine)
and CUA (leucine)

Stratagene

BL21 (DE3)
CodonPlus-RP

AGG/AGA (arginine) and CCC (proline)

Stratagene

Rosetta or Rosetta
(DE3)

AGG/AGA (arginine), CGG (arginine),
AUA (isoleucine)
CUA (leucine) CCC (proline), and GGA
(glycine)

Novagen

Expresión en *Escherichia coli*

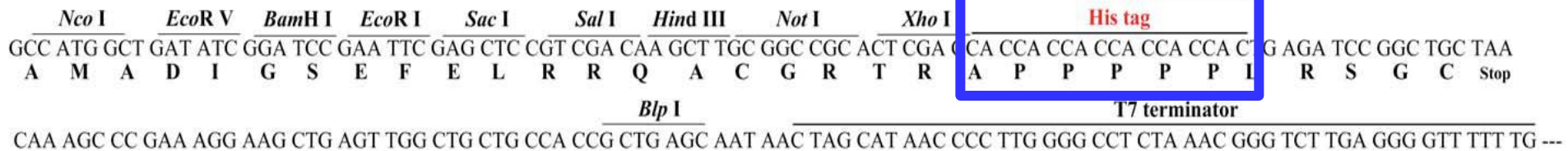
Modificaciones postraduccionales

Proteínas con puentes disulfuro

La expresión de estas proteínas en ambientes reductores generalmente produce su mal plegamiento.

Puede solucionarse utilizando cepas con un ambiente citoplasmático más oxidante

AD494	mutation in thioredoxin reductase (trxB)
Origami	double mutant in thioredoxin reductase (trxB) and glutathione reductase (gor)

Ej: pET-32a + *GSL1*

Expresión en *Escherichia coli*

Secuencias que codifican Tags

Tags de afinidad:

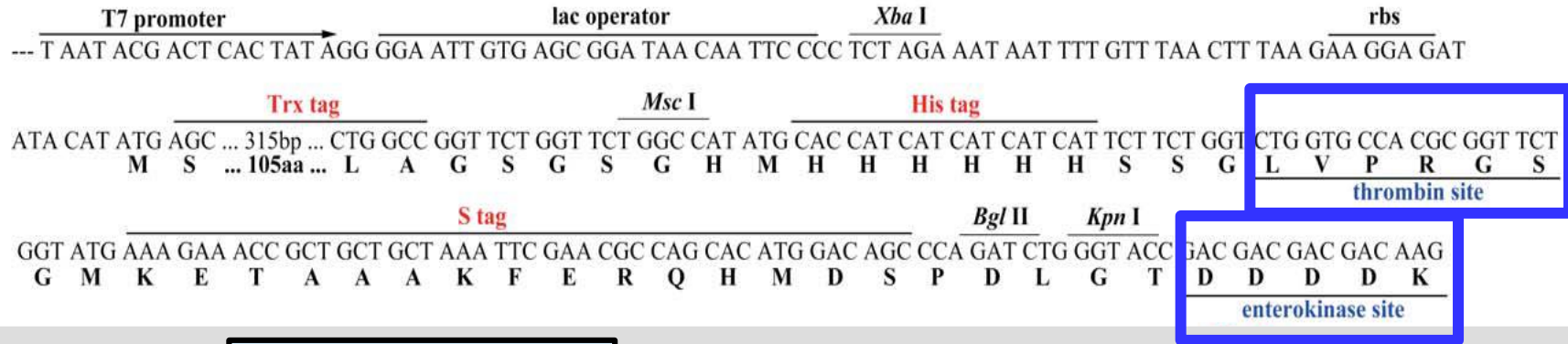
Pequeñas secuencias de aminoácidos cuya fusión a la proteína diana permite, en teoría, su purificación mediante cromatografía de afinidad.

Tag	Ligando inmovilizado a matriz	Elusión
GST	GSH	GSH
Hisx6	Ni-NTA, Ni-IDA	imidazol
MBP	amilosa	maltosa
epitopes	anticuerpos específicos	pH, fuerza iónica

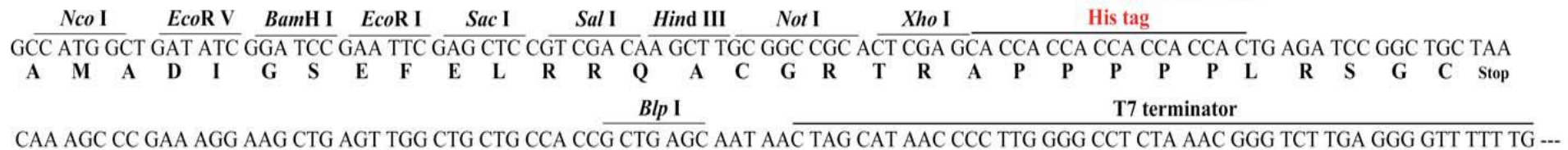
Expresión en *Escherichia coli*

Secuencias que codifican sitios de restricción proteolíticos

Ej: pET-32a + *GSL1*



ttc-GSL1-gaa



Expresión en *Escherichia coli*

Secuencias que codifican sitios de restricción proteolíticos

Una vez que se han purificado las proteínas de fusión a Tag, estos pueden ser eliminados con una proteasa de restricción si su sitio de reconocimiento está en la secuencia polipeptídica entre el Tag y la proteína de interés

Trx His x 6 Sitio Trombina S
MS...105aa...LAGSGSGHMHSSGLVPRGSGMKETAAAKFERQHMDS



Sitio Enteroquinasas GSL1
PDLGTDDDDKAMADIGSEF...64aa...EFELRRQACGRTTRAPPPPLRSGC



Enzima	Secuencia reconocida y corte
Enteroquinasas	-Asp-Asp-Asp-Lys↓-
Trombina	-Leu-Val-Pro-Arg↓-Gly-Ser-
Factor Xa	-Ile-(Glu o Asp)-Gly-Arg↓-
proteasa TEV	-Gln-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln↓Gly-

Expresión en *Escherichia coli*

Condiciones de inducción



1 colonia aislada



2

- Hasta 50 mL
- 37°C hasta $DO_{600} = 0,4-1$
- Antibiótico
- Buena agitación y aireación

3

Promoter	induction	typical condition	range
trc (hybrid)	addition of IPTG	0.2 mM	0.05 - 2.0 mM
araBAD	addition of l-arabinose	0.2%	0.002 - 0.4 %
T7-lac operator	addition of IPTG	0.2 mM	0.05 -2.0 mM

4

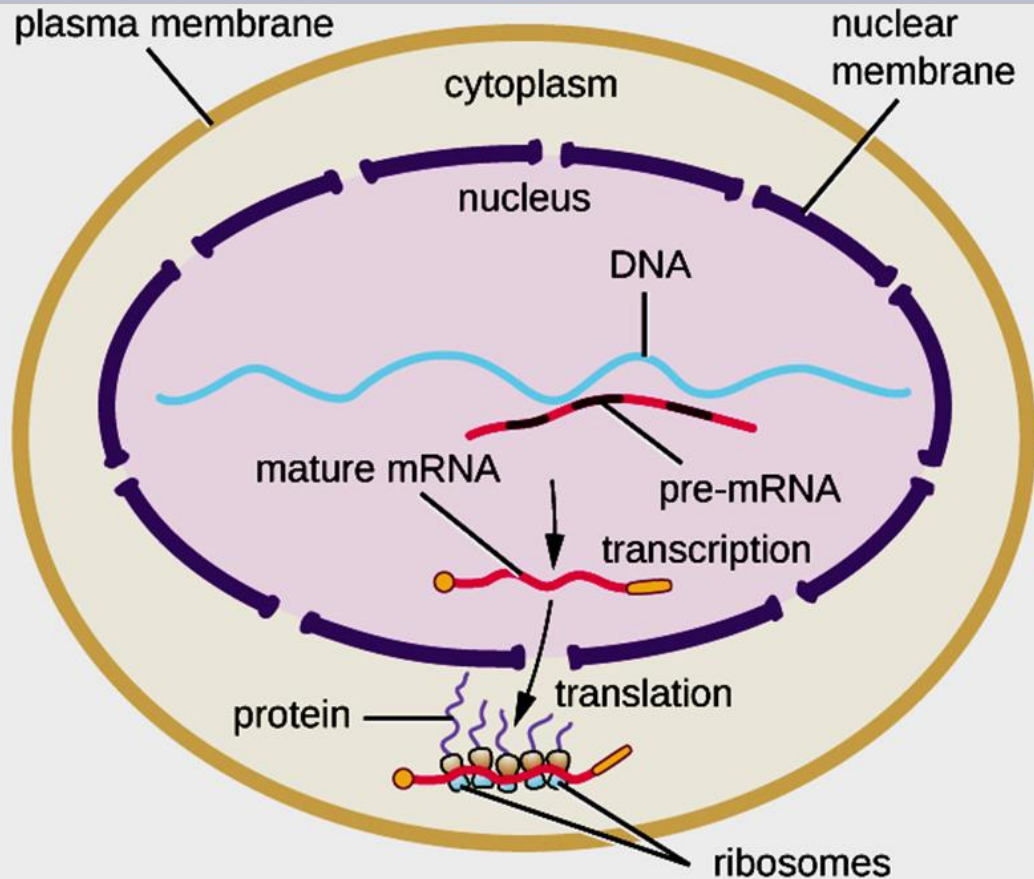
Incubation temperature	incubation time
15°C	overnight
20°C	overnight
25°C	overnight
30°C	5-6 h
37°C	3-4 h

5

centrifugación a 6000 *g* por 20 min. Conservar a -20°C

- 1 - Preparación de inóculo
- 2 - Crecimiento de cultivo
- 3 - Inducción
- 4 - Expresión
- 5 - Cosecha y guardado de pellet celular

Expresión en células de mamíferos



eukaryote

(b)

células de eucariotas

Hay procesamiento de transcritos como capping, poliadenilación y splicing

Permite modificaciones postraduccionales complejas

Expresión en células de mamíferos

Secuencias usadas para expresión en células de mamíferos

Promotores:

- Promotores constitutivos fuertes de virus (ej: pCMV, pSV40)
- Promotores regulables (ej: promotor de tetraciclina). Pueden ser: on-off, dosis dependiente.

Sitios de poliadenilación:

- De mamíferos (ej: PolyA de bGH)
- De virus (PolyA de SV40)

Expresión en células de mamíferos

La expresión del ADN de interés puede ser:

Transciente: cuando no puede replicar en el hospedador de expresión

Estable: cuando puede replicar en el hospedador de expresión.

- Integración a un cromosoma (copias y ubicación)
- Presencia de origen de replicación de virus (SV40, EBV) en una línea celular que expresa el gen de la proteína necesaria para su uso (T large, EBNA-1).

Expresión en células de mamíferos

Vectores shuttle (transbordador)

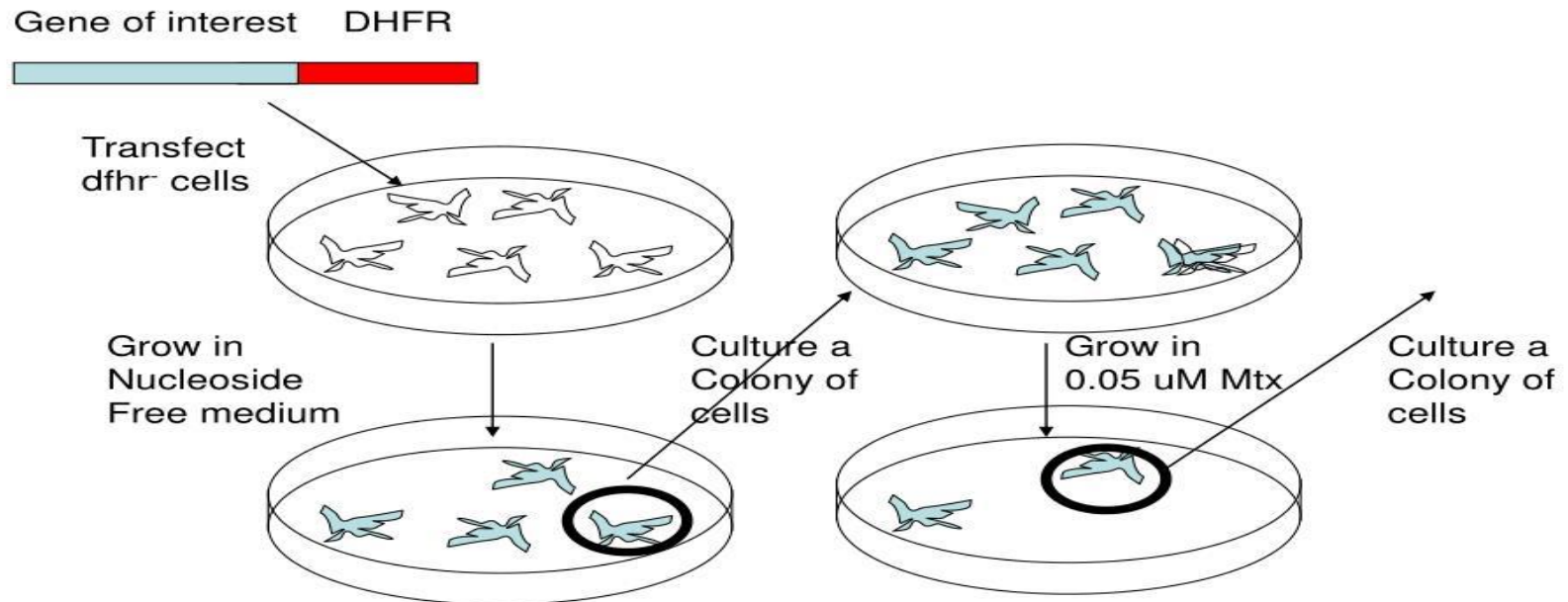
Pueden replicarse en células de organismos de distintas especies. Uno de fácil manipulación (ej. *E. coli*) y el otro es el hospedador objetivo.

