



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIA
APLICADA Y TECNOLOGÍA AVANZADA,
Unida Legaria**

**Obtención Purificación y Aplicación
de Lunasin Recombinante**

M. en T. Miguel Ángel Gruital Santos

T E S I S

**Para obtener el grado de
Doctor en Tecnología Avanzada**

Directores

Dra. Sonia Teresa Silvente Kelle

Dr. José Luís Fernández Muñoz

México D. F., Diciembre de 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 18:00 horas del día 10 del mes de enero del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-IPN para examinar la tesis titulada:

Obtención Purificación y Aplicación de Lunasina Recombinante

Presentada por el alumno:

Gruital
Apellido paterno

Santos
Apellido materno

Miguel Angel
Nombre(s)

Con registro:

A	0	8	0	4	8	7
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: Doctorado en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Sonia Teresa Silvente Keller

Dr. José Luis Fernández Muñoz

Dr. Eduardo San Martín Martínez

Dra. Patricia García López

Dr. Martín Guadalupe Zapata Torres

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. José Antonio Irán Díaz Góngora



CICATA IPN
Centro de Investigación en Ciencias
Aplicada y Tecnología Avanzada
del Instituto Politécnico Nacional



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de **México D. F.** el día **23** del mes **marzo** del año **2012**, el (la) que suscribe **M. en T. Miguel Ángel Guintal Santos** alumno (a) del Programa de **Doctorado en Tecnología Avanzada** con número de registro **A080487**, adscrito a **CICATA LEGARIA**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Sonia Teresa Silvente Kelle y el Dr. José Luís Fernández Muñoz** y cede los derechos del trabajo titulado **Obtención Purificación y Aplicación de Lunasin Recombinante**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **voyager_fobos@yahoo.com.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



Miguel Ángel Guintal Santos
Nombre y firma



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACION DE DIRECTOR DE TESIS

México, D.F. a 23 de febrero de 2010

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICATA-LEG en su sesión Ordinaria No. II celebrada el día 23 del mes de febrero conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

Gruintal Santos Miguel Ángel
Apellido paterno materno nombre

Con registro:

A	0	8	0	4	8	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de: Doctor en Tecnología Avanzada

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado: obtención, purificación y aplicación de lunasina recombinante.

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos: Clonación del péptido lunasina a un vector de expresión y la transformación de *E. coli* con este vector, así como su purificación y microencapsulado.

2.- Se designan como Directores de Tesis a los C. Profesor:
Dra. Sonia Silvente Keller y Dr. José Luis Fernández Muñoz

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
En el Laboratorio de Ciencias Genómicas de la UNAM Campus Morelos.
Laboratorio de Pruebas Físicas del CICATA-IPN Leg.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Dra. Sonia Silvente Keller

Los Directores de Tesis

Dr. José Luis Fernández Muñoz

C. Miguel Ángel Gruintal Santos



El Presidente del Colegio

INVESTIGACION EN CIENCIA
Y TECNOLOGIA AVANZADA

Dr. José Antonio Irujo Díaz Gongora



El presente trabajo se realizó:

Laboratorio de Genómica Funcional de Eucariontes del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM Campus Morelos, bajo la dirección de la Dra. Sonia Teresa Silvente Kelle

Instituto Nacional de Cancerología, bajo la dirección de la Dra. Patricia García López

Laboratorio de física del Centro de investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada Unidad Legaria del IPN.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	V
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUCCIÓN	
1.1 La situación del cáncer en el mundo	
1.2 Lunasin desde su descubrimiento hasta nuestros días	
2 ANTECEDENTES	
2.1 Actividad anticancerígena de lunasin	
2.1.1 Descubrimiento de la actividad anticancerígena de lunasin	
2.1.2 Lunasin como preventivo anticancerígeno	
2.1.3 Lunasin en el tratamiento del cáncer de colon	
2.2 Contenido de lunasin en distintas semillas	
2.3 Mecanismo molecular de la actividad anticancerígena de lunasin	
2.3.1 Apoptosis	
2.3.2 Mecanismo epigenético de lunasin como anticancerígeno	
2.4 Lunasin desde el proceso digestivo hasta el torrente sanguíneo	
2.4.1 Proceso digestivo de proteínas y lunasin en el estomago	
2.4.2 Proceso digestivo de proteínas y lunasin en el duodeno y el yeyuno	
2.4.3 Digestión y absorción de péptidos en el intestino delgado	
2.4.4 Lunasin en el torrente sanguíneo	
3 JUSTIFICACIÓN	
4 OBJETIVOS	
4.1 Generales	
4.2 Particulares	
4.2.1	
4.2.2	
5 MATERIAL Y METODOS	
5.1 Técnicas	
5.1.1 Obtención de ADN geonómico de soya	

- 5.1.2 Extracción de ADN de gel de agarosa
- 5.1.3 Extracción de plásmido
- 5.1.4 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)
- 5.1.5 Clonación
- 5.1.6 Trasformación en *E. coli* DH5 α y *E. coli* M15 [pREP4]
- 5.1.7 Electroforesis
- 5.1.8 Bradford para cuantificar proteínas
- 5.1.9 Purificación de 6xHis-Proteínas
- 5.2 Medios y soluciones
 - 5.2.1 Medios de cultivo y almacenaje
 - 5.2.2 Soluciones para correr, teñir y desteñir geles
 - 5.2.3 Buffer para preparar y correr gel Tricina SDS-PAGE
 - 5.2.4 Buffer para purificar 6xHis-Proteínas
 - 5.2.5 Buffer para digerir 6xHis-Proteínas
- 5.3 Marcadores de Masa Molecular
 - 5.3.1 Marcadores de Masa Molecular de ADN
 - 5.3.2 Marcadores de Masa Molecular de proteínas
- 5.4 Enzimas
 - 5.4.1 Enzimas de restricción
 - 5.4.2 Enzima *Taq* DNA polimerasa
 - 5.4.3 Proteasas
- 5.5 Oligos
 - 5.5.1 Forward
 - 5.5.2 Rivers
- 5.6 Vectores para clonar
 - 5.6.1 Vector pJET1.2/blunt
 - 5.6.2 Vector pQE-30
 - 5.6.3 Vector pQE-40
 - 5.6.4 pREP-4
- 5.7 Secuencias
 - 5.7.1 Gen PGR97-103 de *Glycine max*
 - 5.7.2 Vector pQE-30
 - 5.7.3 Vector pQE-40
- 5.8 Gliceroles
 - 5.8.1 *E. coli* DH5 α
 - 5.8.2 *E. coli* M15 [pREP4]

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 6.1 Obtención de la proteína recombinante MRGS-6xH-GS-Lunasin
- 6.2 Obtención de la proteína recombinante M-Lunasin
- 6.3 Obtención de la proteína recombinante Lunasin
- 6.4

- 7. CONCLUSIONES**
- 8. RECOMENDACIONES**
- 9. TRABAJOS A FUTURO**
- 10. REFERENCIAS**
 - 10.1 Hemerografía
 - 10.2 Bibliografía
 - 10.3 Fuentes electrónicas
- 11. GLOSARIO**
- 12. PRODUCTOS**

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1** Causas de muerte en el mundo en el año 2011.
- Figura 1.2** Causas de muerte no trasmisibles en el promedio mundial en el año 2011.
- Figura 1.3** Estructura primaria del péptido lunasin
- Figura 2.1** Vista por Microscopia de Contraste de Fase de *Escherichia coli* DH5 α , durante la expresión de la proteína: a) lunasin (43 aa), en este caso no se observa la formación de septos y eventualmente las células mueren, b) lunasin sin 9xAsp-coo⁻ (34 aa), en este caso si hay formación de septos como lo señalan las flechas, las células parecen tener un crecimiento y división celular normal, la línea corresponde a 5 μ m.
- Figura 2.2** Células hepatoma mureína, Hepa 1c1c7.
- 1- Vista por Microscopía de Contraste de Fase de células de 48 h después de ser transfectadas con la secuencia GFP-Lunasin sin 9xAsp-coo⁻, las flechas en negro son células no transfectadas y las flechas en blanco son células transfectadas.
 - 2- Misma toma que en 1, donde solo se observa la fluorescencia verde de la proteína “GFP-lunasin sin 9xAsp-coo⁻” expresada, comparar flechas blancas en 1 y 2.
 - 3- Florescencia roja del ADN teñido con yoduro de propidio (PI) en células transfectadas con la secuencia GFP-Lunasin sin 9xAsp-coo⁻, flechas blancas.
 - 4- Células de 48h de ser transfectadas con la secuencia lunasin, se observa a la célula que fue transfectada y sufrió lisis junto a la que no fue transfectada y continua intacta.
 - 5- Vista por Microscopia de Contraste de Fase de células de 48h después de ser transfectadas con la secuencia lunasin, donde se observa la fragmentación del ADN por el método TUNEL.
 - 6- Célula de 72h de ser transfectada con la secuencia lunasin, la fluorescencia amarilla muestra la fragmentación del ADN, producida por la exposición de las partes terminales del ADN.
 - 7- Vista por Microscopía de Contraste de Fase de célula de 72h después de ser transfectada con la secuencia GFP-Lunasin donde la lisis celular ocurre.
 - 8- Florescencia verde de célula transfectada con la secuencia GFP- lunasin.
- Figura 2.3** Interacción de lunasin con oxaliplatino en células de cáncer de colon KM12L4, ■ oxaliplatino, ■ oxaliplatino con lunasin 10 μ M y □ oxaliplatino con lunasin 25 μ M. La barra de error indica la desviación estándar, * indica la diferencia de significancia, $p < 0.05$, $n = 3$.

Figura 2.4 Mecanismos de señalización que conduce a apoptosis, a) Cascada generada por cambios en la permeabilidad de la membrana, b) Cascada generada por receptores transmembranales de muerte.

Figura 2.5 Secuencia de la proteína lunasin, del aminoácido 1 al 22 su actividad es desconocida, del 23 al 31 dirige lunasin a las histonas, del 32 al 34 internaliza lunasin a la célula, del 33 al 35 internaliza lunasin al núcleo, del 36 al 43 se une a lisinas de histonas desacetiladas.

Figura 2.6 Liberación de los factores de transcripción E2F y DP por cdk o por la oncoproteína E1A.

Figura 2.7 Estructura del nucleosoma, las histonas H3 y H4 se organizan formando dímeros que a su vez forman tetrameros, las histonas H2A y H2B también se organizan en dímeros, dos dímeros H2A-H2B posteriormente se agregan al tetramero H3-H4 formando un octámero de histonas, estas cuatro histonas son llamadas *core* o nucleares. Por cada octámero el ADN da 1.7 vueltas, Steven *et al.* (2002).

Figura 2.8 Modelo que explica el mecanismo de acción de lunasin como anticancerígeno preventivo.

yGCN5 y PCAF	Enzimas Histonas Acetil Trasferasas (HAT)
CBP y p300	Regulan la trascrición, Vo y Goodman (2001)
HDAC	Enzima histona desacetilasa
HAC	Enzima histona acetilasa
	Conjunto de histonas <i>core</i> (ver figura 2.5)
	Histonas H1, son histonas <i>linker</i> o externas
	Nucleosoma, el cual tiene 1.7 vueltas de ADN, las histonas <i>core</i> se encuentran acetiladas
Ac	Grupo acetilo ($-\text{COCH}_3$)

Figura 2.9 Representación esquemática de las partes del estomago.

Figura 2.10 Producto de hidrólisis de lunasin causado pos la pepsina, la cual digiere en los aminoácidos Fenilalanina (F), Tirosina (Y) y Triptófano (T) del lado amino. Esta digestión genera dos péptido, 1) del aa 1-19 y 2) del aa 20- 43.

Figura 2.11 Duodeno y su conexión con: el Hígado, la Vesícula y el Páncreas, a) se observa el esfínter de Oddi en el duodeno, b) El yeyuno y su conexión con el duodeno y el íleon.

- Figura 2.12** Producto de hidrólisis de lunasin causado por la tripsina, la cual digiere del lado Carboxilo donde haya Arginina (R) o Lisina (K). Esta digestión genera cinco péptidos y un aminoácido libre, 1) del aa 1-11, 2) aa 12, 3) del aa 13-24, 4) del aa 25-29, 5) del aa 30-33 y 6) del aa 34-43.
- Figura 2.9** Contenidos de lunasin (➕) y del péptido inhibidos de proteasa de Bowman Birk (BBI) (➖), desde 0 hasta 120min, a) durante la digestión con Fluido Gástrico Simulado, SGF, b) durante la digestión con Fluido Intestinal Simulado, SIF.
- Figura 2.14** Representación del interior del intestino delgado, desde el duodeno hasta la válvula ileocecal la estructura es similar.
- Figura 2.15** Estructura interna del intestino delgado, a) vista interna del duodeno, b) La imagen muestra la cripta de Lieberkühn, situada entre las vellosidades de todas las regiones del intestino delgado.
- Figura 5.1** Gel TAE-agarosa 0.8%, visualizado con Bromuro de Etidio, Marca: BioLabs Ing, Almacenar a -20°C. Marcador de Masa Molecular de ADN de 1kpb.¹
- Figura 5.2** Gel TAE-agarosa 1.3%, visualizado con Bromuro de Etidio, Marca: BioLabs Ing, Almacenar a -20°C. Marcador de Masa Molecular de DNA de 100pb.²
- Figura 5.3** Gel TAE-agarosa 1.8%, visualizado con Bromuro de Etidio, Marca: BioLabs Ing, Almacenar a -20°C. Marcador de Masa Molecular de DNA de 50pb.³
- Figura 5.4** Gel 20% Tris-HCl SDS-PAGE, cargados a la columna 10µL, Teñido con Azul de Coomassie R-250. Compañía Bio-Rad, Número de catalogo 161-0372, almacenar a -20°C.⁴
- Figura 5.5** Gel 18% Tris-HCl SDS-PAGE, Marcador de Masa Molecular de bajo rango (2.5 a 45 kDa), Compañía: Fermentas, número de catalogo: SM1861, almacenar a -20°C.⁵
- Figura 6.6** Tipo TL (●) Cuajo de ternera (■) y Tipo XL (◇)
- Figura 6.7** Tipo TL (●), Tipo XL (◇) y Cuajo de ternera (■).

¹ Revisar referencias electrónicas.

² Revisar referencias electrónicas.

³ Revisar referencias electrónicas.

⁴ Revisar referencias electrónicas.

⁵ Revisar referencias electrónicas.

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.1** Estadísticas de 14 tipos de cáncer de un total de 79 causas de muerte en los 189 países del mundo (2011) organización Mundial de la salud, Esperanza de vida en el promedio mundial 65.8 años
- Tabla 2.1** IC₅₀ de células de cáncer de colon y sus variedades resistentes al oxaliplatino.
- Tabla 2.2** Amaranto, *Amaranthus hypochondriacus*, Silva *et al.*, (2008).
- Tabla 2.3** Cebada, *Hordeum vulgare*, Hyung *et al.*, (2002).
- Tabla 2.4** Trigo, *Triticum spp.*, Hernández *et al.*, (2008).
- Tabla 2.5** Linterna China, *Physalis alkekengi var. Franchetti*, Jin *et al.*, (2007).
- Tabla 2.7** *Solanum nigrum l.*, Jin *et al.*, (2007).
- Tabla 2.8** Toloache, *Datura stramonium*, Jin *et al.*, (2007).
- Tabla 2.7** *Solanum nigrum l.*, Jin *et al.*, (2007).
- Tabla 2.8** Toloache, *Datura stramonium*, Jin *et al.*, (2007).
- Tabla 2.9** Concentración de lunasin en diferentes variedades de soya (*Glycine max*), Elvira *et al.*, (2004)^a, Hyung *et. al.*, (2007)^b y Hernández *et al.*, (2008)^c.
- Tabla 2.10** Concentración de lunasin en plasma sanguíneo después de 0.5 y 1h de consumir 155.5mg lunasin en 50g de proteína de soya, determinado por la técnica ELISA.
- Tabla 5.1** Condiciones de corrida del PCR.
- Tabla 5.2** Preparación de geles de agarosa.
- Tabla 5.3** Preparación de gel glicina SDS-PAGE.
- Tabla 5.4** Preparacion del stack.
- Tabla 5.5** Preparacion de geles tricina SDS-PAGE.
- Tabla 5.6** Preparacion del stack para gel tricina SDS-PAGE.
- Tabla 5.7** Voltage y tiempo requerido al inicio de la corrida del gel tricina SDS-PAGE.

- Tabla 5.8** Voltage y tiempo requerido al inicio de la corrida del gel tricina SDS-PAGE.
- Tabla 5.9** Voltage y tiempo requerido al inicio de la corrida del gel tricina SDS-PAGE.
- Tabla 5.10** Voltage y tiempo requerido al inicio de la corrida del gel tricina SDS-PAGE.
- Tabla 5.12** Péptidos esperados y sus Masas Moleculares en kDa.
- Tabla 5.13** Secuencia y características del oligo Forward, 1723 Unidad de Síntesis y Secuenciación.
- Tabla 5.14** Secuencia y características del oligo Forward, 4555 Unidad de Síntesis y Secuenciación.
- Tabla 5.15** Secuencia y características del oligo Forward, 1120 Unidad de síntesis y secuenciación.
- Tabla 5.16** Secuencia y características del oligo Forward, 1119 Unidad de síntesis y secuenciación.
- Tabla 5.17** Secuencia y características del oligo rivers, 1724 Unidad de síntesis y secuenciación.
- Tabla 5.18** Secuencia y características del oligo rivers, 1121 Unidad de síntesis y secuenciación.
- Tabla 5.19** Elementos genéticos del vector pJET1.2/blunt.
- Tabla 5.20** Enzimas que cortan a pJET1.2/blunt.
- Tabla 5.21** Enzimas que no cortan a pJET1.2/blunt.
- Tabla 5.22** Sitio Múltiple de Clónaje (MCS) de pJET1.2/blunt.
- Tabla 5.24** Sitio Múltiple de Clónaje (MCS) del Vector pQE-30.
- Tabla 5.26** Sitio Múltiple de Clónaje (MCS) del Vector pQE-40.
- Tabla 5.27** Gen PGR97-103 de *Glycine max*, con sus elementos genéticos.
- Tabla 5.28** Vector pQE-30 con sus elementos genéticos.
- Tabla 5.29** Secuencia del Vector pQE-40 con sus elementos genéticos
- Tabla 5.30** Características del glicerol de *E. coli* DH5 α , creado el 22/sep./2009.

