

Producción del interferón- β recombinante en *Escherichia coli* utilizando las proteínas de fusión CusF3H+ y SmbP

Arlette Yuliana Garza Ramírez^{a*}, Xristo Zárate Kalfópulos^a

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Pedro de Alba s/n, Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L., México.

*yulianagza7@gmail.com

Palabras clave: Expresión y purificación de proteínas, SmbP, Interferón- β

Introducción.

Las proteínas recombinantes son aquellas que se obtienen al expresar un gen clonado en una línea celular distinta a la original. El sistema de expresión de *Escherichia coli* es ampliamente utilizada en la industria biotecnológica para la producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos, ya que está caracterizada fisiológica como genéticamente¹. La producción de proteínas recombinantes ha mejorado gracias al uso de proteínas de fusión, estas proteínas tienen la capacidad de mejorar la solubilidad y facilitar la purificación de la proteína que se desea sintetizar². El interferón- β es una glicoproteína que presenta propiedades antivirales, actividad antiproliferativa e inmunostimuladora: limitando la presentación de antígenos. Debido a estas características se ha estudiado como tratamiento contra diversas enfermedades como: esclerosis múltiple, artritis, enfermedades infecciosas, melanomas, entre otras³. En este trabajo se propone utilizar CusF3H+ y SmbP como proteínas de fusión para la síntesis del interferón- β , logrando mejorar los procesos post-traduccionales y de purificación, obteniendo así mayores rendimientos y bajos costos de producción, para su potencial aplicación como biofármaco.

Parte experimental

Se diseñó el gen IFNB1 optimizado, que codifica para el interferón- β , con el fin de expresarse en *E. coli*, añadiendo una modificación de cambio de aminoácido en la posición Cys-17, por Ser para asegurar el correcto plegamiento de la proteína. Posteriormente se realizaron las técnicas de clonación en el plásmido pET30a, seguido de la expresión donde se probaron diferentes condiciones: Temperatura (25, 30 y 37 °C), tiempo de expresión (4, 16 y 24 h), medio de cultivo (TB y LB), concentración del inductor (0.1, 0.5 y 1mM) y densidad óptica, (0.4, 0.8, y 1 D.O₆₀₀); finalmente la etapa de purificación mediante una columna de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC), utilizando Ni(II) en la cual se utilizó como eluyente: buffer 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500mM NaCl y 200 mM imidazol; las fracciones obtenidas fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para la identificación del interferón- β .

Resultados y discusión.

Basado en los resultados obtenidos se seleccionaron las mejores condiciones de expresión: medio Terrific Broth (TB) a una

temperatura de 37°C 200 rpm, inducción con IPTG a concentración de 1mM al llegar a una D. O de 1, durante 4 h. Posteriormente para su caracterización se realizó un SDS-PAGE (Fig.1) en el cual se puede observar la banda correspondiente al peso molecular de la proteína fusionada, ~30 kDa.

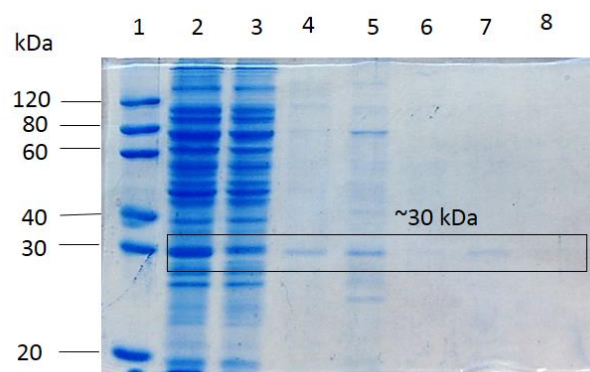


Fig. 1 SDS-PAGE 12%. Carril 1: marcador de peso molecular, 2: Muestra sin purificar, 3: fracción no unida, 4-8: fracciones de elusión.

Un parámetro crítico para la expresión de proteínas recombinantes en un sistema inducible es la temperatura, la mayoría de los artículos sugiere que la inducción se realice a bajas temperaturas para obtener altos niveles de producción y evitar la formación de cuerpos de inclusión, sin embargo, para el interferón- β , las altas temperaturas favorecieron su expresión⁴. El medio de cultivo, es otro parámetro que se debe de tomar en cuenta ya que para la expresión se debe contar con alta disponibilidad de nutrientes, motivo por el cual se decidió trabajar con el TB.

Conclusiones

Los resultados muestran que las condiciones seleccionadas son las mejores para la expresión del interferón- β en *E. coli*. Durante la purificación se observa que la proteína es afín a la resina cargada con Ni(II), sin embargo, se debe trabajar probando diferentes condiciones, para lograr mejorar la pureza del interferón- β .

Referencias

1. García, J; Santana, Z; Zumalacárregui, L; Quintana, M; González, D; Furrázola, G. *VacciMonitor*. 2013, 22,2,30-39.
2. Smith, D; Johnson, K. *Gene*. 1998, 67, 31-40.
3. Cruz, A; Rodríguez, Y; Bello, C. *Rev. Cubana Endocrinol*. 2013, 24,3.
4. Poonam, S; Palash, B; Gaurav, P; K.J, M. *Protein Expression and Purification*. 2005, 41,313-322.