Marcador de selección en eucariotas

- Resistencias a antibióticos. Ej. Neomicina fosfotransferasa, Higromicina fosfotransferasa.
- Complementación de auxótrofos (líneas celulares deficientes en alguna vía metabólica). Ej. Dihidrofolato reductasa (DHFR) y Glutamina sintetasa (GS) en líneas CHO y NSO .

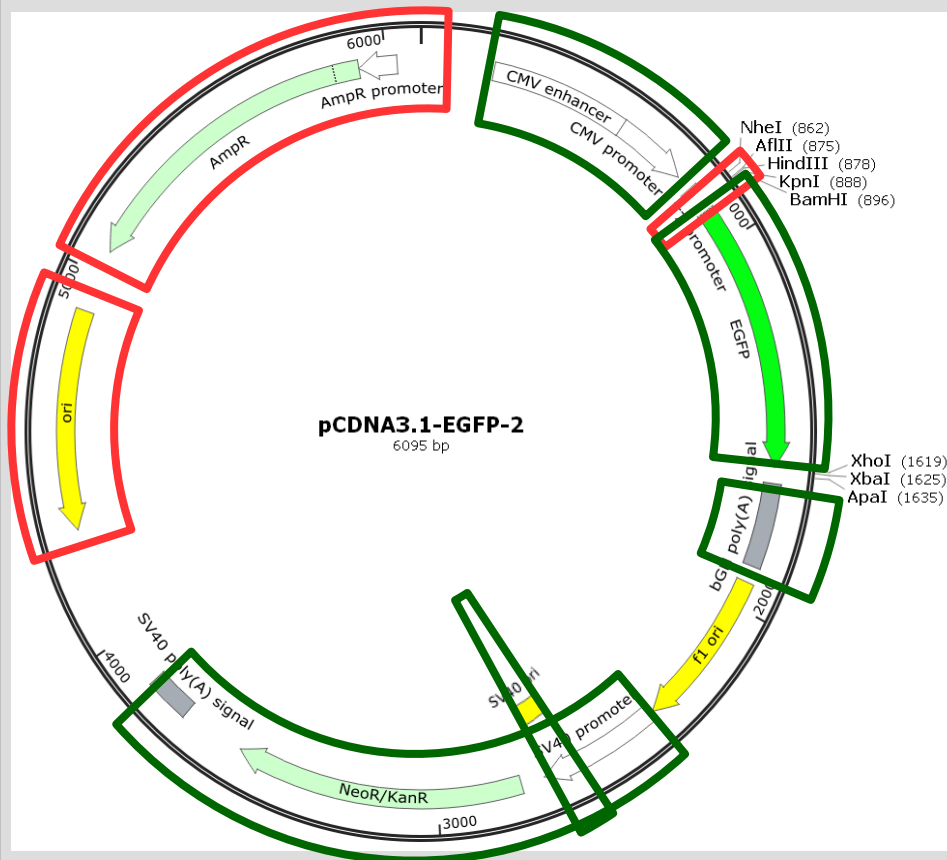
Expresión en células de mamíferos

Methotrexate (MTX) Selection



Expresión en células de mamíferos

Vectores shuttle (transbordador)



Vector de clonado en procariontas:

ori

Marcador de selección

Sitio de múltiple clonado

Vector de expresión en mamífero:

ori

Marcador de selección

Promotor

Sitio de poliadenilación

Tag

Preparación de extractos proteicos

Objetivo: Preparación de la muestra para su ulterior uso. (por ej: purificación).

Consiste en remoción de material particulado y otros contaminantes (ADN, lípidos) que compliquen técnicas que serán empleadas posteriormente (ej: cromatografía).

Generalmente, se deben extraer de la célula productora que debe lisarse lo que depende del tipo celular y la densidad del cultivo.

Elección del tampón de pH para lisis

- Estabilidad de la proteína con respecto al pH.
- Compatibilidad con los componentes del tampón.
- Compatibilidad con pasos subsiguientes. No sería recomendable un paso adicional de cambio de buffer.

Se suelen usar en concentraciones en el rango de 20-50 mM.

Buffer	pH range
Sodium dihydrogen phosphate - disodium hydrogen phosphate	5.8 - 8.0
Tris - HCl	7.0 - 9.0
HEPES - NaOH	7.2 - 8.2

Los tampones fosfato son incompatibles con el uso de cationes divalentes.

TRIS posee una amina potencialmente reactiva. Su pH es muy afectado por T y cc.

HEPES interfiere con el ensayo de Lowry (no con el de Bradford).

Aditivos

Class of additive	example	concentration	purpose
Salts	NaCl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄	50-150 mM	maintain ionic strength of medium
Detergents	Deoxycholate, Triton X-100	0.1-1%	solubilization of poorly soluble proteins
Glycerol		5-10%	stabilization
Glucose or sucrose		25 mM	Stabilize lysosomal membranes, reduce protease release
Metal chelators	EDTA, EGTA	1 mM	reduce oxidation damage, chelate metal ions
Reducing agents	DTT, DTE 2-Mercaptoethanol	1-10 mM 0.05%	reduce oxidation damage
Ligands, metal ions	Mg ²⁺ , ATP, GTP	1-10 mM	stabilization

Usarlos sólo cuando sea necesario.

Inhibidores de proteasas

La disrupción de la célula lleva a la liberación de enzimas proteolíticas que pueden disminuir el rendimiento. Para controlar la proteólisis no deseada puede ser necesario agregar un “cocktail” de inhibidores de proteasas a la suspensión celular. Algunos de estos compuestos no son muy estables en solución.

Inhibidor de proteasa	Concentración final	Concentración stock (solvente)	Dianas
Aprotinina	1 - 2 $\mu\text{g/ml}$	10 mg/ml (agua)	Serín-proteasas
Benzamidina	15 $\mu\text{g/ml}$	10 mg/ml (agua)	Serín-proteasas
EDTA, EGTA	1 - 10 mM	0,5 M (agua, pH 8)	Metalo-proteasas
Leupeptina	1 - 2 $\mu\text{g/ml}$	10 mg/ml (agua)	Cisteín y serín-proteasas
E-64	5 – 40 μM	10 mM (DMSO)	Cisteín-proteasas
AEBSF	0,1 – 1 mM	100 mM (agua)	Serín-proteasas
PMSF	0,1 – 1 mM	100 mM (isopropanol)	Serín-proteasas
Pepstatina A	1 $\mu\text{g/ml}$	1 mg/ml (metanol)	Proteasas aspárticas
Bestatina	40 – 400 μM	4 mM (DMSO)	Aminopeptidasa B, leucina aminopeptidasa

Inhibidores de proteasas

PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) tiene una vida media corta en solución acuosa. La solución stock debe diluirse inmediatamente antes de usar. Pefablock es una alternativa menos tóxica y más soluble y estable.

AEBSF es más estable a pHs bajos.

El uso de EDTA y EGTA no es compatible con la presencia de iones Mg^{2+} (requeridos para la unión de nucleótido) en el tampón o con la cromatografía de afinidad en columnas de Ni^{2+} .

Tampón de lisis ejemplo

50 mM Tris-HCl pH 7.5

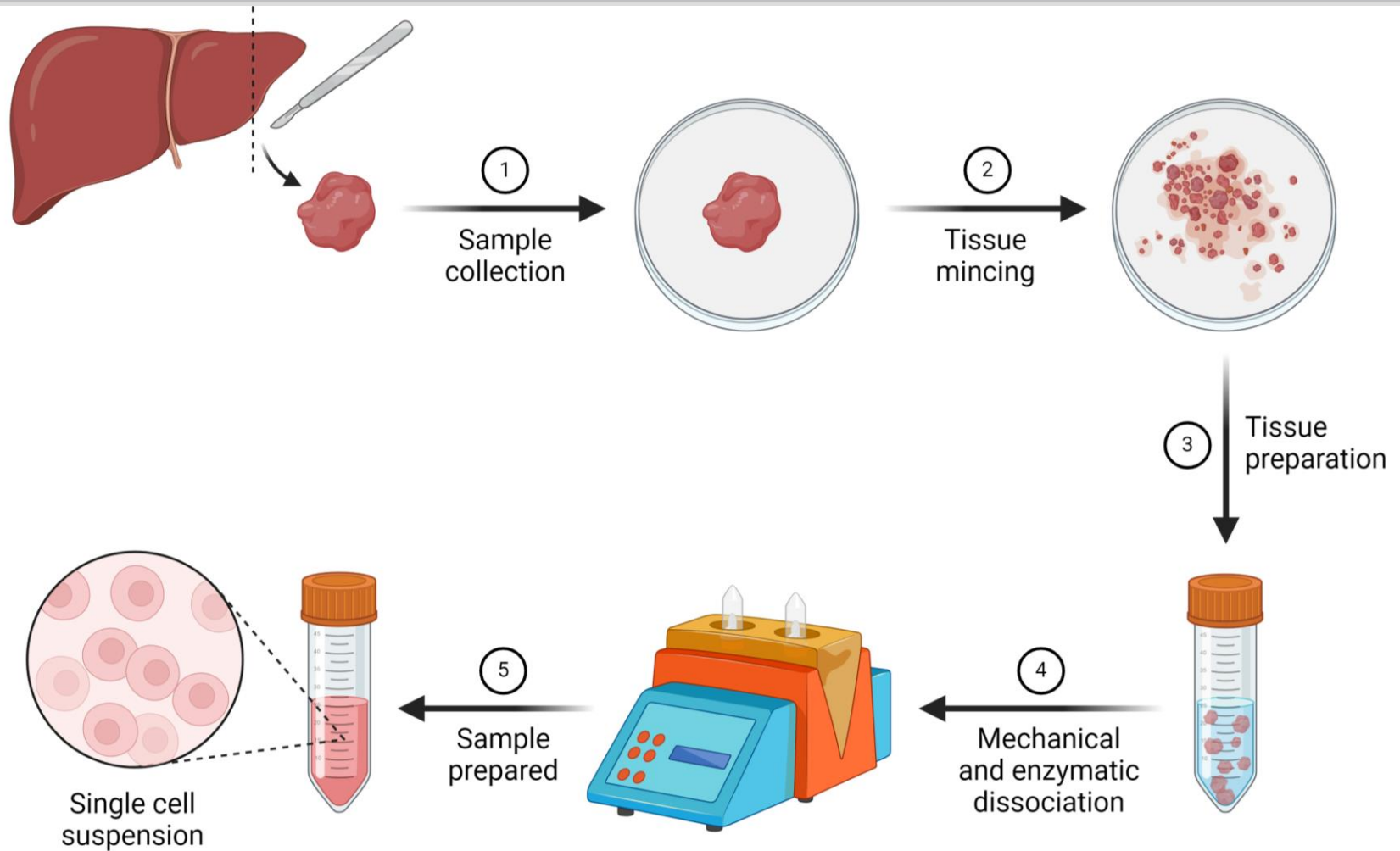
100 mM NaCl

1 mM DTT (for intracellular proteins)