- Tabla 5.31** Características del glicerol de *E. coli* DH5 α , creado el 30/abr./2010.
- Tabla 5.32** Características del glicerol de *E. coli* DH5 α , creado el 08/oct./2009.
- Tabla 5.33** Características del glicerol de *E. coli* M15 [pREP4], creado el 14/oct./2009.
- Tabla 5.34** Características del glicerol de *E. coli* M15 [pREP4], creado el 14/oct./2009.
- Tabla 5.35** Características del glicerol de *E. coli* M15 [pREP4], creado el 31/mar./2010.
- Tabla 5.36** Características del glicerol de *E. coli* M15 [pREP4], creado el 06/mayo/2010.
- Tabla 5.37** Características del glicerol de *E. coli* M15 [pREP4], creado el 12/mayo/2010.
- Figura 6.15** Proteína 6xHis-DHFR-Factor Xa-Lunasin de M. M. 28.968 kDa, fila 1) Secuencia de aminoácidos, 2) Aminoácidos polares (Po) 68 aa, 27.1%, no polares (NP) 92 aa, 36.7%, cargados entre pH 6.0 a 7.0, con carga (+) 54 aa, 21.5% y con carga (-) 37 aa, 14.7%.

ABREVIATURAS

AB -1.6	Acrilamida Bisacrilamida-Reticulador 1.6%
AIF	Factor Inductor de Apoptosis
Apaf-1	Apoptosis Protease Activating factor-1
APS	
BBI	Inhibidor de Proteasa de Bowman Birk
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BIR	Baculovirus IAP Repeat
BSA	albúmina bovina fracción V (BSA, Sigma)
CARD	
Cdk	Quinasa (o cinasas) dependiente de ciclina
Cfr.	Confrontar
Dc	Decoy receptors (Receptores señuelo)
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DHFR	Dihidrofolato Reductasa
DMBA	7,12-dimethylbenz(α)anthracene
DR	Death Receptors
FADD	Faz Associating Protein with Death Domain
HAT	Enzimas Histonas Acetil Trasferasas
IAPs	Proteínas Inhibidoras de Apoptosis
LB	Luria Broth
MCS	Multiple Cloning Site
OD ₆₀₀	Densidad Óptica con $\lambda=600\text{nm}$
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SENCAR	SENSitive to CARcinogenesis
SGF	Fluido Gástrico Simulado
SIF	Fluido Intestinal Simulado
SLS	Lauril Sulfato de Sodio
SODD	Silencer Of Death Domains
SODD	Silenciadora de los dDominios de Muerte
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-metil-etileno-diamina
TNF	Receptor del factor de Necrosis Tumoral
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
UFC	Unidades Formadoras de Colonia

RESUMEN

El cáncer en la actualidad representa la segunda causa de muerte en el promedio mundial, para el desarrollo de este trabajo proponemos utilizar un compuesto que tenga actividad anticancerígena como preventivo, para que un compuesto pueda ser utilizado como preventivo necesitamos que no sea tóxico, que tenga un amplio espectro de acción, es decir que proteja contra una gran variedad de tipos de cánceres y que sea de un costo accesible para que pueda tener un impacto a las diferentes clases sociales. Lunasina fue descubierto en semillas de soya y es donde se encuentra en mayor cantidad no es tóxica, presenta actividad anticancerígena probada en cáncer de mama, colon, próstata leucemia y piel, por esta razón decidimos proponer la utilización de este péptido, pero tiene los inconvenientes que actualmente es muy costosa su obtención, como es un péptido se pierde aproximadamente 95% durante el sistema digestivo, una opción podría ser consumir soya directamente ya que es la semilla que más la contiene, pero de todas formas se encuentra en muy poca cantidad y siempre se perdería durante la digestión otro inconveniente es que el consumo de soya en el promedio mundial se muy reducido. Por estas razones proponemos clonar la secuencia de ADN de lunasina y transformar a *E. coli* en un sistema de sobre expresión que nos permita obtenerla, durante el proceso de expresión de la proteína se presentaron problemas para poder obtenerla y nos dimos cuenta que el problema radica en que la proteína es demasiado pequeña de apenas 4.5 kDa, para resolver este inconveniente propusimos anclarla a la proteína DHFR con sitio de digestión para Factor Xa y de esta manera obtener a lunasina libre, los problemas que se presentaron fueron que debido que la secuencia DHFR contiene una secuencia de 6xHis la cual le confiere carga negativa a toda la proteína en un intervalo de pH entre 6 a 7 y la secuencia de ácidos grasos que tiene lunasina se encuentra cargado negativamente se produce un proceso de polimerización haciendo imposible la obtención de lunasina libre, por estas razones decidimos buscar un nuevo camino, el cual fue clonar a la proteína lunasin con la misma proteasa DHFR pero con un sitio de corte para la proteasa aspártica la cual tiene la ventaja que su actividad se encuentra en un pH ácido y su costo que es muy económica, logramos corregir el problema de la digestión por este camino pero nos trajo nuevos inconvenientes el principal fue que digiere a la proteína de anclaje DHFR produciendo una mezcla donde es muy difícil obtener a lunasina pura, para poder resolver este problema proponemos continuar con la misma proteasa aspártica debido a que no digiere a lunasina y que es muy económica, para esto sería necesario utilizar a lunasina como proteína de anclaje es decir construir una secuencia que contenga unas 3 copias de lunasina con sitios intermedios de corte para la proteasa aspártica de tal manera que al digerirla obtengamos secuencias de lunasina, el problema de la purificación que produce la secuencia de 6xHis se resolvería a través de clonarla esta secuencia sin los 6xHis y su purificación se realizaría a través de resina de intercambio iónico, para resolver el problema de la pérdida debida a la digestión proponemos utilizar una microcapsula entérica que permita que lunasina solo sea liberada en el intestino delgado, como la digestión de las proteínas continúa todavía en este sitio proponemos que lunasina se encuentre mezclada con ácido ascórbico ya que este produciría un ambiente ácido alrededor de lunasina inhibiendo a las proteasa que puedan atacar a lunasina dando todavía mayor posibilidad de que se mantenga

intacta para que pueda atravesar el epitelio intestinal y finalmente llegar al torrente sanguíneo otra forma en la cual se podría utilizar a lunasina es en cremas para la piel ya que se ha demostrado que reduce la probabilidad del cáncer de piel hasta en un 75% en este caso se podría micro encapsular en liposomas y con esto aumentaríamos la probabilidad de absorción.

ABSTRACT

Cancer is currently the second leading cause of death in the world average for the development of this work we propose to use a compound having anticancer activity as a preventative, so that a compound can be used as a preventative need not be toxic, have a broad spectrum of action, ie to protect against a variety of types of cancers and that is affordable so you can have an impact on different social classes. Lunasin was found in soybeans and is home to a greater amount is not toxic, it has proven anti-cancer activity in breast cancer, colon, prostate, leukemia and skin, therefore desidimosproponer the use of this peptide, but has the disadvantages is currently very expensive to obtain, such as a peptide loses about 95% during the digestive system, one option could be consumed directly as soybean seed is more contained, but still is in very small quantities and always be lost during digestion other drawback is that soy consumption in the global average is very low. For these reasons we propose to clone the DNA sequence of lunasin and transform E. coli overexpression system that allows us to obtain, during the process of protein expression were problems to get it and we realized that the problem is that the protein is too small, just 4.5 kDa, to solve this problem proposed to anchor the protein DHFR with digestion site for Factor Xa and thus obtain a free lunasin, the problems that arose were that because the basin is DHFR contains a 6xHis sequence which confers negative charge to the entire protein in a pH range from 6 to 7 and paragraphs acid sequence that has lunasin is negatively charged is a polymerization process making it impossible to obtain free lunasin for these reasons we decided to seek a new path, which was cloned lunasin protein with the same protease DHFR but with a cutting site for protease stateless which has the advantage that its activity is at acidic pH and its cost is very economical, we can correct the problem this way digestion brought new problems but the main one was that digests protein DHFR anchor producing a mixture which is very difficult to obtain a pure lunasin in order to solve this problem we propose to continue with the same protease apart because not digested lunasin and is very economical, for this would be necessary to use as spike protein lunasin ie construct a sequence containing a 3 copies of lunasin with cutting intermediate sites for aspartic protease to digest so that lunasin obtain sequences, the problem of purification of 6xHis sequence occurs dare to clone it would solve this sequence without purification of 6xHis and dare be held ion exchange resin, to solve the problem of loss due to digestion propose to use an enteric microcapsule lunasin let alone be released into the small intestine, as the digestion of proteins on this site still continues propose that lunasin is mixed with ascorbic acid as this would produce an acidic environment around the protease inhibiting lunasin they can to lunasin danto to even greater ability to remain intact Paraquad can cross the intestinal epithelium and finally reach the bloodstream in which otherwise could be used to lunasin is in skin creams because it has been shown to reduce the likelihood of skin cancer by up to 75% in this case could be micro-encapsulated in liposomes and thereby increase the likelihood of absorption.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La situación del cáncer en el mundo

La Organización Mundial de la Salud¹ prevé que a nivel mundial, la mortalidad por cáncer aumentará un 45% del 2007 al 2030 (pasará de 7.9 millones a 11.5 millones de defunciones). En las estimaciones se han tenido en cuenta las ligeras reducciones previstas de la mortalidad por algunos tipos de cáncer en países con grandes recursos. Se estima que durante el mismo lapso el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 millones en 2007 a 15.5 millones en 2030.

En la tabla 1.1 se muestran todas las causas de muerte divididas en 3 grupos donde el que se lleva el mayor número de decesos es el grupo de las no transmisibles con un 61% del total de las defunciones.

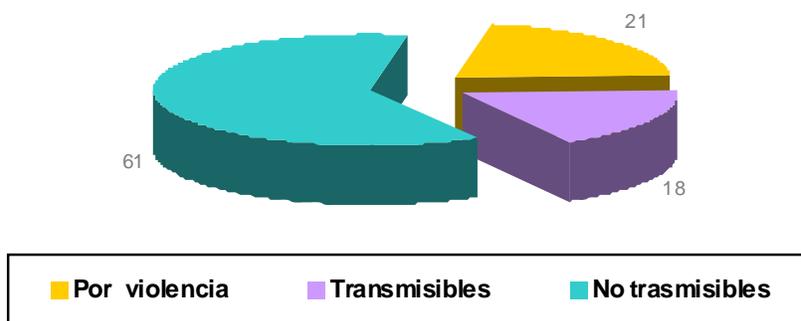


Figura 1.1 Causas de muerte en el mundo en el año 2011.

En la mayor parte de los países desarrollados el cáncer es la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares figura 1.2, los datos epidemiológicos muestran el comienzo de esta tendencia en los países subdesarrollados, en particular en aquellos en transición y de ingresos medianos, por ejemplo en América del Sur y Asia.

¹ Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

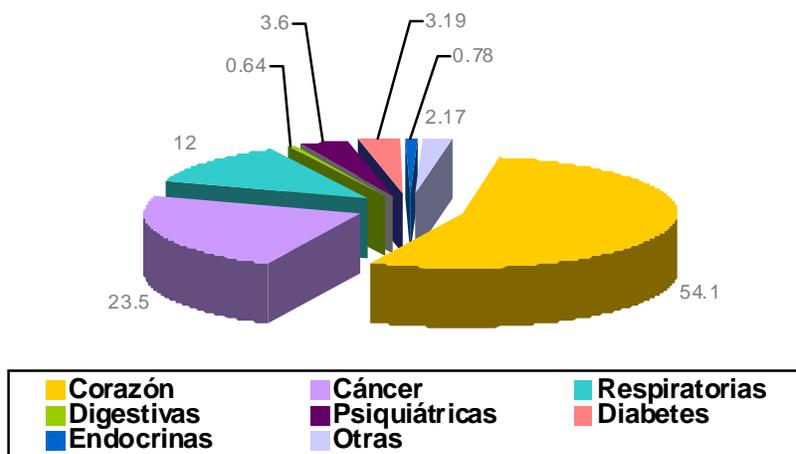


Figura 1.2 Causas de muerte no trasmisibles en el promedio mundial en el año 2011.

El cáncer pulmonar mata a más gente que cualquier otro tipo de cáncer y se prevé un aumento de esta tendencia hasta 2030 a menos que se intensifiquen mucho las actividades de control mundial del tabaquismo. Algunos tipos de cáncer, como los de próstata, mama y colon, son más frecuentes en los países desarrollados. Otros tipos de cáncer, como los de hígado, estómago y cuello uterino, son más frecuentes en los países en desarrollo.

Cáncer	Posición	Cáncer	Posición
1 Pulmón	9	8 Cervical	40
2 Estomago	15	9 Páncreas	41
3 Colon	19	10 Vejiga	43
4 Hígado	20	11 Ovario	48
5 Mama	23	12 Oral	48
6 Estómago	24	13 Útero	55
7 Próstata	35	14 Piel	56

Tabla 1.1 Estadísticas de 14 tipos de cáncer de un total de 79 causas de muerte en los 189 países del mundo (2011) organización Mundial de la salud, Esperanza de vida en el promedio mundial 65.8 años

La aparición de cáncer se ha asociado a varios factores de riesgo comunes, a saber: un modo de vida poco sano (consumo de tabaco y alcohol, dieta inadecuada, falta de actividad física) y exposición a carcinógenos (por ejemplo asbesto) en el entorno laboral o en el medio ambiente (por ejemplo por contaminación del aire en locales cerrados), radiación (por ejemplo ultravioleta o ionizante) y algunas infecciones (por ejemplo hepatitis B o infección por virus del papiloma humano).

1.2 Lunasin desde su descubrimiento hasta nuestros días

Lunasin² fue descubierta y aislada por primera vez por Shoji *et al.* (1987) en la Universidad de Niigata Japón, de un extracto de semillas de soya (*Glycine max*) en etanol al 60% por cromatografía de intercambio iónico y por cromatografía en fase reversa, determinó su MM aparente en 4.4kDa (MM real 5.028kDa), observó que el péptido tenía una secuencia de unión a células sustitutas (aa 33-34-35) figura 1.1 y contenía una secuencia inusual de ácidos aspárticos del lado carboxilo terminal (aa 35 al 43) figura 1.3, por esta razón lo nombró “péptido de frijol de soya rico en ácidos aspárticos”, pero no fue hasta el 2001 que O. de Lumen la dio a conocer como lunasin lunasin, debido a que el es de origen filipino tomo este vocablo del tagalo que significa “para curar”, Galvez *et al.* (2001).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S	K	W	Q	H	Q	Q	D	S	C	R	K	Q	L	Q	G	V	N	L	T
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
P	C	E	K	H	I	M	E	K	I	Q	G	R	G	D	D	D	D	D	D
41	42	43																	
D	D	D																	

Figura 1.3 Estructura primaria del péptido lunasin

Tuvieron que transcurrir 10 años más desde el descubrimiento de lunasin en 1987, para que aparecieran más publicaciones al respecto, las cuales fueron realizadas por O. de Lumen de la Universidad de Berkeley Ca., quien descubrió un gen de 770pb en soya (*Glycine max*), que se le asigno el nombre de PGR97-103 (sección 5.7.1), que codifica para una nueva proteína albúmina rica en metioninas la cual fue nombrada como Gm2S-1, posteriormente se dio cuenta que del triplete 27 al 69 de este gen codificaba para la proteína lunasin y que esta proteína es liberada de la proteína Gm2S-1 por un proceso postranscripcional Galvez *et al.* (1997).

Galvez *et al.* (1999) Al clonar el gen de lunasin y transformar en *E. coli* observaron que durante el proceso de división celular en la fase G1/S no se formaban septos y eventualmente las células morían, debido a que lunasin detiene el ciclo celular en la fase G1/S decidieron probarla en modelos de células cancerígenas de mamíferos y observaron el mismo efecto antimitótico, de esta manera descubrieron la actividad anticancerígena de lunasin.

Desde su descubrimiento hasta nuestros días han transcurrido 24 años, cada año se esclarecen detalles de su mecanismo de acción, se prueba lunasin en nuevos modelos de cáncer tanto en

² El genero de la palabra lunasin la tomamos como femenino

vitro como en vivo, se descubre su presencia en otras semillas y se comprende un poco más sobre su mecanismo de absorción.

Por otra parte se han llevado acabo unas 50 publicaciones realizadas en un total de 6 centros de investigación (Universidad de California, Berkeley Ca. USA, Universidad de Illinois, en Urbana Champaign, USA, Instituto Potosino de Investigaciones Científicas y Tecnológicas México, Universidad Nacional de Taiwán, Taipei, Taiwán, Universidad de Niigata, Niigata, Japón y por nosotros del Centro de Ciencias Genómicas UNAM, Instituto Nacional de Cancerológica y Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, Unidad Legaria, México), donde las investigaciones están encabezadas por Estados Unido, seguidas por México posteriormente Taiwán y en ultimo lugar Japón.

A pesar de los esfuerzos realizados por los distintos grupos de investigación para lograr la obtención de lunasin por un método económicamente rentable todavía no ha sido posible, pero nos estamos acercando cada día más.

2 ANTECEDENTES

2.1 Actividad anticancerígena de lunasin

2.1.1 Descubrimiento de la actividad anticancerígena de lunasin

Galvez *et al.* (1999) clonaron por primera vez la secuencia de ADN que codifica para la proteína lunasin en el vector pFLAG-1 y con esta construcción transformaron a células competentes *E. coli* DH5 α , durante el proceso de la inducción de la expresión de la proteína recombinante observaron que había una reducción del crecimiento bacteriano, esto los llevo a realizar pruebas por microscopía de contraste de fase para determinar la causa de este fenómeno, observaron una anormal formación en el proceso de elongación durante la fase de división celular (G1/S), notaron que no existía formación de septos y que eventualmente las células morían figura 2.1 a, posteriormente clonaron y transformaron con el mismo vector y la misma cepa de *E. coli*, la secuencia que codifica para la proteína lunasin (sección 5.7.1), del aminoácidos 1 al 34, es decir lunasin sin los Asp del lado carboxilo termina (lunasin sin 9xAsp-coo⁻) y observaron un crecimiento y división celular normal, figura 2.1 b.

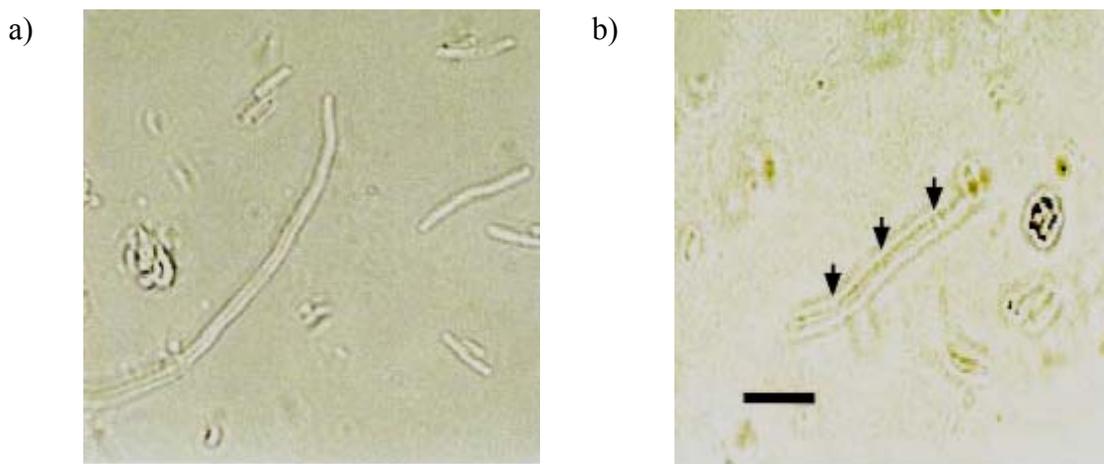


Figura 2.1 Vista por Microscopía de Contraste de Fase de *Escherichia coli* DH5 α , durante la expresión de la proteína: a) lunasin (43 aa), en este caso no se observa la formación de septos y eventualmente las células mueren, b) lunasin sin 9xAsp-coo⁻ (34 aa), en este caso si hay formación de septos como lo señalan las flechas, las células parecen tener un crecimiento y división celular normal, la línea corresponde a 5 μ m.

