

Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* utilizando un mutante de CusF como proteína de fusión

Teresa Vargas-Cortez^a, Xristo Zárate^{a,*}

^a Biotecnología 2, Facultad de Ciencias Químicas, UANL, Guerrero esq. Progreso S/N Monterrey, México.

*xristo.zaratekl@uanl.edu.mx

Palabras clave: Proteínas de fusión, proteínas recombinantes, purificación, FPLC.

Introducción

La producción de proteínas recombinantes a partir de la tecnología del ADN recombinante forma parte ya del día a día en laboratorios e industrias alrededor del mundo.¹ El procedimiento es simple y lineal, 1) se selecciona el gen que codifica para la proteína que queremos obtener, 2) se inserta dicho gen en un vector inducible, 3) el vector se transforma dentro de un organismo hospedero de expresión, 4) se expresa la proteína y 5) se purifica.¹

Sin embargo, es posible encontrarse con serias dificultades en cualquiera de los pasos antes dichos.² Por esta razón, una de las herramientas más útiles que han surgido en la historia de la producción de proteínas recombinantes, es el uso de “etiquetas de afinidad”.³ Estas etiquetas pueden ser desde pequeños péptidos hasta grandes proteínas de uno o más dominios y su principal característica es que son afines a un ligando específico, facilitando su purificación por cromatografía de afinidad.⁴

El gen de la etiqueta seleccionada se une al gen de interés bajo el mismo marco de lectura, produciendo una proteína química que conservará la afinidad al ligando específico, permitiendo su purificación.³ La etiqueta de afinidad a usar dependerá de la naturaleza de la proteína que se desee purificar y de ser posible deberá elevar su expresión y solubilidad.^{4,5} Cabe señalar, que una etiqueta de bajo peso molecular siempre será preferible ya que no intervendrá de gran manera en el rendimiento final.

En el presente proyecto se propuso el uso de una variante mutante de la proteína CusF, la cual ha sido llamada CusF3H+ como proteína de fusión para la expresión y purificación de proteínas recombinantes. La proteína CusF es parte del complejo de flujo CusCBFA de *Escherichia coli* y participa en la regulación de iones metálicos con el exterior. Debido a esto, posee una alta afinidad a los iones metálicos monovalentes Ag(I) y Cu(I). El polipéptido maduro es pequeño, de apenas 9.9 kDa y forma una estructura de barril-beta.⁶

Parte Experimental

La mutagénesis dirigida del gen CusF se realizó por PCR empleando iniciadores que incluían los codones necesarios para añadir tres histidinas en el N-terminal. La construcción de los plásmidos se realizó mediante digestión y ligación empleando el vector comercial pET30a(+), quedando la proteína de fusión entre los sitios de *NdeI* y *KpnI* y las proteínas de interés entre *NcoI* y *BamHI*. Se probaron diversas proteínas de interés, de

diferente origen y pesos moleculares con el fin de valorar la expresión y solubilidad. Para evaluar la purificación, se empleó la proteína GFP (proteína verde fluorescente) y se comparó con un *His-tag*. Finalmente, la proteína de fusión fue removida con la enzima enteroquinasa de cadena ligera y recuperada con una segunda purificación.

Resultados y discusiones

A través de mutagénesis dirigida fue posible introducir la mutación en el gen CusF, obteniendo la variante CusF3H+. La evaluación de la expresión y solubilidad demostró que CusF3H+ mejora la expresión de la proteína de interés y aumenta la solubilidad de la misma. Gracias a la modificación hecha, fue posible purificar la proteína reportera GFP empleando cromatografía IMAC con el equipo FPLC Äkta prime plus. A diferencia de su contraparte original, CusF3H+ presentó una excelente afinidad a Ni(II) mejorando mucho la pureza final obtenida. CusF3H+ permitió obtener mayores niveles de pureza en comparación con *His-tag*, evaluado también con la misma metodología. La proteína GFP se obtuvo de manera pura por medio de una segunda purificación con iones Ni(II) después del corte con enteroquinasa. Debido al pequeño peso molecular de CusF3H+, el rendimiento final de la proteína de interés fue bastante elevado.

Conclusiones

La proteína CusF fue mejorada a través mutagénesis dirigida creando la proteína CusF3H+. CusF3H+ mejora los niveles de expresión y solubilidad de las proteínas de interés probadas de una manera equiparable al *His-tag*. CusF3H+ permite la purificación mediante cromatografía tipo IMAC empleando Ni(II) elevando los niveles de pureza finales a comparación de *His-tag*. Es posible recuperar la proteína de interés con una segunda purificación después del corte con enteroquinasa para liberar la proteína de interés.

Referencias

1. Rosano GL.; Ceccarelli EA. *Front. Microbiol.* **2014**, 5, 172.
2. Stevens RC. *Structure.* **2000**, 8, R177-85.
3. Zhao, X.; Li, G.; Liang, S. *J. Anal. Methods Chem.* **2013**, 1-8.
4. Terpe, K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 60, 523-533.
5. Young, CL.; Britton, ZT.; Robinson, AS. *Biotechnol. J.* **2012**, 7, 620-634.
6. Cantu-Bustos, JE. *Protein Expr. Purif.* **2001**, 121, 61-65.