5% glycerol (possibly)

<i>E. coli</i>	Yeast	Insect cells	Mammalian cells
1 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM EDTA	1-10 mM AEBSF
1 mM PMSF	1 mM PMSF	1 mM PMSF	0,8-8 μ M Aprotinin
	1 μ g/ml Leupeptin	1 μ g/ml Leupeptin	40-400 μ M Bestatin
	1 μ g/ml Pepstatin A	1 μ g/ml Pepstatin A	14-140 μ M E-64
			20-200 μ M Leupeptin
			15-150 μ M Pepstatin A

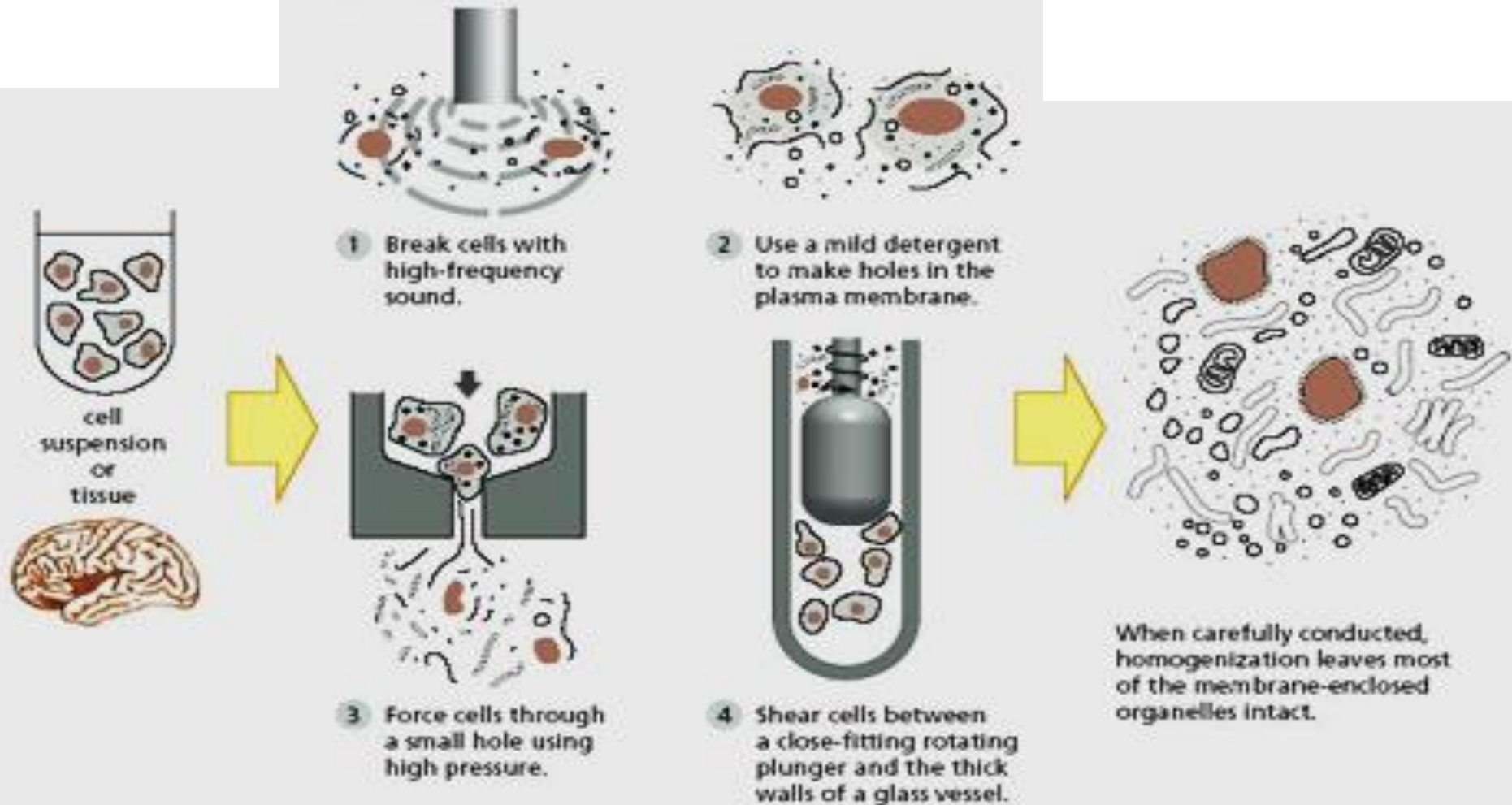
Métodos de lisis



Métodos de lisis

Método	Descripción
Sonicación	Pulsos cortos: 5-10", con intervalos en hielo, 10-30" (evitar calentamiento). Rotura de ADN
Homogeneización	Con prensas: las células se presurizan y la presión es liberada de golpe (ej: French Press); mantener frío, evitar la formación de espuma. Con homogeneizadores manuales (tipo Dounce) o eléctricos (ej. Ultra-Turrax).
Congelar y moler	con N ₂ líquido, mortero y hospital. El polvo se puede guardar a -80 °C y se reconstituye con 5 vol. de buffer.
Enzimas líticas de pared	digestión de la pared celular (lisozima, lisostafina, zimolasa, liticasa, celulasa). Se debe usar ADNasa. Para grandes volúmenes resulta costoso.
Vortexeado con cuentas de vidrio	0,4-0,5 mm. Varios ciclos de 30-60 seg (enfriando en hielo). Roura del 50-95 %. Para volúmenes grandes se requiere aparato especial).

Métodos de lisis



Métodos de lisis



Sonicador



French Press



Dounce



Ultra-turrax

Remoción del ADN

- Digestión enzimática por adición de ADNasa I ($1 \mu\text{g/ml}$) al lisado celular. En hielo, 10 - 15 min.
- Tratamiento (30 min a 4°C) para precipitación con polietilenimina (0,1 % (p/ v)) o sulfato de protamina (1 % (p/ v)) seguido de centrifugación. Trasvasar y conservar el sobrenadante.

Cuantificación de proteínas

Unión de colorante:

- Bradford: une Coomassie (G-250) en medio ácido (de marrón, máx. 465 nm, a azul, máx. 605 nm); se lee a 595 nm y es proporcional a Phe, Pro, Arg y Trp.

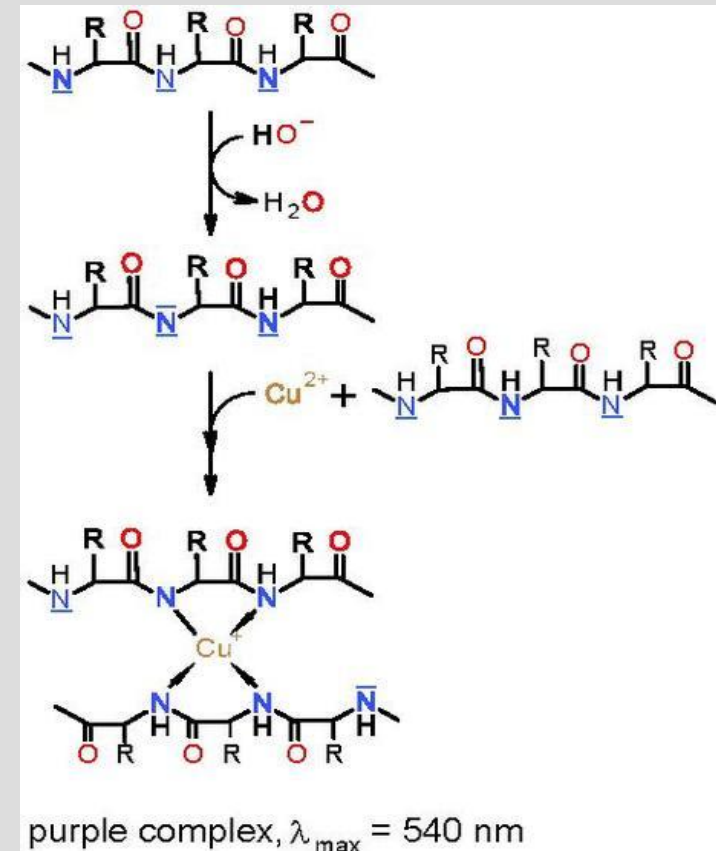
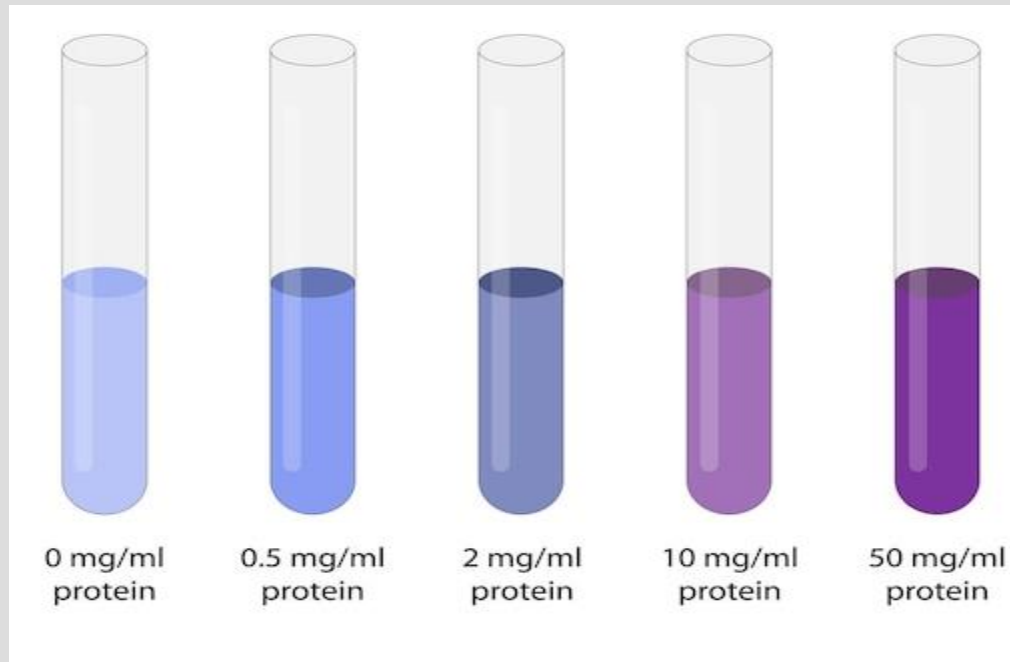


- NanoOrange: muy sensible, fluorescente.

Cuantificación de proteínas

Ion cobre en medio alcalino:

- Biuret: los Cu^{2+} son quelados por la unión peptídica y se reducen a Cu^+ dando color lila (545 nm).
Reacción dependiente de temperatura.



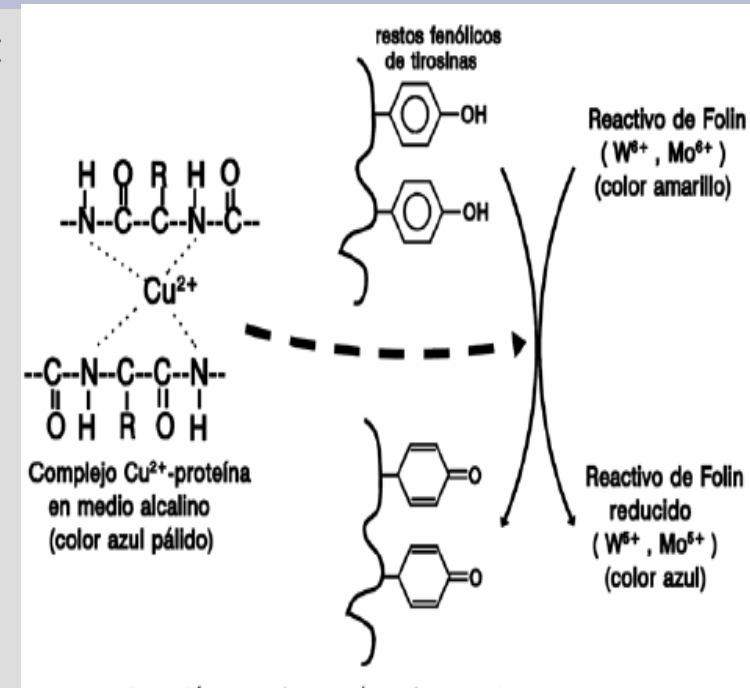
Cuantificación de proteínas

Ion cobre en medio alcalino (modificaciones de Biuret):

- Lowry: detección con reactivo de Folin - Ciocalteu (ácido fosfomolibdico/ fosfotungsténico) catalizada por Cu, color azul, 650-750 nm. Tirosina y triptófano.