Debido a que lunasin detiene el ciclo de división en una célula procariota (*E. coli*) en la fase G1/S, pensaron que talvez podría utilizarse para el mismo fin en células cancerígenas de mamíferos. Por esta razón decidieron transfectar a células: Hepa 1c1c7, figura 2.2, MCF-7 y C3H 10T1/2 datos no mostrados, con GFP-lunasin (proteína verde fluorescente-lunasin) y GFP-lunasin sin 9xAsp-coo⁻.

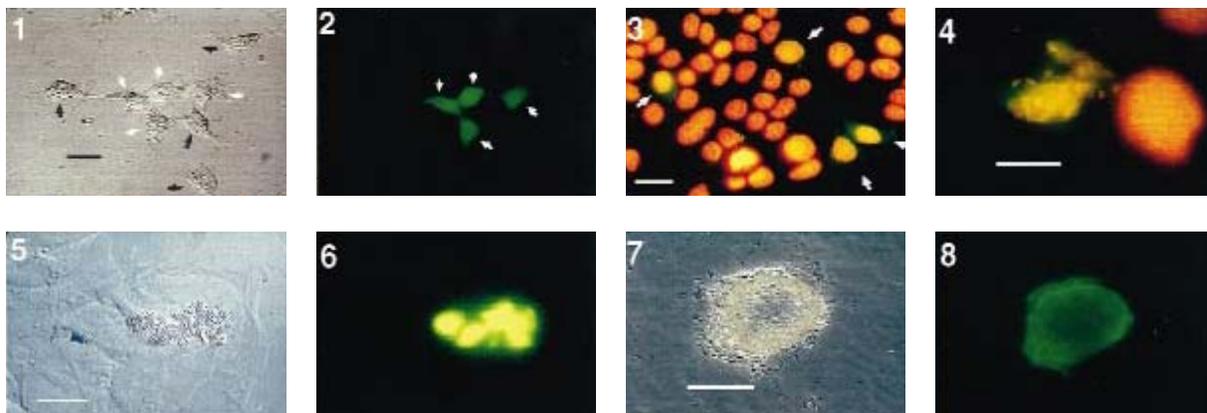


Figura 2.2 Células hepatoma mureína, Hepa 1c1c7.

- 1- Vista por Microscopía de Contraste de Fase de células de 48 h después de ser transfectadas con la secuencia GFP-Lunasin sin 9xAsp-coo⁻, las flechas en negro son células no transfectadas y las flechas en blanco son células transfectadas.
- 2- Misma toma que en 1, donde solo se observa la fluorescencia verde de la proteína “GFP-lunasin sin 9xAsp-coo⁻” expresada, comparar flechas blancas en 1 y 2.
- 3- Florescencia roja del ADN teñido con yoduro de propidio (PI) en células transfectadas con la secuencia GFP-Lunasin sin 9xAsp-coo⁻, flechas blancas.
- 4- Células de 48h de ser transfectadas con la secuencia lunasin, se observa a la célula que fue transfectada y sufrió lisis junto a la que no fue transfectada y continua intacta.
- 5- Vista por Microscopía de Contraste de Fase de células de 48h después de ser transfectadas con la secuencia lunasin, donde se observa la fragmentación del ADN por el método TUNEL.
- 6- Célula de 72h de ser transfectada con la secuencia lunasin, la fluorescencia amarilla muestra la fragmentación del ADN, producida por la exposición de las partes terminales del ADN.
- 7- Vista por Microscopía de Contraste de Fase de célula de 72h después de ser transfectada con la secuencia GFP-Lunasin donde la lisis celular ocurre.
- 8- Florescencia verde de célula transfectada con la secuencia GFP- lunasin.

2.1.2 Lunasin como preventivo anticancerígeno

i) Cáncer de piel

Elaine *et al.* (2004), realizaron pruebas de cáncer de piel en ratones SENCAR utilizando como carcinogénicos a DMBA y TPA por administración tópica durante 3 semanas y como anticancerígeno aplicaron lunasin con una concentración de 0.625mg/mL a 3cm² de piel dos veces a la semana por 4 semanas, observaron que se reducía la formación de queratinocitos entre 9 a 16%.

Otras pruebas realizadas también en ratones SENCAR y como agentes carcinogénicos DMBA y TPA aplicando 250µg de lunasin/semana, observaron que se reduce la incidencia de tumores de piel hasta en un 70% comparado con los ratones no tratados, Galvez *et al.* (2001).

ii) Cáncer de mama

Concentración de lunasin 10µM

Oncoproteína E1A

Pero no inhibe el crecimiento de líneas celulares inmortalizadas y establecidas como cancerígenas

Células MCF-7 de cáncer de mama

Las células fueron incubadas toda la noche

Lam *et al.* (2003)

Cáncer de mama humano MDA-MB-231

iii) Fibroblastos

Células NIH 3T3 fibroblastos

Concentración de lunasin 10µM

Oncoproteína E1A

Pero no inhibe el crecimiento de líneas celulares inmortalizadas y establecidas como cancerígenas

Lam *et al.* (2003)

iv) Leucemia

Causa apoptosis a células de leucemia L1210 a través de la activación de la caspasa 3
De Mejia *et al.* (2010)

2.1.3 Lunasin en el tratamiento del cáncer de colon

Lunasin se ha probado con una concertación entre 5 a 25 μ M en líneas celulares de cáncer de colon metastático: HCT-116, HT-29 y KM12L4 y sus variedades resistentes al oxaliplatino (OxR), que es utilizado ampliamente en el tratamiento de este tipo de cáncer, HCT-116OxR, HT-29OxR y KM12L4OxR, HT-29OxR, en la única línea celular donde no se observo ningún efecto citotóxico fue en HT-29OxR donde lunasin se probo hasta una concentración de 50 μ M, tabla 2.1. Por otra parte utilizando lunasin hasta una concentración de 100 μ M en fibroblastos normales ccD-33Co no se observó citotoxicidad.

Célula	IC ₅₀	Célula	IC ₅₀
RKO	21.6 μ M	RKOOxR	38.9 μ M
HCT-116	26.3 μ M	HCT-116OxR	31.6 μ M
HT-29	61.7 μ M	HT-29OxR	- - -
KM12L4	13.0 μ M	KM12L4OxR	34.7 μ M

Tabla 2.1 IC₅₀ de células de cáncer de colon y sus variedades resistentes al oxaliplatino.

Se observó que detiene el ciclo celular en la fase G2/S y activa el mecanismo de apoptosis vía mitocondrial (sección 2.3.1), esto fue evidenciado por cambios en la expresión de Bcl-2, Bax, grumos nucleares, liberación de citocromo c y caspasa 3, en células KM12L4, Vermont *et al.* (2011). Lunasin también fue probada con oxaliplatino en líneas celulares de cáncer de colon KM12L4, los resultados son graficados en la figura 2.3, Dia y de Mejia (2011).

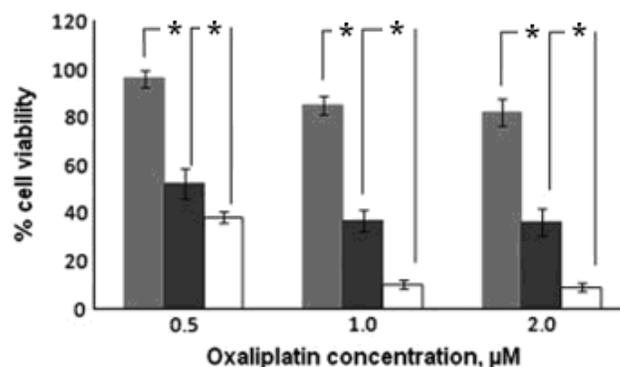


Figura 2.3 Interacción de lunasin con oxaliplatino en células de cáncer de colon KM12L4, ■ oxaliplatino, ■ oxaliplatino con lunasin 10 μ M y □ oxaliplatino con lunasin 25 μ M. La barra de error indica la desviación estándar, * indica la diferencia de significancia, $p < 0.05$, $n = 3$.

2.2 Contenido de lunasin en distintas semillas

De la tabla 2.2 a la 2.9 se muestran las plantas en las que se ha encontrado lunasin, en todos los casos solo se encontró exclusivamente en semillas.



Variedad	$\frac{\mu g}{g}$ Lunasin Extracto Proteico
Gabriela	9.5
Nutrisol	10.9
Criolla	12.0
DGETA	12.1

Tabla 2.2 Amaranto, *Amaranthus hypochondriacus*, Silva *et al.*, (2008).

Lunasin fue descubierto en el Amaranto por el grupo de Ana Paulina Barba de la Rosa del Instituto Potosino de Investigaciones Científicas y Tecnológicas México dicho descubrimiento le valió el premio Nacional en Ciencia y Tecnología de Alimentos México 2009.



Variedad	$\frac{\mu g}{g}$ Lunasin Semilla
Hordeum vulgare L.	13.56
cv. Olbori	18.61
cv. Daebackbori	21.48
cv. Mirakbori	14.18
cv. Ricebori	17.14

Tabla 2.3 Cebada, *Hordeum vulgare*, Hyung *et al.*, (2002).



$$0.211 \text{ a } 0.249 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \cdot \frac{\text{lunasin}}{\text{semilla}}$$

Tabla 2.4 Trigo, *Triticum spp.*, Hernández *et al.*, (2008).



$$0.132 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \cdot \frac{\text{lunasin}}{\text{semilla}}$$

Tabla 2.5 Linterna China, *Physalis alkekengi var. Franchetti*, Jin *et al.*, (2007).



$$0.397 \frac{\text{mg}}{\text{g}} \cdot \frac{\text{lunasin}}{\text{semilla}}$$

Tabla 2.6 *Solanum lyratum*, Jin *et al.*, (2007).



$$1.810 \frac{mg}{g} \cdot \frac{lunasin}{semilla}$$

Tabla 2.7 *Solanum nigrum l.*, Jin et al., (2007).



$$0.305 \frac{mg}{g} \cdot \frac{lunasin}{semilla}$$

Tabla 2.8 Toloache, *Datura stramonium*, Jin et al., (2007).

En semillas de soya fue donde se encontró por primera vez lunasin y es la planta que contiene la mayor concentración hasta ahora conocida, Lunasin comienza a aparecer en las semillas a la 6^o semanas de la floración y continúa incrementándose durante la maduración. Durante el proceso de germinación lunasin comienza a desaparecer al 2^o día de remojar las semillas y desaparece completamente al 7^o día, en condiciones de luz u oscuridad, Jae *et al.*, (2005).

Variedad	$\frac{mg}{g}$ lunasin semilla
a Sowonkong	0.50
a Seritae	0.95
a Andongkumjungkong	1.61
b Juinunikong	1.99
b Milyang-139	2.26
b Pungsangnamulkong	3.68
b Exótico	5.30
b Chungjakong-1	5.65
b Moderno	6.00
b Ancestral	6.50
b cv. Hwangkumjungkong	8.13
c Modificado genéticamente	70.49

Tabla 2.9 Concentración de lunasin en diferentes variedades de soya (*Glycine max*), Elvira *et al.*, (2004)^a, Hyung *et. al.*, (2007)^b y Hernández *et al.*, (2008)^c.

2.3 Mecanismo molecular de la actividad anticancerígena de lunasin

2.3.1 Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada, en sus elementos básicos, ha cambiado muy poco desde su organización primitiva en los nemátodos hasta su organización en organismos superiores. Los cambios morfológicos que observan las células durante la apoptosis son: el daño mitocondrial, la ruptura de la membrana nuclear, la fragmentación del ADN, la condensación de la cromatina y la formación de los cuerpos apoptóticos, todos estos mecanismos son iniciados por las caspasas.

i) Activación de las caspasas durante la apoptosis, Nika N. Danial (2004)

Actualmente se conocen más de catorce caspasas, algunas de ellas se desconoce su función; se agrupan en tres partes: caspasas implicadas en la producción de citocinas (1, 4, 5 y 13), caspasas de señalización o de activación de otras caspasas (2, 8, 9 y 10) y caspasas efectoras de muerte o ejecutoras (3, 6 y 7).

Todas las caspasas apoptóticas permanecen en las células normales como proenzimas inactivas. Cuando las células entran en apoptosis, las caspasas se activan a través de uno o dos pasos proteolíticos que acaban por cortar el péptido precursor, dando como resultado la generación de dos fragmentos (grande y pequeño) donde el fragmento grande constituyen el enzima activo.

Actualmente hay dos cascadas de activación para las caspasas, una intrínseca y otra extrínseca a la célula que son fundamentales en la regulación de la apoptosis y son:

- **Intrínseca:** Cascada desencadenada por cambios en la permeabilidad de la mitocondria, figura 2.4 a.
- **Extrínseca:** Cascada generada por los DR de membrana, figura 2.4 b.

ii) Activación de las caspasas a través de cambios en la permeabilidad de la mitocondria

Se ha visto *in vitro* que el citocromo c liberado de la mitocondria actúa junto con los factores citosólicos, Apaf-1 y procaspasa-9, para activar a la caspasa 3.

- **Citocromo c:** Solo es funcional el holocitocromo c, no el apocitocromo sintetizado en el citoplasma (reacción 2.1). Se ha observado que la actividad inductora de apoptosis

es independiente del estado redox del citocromo c. Se sabe que el citocromo c es liberado de la mitocondria por variados estímulos, entre los que se incluyen, agentes que dañan el ADN, inhibidores de kinasas y la activación de los receptores de superficie DR.



- **Apaf-1:** Proteína de 130kDa, presenta tres dominios; el dominio amino terminal tiene homología con el prodominio de distintas caspasas (1, 2 y 9); este dominio, según se ha propuesto, actuaría como dominio de unión de caspasas (CARD), uniendo caspasas que a su vez lo presentaran; de todas las caspasas con CARD solo la procaspasa 9 se activa con Apaf-1. Tras el CARD, Apaf-1 tiene una secuencia de 310 aminoácidos que presenta un 50% de similitud de secuencia primaria con CED-4 del nematodo *Caenorhabditis elegans* (proteína promotora de apoptosis); dentro de este dominio se encuentran las cajas de Walker A y B, de las cuales se piensa que son necesarias para la unión de nucleótidos (entre los cuales están ATP y dATP); mutaciones en este sitio eliminan la función tanto de Apaf-1 como de CED-4. La mitad Carboxilo terminal de Apaf-1 está compuesta por 12-13 repeticiones de 40 WD, que actúan como dominio de interacción proteína-proteína; Cuando se modifica este dominio, Apaf-1 aparece constitutivamente activa in vitro independientemente de las concentraciones de ATP/dATP y de citocromo c, aunque la caspasa 9 activa no puede liberarse, lo cual indica que este dominio presenta dos funciones en condiciones normales: inhibir la actividad Apaf-1 y favorecer la liberación de la caspasa 9 ya activada.
- **Procaspsa 9:** La activación de la procaspasa 3 requiere una reacción escalonada: Primero Apaf-1 une ATP/dATP y los hidroliza a ADP y dADP respectivamente. Esta hidrólisis no tiene ningún significado si el citocromo c está ausente; lo que parece ser que ocurre es que el ATP estabiliza la unión del citocromo c con Apaf-1, y la hidrólisis de ATP/dATP induce la formación de complejos multiméricos de Apaf-1 y citocromo c. Estos complejos multiméricos son totalmente funcionales para reclutar y activar a la procaspasa 9. Una vez se ha formado ese complejo la procaspasa 9 es reclutada en proporción 1:1 con Apaf-1 y se activa por proteólisis; más exactamente por autocatalisis de la propia procaspasa 9.

Finalmente, la caspasa 9 activa es liberada del complejo Apaf-1/citocromo c para cortar y activar a las caspasas como la 3, 6 y 7.

La formación de este complejo Apaf-1/citocromo c tiene dos finalidades: primero, incrementar la concentración local de procaspasa para favorecer el corte intermolecular y segundo, establecer el umbral de activación de las caspasas relativamente alto de tal forma que una salida ocasional de citocromo c de la mitocondria no cause la muerte de la célula por apoptosis, ver figura 2.4 a.

iii) Regulación de la activación de las caspasas por la mitocondria

El primer paso regulador en la activación de caspasas mediada por la mitocondria debe encontrarse a nivel de la liberación del citocromo c. Una microinyección o una electroporación con citocromo c, induce apoptosis en ciertos tipos celulares, indicando que en estos tipos celulares la liberación del citocromo c es un paso clave en la regulación de la apoptosis.

Los reguladores, que se conocen, de la liberación de citocromo c son los miembros de la familia de proteínas Bcl-2. Se sabe que una sobre expresión de Bcl-2 o Bcl-xL bloquea la liberación del citocromo c, mientras que, la sobre expresión de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax, Bid o Bad, favorece la liberación de citocromo c de la mitocondria y por tanto la entrada en apoptosis.

Los mecanismos bioquímicos de la liberación del citocromo c y de su regulación por la familia Bcl-2 aún no se conocen; por ahora nos tenemos que conformar con las tres teorías que se proponen: la teoría del PTP, el modelo de flujo iónico y el modelo de proteínas con dominio BH3.

- **La familia Bcl-2 como reguladora del PTP**

Los miembros de la familia Bcl-2 se encuentran en la cara citoplasmática de varios orgánulos, incluyendo la mitocondria, el retículo endoplasmático y el núcleo.

Se sabe desde hace tiempo que ciertos signos de daño mitocondrial, como una pérdida de potencial de membrana, son marcadores tempranos de que la célula está destinada a apoptosis. Por otra parte el PTP, encargado de regular el potencial de la membrana interna mitocondrial, pudiera estar regulado por la familia Bcl-2.

La identidad del PTP aún no está bien caracterizada, se sabe que están implicadas proteínas como la ciclofilina D, el ANT, ambos en la membrana interna mitocondrial, y la porina, en la membrana externa.