- BCA: ulterior detección con ácido bicinconínico. Cu^+ -BCA

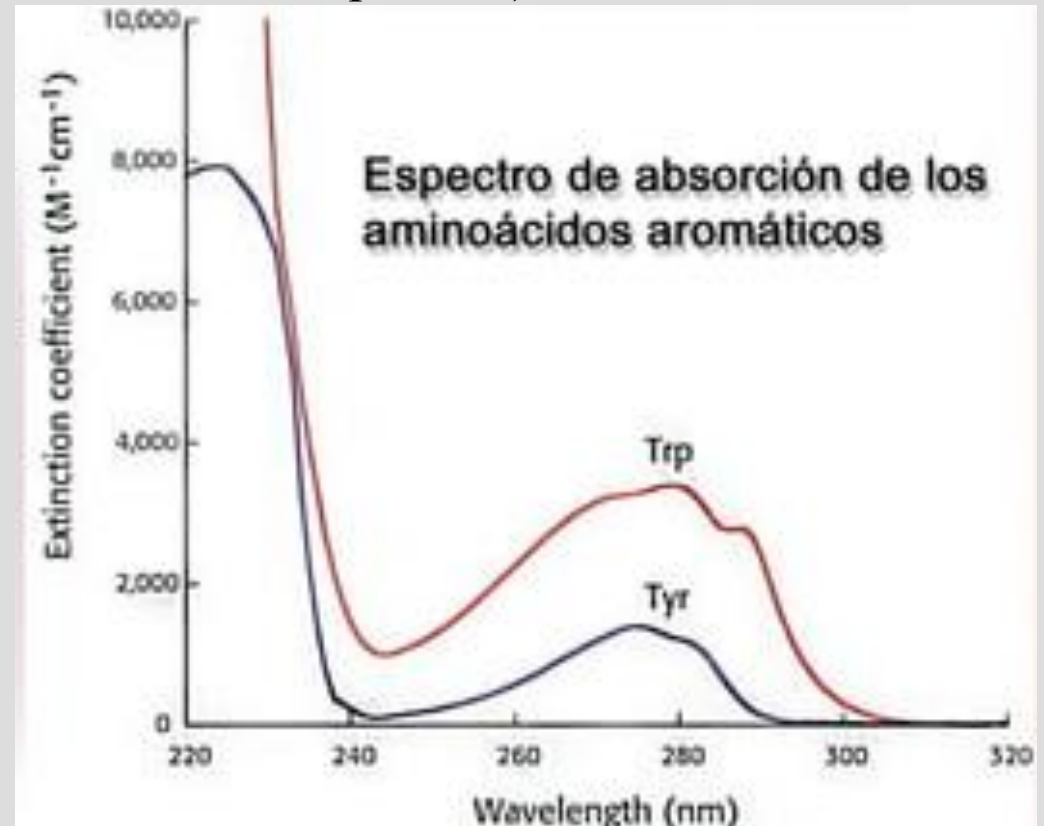


Cuantificación de proteínas

Abs 280 nm:

- Amino ácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano).

Se considera: $1 \text{ Abs}_{280\text{nm}} \equiv 1 \text{ mg/ml}$



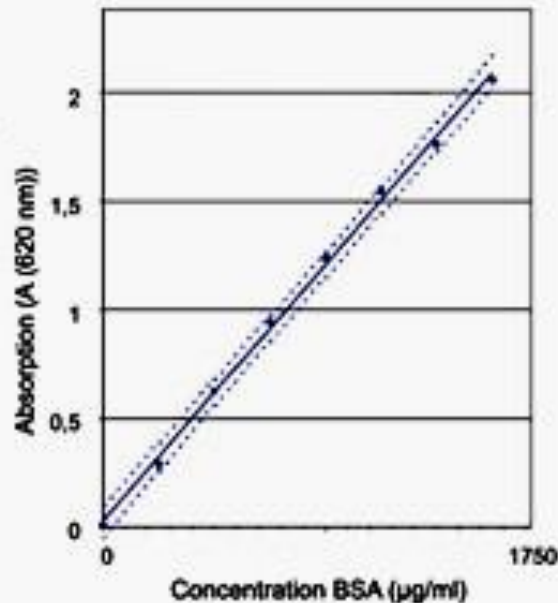
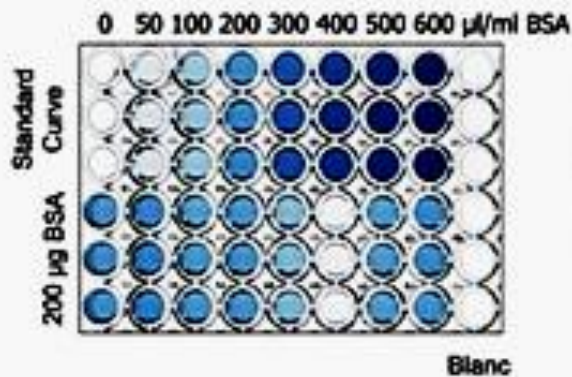
Cuantificación de proteínas

Table 2. Comparison of methods for quantitating proteins in solution.

Assay Method	Useful Range	Comments
NanoOrange® assay	10 ng/mL to 10 µg/mL	• Samples can be read up to six hours later without any loss in sensitivity • Low protein-to-protein signal variability • Detection not influenced by reducing agents or nucleic acids
BCA method ¹	0.5 µg/mL to 1.5 mg/mL	• Samples must be read within 10 minutes • Not compatible with reducing agents
Bradford assay ²	1 µg/mL to 1.5 mg/mL	• Proteins precipitate over time • High protein-to-protein signal variability • Not compatible with detergents
Lowry assay ³	1 µg/mL to 1.5 mg/mL	• Lengthy, multistep procedure • Not compatible with detergents, carbohydrates or reducing agents
Absorbance at 280 nm ⁴	50 µg/mL to 2 mg/mL	• High protein-to-protein signal variability • Detection influenced by nucleic acids and other contaminants
Biuret	5 – 160 mg/mL	

Cuantificación de proteínas

- Curva de calibración (BSA).
- Bradford (5' TA) NanoOrange (5' a 95 °C), Nanodrop rápidos. Los demás requieren incubación en baño a 37 °C (generalmente 30').
- Estabilidad del color y lectura de todas las muestras en un rango de tiempo.



Electroforesis de proteínas

Objetivo: separación de proteínas en base a su PM, forma y carga.

Método analítico. Aunque se puede eluir del gel una proteína separada y obtenerla en solución.

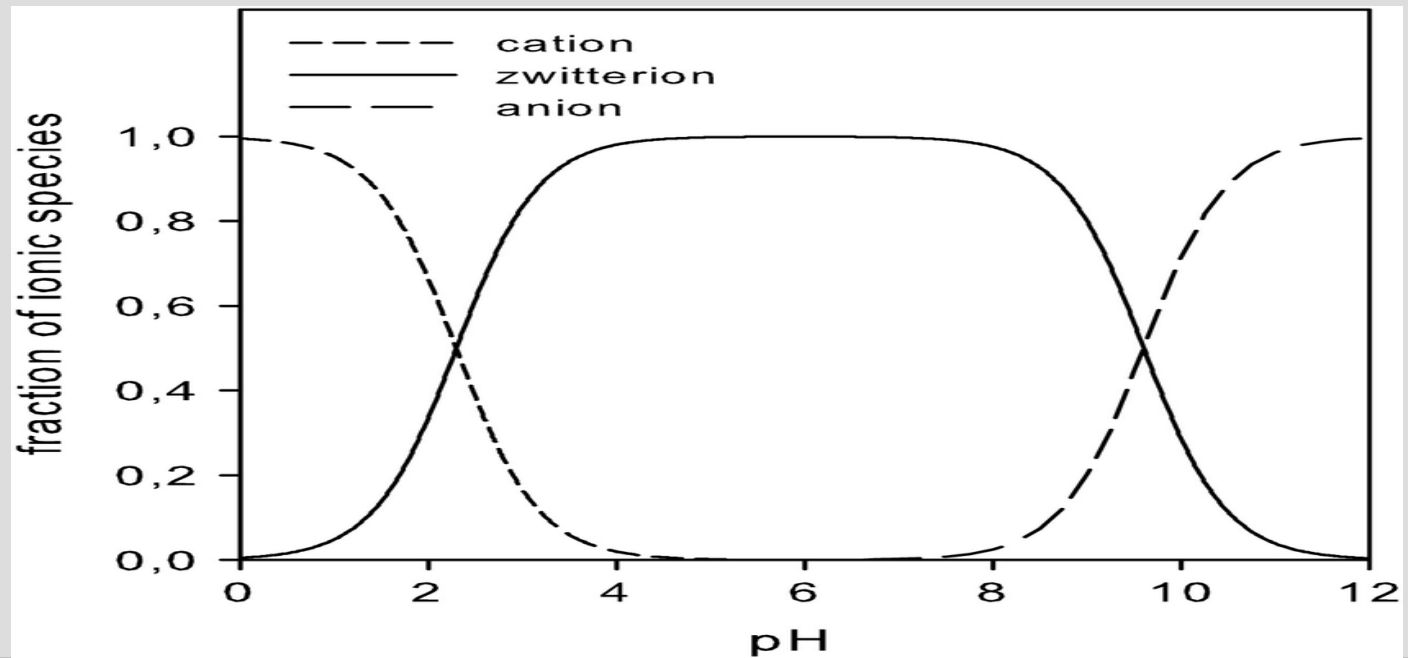
Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), electroforesis en gel de poliacrilamida. Técnica ampliamente utilizada para separar macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos) de acuerdo a su movilidad electroforética. Esta movilidad es función de su longitud, conformación y carga.

Puede ser tratada con un agente desnaturalizante (SDS) o analizadas en su forma nativa (a veces seguido de tinción enzimática).

Electroforesis de proteínas

Tampón: Debe ser no reactivo y no modificar o reaccionar con las proteínas. Se usan varios tampones para cátodo y ánodo (el mismo o distintos) según la aplicación. Los más comunes incluyen Tris, Bis-Tris o imidazol.

Contraión: Balancea la carga intrínseca del ión del tampón y, a su vez, afecta la fuerza del campo eléctrico durante la electroforesis (ejs: Cl^- y gly^-) La movilidad del glicinato puede ser ajustada con el pH.



Electroforesis de proteínas

Acrilamida: Cuando se disuelve en agua se auto-polimeriza espontanea pero muy lentamente. Los monómeros se unen en forma cabeza-cola en largas cadenas lineales que no se entrecruzan. La solución se vuelve viscosa pero no forma un gel a menos que se entrecrucen estas cadenas. Se recomienda guardar la solución acuosa en un lugar fresco, oscuro y seco para evitar la auto-polimerización u hidrólisis. La acrilamida es una neurotoxina.