Todavía se desconoce cómo la apertura del PTP lleva a una pérdida en la integridad de la membrana externa, pero se especula con la posibilidad de que la disminución de los gradientes electrostático y osmótico conduciría a la hinchazón de la mitocondria y a la liberación de calcio y de proteínas de la membrana interna como el citocromo c y AIF.

- **Familia Bcl-2 en su papel como canales iónicos**

El que Bcl-2 tuviese actividad como canal iónico se sugirió a partir del estudio de la estructura tridimensional (por RMN) de Bcl-xL, dado que recuerda a la estructura de

ciertas toxina bacterianas como la toxina de la difteria. Estas toxinas actúan insertándose en las bicapas lipídicas formando canales iónicos.

De acuerdo con este modelo se vio que Bcl-xL (homólogo de Bcl-2) formaba un canal catiónico (+) en vesículas con mono o bicapa lipídica, mientras que Bax (proapoptótico) formaba un canal aniónico (-).

El hinchamiento mitocondrial y la ruptura de la membrana externa son acontecimientos tempranos en muchas formas de muerte por apoptosis. Se ha visto que Bcl-xL puede proteger a la mitocondria de estos daños, sugiriendo que el daño mitocondrial sería el paso decisivo en la apoptosis.

De todas formas todavía no se ha establecido una unión directa entre el flujo de iones y la homeostasis mitocondrial.

Se piensa que la hinchazón de la mitocondria conduciría a la ruptura de la membrana externa con la consiguiente liberación del citocromo c, que las proporciones relativas de las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas condicionarían el flujo de iones, y consecuentemente, el de agua. Alternativamente los canales podrían influir en la apertura de otros poros, como el PTP, que podrían regular el volumen mitocondrial.

- **El modelo de proteínas con dominio BH3**

En contra del modelo anterior se ha visto que no todos los componentes de la familia Bcl-2 son capaces de formar poros. De hecho los dominios conservados, las hélices BH1 y BH2, responsables de la formación de los poros son inexistentes en muchas de las proteínas proapoptóticas de esta familia, entre ellas Bid y Bad. Se ha demostrado mediante experimentos mutagénicos que para la función apoptótica de estos miembros es imprescindible la existencia de una secuencia de 9 a 16 aminoácidos localizada en el dominio BH3.

Se ha visto que, niveles elevados de péptidos con dominio BH3 pueden inducir la liberación de citocromo c de la mitocondria. Dado que no todos los estímulos apoptóticos se pueden inhibir con inhibidores del PTP, es tentador pensar que estas proteínas, con BH3, actuarían en una ruta independiente y de momento desconocida, de señalización de apoptosis.

Bid media en la liberación de citocromo c cuando es cortado por la caspasa 8. Se ha visto que el dominio BH3 de Bid es tan importante para su actividad proapoptótica como para su habilidad para interactuar con otras proteínas de la familia Bcl-2.

Parece ser que tras el corte por la caspasa 8 en el citoplasma, el fragmento de Bid con el dominio BH3 se transloca a la mitocondria e induce la liberación de citocromo c. Si se muta el BH3 de Bid se inhibe la liberación de citocromo c y la capacidad de Bid

para unirse con Bcl-2 o con Bax, pero no la capacidad de migrar a la mitocondria. Por tanto Bid podría interactuar con una proteína diana de la membrana mitocondrial que todavía no ha sido descrita, esta interacción no sería suficiente para liberar citocromo c en ausencia de un dominio BH3 funcional.

La activación de la apoptosis mediada por la caspasa 8 puede transcurrir por dos vías en función de su concentración: Si la concentración de la caspasa 8 es alta la apoptosis se continúa por la activación por corte directo de diversas caspasas como la 3, 6 y 9. En cambio si la concentración de la caspasa 8 no es lo suficientemente elevada, entonces las caspasas son activadas indirectamente al inducirse la liberación de citocromo c mitocondrial tras el corte de Bid, de forma que la apoptosis sigue en este caso la ruta de Apaf-1. Por tanto la ruta indirecta mediada por Bid y dependiente de la liberación del citocromo c representa un importante paso de amplificación en el caso de bajas concentraciones de caspasa 8. Además de la caspasa 8 otras caspasas pueden procesar a Bid, sugiriendo que Bid participa en la amplificación de varias señales apoptóticas sumadas a las provenientes de los receptores celulares, ver figura 2.5 a y b.

iv) Activación de las caspasas a través de los receptores de muerte de membrana.

Una de las rutas que conduce a la activación de las caspasas se inicia con la unión de los DR de la superficie celular con su ligando específico.

Los DR son una familia de proteínas transmembranales que pertenece a la superfamilia del TNF. Incluye a Fas (CD95), al TNFR1, a DR-3 y a los receptores TRAIL (DR-4 y DR-5). Conservan una región rica en Cys en sus dominios extracelulares, Fas y TNFR comparten una región homóloga en sus dominios intracelulares denominada DD necesario para la transducción de la señal de suicidio celular. Los ligandos activadores de estos DR están estructuralmente relacionados entre sí, perteneciendo todos ellos a la superfamilia de genes TNF.

La unión de FasL a Fas induce la trimerización de Fas (un solo FasL une tres Fas). La región citoplasmática de cada Fas, a través del DD, recluta una molécula adaptadora que también posee DD (la FADD) en su extremo carboxilo terminal; la unión se realiza a través de los DD; son dominios fundamentales, ya que una simple mutación en el DD impide la transmisión de la señal de apoptosis al interior celular.

FADD también presenta un dominio fundamental en su extremo amino terminal, el DED. Imprescindible para reclutar las procaspasas iniciales de la cascada, como la procaspasa 8 y/o la procaspasa 10. El reclutamiento se realiza gracias a que la procaspasa 8 tiene dos DED en su N-terminal a través de los cuales se une al DED de FADD.

El dominio C-terminal de la procaspasa 8 contiene una región homóloga de caspasas. Justo después de su reclutamiento se produce el procesamiento de la procaspasa 8 generándose los

dos fragmentos catalíticos que forman la caspasa 8 activa. Se piensa que la activación es por la oligomerización de la procaspasa 8, ya que se ha visto *in vitro* que la dimerización de procaspasa 8 resulta en una auto activación por proteólisis, sugiriendo la posibilidad de que las procaspasas tengan una débil actividad proteasa y que se corten una a la otra cuando ambas están muy próximas, ver figura 2.4 b.

v) Regulación de la activación de caspasas por los receptores de muerte

Se ha visto que se dan tres mecanismos reguladores:

- El primer mecanismo evita el reclutamiento de las procaspasas 8 y/o su activación en el complejo n(3FAS-3FASL-FADD). Hay un grupo de proteínas virales, las vFLIPS (FADD-Like ICE *Inhibitory Proteins*), que poseen dos dominios DED y evitan el reclutamiento de la procaspasa 8 al competir con las procaspasas en la unión al DED de FADD. Hay un homólogo de vFLIPS en mamíferos, cFLIP (también llamado Casper, I-FLICE, FLAME)
- El segundo consiste en la expresión de Dc para el ligando TRAIL, muy relacionados con los receptores DR4 y DR5 de TRAIL, aunque el receptor DcR1 carece de dominio citoplasmático y el DcR2 presenta el dominio de muerte (DD) de la región citoplasmática truncado. Al presentar las mencionadas características los DcR actúan inhibiendo específicamente la apoptosis inducida por TRAIL al secuestrar al ligando evitando su unión con los receptores de muerte DR4 y DR5. Se ha visto que los tejidos humanos normales expresan estos receptores señuelo mucho más abundantemente que los tejidos tumorales, sugiriendo la posibilidad de que la mayor sensibilidad que presentan los tumores a la apoptosis sea en parte debido a este fenómeno. También hay que señalar que existe un tercer receptor señuelo, el DcR3 capaz de unir el ligando Fas, que aumenta su expresión en los tumores de pulmón y colon lo cual indica que en estos tumores la expresión de Dc proporciona un mecanismo de resistencia a la apoptosis.
- El tercer mecanismo para evitar el estímulo inducido por los receptores de muerte consiste en inhibir directamente la activación proteolítica de las procaspasas iniciadoras (procaspasa 8 o 10). Un ejemplo de esta clase de inhibidores es la proteína viral crmA, miembro de la familia de las serpinas, que es un potente inhibidor de la procaspasa 8.

Se ha identificado una proteína de 60kDa, denominada SODD, esta proteína parece ser que en condiciones normales se encuentra asociada a los DD del TNF-R1 evitando la señalización espontánea, no inducida, por receptores con DD.

De cualquier forma todavía no está claro si existen otros factores implicados además de FasL, Fas, FADD y SODD, ver figura 2.5 b.

vi) El papel de las IAPs

Otro grupo de reguladores negativos de la apoptosis son las IAPs. Se han identificado en baculovirus, en *Drosophila*, y en humanos (siendo las de humanos las c-IAP, c-IAP-2, XIAP, survivina, y NAIP). Estas proteínas comparten un motivo común de 70 aminoácidos denominado BIR (Baculovirus IAP Repeat). La mayoría de las IAPs contienen dos o tres copias de BIR, además contienen en el lado carboxilo terminal de las repeticiones BIR un dominio de unión a dedos de zinc. Las proteínas c-IAP y c-IAP-2 además presentan un CARD o dominio de reclutamiento de caspasas.

La sobreexpresión de IAPs genera resistencia celular a una amplia gama de estímulos apoptóticos. El punto exacto de la inhibición por IAPs es de momento desconocido, se proponen varios modelos. Parece ser que por un lado las IAPs inhiben la apoptosis interfiriendo directamente con la actividad catalítica de ciertas caspasas, por otra parte las IAPs pueden incluso evitar el procesado o la activación de las procaspasas u otras proteínas implicadas en su activación.

Esto último sugiere que las IAPs participan en las dos rutas principalmente de la apoptosis, la ruta de los receptores de membrana y la ruta Apaf-1, dependiente de citocromo c.

- En la ruta de los receptores de membrana, las IAPs bloquearían las caspasas efectoras 3 y 7, parando así la cascada de apoptosis iniciada por la caspasa-8.
- En la ruta dependiente de citocromo c, las IAPs actuarían a tres niveles: Interfiriendo directamente con la procaspasa 9 evitando su procesamiento, Mediante sus CARDS compitiendo para unir a Apaf-1 y inhibiendo directamente las caspasas activadas.

Se puede concluir que las IAPs proporcionan un mecanismo de defensa contra cualquier mínima activación del programa apoptótico, es decir, elevan el umbral para la activación de las caspasas. Los niveles celulares de estas IAPs deberían determinar las diferencias en cuanto a sensibilidad a estímulos proapoptóticos existentes en distintos tipos celulares. Por esta razón la regulación de estos niveles resulta fundamental. Se ha visto que las c-IAPs son reguladas transcripcionalmente de manera directa por el NF- κ B, ver figura 2.5.

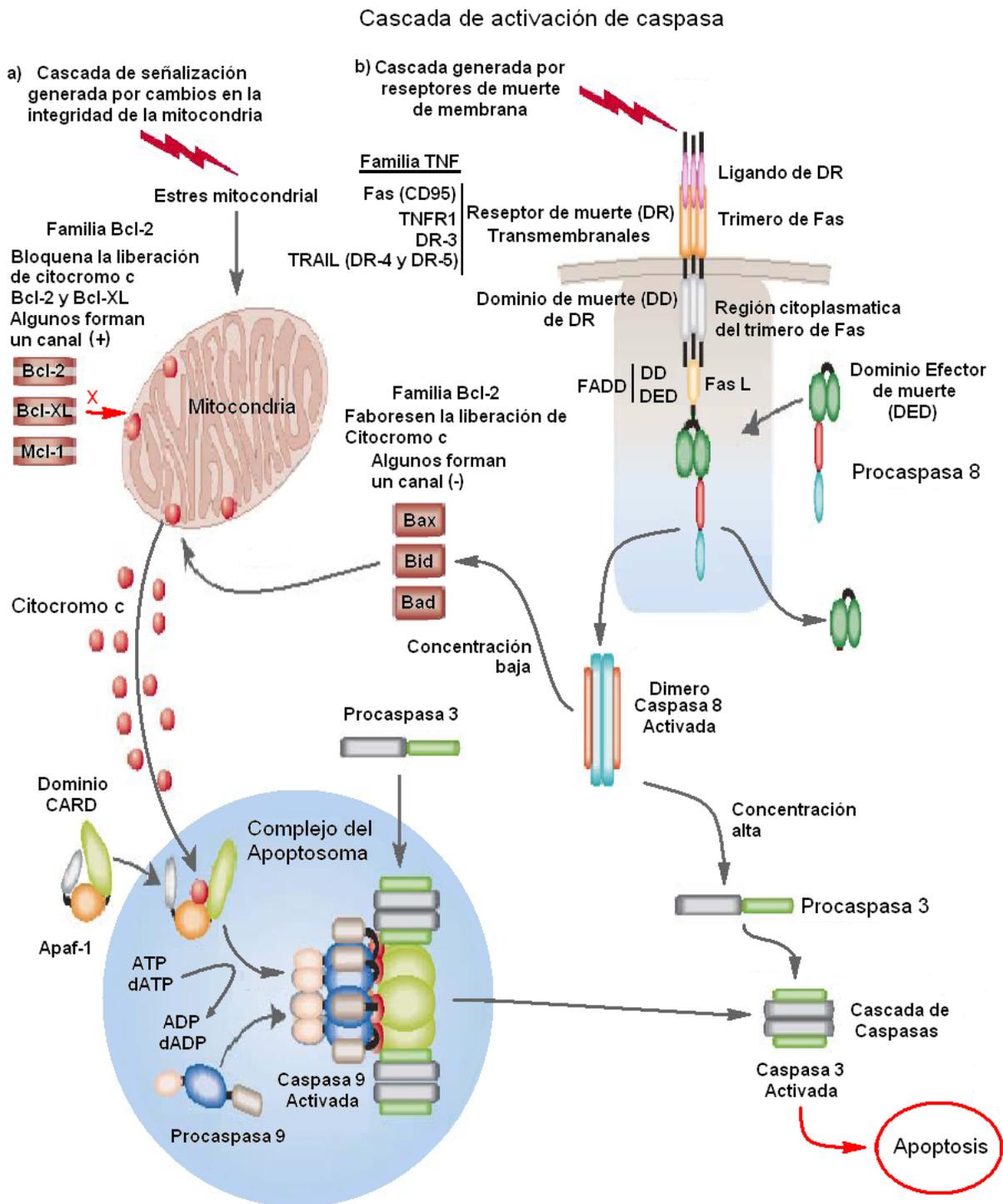


Figura 2.4 Mecanismos de señalización que conduce a apoptosis, a) Cascada generada por cambios en la permeabilidad de la membrana, b) Cascada generada por receptores transmembranales de muerte.

2.3.2 Mecanismo epigenético de lunasin como anticancerígeno

En la figura 2.5 se muestra la estructura primaria y las funciones de las distintas partes del péptido lunasin, Ledesma *et al.* (2009).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S	K	W	Q	H	Q	Q	D	S	C	R	K	Q	L	Q	G	V	N	L	T
Actividad desconocida																			
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
P	C	E	K	H	I	M	E	K	I	Q	G	R	G	D	D	D	D	D	D
		Dirige lunasin a las histonas									Inter. célula			Actividad anti-					
											Inter. núcleo								
41	42	43																	
D	D	D																	
cancerígena																			

Figura 2.5 Secuencia de la proteína lunasin, del aminoácido 1 al 22 su actividad es desconocida, del 23 al 31 dirige lunasin a las histonas, del 32 al 34 internaliza lunasin a la célula, del 33 al 35 internaliza lunasin al núcleo, del 36 al 43 se une a lisinas de histonas desacetiladas.

En células sanas, las cdk realizan la fosforilación del complejo retinoblastoma Rb-E2F y con esto liberan el factor de transcripción E2F el cual es la señal para que la transcripción se lleve a cabo. Por otra parte si las células han sido transformadas en cancerígenas, Rb no es fosforilado, ni los factores de transcripción son liberados y como consecuencia se activa el mecanismo de apoptosis, pero en raras ocasiones esto no sucede así es decir los factores de transcripción son liberados a pesar de que la célula ha sido transformada en cancerígena, esto se debe a distintas razones, por ejemplo la presencia de un agente químico carcinogénico o una oncoproteína como E1A la cual se une a Rb y produce la liberación de los factores de transcripción, figura 2.6, otro factor determinante es que la proteína p53 se encuentre alterada, se ha observado que en cerca del 60% de los tumores se encuentra inactiva ya sea por alguna mutación en el gen que la expresa TP53 o por cambios postranscripcionales en la proteína, Patiño *et al.* (2004).

Una vez que los factores de transcripción han sido liberados y se ha dado la señal para que la transcripción trascorra, en la fase G1/S se lleva a cabo la acetilación de las histonas H3 y H4 ver figura 2.7, en específico en lisinas, de esta manera es liberado el ADN del nucleosoma para que sea duplicado, Xiang y Yang (2004).

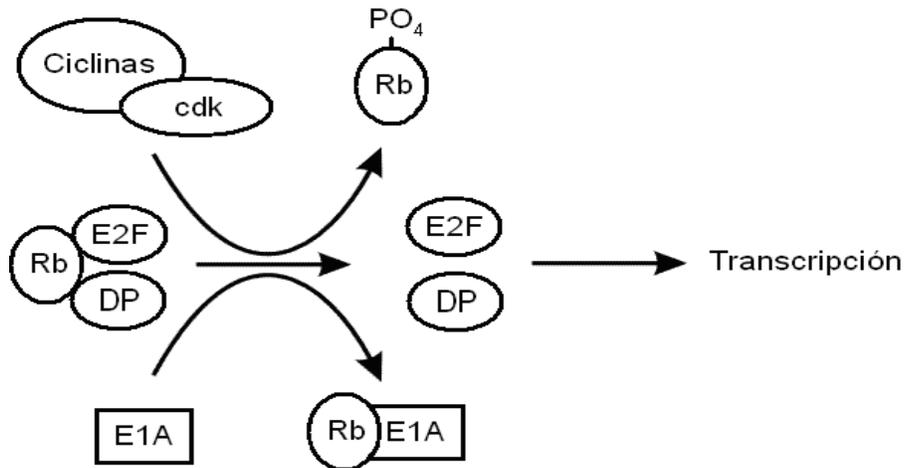


Figura 2.6 Liberación de los factores de transcripción E2F y DP por cdk o por la oncoproteína E1A.

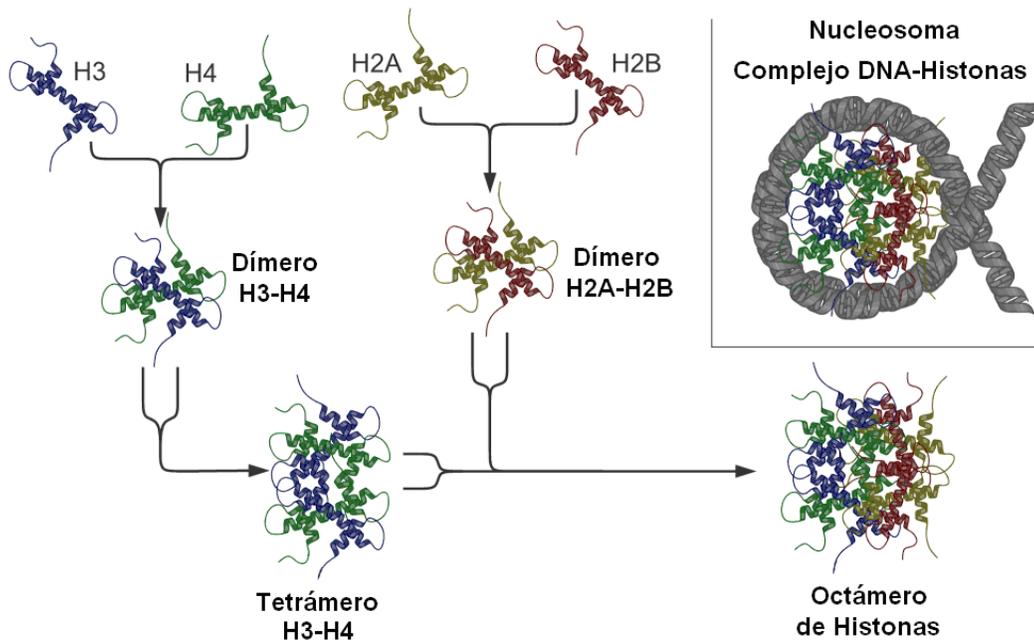


Figura 2.7 Estructura del nucleosoma, las histonas H3 y H4 se organizan formando dímeros que a su vez forman tetrámeros, las histonas H2A y H2B también se organizan en dímeros, dos dímeros H2A-H2B posteriormente se agregan al tetrámero H3-H4 formando un octámero de histonas, estas cuatro histonas son llamadas *core* o nucleares. Por cada octámero el ADN da 1.7 vueltas, Steven *et al.* (2002).

En la figura 2.8 se muestra el mecanismo epigenético de lunasin como anticancerígeno, el cual consiste en la unión de lunasin a histonas desacetiladas, se ha observado *in vivo* que lunasin se une a las histonas H3 y H4 desacetiladas e impide su acetilación, Galvez *et al.* (2001), esta unión se realiza entre los ácidos aspárticos del lado carboxilo terminal de lunasin y lisinas de las histonas, impidiendo su acetilación, la célula interpreta esto como anormal y decide activar el mecanismo de apoptosis vía mitocondria (figura 2.4 inciso a), se ha visto en modelos de células recién transformadas que cuando esta presente lunasin y se agrega la oncoproteína E1A, los factores de transcripción DP y E2F son liberados de Rb (figura 2.6), pero no se lleva a cabo la acetilación de las histonas, como consecuencia no es liberado el ADN del nucleosoma (figura 2.7) y se detiene el ciclo celular entre las fases G1/S esto se ha observado en células que comienzan a transformarse en cancerígenas como en recién transformadas, pero no en células sanas, Ledesma *et al.* (2009), por lo tanto el mecanismo epigenético de lunasin como anticancerígeno no promueve el envejecimiento células.

Si lunasin se une a histonas desacetiladas en células recién transformadas y esto no sucede en células normales, sería de esperarse que exista un mecanismo todavía desconocido que impida esta unión.

Se sabe que lunasin activa el mecanismo de apoptosis vía mitocondrial (figura 2.4 a) en células recién transformadas, la activación de este mecanismo se realiza por la liberación del citocromo c de la mitocondria, en el mecanismo de señalización que desencadena la liberación del citocromo c participa p53 Juan Carlos Herrera Patiño *et al.* (2004), por otra parte en modelos celulares donde p53 se encuentra inactivo, lunasin también tiene actividad anticancerígena, esto sugiere que lunasin actúa activando la cascada de señalización vía mitocondrial que lleva a apoptosis, por una vía donde no interviene p53, esto es importante debido a que p53 se encuentra mutado en alrededor del 60% de los cánceres, como ya se menciono anteriormente.

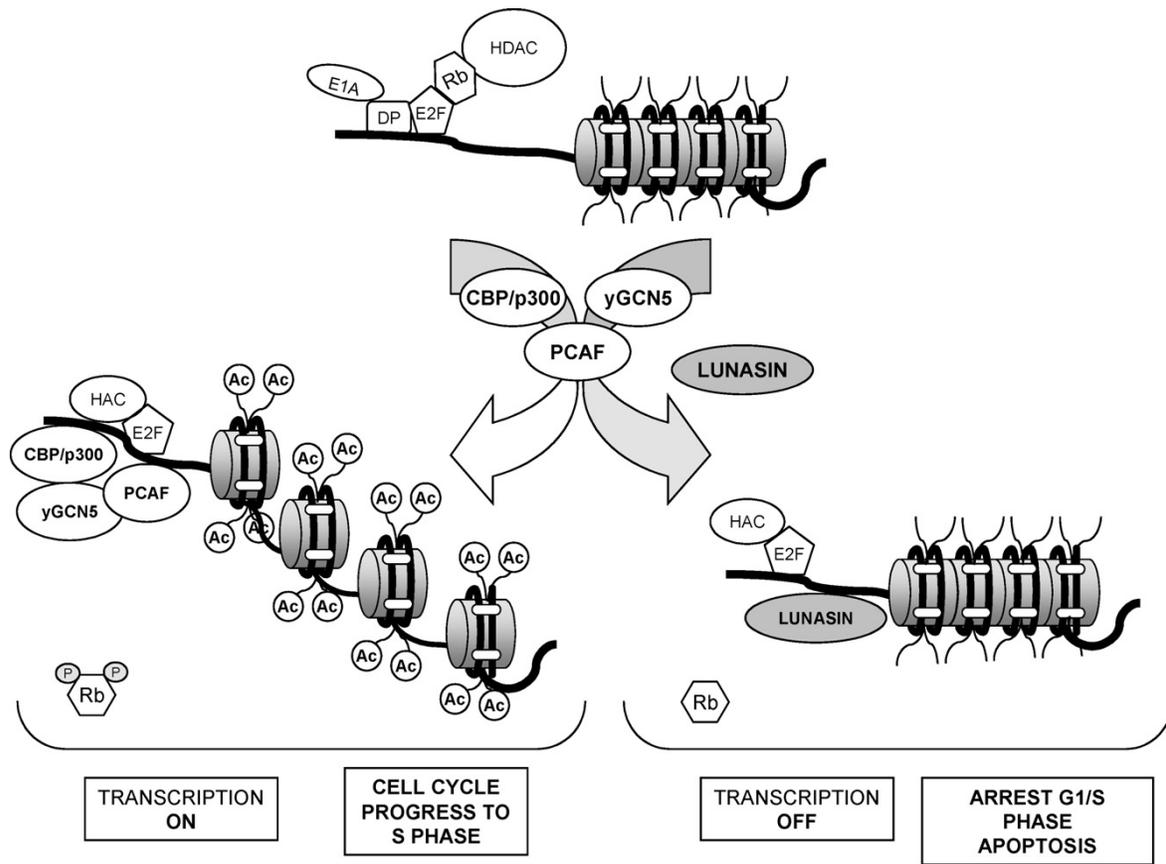
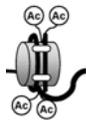


Figura 2.8 Modelo que explica el mecanismo de acción de lunasin como anticancerígeno preventivo.

- yGCN5 y PCAF HAT
- CBP y p300 Regulan la transcripción, [Ngan Vo \(2001\)](#)
- HDAC Enzima histona desacetilasa
- HAC Enzima histona acetilasa
-  Conjunto de histonas *core* (ver figura 2.5)
-  Histonas H1, son histonas *linker* o externas
-  Nucleosoma, el cual tiene 1.7 vueltas de ADN, las histonas *core* se encuentran acetiladas
- Ac Grupo acetilo (-COCH₃)

2.4 Lunasin desde el proceso digestivo hasta el torrente sanguíneo

2.4.1 Proceso digestivo de proteínas y lunasin en el estomago, Guiton and Hall (2006)

El estomago se estabiliza en el proceso digestivo a un $\text{pH} \approx 1.2$, debido al ácido clorhídrico secretado por las glándulas oxínticas también conocidas como gástricas o parietales, las cuales secretan menor o mayor cantidad de ácido clorhídrico dependiendo principalmente de la cantidad de carne ingerida. Las células pépticas y mucosas de las glándulas gástricas también secretan varios tipos ligeramente distintos de pepsinógeno de unos 42.5kDa de Masa Molecular los cuales en cuanto entran en contacto con la enzima pepsina ya preformada y el HCl son hidrolizados dando origen a la pepsina activa de aproximadamente 35.0kDa, donde su actividad optima se encuentra entre un pH 1.8 a 3.5, también el pepsinógeno es secretado en menor cantidad por las glándulas pilóricas figura 2.9.

En la figura 2.10 se muestra los productos esperados de la hidrólisis de lunasin causado por la enzima pepsina. El proceso que sufriría lunasin y el Péptido BBI es realizado con SGF como se muestra en la figura 2.6 a, donde se observa que al termino de 2h de digestión se ha perdido $\approx 70\%$ de lunasin, en el caso de que lunasin sea ingerida de un producto elaborado con soya se esperaría que la perdida fuera menor debido a que el BBI presente en la soya inhibe a las proteasas que digirirían a lunasin.

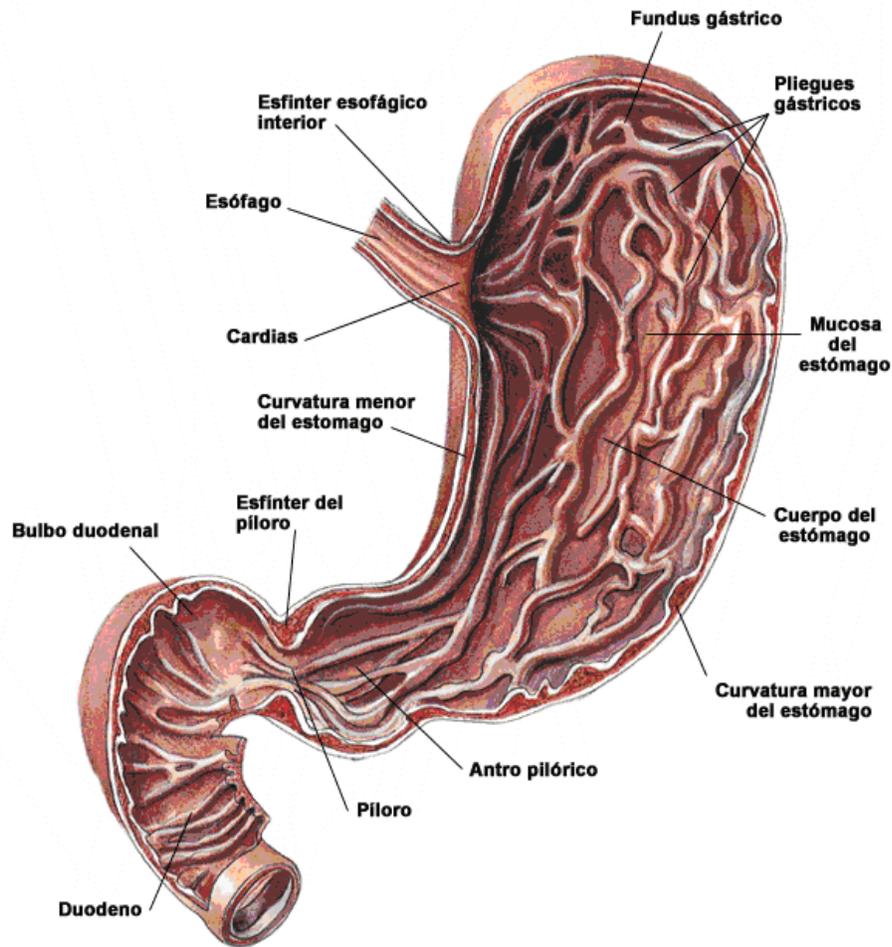


Figura 2.9 Representación esquemática de las partes del estomago.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S	K	W	Q	H	Q	Q	D	S	C	R	K	Q	L	Q	G	V	N	L	T
Actividad desconocida																			
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
P	C	E	K	H	I	M	E	K	I	Q	G	R	G	D	D	D	D	D	D
Dirige lunasin a las histonas											Inter. célula			Actividad anti-					
											Inter. núcleo								
41	42	43																	
D	D	D																	
cancerígena																			

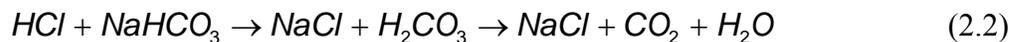
Figura 2.10 Producto de hidrólisis de lunasin causado pos la pepsina, la cual digiere en los aminoácidos Fenilalanina (F), Tirosina (Y) y Triptófano (T) del lado amino. Esta digestión genera dos péptido, 1) del aa 1-19 y 2) del aa 20- 43.

2.4.2 Proceso digestivo de proteínas y lunasin en el duodeno y le yeyuno

Una vez que el quimo sale del estomago, a través del esfínter del píloro figura 2.9, entra en la primera porción del intestino delgado llamado duodeno, en respuesta a la llegada del quimo ácido, las glándulas de Brunner figura 2.15 a, secretan moco, estas glándulas se encuentran ubicadas en los primeros centímetros del duodeno especialmente entre el píloro y el esfínter de Oddi figura 2.11 a.

En el duodeno a través del Esfínter de Oddi, el hígado, la vesícula y el páncreas secretan jugo digestivo, debido a que el hígado y la vesícula están dirigidos a la digestión y absorción de las grasas, nos enfocaremos solo en el páncreas que juega un papel importante en la digestión de lunasin.

Los acinos pancreáticos secretan enzimas que digieren grasas carbohidratos y proteínas y grandes cantidades de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) el cual reacciona con el HCl que viene del estomago, elevando el pH entre 7.0 a 8.0 y liberando bióxido de carbono como producto, de acuerdo a la reacción 2.2, que es absorbido por el torrente sanguíneo y liberado por los pulmones en la respiración.



La secreción de las enzimas pancreáticas es estimulada por una hormona llamada colecistocinina producida por las células I, ubicadas en la mucosa del duodeno y la parte proximal del yeyuno figura 2.11 incisos a y b, las células I son estimuladas por la presencia de alimento, una vez producida la colecistocinina pasa al torrente sanguíneo y desde ahí al páncreas estimulando la producción y liberación de enzimas (de igual manera pasa al hígado y la vesícula, estimulando la liberación de bilis).

Las enzimas proteolíticas pancreáticas más importantes son: tripsina, quimiotripsina, carboxipolipeptidasa y elastasa, las cuales son producidas en su forma inactiva (tripsinógeno, quimiotripsinógeno, procarboxipolipeptidasa y proelastasa), solo se activan en el momento que alcanzan la luz del intestino, la más abundante de todas ellas es, con mucho la tripsina, el tripsinógeno es activado por una enzima llamada enterocinasa secretada por la mucosa intestinal una vez activada la tripsina, activa a las demás enzimas incluyendo a los nuevos tripsinógenos entrantes. La elastasa digiere a las fibras de elastina que mantiene la estructura de la carne, la tripsina y la quimiotripsina hidrolizan a las proteínas que vienen del estomago a péptidos los cuales a su vez son hidrolizados a aminoácidos y péptidos todavía más pequeños por la carboxipeptidasa.

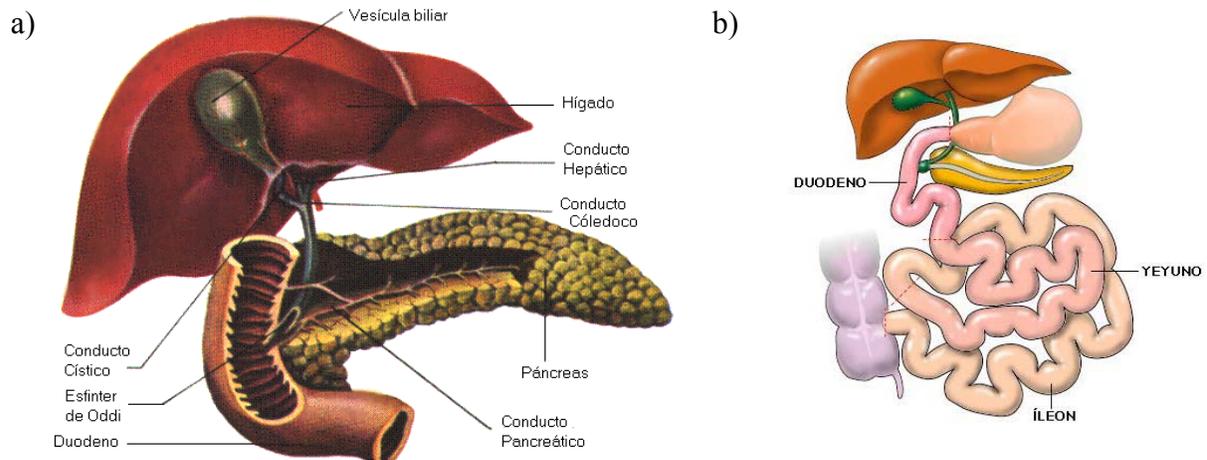


Figura 2.11 Duodeno y su conexión con: el Hígado, la Vesícula y el Páncreas, a) se observa el esfínter de Oddi en el duodeno, b) El yeyuno y su conexión con el duodeno y el íleon.

Las secreciones del páncreas rara vez liberan aminoácidos de las proteínas, la mayor parte de la digestión de las proteínas se lleva a cabo en el duodeno y el yeyuno, en la figura 2.12 se muestra el producto de la digestión de lunasin causado por la tripsina.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S	K	W	Q	H	Q	Q	D	S	C	R	K	Q	L	Q	G	V	N	L	T
Actividad desconocida																			
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
P	C	E	K	H	I	M	E	K	I	Q	G	R	G	D	D	D	D	D	D
Dirige lunasin a las histonas											Inter. célula		Actividad anti-						
											Inter. núcleo								
41	42	43																	
D	D	D																	
cancerígena																			

Figura 2.12 Producto de hidrólisis de lunasin causado por la tripsina, la cual digiere del lado Carboxilo donde haya Arginina (R) o Lisina (K). Esta digestión genera cinco péptidos y un aminoácido libre, 1) del aa 1-11, 2) aa 12, 3) del aa 13-24, 4) del aa 25-29, 5) del aa 30-33 y 6) del aa 34-43.

En la figura 2.13 b se observa el proceso de digestión de lunasin y del péptido BBI, al término de 2h lunasin se ha digerido en un 30% solo en este proceso, si tomamos en cuenta el proceso digestivo en el estómago y el intestino delgado juntos al término de unas 4h nos queda $\approx 20\%$ del total inicial Jae *et al.*, (2007), del cual faltaría calcular la pérdida por la digestión causada en las vellosidades del intestino delgado.