Bisacrilamida (N,N'-Methylenebisacrylamide): Es el entrecruzane más frecuentemente usado para PAGE. Químicamente puede imaginarse como dos moléculas de acrilamida unidas cabeza-cabeza por sus extremos no reactivos, y entonces puede entrecruzar dos cadenas de poliacrialmida lineales generando un gel.

$$\%T = \frac{g \text{ de acrilamida} + g \text{ de bisacrilamida}}{100 \text{ ml de solución}}$$

$$\%C = \frac{g \text{ de bisacrilamina}}{100 \text{ ml de solución}}$$

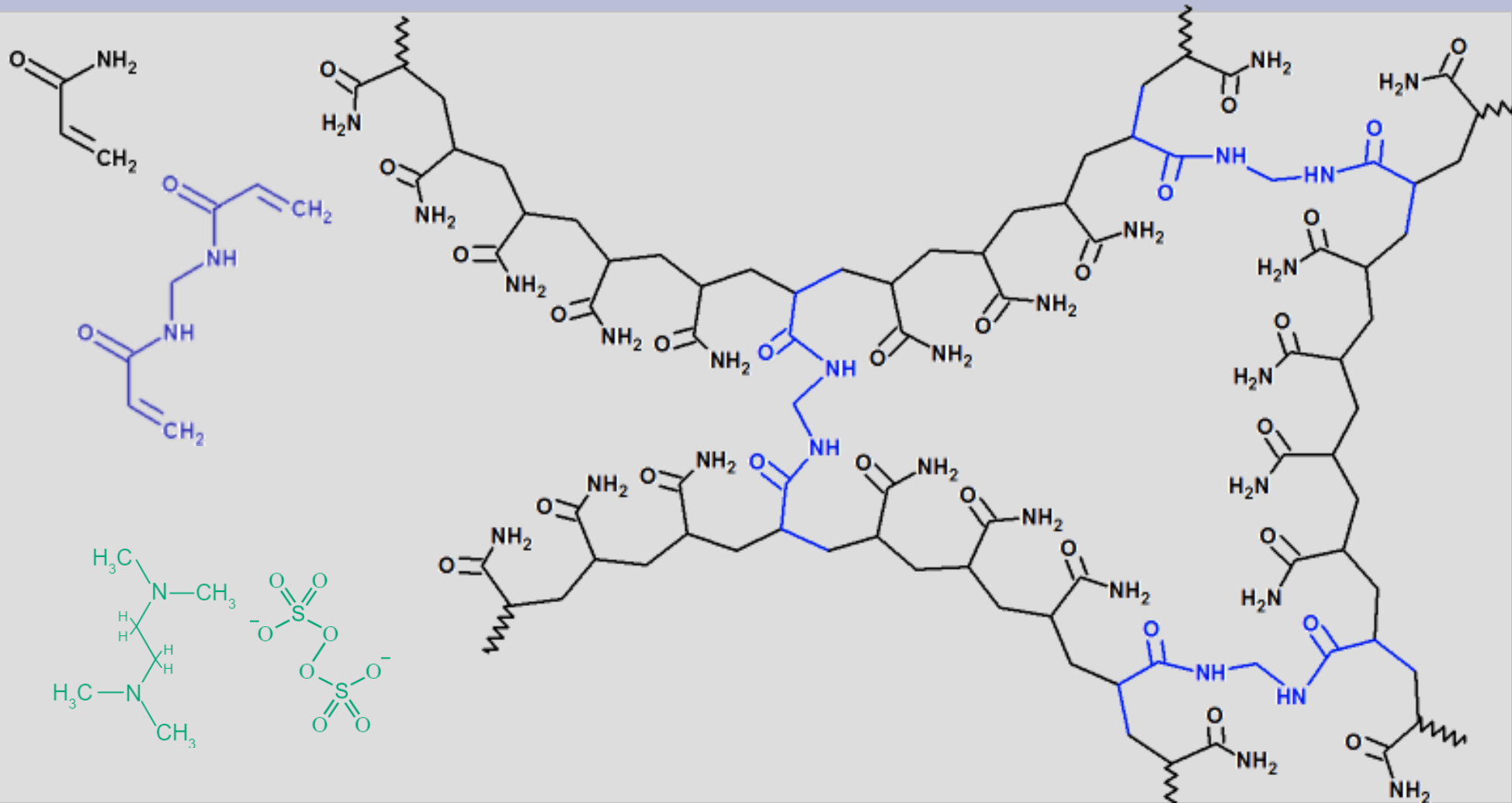
Electroforesis de proteínas

Persulfato de amonio (APS): fuente de radicales libres y se usa como iniciador de la formación del gel.

TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina): el TEMED estabiliza los radicales libres y mejora la polimerización.

La velocidad de polimerización y las propiedades del gel resultante dependen de las concentraciones de radicales libres; un exceso da un largo promedio de polímero más corto, incremento en la turbidez y menor elasticidad, mientras que su defecto provoca el efecto inverso. Las menores concentraciones que permitan la polimerización en un tiempo razonable (15-40 min) se deben usar. El APS y el TEMED se usan típicamente en concentraciones equimoleculares (1-10 mM). El oxígeno inhibe la polimeración.

Electroforesis de proteínas



Electroforesis de proteínas

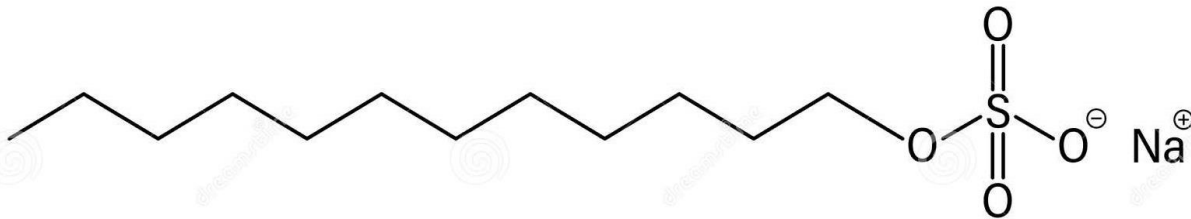
Aditivos para muestras.

- **Colorante de trazado.** Para seguir la corrida, se agrega un colorante aniónico (al tampón de siembra de la muestra) de movilidad electroforética conocida. El azul de bromofenol (3',3'',5',5'' tetrabromofenolsulfoftaleína) es el más usado. Es azul a pH neutro y levemente alcalino, se mueve hacia el ánodo más rápidamente que la mayoría de las proteínas. Puede pegarse débilmente a algunas proteínas dándoles un leve color.
- **Asistencia en la siembra.** La mayoría de los sistemas de PAGE se cargan en pocillos en la parte superior del gel. Para asegurar que la muestra se hunda en el fondo del pocillo, se suplementa con aditivos que aumentan la densidad de la misma. Deben ser no-iónicos y no-reactivos (**glicerol** y sacarosa).

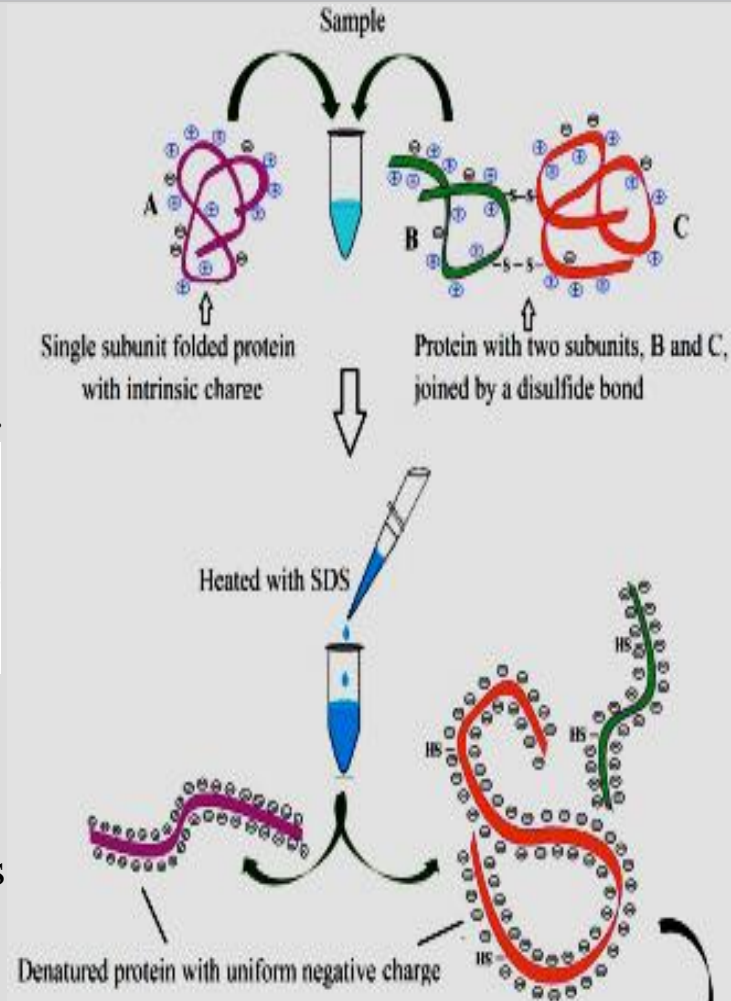
Electroforesis de proteínas

SDS-PAGE:

SDS: sodium dodecyl sulfate; detergente aniónico que desnaturaliza las estructuras secundarias y terciarias no unidas por puentes disulfuro. Se une a las proteínas confiriéndole una carga neta negativa, otorgándole una forma de bastón y una relación carga/masa igual para todas las proteínas en la mezcla (1,4 g SDS/ g de proteína). Esto hace que migren según su PM.

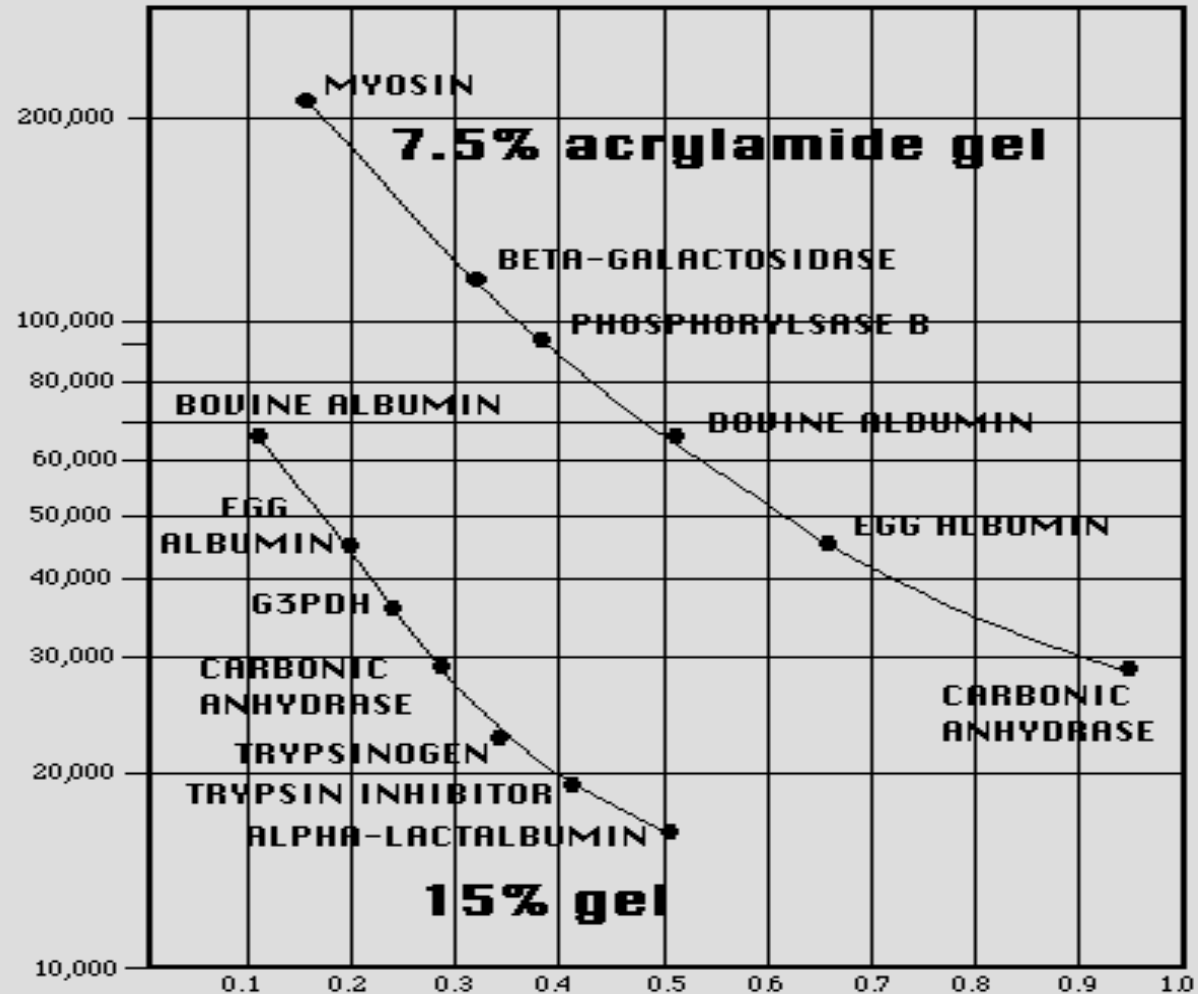


Se puede calentar las muestras a temperatura cercana a la ebullición en presencia de un agente reductor (ditiotreitól (DTT) o 2-mercaptoetanol (beta-mercaptoetanol), para reducir los puentes disulfuro presentes en algunas estructuras terciarias y cuaternarias (separando subunidades de oligómeros): reducing SDS-PAGE.