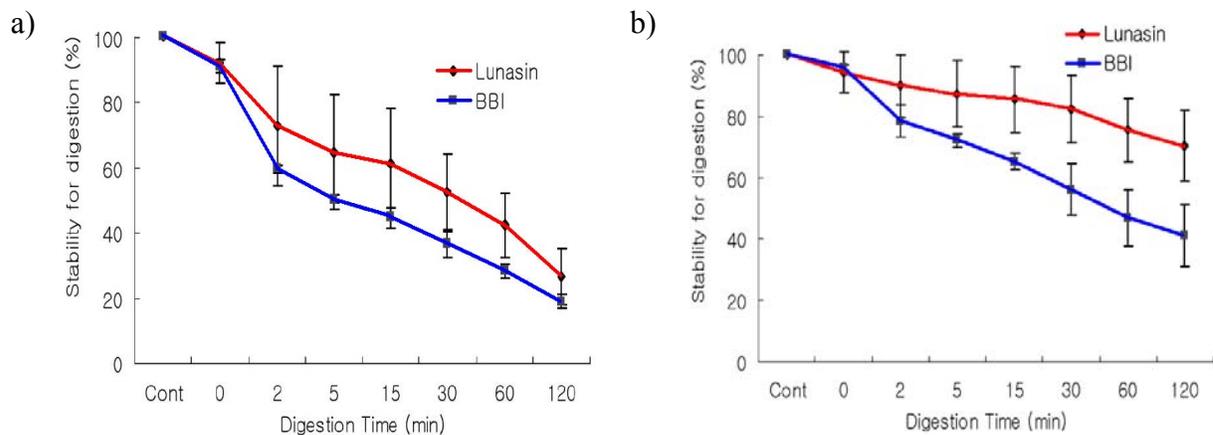


Figura 2.9 Contenidos de lunasin (♦) y del péptido inhibidos de proteasa de Bowman Birk (BBI) (■), desde 0 hasta 120min, a) durante la digestión con Fluido Gástrico Simulado, SGF, b) durante la digestión con Fluido Intestinal Simulado, SIF.

2.4.3 Digestión y absorción de péptidos en el intestino delgado

A lo largo de toda la superficie interna del intestino delgado existen pequeñas depresiones llamadas criptas de Lieberkühn figura 2.15 incisos a y b que se encuentran entre las vellosidades figura 2.14. La superficie de las criptas y las vellosidades están cubiertas por un epitelio formado por células caliciformes, secretoras de un moco que lubrica y protege la superficie intestinal, también se encuentran un gran número de enterocitos, los cuales tienen forma de columna figura 2.15 a, por un lado orientados hacia el lumen del intestino, zona apical y por el lado opuesto orientado hacia los vasos sanguíneos, zona basal. Los enterocitos en las criptas secretan grandes cantidades de agua y electrolitos Cl^- y HCO_3^- (pH 7.5 a 8.0), mientras que en la superficie de las vellosidades reabsorben el agua y los electrolitos junto con los productos finales de la digestión, estos electrolitos principalmente el anión Cl^- producen un arrastre eléctrico de los iones Na^+ a través de la membrana del enterocito.

Los enterocitos, sobre todo los que cubren las vellosidades contienen enzimas digestivas que digieren a las grasas, los azúcares y los péptidos mientras son absorbidos.

La membrana celular de las microvellosidades contiene enzimas que digieren a los péptidos, donde las más importantes son aminopolipeptidasa y varias dipeptidasa las cuales continúan la digestión liberando aminoácidos y reduciendo todavía más el tamaño de los péptidos hasta tamaños de 2 a unos 3 aminoácidos los cuales son transportados al interior del enterocito. Por último, en el citosol del enterocito existen muchas otras peptidasas específicas liberando a los aminoácidos de los muy pequeños péptidos restantes, a continuación estos pasan a la sangre

por el lado posterior del enterocito. Más del 99% de los productos de las proteínas que llegan a la sangre son aminoácidos.

Las células de Paneth ver figura 2.15 b, son células epiteliales y solo se encuentran en la parte basal de las criptas de Lieberkuhn, secretan los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico que se encarga de inducir la proliferación celular, esto produce que las células se dividan continuamente por mitosis, produciendo que gradualmente emigren hacia el exterior de las criptas, es decir hacia las puntas de las vellosidades. Cuando las células de las vellosidades envejecen se desprenden hacia las secreciones intestinales, su ciclo vital es muy corto de apenas unos 5 días.

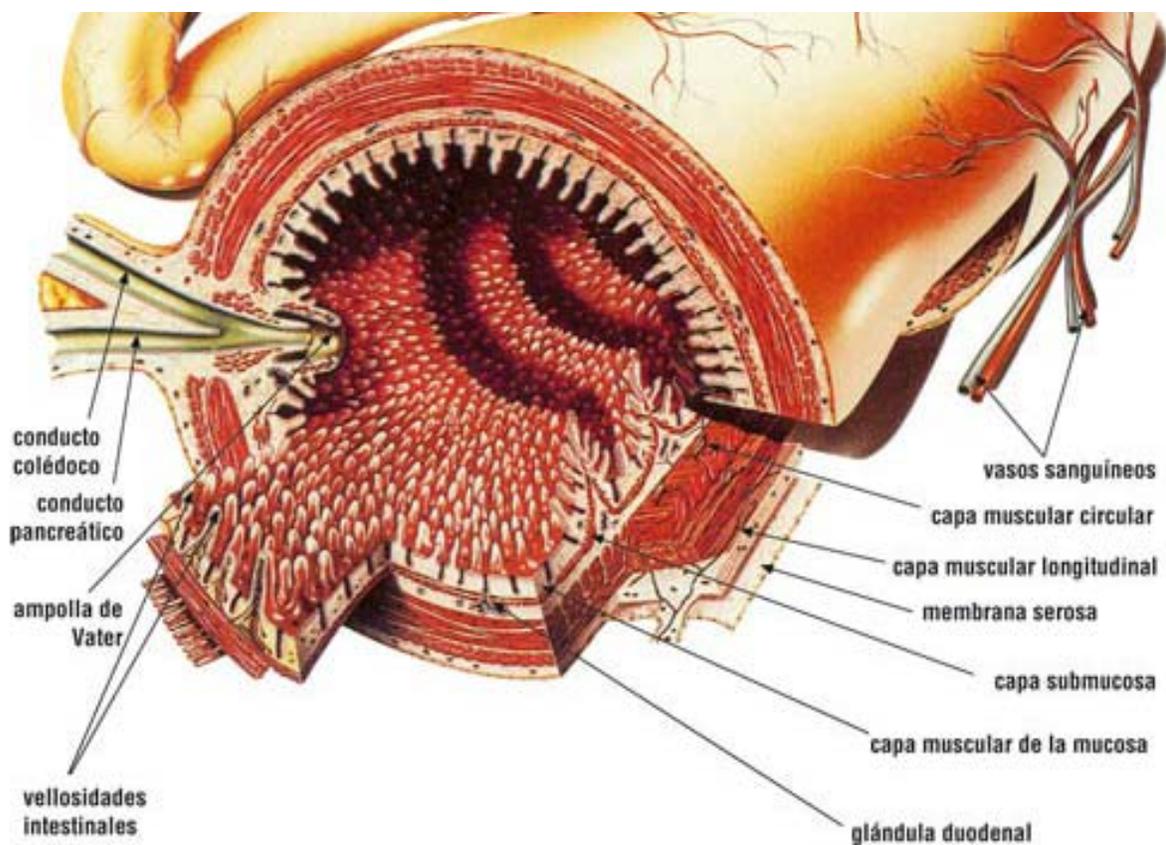


Figura 2.14 Representación del interior del intestino delgado, desde el duodeno hasta la válvula ileocecal la estructura es similar.

Las microvellosidades de los enterocitos forman el "borde en cepillo", que está compuesto por microvellosidades finas de aproximadamente 1mm de longitud por 0.1mm de ancho. Debido a ellas el área de la superficie de la mucosa del intestino delgado del adulto es de aproximadamente 250m² (alrededor del tamaño de una cancha de tenis).

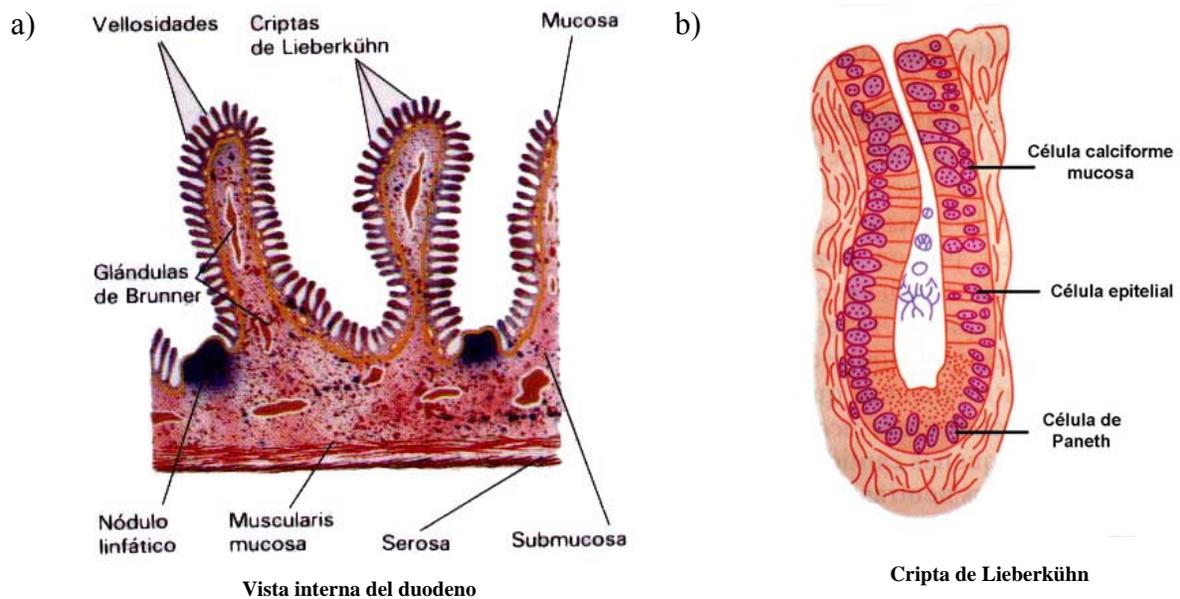


Figura 2.15 Estructura interna del intestino delgado, a) vista interna del duodeno, b) La imagen muestra la cripta de Lieberkühn, situada entre las vellosidades de todas las regiones del intestino delgado.

2.4.4 Lunasin en el torrente sanguíneo

Para comprobar si lunasin pasa al sistema circulatorio después de consumir suplementos de soya, que contienen lunasin de forma natural, se usaron cinco sujetos caucásicos, saludables de sexo masculino, con edades entre 18 a 25 años, se excluyeron personas que fueran: fumadoras, vegetarianas o que tomaran suplementos dietéticos.

El experimento consistió de dos semanas, la primera semana fue el periodo de lavado, durante esta semana se les preguntó a los participantes si consumían alimentos elaborados con soya y si asistían a restaurantes de comida china, en la segunda semana consumieron diariamente en el almuerzo 50g de proteína de soya (155.5mg lunasin) por un periodo de 5 días.

La proteína de soya se encontraba en dos alimentos distintos:

- Preparado de soya con chile, que fue elaborado con 300g de frijol de soya en conserva, con una concentración de 0.16 ± 0.001 mg de lunasin/g de frijol de soya.
- Licuado de leche de soya, elaborado con 28g de proteína de soya en polvo, con una concentración de 4.3 ± 0.4 mg de lunasin/g de proteína de soya en polvo.

En el 5º día se tomaron muestras de sangre a los 30min y 1h después del consumo de los 50g de proteína de soya y se determinó la presencia y concentración de lunasin en el plasma sanguíneo, tabla 2.10.

Se determinó la presencia de lunasin en el plasma por: SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), Wester Blot, MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight*) y LC-MS/MS (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*). La concentración de lunasin en plasma sanguíneo fue determinada por la técnica ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) y lunasin fue aislada del plasma por la técnica de cromatografía de Fuerza de Intercambio Aniónico (*SAX, Strong Anionic Exchanger*).

Tiempo	Rango	Promedio
h	$\frac{ng}{mL}$ Lunasin Plasma Sanguíneo	
0.5	50.2 a 110.6	66.0 ± 25.4
1	33.5 a 122.7	71.0 ± 32.8

Tabla 2.10 Concentración de lunasin en plasma sanguíneo después de 0.5 y 1h de consumir 155.5mg lunasin en 50g de proteína de soya, determinado por la técnica ELISA.

Se estima que el 97% de lunasin es destruido durante el proceso digestivo y que la poca cantidad detectada, de acuerdo a los resultados de este estudio, se encuentra en forma bioactiva en el plasma humano, Vermont *et al.* (2009).

Por otra parte estudios realizados en ratones, con lunasin sintética marcada con el isótopo 3H , revelan que lunasin al ser ingerida, alrededor del 35% es absorbida y que finalmente se encuentra presente en diversos tejidos 6h después de la ingestión, de Lumen (2005).

3 JUSTIFICACIÓN

Actualmente el cáncer es la segunda causa de muerte en México y el mundo de acuerdo a la organización mundial de la salud¹ la cual prevé que del 2007 al 2030 la mortalidad por cáncer se incrementara en un 40%. Por otra parte cuando nos enfrentamos a un problema crítico como es el caso del cáncer, el primer paso es la prevención, la cual podría ahorrar costos por tratamiento, además debido a que cuando algunas personas contraen cáncer no pueden trabajar, esto también representa una disminución en recursos económicos para un país.

Para que el mecanismo de prevención pueda incrementar su éxito sería recomendable que modificara lo menos posible los hábitos de las personas, por esta razón proponemos agregar lunasin a alimentos que consumimos cotidianamente.

También es necesario que el compuesto que se desea utilizar como preventivo, no sea tóxico y que tenga un amplio espectro de acción, es decir que proteja contra un gran número de tipos de cánceres. Actualmente se estudian y descubren una gran cantidad de compuestos con actividad anticancerígena donde algunos son tóxicos por lo tanto no podrían utilizarse como preventivos, otros presentan un limitado espectro de acción como es el caso de los glucosinolatos [Fernando Geu-Flores et al. \(2008\)](#), que protegen contra cáncer de estómago, el licopeno que protege contra cáncer de próstata, las isoflavonas que protegen contra cáncer de útero causado por el estrógeno o el **ácido linoleico conjugado** que actúa protegiendo en cáncer de sea hormono dependiente o no en el caso de lunasin se ha comprobado que protege contra cáncer de mama, útero, mama, colon, leucemia y piel. Además se ha probado su efectividad en líneas celulares en el tratamiento de cáncer de colon metastásico, con oxaliplatino y solo.

La actividad anticancerígena de lunasin es cuatro veces mayor que el péptido inhibidor de proteasas de Bowman Bir y mucho más que las isoflavonas genisteína y daidzeína de soya [Concepción Navarro Moll, \(2005\)](#) y [Lori Rice, \(2008\)](#).

Por otra parte existe un grupo muy limitado de compuestos que protegen contra el cáncer y que se encuentren de forma comercial, como es el caso de las isoflavonas de soya, el ácido linoleico conjugado donde sus costos son altos, por esta razón solo podemos adquirirlos en tiendas naturistas también se debe de tomar en cuenta el precio final del producto, el cual debe ser económico para que pueda ser de consumo cotidiano y masivo.

El primer camino enfocado a tratar de obtener a lunasin por un método económicamente rentable fue a través de la ingeniería genética, clonando la secuencia de lunasin en un vector y transformando a *E. coli*, pero debido a su toxicidad no fue posible, estos resultados encaminaron las investigaciones hacia otros rumbos, como buscar a una semilla que produzca mayor cantidad de lunasin que soya (0.50 a 8.13mg/g semilla) sin que se haya obtenido éxito hasta

¹ Consultar fuentes electrónicas.

ahora (sección 2.2) continuando en esta dirección decidieron producir una planta de soya modificada genéticamente que pueda expresar mucha más lunasin, logrando una planta con la capacidad de producir 70.49mg de lunasin/g de semilla es decir un 867% más que la semilla que más la producía, enseguida se realizaron estudios para ajustar las condiciones de cultivo que nos permita obtener la mayor expresión de lunasin y(2011), ya se propone un metodo par la purificación de lunasin en semillas.

Muy recientemente ... et a. (2011) obtuvieron a la proteína GFP-lunasin, por el mismo camino que la obtuvo Galvez et. Al (1999) pero al ser una proteína tan grade no es recomendable utilizarla ya que puede producir reacciones alergénicas y también pueden existir otros efectos no conocidos.

Con respecto a obtener a lunasin a través de soya modificada genéticamente, se tiene el inconveniente que se necesitan 2 meses desde que se siembra la semilla hasta que se cosechan, donde muchas de las condiciones de crecimiento de la planta dependen del clima, plagas, tipos de suelo, en cambio la obtención de lunasin através de la sobre expresión en un microorganismo modificado genéticamente solo necesita 24h de crecimiento y el proceso completo hasta obtener pura la proteína lunasin solo necesita 1 semana.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Realizar un análisis detallado de las distintas propuestas encaminadas a obtener a la proteína lunasin purificada, comprender las causas que impiden que su producción sea económicamente rentable. Proponer una estrategia que nos permita acercarnos a este fin.

4.2 Objetivos particulares

Obtención de la proteína recombinante 6xHis-DHFR-Proteasa Aspartica-Lunasin
Diseñar un buffer

Obtención de la proteína recombinante 6xHis-DHFR-Factor Xa-Lunasin

Realizar brubas en líneas celulares con las proteínas

Lunasin (43aa)

Lunasin sin la secuencia de actividad desconocida

5 MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Técnicas

Las técnicas que se enlistan se muestran como fueron utilizadas y algunas contienen modificaciones de la técnica original.