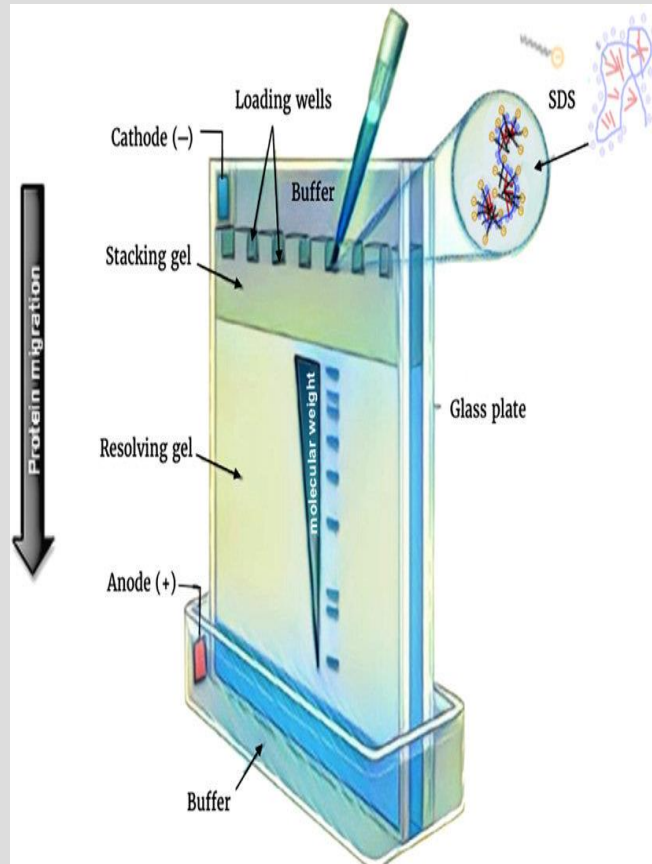


Electroforesis de proteínas

Rango de resolución	T%
100-600 kDa	4%
50-500 kDa	7%
30-300 kDa	10%
10-200 kDa	12%
3-100 kDa	15%



Electroforesis de proteínas



Tris-Gly pH 8.3

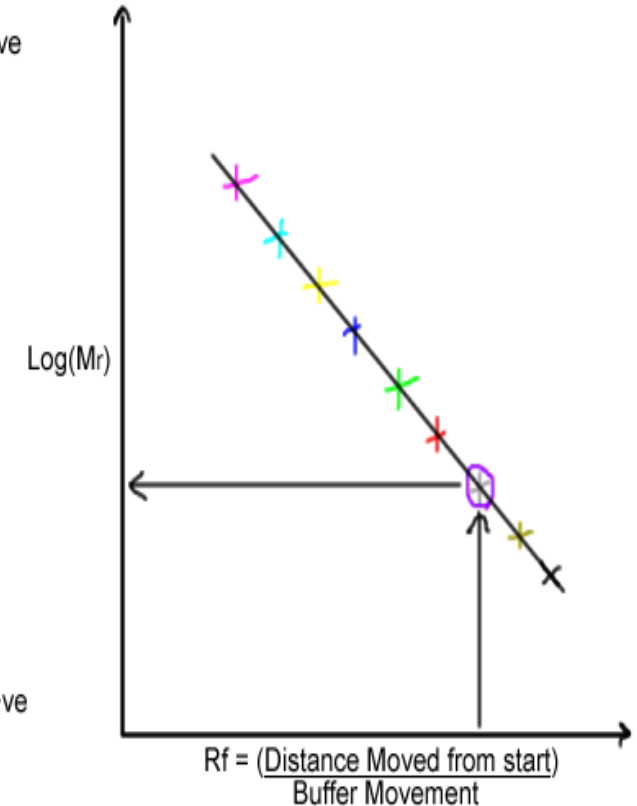
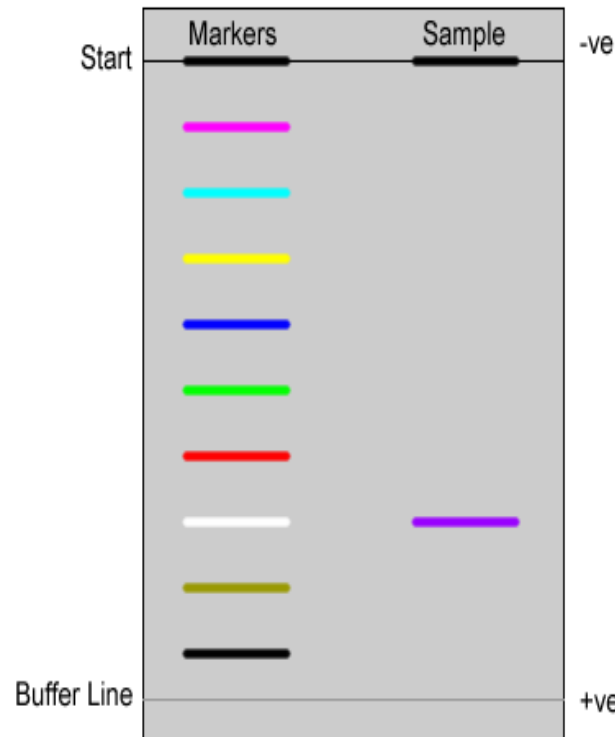
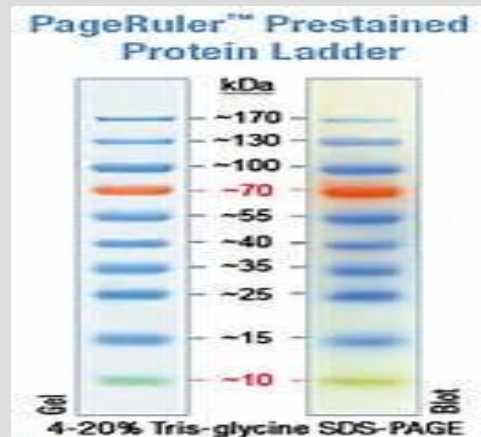
Tris-HCl pH 6.8

Tris-HCl pH 8.8

Tris-Gly pH 8.3



Electroforesis de proteínas

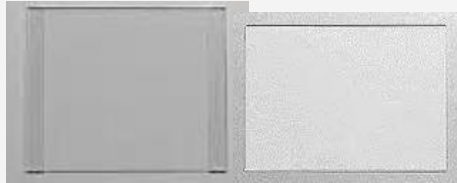


Electroforesis de proteínas

https://www.youtube.com/watch?v=i_6y6Z5UvwE



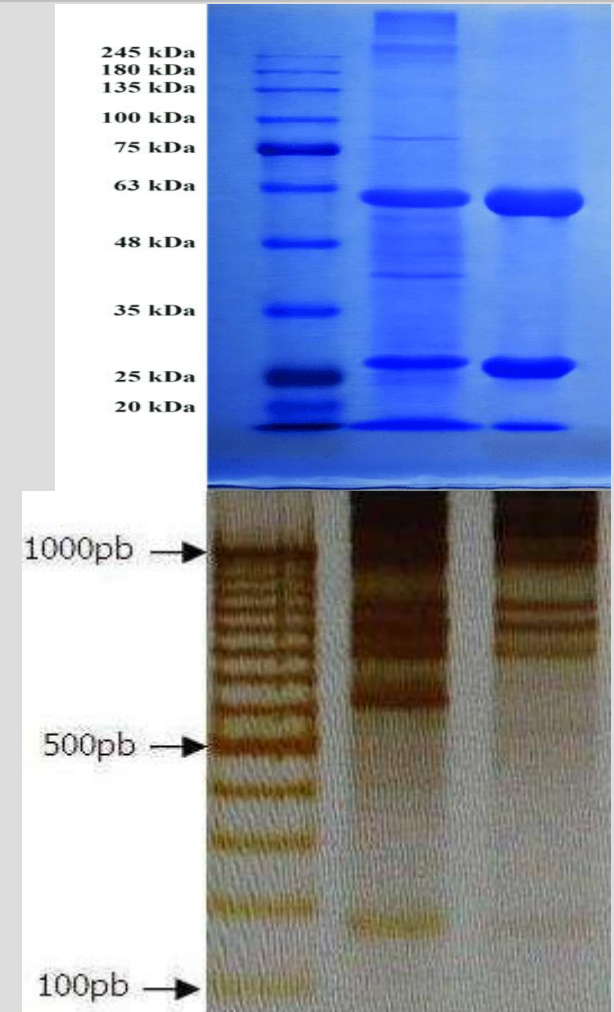
0,75 – 1 – 1,5 mm



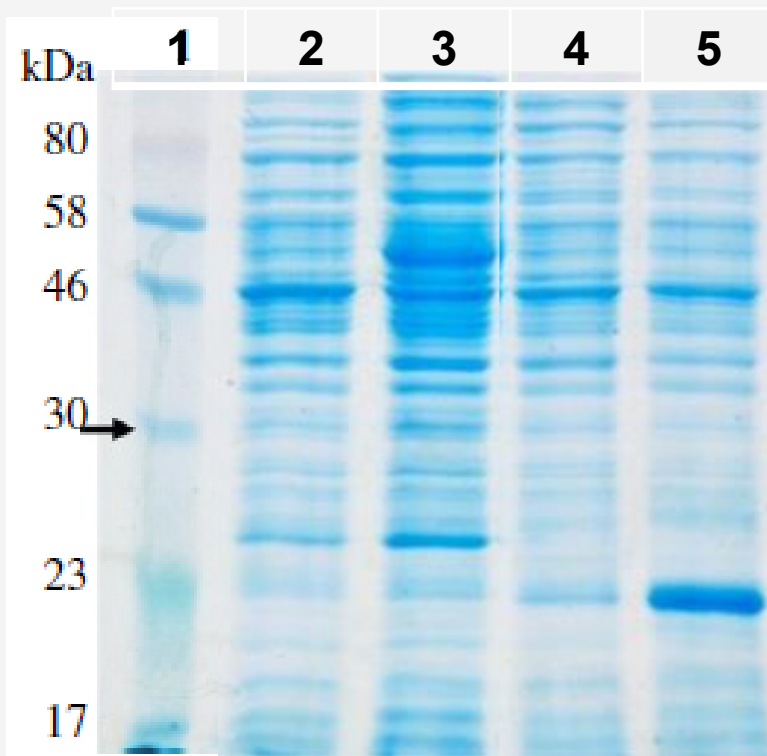
Electroforesis de proteínas

Tinciones generales para proteínas

- **Coomassie Brilliant Blue R-250.** Es el más popular para el teñido de estos geles. Es aniónico se une inespecíficamente e irreversiblemente a las proteínas. Es no polar, se usa en solución alcohólica (etanol, metanol, isopropanol) acidificada con ácido acético (que además fija las proteínas en el gel). El gel se tiñe completamente y se destiñe con la misma solución pero sin colorante. Las proteínas se visualizan como bandas azules sobre un fondo transparente.
- **Tinción con plata.** Es mucho más sensible (unas 50 veces) que el Coomassie (50 ng proteína por banda). Se desconoce el mecanismo de tinción. Las proteínas se tiñen de acuerdo a sus propias características en colores desde el amarillo al marrón oscuro. Se recomienda el uso de recipientes muy limpios, reactivos muy puros y guantes para asegurar el éxito de la técnica.



Electroforesis de proteínas (ejemplo)



Análisis SDS-PAGE de expresión del péptido his6-tiorredoxina- GSL1 in *E. coli*.

Calles 2 y 3 extractos proteicos de BL21(DE3) transformada con el plásmido pET32a+GSL1, 0 y 2 hr post-inducción, respectivamente.

Calles 4 y 5 extractos proteicos de BL21(DE3) transformada con el plásmido pET32a, 0 y 2 hr post-inducción, respectivamente.

El tamaño esperado para his6-tiorredoxina es aproximadamente 23 kDa, y para his6-tiorredoxina- GSL1 es aproximadamente 30 kDa.

Calle 1: Marcador de peso molecular.

Tinción: Coomassie Blue

Western blot

Objetivo: identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, tal como la que se presenta en extractos celulares o de tejidos.