5.1.1 Obtención de ADN genómico de soya

El ADN se obtuvo de hoja y de raíz de *Glycine max* var. Bragg

i) Lavado de semillas para poner a germinar

1. Se ponen 100 semillas a remojar en 2 a 3mL de alcohol al 96% y se agita.
2. Posteriormente se enjuaga con H₂O destilada hasta que no se perciba el olor a alcohol.
3. En seguida se pone a remojar en solución de cloro comercial “Cloralex” al 10% durante 20min agitando periódicamente.
4. Al término del remojo se procede a lavar las semillas con H₂O destilada repetidas veces hasta que se quite el cloro por completo.

ii) Germinación de semillas

1. Se flamea una charola con alcohol.
2. Se colocan 8 pliegos de papel absorbente sobre la charola y se distribuyen las semillas a espacios equidistantes, unos 3cm.
3. Se agrega H₂O destilada y estéril sobre la superficie del papel hasta que se humedezca, es importante que el agua no escurra.
4. Se tapa la charola con papel aluminio para que las plantas estén en completa obscuridad y se ponen las semillas a germinar a 30°C durante 5 días, el tiempo puede variar dependiendo de la rapidez con que germinen, lo importante es que los germinados comiencen a tener hojas.

iii) Obtención de hojas y raíces para la extracción de ADN

1. Con tijeras previamente lavadas se procede a cortar las hojas y las raíces, las cuales se ponen en tubos falcón.
2. Los tubos falcón inmediatamente se pone en N₂ líquido, es importante mantener siempre a las hojas y las semillas en N₂ líquido (Punto de ebullición -195.8°C) para que el ADN no sufra daño por la acción de las enzimas ADNas.

3. Se almacena -80°C para su uso posterior.

iv) Extracción de ADN genómico en hojas y semillas

Nombre del kit utilizado: ZR Plant/Seed DNA MiniPrep^{TM, 2}

Número de catálogo: D6020

Marca: Zymo Research

Zymo-spin IV-HRC spin Filters (tapa verde) necesita ser preparado antes de su uso.

- Romper el sello de la base de la columna.
 - Insertar la columna a su tubo de recolección.
 - Centrifugar en una microcentrífuga a 8,000xg por 3min.
1. Agregar hasta 150mg de hoja a ZR Bashing Bead enseguida agregar 750µL de Lysis solution.
 2. Mezclar en el bortex a máxima velocidad por 10min.
 3. Centrifugar el tubo ZR Bashing Bead de lisis en una microcentrífuga a una velocidad $\geq 10,000xg$ durante 1min.
 4. Transferir 400µL del sobrenadante a Zymo-Spin IV sobre la superficie del filtro de la columna, colocar en su tubo de recolección y centrifugar a 7,000rpm ($\approx 7,000xg$) durante 1min.
 5. Agregar 1,200µL de Plant/seed DNA Binding Buffer sobre el filtrado en el tubo de recolección repetir paso 4 y mezclar.
 6. Transferir 800µL de la mezcla obtenida del paso 5 a Zymo-SpinTM IIC sobre la columna y puesta sobre el tubo de recolección y centrifugar a 10,000xg por 1min.
 7. Descargar en un nuevo tubo de recolección y repetir paso 6.
 8. Agregar 200µL de DNA-Wash Buffer a el Zymo-SpinTM IIC column en un nuevo tubo recolector y centrifugar a 10,000xg por 1min.
 9. Trasferir el Zymo-SpinTM IIC column a un tubo para microcentrífuga limpio de 1.5mL y añadir 50-100µL DNA Elution Buffer directamente sobre la matriz de la columna. Centrifugar a 10,000xg por 30s para diluir el ADN.
 10. Trasferir el ADN eludió del paso 9 para preparar Zymo-spin IV-HRC spin Filters (tapa verde) poner enzima en un tubo limpio de microcentrífuga a exactamente 8,000xg por 1min. El filtrado de ADN es ahora apropiado para PCR y otras aplicaciones.

² Cfr. Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

5.1.2 Extracción de ADN en gel de agarosa

Nombre del kit: QIAquick Gel Extraction Kit³

Número de catálogo: 28704

Marca: Qiagen

1. Se corre un gel de agarosa 2x con el producto de PCR y se visualiza la banda que se desea cortar con una lámpara de luz UV, enseguida se corta la banda con un bisturí y se pone en un tubo eppendorf de 1.5mL, importante la luz UV puede producir mutaciones en el ADN.
2. Se agregan 300µL de buffer QG por cada rebanada de gel de agarosa. Si el color de la mezcla es anaranjado o violeta se agrega 10µL de acetato de sodio 3M pH 5.0 y se mezcla. El color de la mezcla se debe tornar amarillo.
3. Se incuba a 50°C por 10min o hasta que el gel se disuelva por completo.
4. Después que el gel se ha disuelto por completo revisar el color de la mezcla la cual debe ser amarilla, si el color es naranja o violeta, agregar 10µL de 3M de acetato de sodio pH 5.0 y mezclar hasta que el color se torne amarillo.
5. Agregar a la mezcla 300µL de isopropanol y mezclar.
6. Colocar la columna en el tubo eppendorf de 1.5mL de recolección y vaciar los ≈600µL sobre la columna, centrifugar durante 1min a máxima velocidad (el ADN se queda unido a la matriz de la columna), desechar el fluido.
7. Lavado de la columna, agregar 0.75mL de Buffer PE sobre la matriz de la columna y centrifuga por 1min a máxima velocidad, repetir dos veces este paso es importante eliminar todo el buffer PE posible porque puede dificultar cargar la muestra purificada al gel.
8. Elución de la banda, pasar la columna a un tubo eppendorf de 1.5mL nuevo y agregar 300µL de buffer de Elución sobre la columna y centrifugar durante 1min a máxima velocidad.
9. Finalmente se corren entre 3 a 5µL de la banda purificada en un gel de agarosa 2x (protocolo 5.1.7 inciso *i*), para revisar que se encuentre purificada.
10. Almacenar a -20°C.

³ Cfr. Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

5.1.3 Extracción de plásmido

Nombre del kit: Zyppy Plasmid Miniprep⁴

Número de catálogo: D4036S

Marca: Zymo Research

1. Se ponen a crecer células *E. coli* transformadas en medio LB líquido durante toda la noche y se procede de la siguiente manera:
 - Se agrega 1mL del cultivo en un tubo eppendorf de 1.5mL y se centrifuga por 30s o hasta que se forme una pastilla de células.
 - Se decanta el sobre nadante.

Se repite este paso hasta que se completen 3mL del cultivo.

2. A la pastilla resultante se le agregan 600µL de agua destilada y se resuspende completamente.
3. A la solución de 600µL se le agregan 100µL de 7x Lysis Buffer (azul), se mezcla por inversión unas 4 a 6 veces y se deja reposar por unos 2min, la desaparición del color azul del buffer indica que la lisis se ha completado.
4. A la mezcla de lisis se le agregan 350µL de Neutralization Buffer (amarillo) frío y se mezcla por inversión, hasta que la neutralización se ha completado.
5. Se centrifuga de 11,000 a 16,000xg (14,000rpm) entre 2 a 4min.
6. Se trasfiere el sobrenadante ≈900µL, tratando de no remover el fondo, a una columna Zymo-SpinTM IIN, la columna se pone dentro de un tubo nuevo y se centrifuga durante 1min a máxima velocidad (14,000rpm). El líquido se vuelve a pasar una vez más a la columna (el plásmido queda unido a la matriz de la columna).
7. Se desecha el líquido que se encuentra en el tubo de recolección y se coloca la columna en el mismo tubo.
8. Se agrega 200µL de Endo-Wash Buffer a la columna y se centrifuga por 1min, no es necesario utilizar un nuevo tubo.
9. A la columna se le agrega 400µL de ZyppyTM Wash Buffer y se centrifuga por 1min a máxima velocidad (14,000rpm), este paso se realiza dos veces.
10. La columna se trasfiere a un tubo eppendorf de 1.5mL, se agrega directamente sobre la matriz de la columna 30µL de ZyppyTM Elution Buffer, se deja reposar por 1min a temperatura ambiente y se centrifuga durante 1min a máxima velocidad. El líquido recuperado se vuelve a pasar una vez más a la columna, (en este paso se recupera al plásmido).
11. Se toman 3µL de la solución del plásmido y se corre un gel de agarosa 1x.

⁴ Cfr. Consúltense el apartado de fuentes electrónicas.

12. La solución restante se etiqueta y guarda a -20°C si no se va a utilizar de inmediato y a 4°C si se va a usar al siguiente día.

5.1.4 PCR, Sambrook and Russel (2001)

1. En un tubo eppendorf se preparan $25.0\mu\text{L}$ de mezcla de reacción como se muestra.

25 mM	10x <i>Taq</i> Buffer	2.5 μL
20 mM	MgCl_2	4.0 μL
2 mM	DNTPs	2.5 μL
5 pmol/ μL	Oligo Forward	1.5 μL
5 pmol/ μL	Oligo Reverse	1.5 μL
5 u/ μL	Enzima <i>Tac</i> polimeraza	0.5 μL
	ADN genómico*	1.0 μL
	H_2O	11.5 μL
	Volumen total:	25.0 μL

*En lugar del ADN genómico se puede usar colonias de células transformadas crecidas en medio LB solido.

El 10x *Taq* Buffer utilizado fue de marca Fermentas con número de catalogo B34 y contiene:

750 mM	Tris-HCl (pH 8.8 a 25°C)
200 mM	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0.1 % (v/v)	Tween 20 o Polisorbato 20
20 mM	MgCl_2

La ADN polimerasa empleada fue la *Taq* ADN polimerasa de Fermentas, la cual deja Adenina del lado 3'-terminal, La enzima se agrega al último para disminuir la posibilidad de ser desnaturalizada durante el proceso de preparación.

El ADN genómico utilizado fue de hoja y de raíz.

- Se agrega $25\mu\text{L}$ de aceite mineral, para impedir la evaporación de la mezcla durante el PCR, se centrifuga para que se asiente y el aceite quede arriba.
- La temperatura de alineación empleada fue de 66°C para la sección 6.1 y para la sección 6.2 y 6.3 fue de 69°C (Block 2/Ventana 2).

	Temperatura tiempo	Block 1	Block 2	Block 3	Block 4	Ciclos
Ventana 1	°C mm:ss	95 5:00				1
Ventana 2	°C mm:ss	94 0:30	66 ó 69 1:00	72 2:00		30
Ventana 3	°C mm:ss			72 5:00	4 ∞	1
Ventana 4	°C mm:ss					0

Tabla 5.1 Condiciones de corrida del PCR.

- Una vez terminado el PCR al producto de PCR se le quita el aceite por escurrimiento en papel parafilm y se guarda a -20°C.

Los Termocicladores utilizados fueron: Robocycler[®] Gradient 40 Temperature Cycle y PTC-100[®] Thermal Cycler.⁵

5.1.5 Clonación

i) Protocolo para clonar en el plásmido pJet1.2/blunt con producto de PCR sticky-end

Nombre del kit utilizado: CloneJET[™] PCR Cloning⁶

Número de catalogo: K1231

Marca: Fermentas

- Se prepara la siguiente mezcla de reacción:

2x Buffer de reacción	10 µL
Producto de PCR	2 µL
H ₂ O libre de nucleadas	5 µL
Enzima ADN blunting	1 µL
Volumen total:	18 µL

⁵ Cfr. Consúltense el apartado de fuentes electrónicas.

⁶ Cfr. Consúltense el apartado de fuentes electrónicas.

Se mezclar por vortex y se centrifuga de 3 a 5s para que se asienten las gotas adheridas en el tubo.

2. Se incuba la mezcla a 70°C por 5min y se enfría brevemente en hielo, este paso es para dejar al producto de PCR con los extremos rectos “blunt”.
3. Se pone la mezcla de reacción (producto de PCR con extremos rectos) en hielo y se agrega la siguiente mezcla de reacción.

	Total de la mezcla anterior	18 μL
50 ng/ μL	Vector para clonar pJET1.2/Blunt	1 μL
5 u/ μL	ADN ligasa T4	<u>1 μL</u>
	Volumen total:	20 μL

4. Se incuba la mezcla de ligación a temperatura ambiente $\approx 22^\circ\text{C}$ por 5min, si se desea un número máximo de bacterias transformadas, el tiempo de incubación puede extenderse hasta por unos 30min.
5. Usar la mezcla de ligación obtenida, directamente para la transformación de bacterias.

No usar más de 2 μL del producto de PCR para evitar la inhibición de la ADN ligasa T4, por las sales presentes en el buffer de PCR. Si se desea emplear más de 2 μL del producto de PCR se requiere purificar el fragmento antes de la clonación.

ii) Protocolo para clonar en el plásmido pQE-30 y pQE-40⁷

1. Se digiere el plásmido pJET+(Construcción: enzima de restricción 1-lunasin- enzima de restricción 2), el 10x Buffer Fast Digest es de marca Fermentas con número de catalogo FD222410X.

	H ₂ O milli-Q	14 μL
	pJET1.2/Blunt-Construcción lunasin*	10 μL
10X	Fast Digest Buffer	<u>3 μL</u>
	Volumen total:	27 μL

* El pJET- Construcción lunasin, puede ser sustituido por producto de PCR.

	Volumen anterior	27.0 μL
	Enzima de restricción 1	1.5 μL
	Enzima de restricción 2	<u>1.5 μL</u>
	Volumen total:	30 μL

Los 30 μL se ponen a digerir durante 3h a 37°C, enseguida se toman 3 μL para correr un gel de agarosa.

⁷ Cfr. Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

- Se digiere el plásmido pQE-30 o pQE-40 con las mismas enzimas de restricción con las que se digirió el plásmido pJET.

Nombre del kit utilizado: QIAexpressionist™ IV⁸

Número de catálogo: 32149

Marca: Qiagen

Vector pQE	3 µL
Buffer	3 µL
H ₂ O	<u>21 µL</u>
Volumen total:	27 µL

Volumen total anterior	27.0 µL
Enzima de restricción 1	1.5 µL
Enzima de restricción 2	<u>1.5 µL</u>
Volumen total:	30.0 µL

Se pone a digerir a 37°C por 3h.

- Se cargan 3µL a un gel de agarosa 2x con las digestiones del paso 1 y 2 y se corre.
- Se cortan la bandas del gel que corresponden a la construcción de lunasin y el vector pQE digeridos y se procede a purificarlos (protocolo 5.1.3).
- La concentración del plásmido pQE-30 o pQE-40 y el inserto lunasin preferentemente deben estar a la misma concentración molar.
- La mezcla de ligación se prepara como se muestra a continuación.

H ₂ O milli-Q	3 µL
5x Rapid ligation Buffer	2 µL
Vector pQE	2 µL
Inserto Lunasin	2 µL
Enzima Ligaza	<u>1 µL</u>
Volumen total:	20 µL

5x Rapid ligation buffer y la enzima ligaza son de marca Fermentas. Se incuba a temperatura ambiente ≈22°C durante 2h.

- Usar la mezcla de ligación directamente para la transformación de bacterias competentes.

⁸ Cfr. Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

5.1.6 Transformación en *E. coli* DH5 α y *E. coli* M15 [pREP4]

i) Preparación de células competentes, Sambrook and Russel (2001)

1. Se siembran células *E. coli* DH5 α en agar LB sin antibiótico o células *E. coli* M15 [pREP4] en agar LB con kanamicina 25mM, por la técnica de extensión en placa y se pone a incubar por toda la noche a 37°C.
2. Se trasfiere una colonia en 100mL de caldo LB en un matraz Erlenmeyer de 250mL y se incuba por \approx 3h a 37°C con agitación vigorosa.
3. Se toman muestras periódicamente y se revisa la OD₆₀₀, la concentración de células no debe de exceder 10⁸UFC/mL.
4. En condiciones estériles, se trasfiere el cultivo en tubos Falcon de 50mL y se reposa en hielo por 10min.
5. Se pone a centrifugar el cultivo a 4,000rpm durante 10min a 4°C, se decanta el medio y se deja que escura durante 1min más, para recuperar el pellet.
6. Se resuspende cada pellet en 10mL de CaCl₂ 0.1M y se almacene en hielo.
7. Se recuperan las células por centrifugación a 4,000rpm durante 10min a 4°C.
8. Se decanta el fluido y se pone a escurrir por 1min más.
9. Se resuspende cada pellet (corresponde a 50mL del cultivo original) en 2mL de CaCl₂ 0.1M.
10. Se pone en hielo y se hacen alícuotas de 1mL en tubos eppendorf de 1.5mL, cada tubo con 1mL de células competentes, se pone en N₂ líquido (Punto de ebullición -195.8°C).
11. Almacenar a -40°C.

ii) Transformación

1. Se pone un tubo eppendorf con 100 μ L de células competentes *E. coli* a descongelar en hielo (aproximadamente 5min), este intervalo de tiempo debe ser lo más corto posible.
2. De la mezcla de ligación (sección 5.1.5) se toman 10 μ L y se agregan a los 100 μ L de células competentes *E. coli* y se continua en hielo por 30min más.
3. Se pasa inmediatamente a 42°C por 2min, este choque térmico es para abrir poros en la membrana de las células competentes y puedan ser transformadas por el vector.
4. Se enfría en hielo por otros 7min más, con la finalidad de que los poros se sierran.
5. Se agregan 800 μ L de medio líquido LB y se incuba a 37°C por 1h con agitación.
6. Se centrifuga a 400 rpm durante 4min y se desecha 800 μ L del sobrenadante.
7. Lo que queda \approx 100 μ L, se resuspende con la pipeta.
8. Se platan 50, 150 y 300 μ L en cajas de LB con antibiótico.
 - Plásmido pJET1.2, pQE-30 y pQE-40, Medio LB, con 100mM ampicilina.
 - Plásmido pREP4, Medio LB, 25mM kanamicina (este ya se encuentra en las células *E. coli* M15).
9. Se pone a incubar por toda la noche a 37°C.

iii) Selección de células transformadas

1. De las colonias de *E. coli* que hayan crecido se numeran ≈ 9 y se resiembran con una punta de micropipeta de 200 μ L en una nueva caja con medio LB y antibiótico de acuerdo a los plásmidos que contengan, se ponen a incubar por unas 4h a 37°C.
2. De cada colonia resemebrada simultáneamente se toma una muestra con la misma punta y se pone cada una en un tubo eppendorf que contenga mezcla de reacción para PCR (sección 5.1.4).
3. Se realiza un PCR, con el producto de PCR se corre un gel de agarosa 1x para seleccionar colonias posiblemente positivas, la banda esperada es de ≈ 150 pb para lunasin.
4. De una de las colonias con probabilidad de ser positivas con un palillo se toma una muestra y se pone a crecer en 5mL de medio líquido LB durante toda la noche a 37°C.
5. Se extrae el plásmido (protocolo 5.1.2) y se manda a secuenciar en la unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM campus Morelos.
6. Si la colonia resulta positiva se resiembra en 5mL de caldo LB con antibiótico de acuerdo a los plásmidos que contengan y se prepara un glicerol.
7. Se guarda a -80°C.

5.1.7 Electroforesis

i) Electroforesis con gel de agarosa, Sambrook and Russel (2001)

1. Preparación del gel:

Para la preparación de TAE 1x consultar sección 5.2.2.

Gel	Agarosa	TAE 1x
1x	0.25g	25mL
2x	0.50g	25mL

Tabla 5.2 Preparación de geles de agarosa.

Calentar hasta ebullición en un matraz Erlenmeyer de 250mL, rectificar volumen en una probeta de 25mL, agregar 0.3 μ L de bromuro de etidio y mezclar. Es importante usar guantes y agregar el bromuro de etidio al final.