La técnica utiliza tres etapas:

- Separación por tamaño (SDS-PAGE)
- Transferencia a un soporte sólido (blot)
- Visualización mediante la marcación de proteínas con el uso de anticuerpos primarios o secundarios apropiados (revelado)

Western blot



PVDF o NC



- cátodo (-)
- papel filtro
- PAGE
- membrana
- papel filtro
- ánodo (+)

Electrotransferencia húmeda



30V ON o 100V 1h

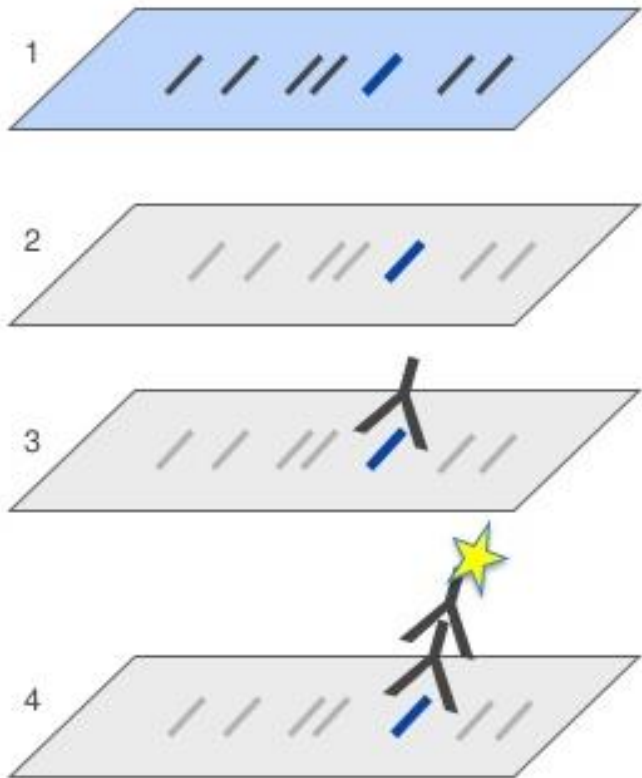
EVITAR BURBUJAS!!!

Electrotransferencia semi-seca



15V 30'

Western blot (revelado)

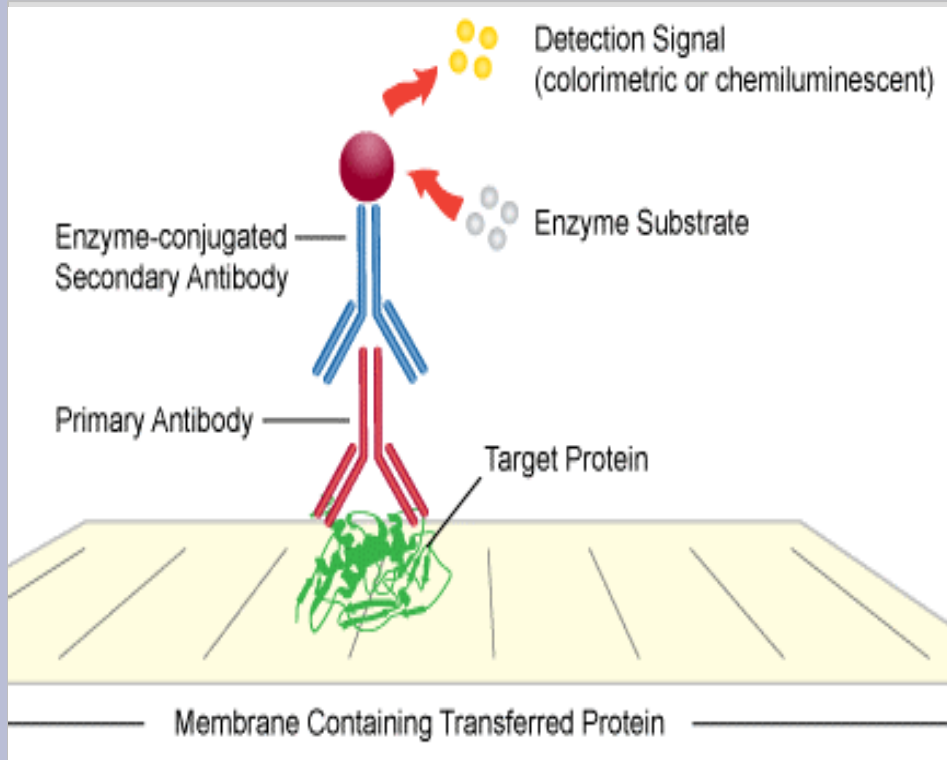


1 a 2: Bloqueo de la membrana: leche en polvo descremada (libre de lípidos) al 5% en PBS

2 a 3: Incubación con el anticuerpo primario

3 a 4: Incubación con el anticuerpo secundario conjugado a enzima que permite la visualización (reacción de color o emisión de luz):

Western blot (revelado)



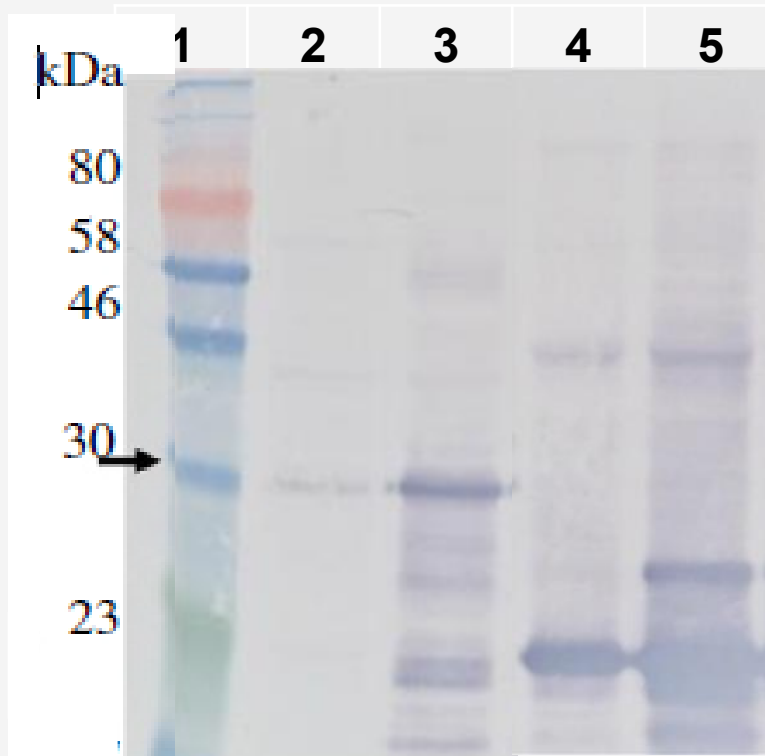
HRP (peroxidasa de rabanito):
 H_2O_2 con:

- DAB, precipitado color rojo-marrón o;
- luminol, emisión de fotones.

AP (fosfatasa alcalina): NBT y
BCIP, precipitado color lila.

<https://www.youtube.com/watch?v=OkH8u84t84M>

Western blot (ejemplo)



Análisis western blot de expression del péptido his6-tiorredoxina- GSL1 in *E. coli*.

Calles 2 y 3 extractos proteicos de BL21(DE3) transformada con el plásmido pET32a+GSL1, 0 y 2 hr post-inducción, respectivamente.

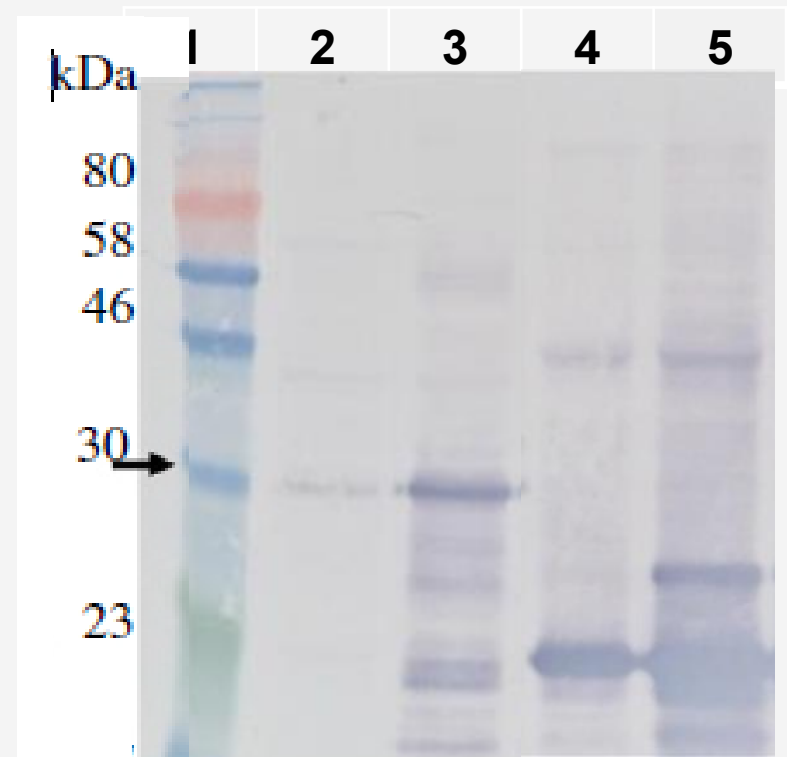
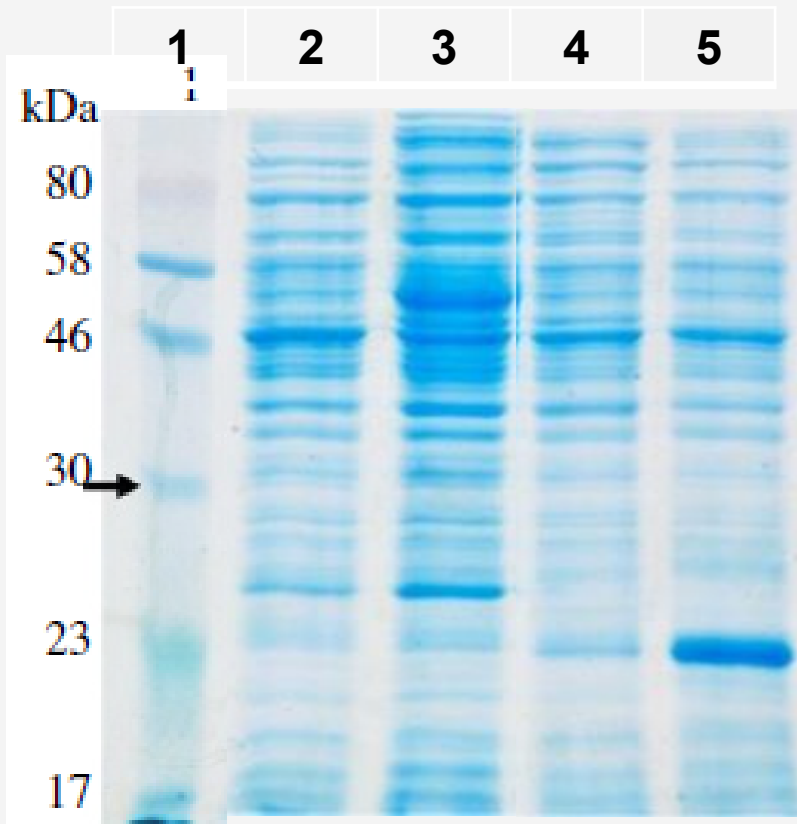
Calles 4 y 5 extractos proteicos de BL21(DE3) transformada con el plásmido pET32a, 0 y 2 hr post-inducción, respectivamente.

El tamaño esperado para his6-tiorredoxina es aproximadamente 23 kDa, y para his6-tiorredoxina- GSL1 es aproximadamente 30 kDa.

Calle 1: Marcador de peso molecular.

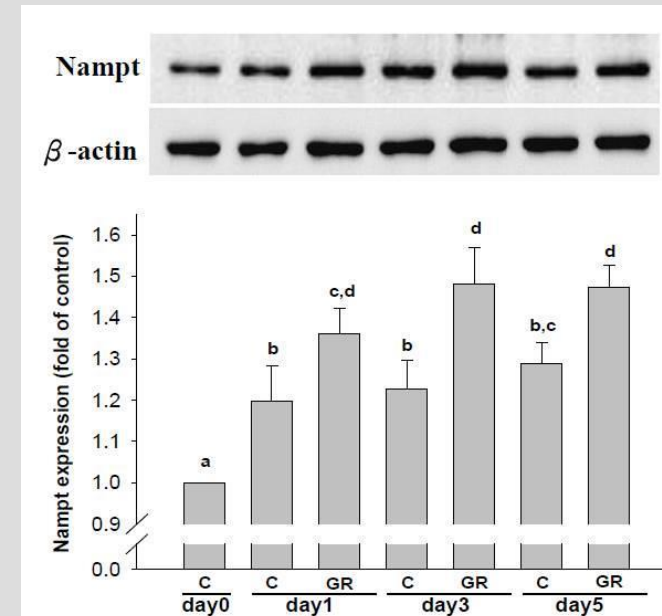
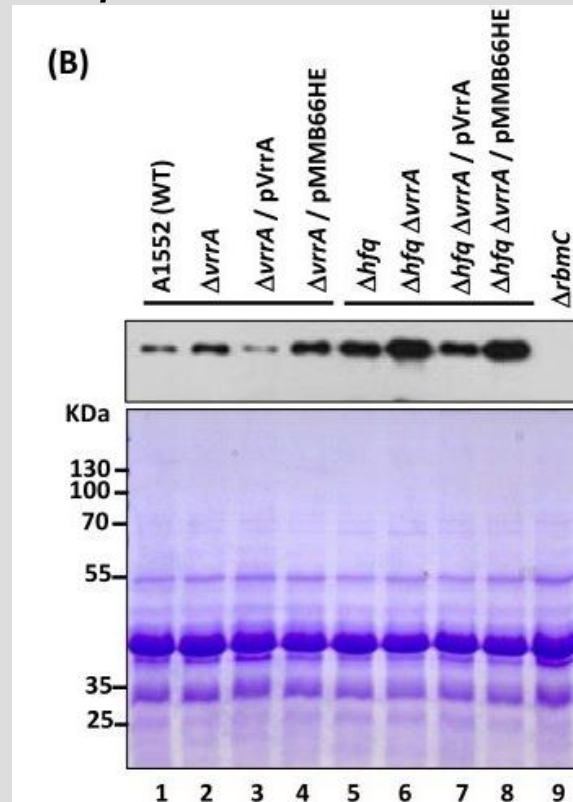
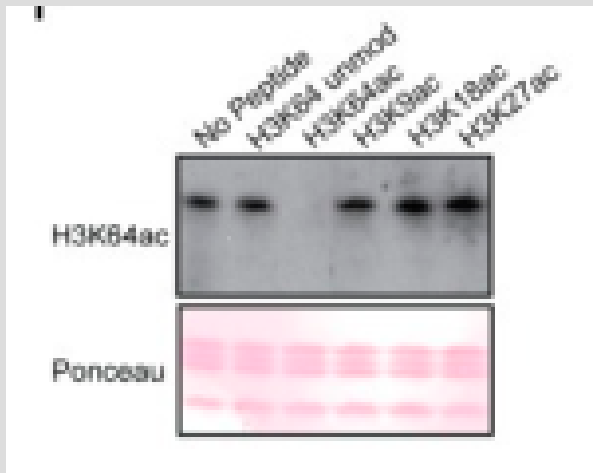
Anticuerpo primario: anti-tiorredoxina

Western blot (ejemplo)



Western blot (semi-cuantificación)

- Ponceau S o Coomassie Brilliant Blue (R-250)
- Detectar gen constitutivo: β -actina, GAPDH, tubulina, específicos de organelas.



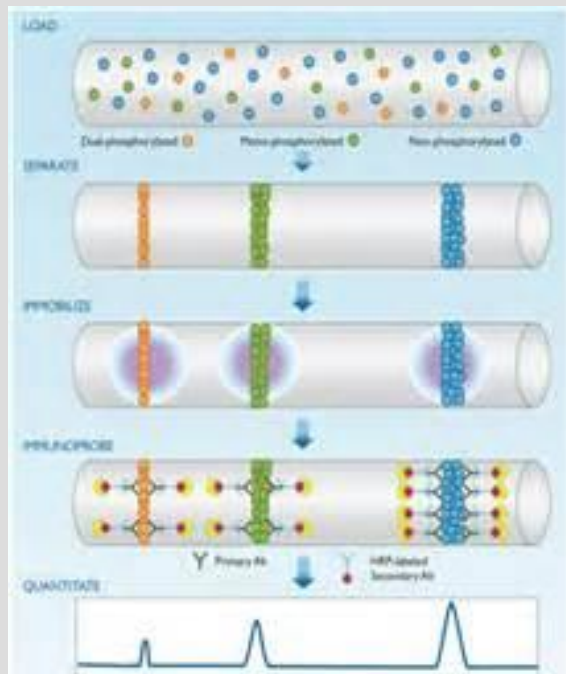
Isoelectroenfoque (IEF)

Técnica para separar moléculas en base a las diferencias en sus puntos isoeléctricos (pI)

Se agrega una solución de anfólitos (ej. proteínas) a un gel de gradiente de pH inmovilizado. Es un gel (de acrilamida, sacarosa o agarosa) de poros grandes co-polimerizado con un gradiente de pH que resulta estable. Se usan poros grandes para evitar un efecto de tamiz y artefactos en la determinación del pI por diferencias en la migración debidas al tamaño.

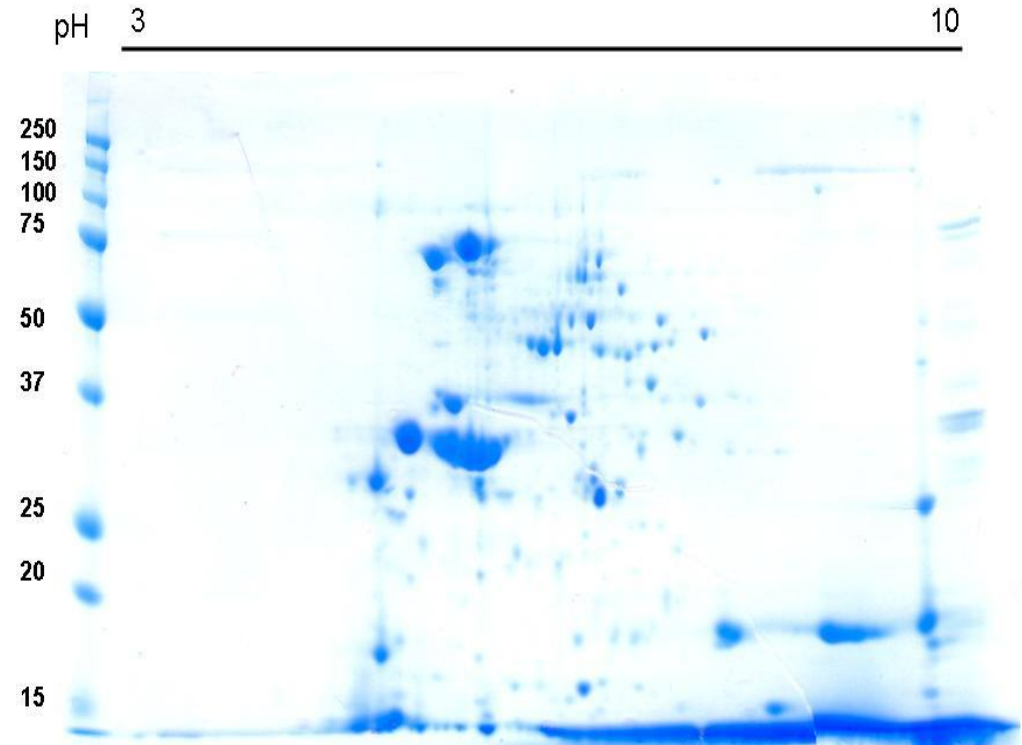
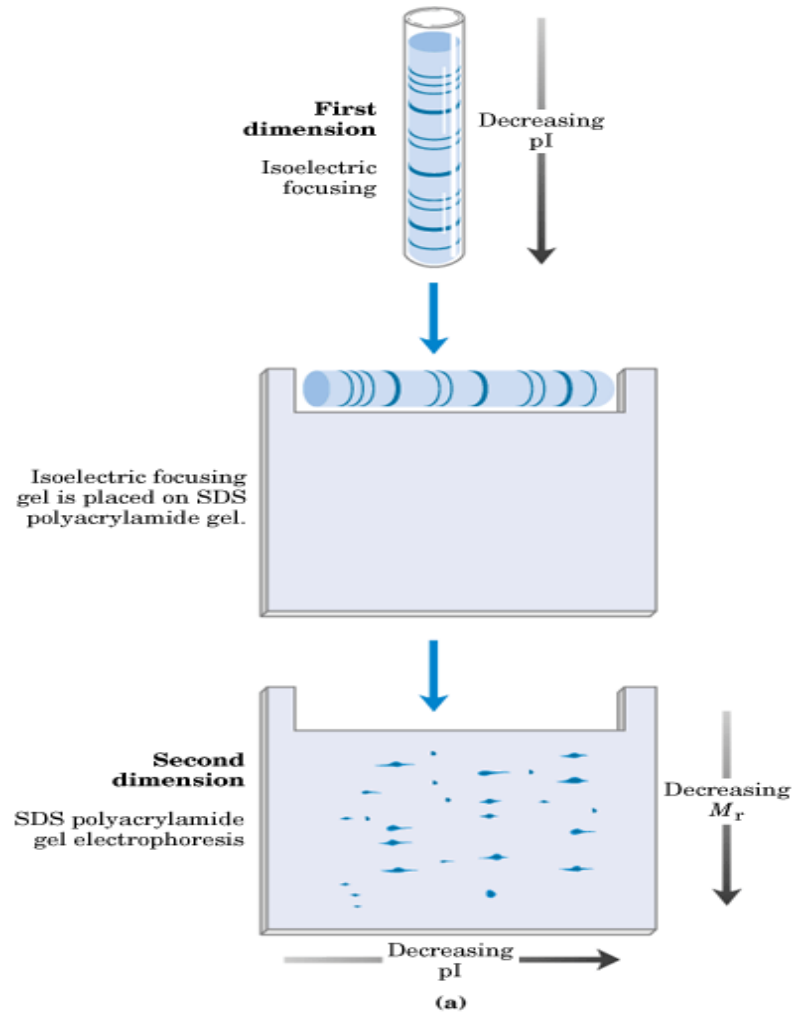
Isoelectroenfoque (IEF)

- Tiras, tubo, gel con calles
- Primera dimensión de un 2D



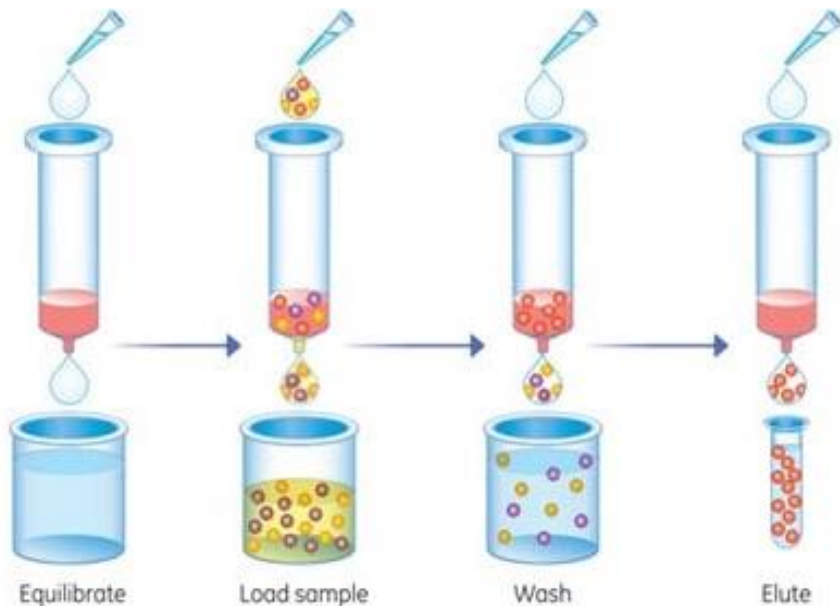
Se aplica una corriente eléctrica y las proteínas migran hacia un extremo u otro dependiendo de su carga neta que a su vez depende del pH y que va cambiando a medida que la molécula se mueve. La proteína deja de moverse y se enfoca cuando no tiene carga neta, en el punto del gradiente en el que el pH = pI. Alta resolución (separa diferencias de 0,01 en su pI).

Gels 2D



Cromatografía de afinidad

Cuando la muestra pasa por la columna, sólo son retenidas las moléculas que se unen de manera selectiva al ligando inmovilizado y las moléculas que no se unen avanzan con la fase móvil. Después, los analitos retenidos pueden ser arrastrados cambiando las condiciones de la fase móvil.



Tag	Ligando inmovilizado a matriz	Elusión
GST	GSH	GSH
Hisx6	Ni-NTA, Ni-IDA	imidazol
MBP	amilosa	maltosa
epitopes	anticuerpos específicos	pH, fuerza iónica

Expresión del ADN recombinante

Muchas Gracias

Lic. Darío Paladini

2026