2. Corrida:

Cargar 3 μ L marcador de masa molecular en un poso y cargar 10 μ L muestra (7 μ L producto de PCR con 3 μ L buffer de carga), Correr a 100V durante 40 a 60min, de acuerdo a la separación deseada de las bandas de ADN.

ii) Electroforesis con gel de Glicina SDS-PAGE

Se prepara el gel glicina SDS-PAGE de acuerdo a la tabla 5.3, si solo se desea usar 1 gel el volumen debe ser 8.5mL y si son 2 geles el volumen debe ser 17mL, para preparar la solución AB-1.6 consultar la sección 5.2.3 tabla 5.11.

% Acrylamide mix	14%		15%	
H ₂ O	2.1	4.2	1.9	3.9
AB-1.6	4.1	8.2	4.3	8.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.1	4.3	2.1	4.3
10% SDS	0.085	0.170	0.085	0.170
10% APS	0.085	0.170	0.085	0.170
TEMED	0.0034	0.0068	0.0034	0.0068
Total:	8.5 mL	17 mL	8.5 mL	17 mL

% Acrylamide mix	16%		17%	
H ₂ O	1.6	3.2	1.3	2.5
AB-1.6	4.6	9.2	4.9	9.9
1.5 M Tris (pH 8.8)	2.1	4.3	2.1	4.3
10% SDS	0.085	0.170	0.085	0.170
10% APS	0.085	0.170	0.085	0.170
TEMED	0.0034	0.0068	0.0034	0.0068
Total:	8.5mL	17 mL	8.5 mL	17 mL

Tabla 5.3 Preparación de gel glicina SDS-PAGE.

El TEMED y la solución 10% APS se debe de guardar a -20°C, el tris pH 8.8 no se debe esterilizar una vez ajustado el pH.

Una vez vaciada la solución de acrilamida mix en la cámara, sobre la superficie del gel se agregan 200 μ L de isopropanol para eliminar las burbujas que se hayan formado y finalmente se deja gelificar durante 15min.

Una vez que haya gelificado el gel, se prepara el stack de acuerdo a la tabla 5.4, se coloca el peine en la cámara y se agrega el stack enseguida se pone a gelificar durante 10min.

H ₂ O	2.0	4.1
AB-1.6	0.51	1.0
1 M Tris (pH 6.8)	0.39	0.78
10% SDS	0.030	0.060
10% APS	0.030	0.060
TEMED	0.0030	0.0060
Total:	3mL	6mL

Tabla 5.4 Preparación del stack.

Para cargar la muestra de proteínas al gel, si la muestra fue dializada o no contiene urea, agregar 5 μ L de buffer E a 40 μ L de muestra de proteínas, enseguida se agrega 2.5 μ L de 4x Sample Buffer (sección 5.2.2) y se pone a calentar a 95°C durante 5min.

Se cargan 3 μ L de Marcador de Masa Molecular en el primer poso del gel y en los siguientes 20 μ L de muestra, se deja reposar durante 10min y se corre, si el gel es 14 ó 15% a 100V, si es de 16 ó 17% a 120V.

Una vez que termino de correr el gel se tiñe con solución para teñir geles SDS-PAGE (sección 5.2.2) con agitación durante unas 4h, enseguida se elimina el exceso de azul de Coomassie con unos 3 lavados con solución para desteñir geles SDS-PAGE (sección 5.2.2) poniendo la solución durante unos 20min por cada lavado.

iii) Electroforesis con gel Tricina SDS-PAGE, Hermann Schägger, (2006) y Hermann Schägger (1987).

Se prepara el gel tricina SDS-PAGE siguiendo las indicaciones de la tabla 5.5, la solución AB-X se prepara según sección 5.2.3 tabla 5.11 y puede ser para X=3, 4, 5 y 6 dependiendo de la resolución deseada.

Para preparar 1 o 2 geles el volumen a preparar es el mismo que en el gel glicina SDS-PAGE, una vez puesto en la cámara el gel, se agrega 200 μ L de isopropanol sobre la superficie del gel para eliminar cualquier burbuja que se haya formado y finalmente se deja gelificar durante 15min.

% Acrilamida mix	Unidades	16%/Glicero		16%/6M Urea	
Urea	g	3.06	6.12
Glicerol		0.60	1.20
H ₂ O		2.20	4.50	0.53	1.05
AB-X		2.85	5.65	2.85	5.65
Gel Buffer (3X)		2.85	5.65	2.85	5.65
Mezclar con Bortex	min	6	6	6	6
Reposar destapado	min	15.00	15	15	15
10% APS		0.028	0.057	0.028	0.057
Mezclar con Bortex	s	10 s	10 s	10 s	10 s
TEMED		0.0028	0.0057	0.0028	0.0057
Gelificar	min	15	15	15	15
Total:	mL	8.5	17	8.5	17

Tabla 5.5 Preparacion de geles tricina SDS-PAGE.

Cuando ya haya gelificado el gel se procede a preparar el stack siguiendo las indicaciones de la tabla 5.6, el stack se reposa durante 10min.

Unidades	4x		10x	
AB-6	0.25	0.50	0.60	1.20
Gel Buffer (3X)	0.75	1.50	1.00	2.00
Glicerol	0.21	0.42
H ₂ O	2.00	4.00	1.20	2.40
10% APS	0.023	0.045	0.015	0.030
TEMED	0.0023	0.0045	0.0015	0.0030
Gelificar	10 min	10 min	10 min	10 min
Lavar gel	H ₂ O	H ₂ O
Total:	3 mL	6 mL	3 mL	6 mL

Tabla 5.6 Preparacion del stack para gel tricina SDS-PAGE.

Voltaje	4x	10x
	tiempo	tiempo
35V	15 min	15 min

Tabla 5.7 Voltage y tiempo requerido al inicio de la corrida del gel tricina SDS-PAGE.

Para preparar la muestra de proteínas se siguen las mismas indicaciones que en el gel glicina SDS-PAGE.

Para correr el gel primero se corre de acuerdo a la tabla 5.7 y después se eleva el voltaje a 100V, al terminar la corrida se procede a teñir el gel de la misma manera que el gel glicina SDS-PAGE. (Protocolo 5.1.7 ii).

5.1.8 Bradford para cuantificar proteína

Se prepara las soluciones de la tabla 5.8 en tubos eppendorf de 1.5mL y se dejan reposar durante 30min.

Agregar	μL	μL	μL	μL	μL	μL
H ₂ O	700	700	700	700	700	700
H ₂ O	100	98	95	90	85	80
BSA (1mg/mL)	0	2	5	10	15	20
Bradford	200	200	200	200	200	200
Total:	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabla 5.8 Soluciones para preparar curva estándar a $\lambda_{595\text{nm}}$.

Absorbancia, Se ajusta a una curva estándar por mínimos cuadrados x (concentración), y (absorbancia)

$$Abs. = A + B[\text{Proteína}] \quad [\text{Proteína}] = \frac{Abs. - A}{B}$$

$$A = 0.0065 \quad B = 0.0135 \quad n = 5 \quad r^2 = 0.9985$$

Las soluciones de la tabla 5.8 se leen en el espectrofotometro absorbancia y transmitancia a $\lambda_{595\text{nm}}$, en la tabla 5.9 se muestran los resultados de absorbancia y en la tabla 5.10 de transmitancia.

	Proteína	Absorbancia recta			
	μg	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio
n	x	y_1	y_2	y_3	\bar{y}
1	2	0.0251	0.0333	0.0276	0.0287
2	5	0.0788	0.0773	0.0787	0.0783
3	10	0.1431	0.1429	0.1483	0.1448
4	15	0.1995	0.2080	0.2122	0.2066
5	20	0.2788	0.2718	0.2767	0.2758

Tabla 5.9 Resultados experimentales de absorbancia.

Los datos de la tabla 5.9 concertación de BSA en $\mu\text{g}/\text{mg}$ absorbancia (x,y) se ajustan por mínimos cuadrados a una recta, ecuación 5.1

$$\text{Abs.} = A + B (\text{Proteína}) \quad (5.1)$$

Las constantes de la ecuación 5.1 son $A=0.0065$, $B=0.0135$, $n=5$ y $r^2=0.9985$

Transmitancia. Se ajusta a una recta estándar por mínimos cuadrados x (concentración), y (\ln (% transmitancia))

	Proteína	% Transmitancia			
	μg	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Promedio
n	x	y_1	y_2	y_3	\bar{y}
1	2	96.27	93.28	94.05	94.53
2	5	85.95	84.30	84.26	84.84
3	10	74.04	72.43	70.50	72.32
4	15	65.47	62.57	61.23	63.09
5	20	53.97	53.84	53.32	53.71

Tabla 5.10 Voltage y tiempo requerido al inicio de la corrida del gel tricina SDS-PAGE.

$$\%T = C \cdot e^{D[\text{Proteína}]}$$

$$[\text{Proteína}] = \frac{\ln \frac{\%T}{C}}{D}$$

$$C = 99.6379 \quad D = -0.0309 \quad n = 5 \quad r^2 = 0.9986$$

Reposar 30min y leer con $\lambda_{595\text{nm}}$

5.1.10 Purificación de 6xHis-Proteínas⁹

Purificación con columna Ni-NTA

Una Columna de Ni-NTA: 13.78 g masa total, 4.2 g de resina

Vol. mL	Descripción
	1° Lisis de células de mL de LB por tubo pH 8.0, Buffer B
	Agitar 2 min, Reposar 1 horas Centrifugar 30 min, 7,000 rpm
	Proteína Total, Bradford, Leer con 5µL muestra, λ = 595 nm Abs. = [Proteína total] = mg/mL
	Proteína Total, Bradford, Diluir 5/35µL, Leer con µL muestra Abs. = [Proteína total] = mg/mL
	Eliminar el Etanol 30% en el que se gurdo la columna Centrifugar 3,000 rpm, 3min
4	Lavar la columna de Ni-NTA con etanol Centrifugar 3,000 rpm, 3min
4	Equilibrar la columna de Ni-NTA pH 8.0 Buffer B, Reposar 3min, Centrifugar 3,000 rpm, 3min
	Proteína Total cargada a la columna Ni-NTA pH 8.0 Buffer B, Reposar 3min, Centrifugar 2,000 rpm 3min
-	Proteína total después de pasar por la columna de Ni-NTA pH 8.0 Buffer B
4	°1 Lavado de la columna Ni-NTA pH 6.3 Buffer C, Centrifugar 2,000 rpm 3min
4	°2 Lavado de la columna Ni-NTA pH 6.3 Buffer C, Centrifugar 2,000 rpm 3min
2	°3 Lavado de la columna Ni-NTA pH 6.3 Buffer C, Centrifugar 2,000 rpm 3min
2	°4 Lavado de la columna Ni-NTA pH 6.3 Buffer C, Centrifugar 2,000 rpm 3min
2	°1 Lavado de la columna Ni-NTA pH 5.9 Buffer D, Centrifugar 2,000 rpm 3min
2	°2 Lavado de la columna Ni-NTA pH 5.9 Buffer D, Centrifugar 2,000 rpm 3min
2	°3 Lavado de la columna Ni-NTA pH 5.9 Buffer D, Centrifugar 3,000 rpm 3min

⁹ Cfr. Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

Vol. mL	Descripción
2	1° Elución de la proteína pH 4.5 Buffer E, Reposar 6 min, Centrifugar 3,000 rpm 3min
2	2° Elución de la proteína pH 4.5 Buffer E, Reposar 6 min, Centrifugar 3,000 rpm 3min
2	3° Elución de la proteína pH 4.5 Buffer E, Reposar 6 min, Centrifugar 3,000 rpm 3min
2	4° Elución de la proteína pH 4.5 Buffer E, Reposar 6 min, Centrifugar 3,000 rpm 3min
2	5° Elución de la proteína pH 4.5 Buffer E, Reposar 6 min, Centrifugar 3,000 rpm 3min
2	6° Elución de la proteína pH 4.5 Buffer E, Reposar 6 min, Centrifugar 3,000 rpm 3min
2	1° Lavado de la columna Ni-NTA pH 13.0 NaOH 0.5M, Reposar 10min, Cent. 3,000 rpm 3min
4	1° Lavado de la columna Ni-NTA Etanol al 30%, Centrifugar 3,000 rpm 3min
4	2° Lavado de la columna Ni-NTA pH 13.0 NaOH 0.5M, Reposar 10min, Cent. 3,000 rpm 3min
4	2° Lavado de la columna Ni-NTA Etanol al 30%, Centrifugar 3,000 rpm 3min
4	3° Lavado de la columna Ni-NTA pH 13.0 NaOH 0.5M, Reposar 10min, Cent. 3,000 rpm 3min
4	3° Lavado, de la columna Ni-NTA Etanol al 30%, Centrifugar 3,000 rpm 3min
4	4° Lavado de la columna Ni-NTA pH 13.0 NaOH 0.5M, Reposar 10min, Cent. 3,000 rpm 3min
4	4° Lavado de la columna Ni-NTA Etanol al 30%, Reposar 3min, Centrifugar 3,000 rpm 3min
6	5° Guardar la columna Ni-NTA Reposar 3mi, Guardar en Etanol al 30% a 10°C

5.2 Medios y soluciones

5.2.1 Medios de cultivo y almacenaje

LB

Peptona de Caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Aforar con H₂O a 1L y ajustar a pH 7.2 con NaOH 10N, si el medio es sólido agregar agar 15g/L.

Preparación de LB con antibióticos.

- **Ampicilina 100µg/mL de LB:** Kanamicina empleada fue de Sigma-Aldrich de número de catalogo K4378-5G. Se pesan 1g de ampicilina y se afora a 10mL con H₂O Milli-Q, se disuelve y esteriliza por filtración, se alícuota en tubos eppendorf de 1.5mL y se almacena a -20°C, solución stock. Usar solución stock Ampicilina 100µL/100mL de LB.
- **Kanamicina 25µg/mL de LB:** Ampicilina empleada fue de Sigma-Aldrich de número de catalogo A9518-5G. Se pesan 0.25g de kanamicina y se afora a 10mL con H₂O Milli-Q, se disuelve y esteriliza por filtración, se alícuota en tubos eppendorf de 1.5mL y se almacena a -20°C, solución stock. Usar solución stock kanamicina 25µL/100mL de LB.

Al agregar el antibiótico, el medio LB no debe estar muy caliente porque lo inactiva.

Glicerol

Se ponen a crecer células *E. coli* en 5mL de caldo LB durante toda la noche, al siguiente día se pasan 1.5mL a 0.5mL de glicerol estéril, se mezcla suavemente y se guardar a -80°C.

5.2.2 Soluciones para correr, teñir y desteñir geles

1x Gel Loading Dye, Blue (6x)

02.5	%	Ficoll 400
11	mM	EDTA
03.3	mM	Tris-HCl
00.017	%	SDS
00.015	%	Bromophenol Blue

New England BioLabs Inc., pH 8.0 a 25°C, Empleado en gel de agarosa para correr ADN.

4x SDS-PAGE Sample Buffer

1 M	Tris pH 6.8	1.25 g
8 %	SDS	0.4 g
40 %	Glicerol	2 mL
20 %	β -Mercaptoethsnol	1 mL
	Azul de Bromofenol	<u>pizca</u>
	Volumen total:	5 mL

El β -Mercaptoethsnol se agrega al final, se emplea para reducir los puentes disulfuro, SDS también se encuentra como SLS. Completar a 5mL con H₂O, Dividir en Aliquotas en tubos eppendorf de 1.5mL y almacenar a -20°C.

5x SDS-PAGE sampole buffer

De acuerdo al manual The QIAexpressionist™ de Quiagen.

0.225 M	Tris HCl, pH 6.8
50 %	Glicerol
5 %	SDS
0.05 %	Azul de Bromofenol
0.25 M	DTT

DTT se emplea para reducir los puentes disulfuro, almacenar a -20°C.

Solución para teñir geles SDS-PAGE

Metanol Absoluto	40	mL
Ácido Acético Glacial	10	mL
Azul de Coomasie R-250	0.25	g

Aforar a 100 mL con H₂O

Solución para desteñir geles SDS-PAGE

Metanol Absoluto	40	mL
Ácido Acético Glacial	10	mL

Aforar a 100 mL con H₂O

10x TAE (Tris Acetato)

Tris base	48.4	g
EDTA	3.72	g

Aforar con H₂O a 1L y ajustar pH 8.1 con ácido acético y filtrar. Para preparar TAE 1x tomar 100mL de solución 10x y aforar con H₂O a 1L.

5.2.3 Buffer para preparar y correr gel SDS-PAGE

En la tabla 5.11 se tiene las soluciones de acrilamida/bisacrilamida, así como sus características.

Solución	Unidades	AB-1.6	AB-3	AB-4	AB-5	AB-6
Acrilamida	g	29.2	48.0	47.5	47	46.5
Bisacrilamida	g	0.8	1.5	2	2.5	3
Mono acrilamida (T)	%	30	49.5	49.5	49.5	49.5
Reticulador (C)	%	1.6	3	4	5	6
T/C	-	18.75	16.5	12.375	9.9	8.25
Acrilamida/Bisacrilamida	-	36.5	32	23.75	18.8	15.5

Tabal 5.11 Soluciones de acrilamida/bisacrilamida.

Para las soluciones de acrilamida/bisacrilamida se recomienda preparar en probeta de 250mL, Ajustar volumen a 100mL en probeta de 100mL, no poner en hielo porque se cristaliza, Almacenar a 4°C.

1. Buffer Ánodo (+)

- **Buffer stock Ánodo 10x**

1.0 M Tris-Base 12.11 g

Aforar a 100mL con H₂O, ajustar a pH 8.9, almacenar a 4°C.

- **Buffer Ánodo 1x:** Tomar 10mL del Buffer ánodo 10x y aforrar con H₂O a 100mL, usar en la parte de abajo de la cámara de electroforesis, almacenar a 25°C.

2. Buffer Cátodo (-)

- **Buffer stock Cátodo 10x**

1.0 M Tris-Base 12.11 g
1.0 M Tricina 17.92 g
1.0 % SDS (10%) 10 mL

Aforar a 100mL con H₂O, no ajustar pH \approx 8.25, almacenar a 4°C.

- **Buffer Cátodo 1x:** Tomar 10mL del Buffer Cátodo 10x y aforrar con H₂O a 100mL, usar en la parte de arriba de la cámara de electroforesis, almacenar a 25°C.

3. Buffer Gel 3x

3.0 M Tris-Base 36.33 g
0.3 % SDS (10%) 3 mL

Aforar a 100mL con H₂O, ajustar pH 8.45, no poner en hielo, almacenar a 4°C.

5.2.4 Buffer para purificar 6xHis-Proteínas

1. Buffer stock para preparar soluciones B, C, D y E. Masa Molecular de: Urea 480.5 g/mol, Tris-Base 121.1g/mol (también se puede encontrar como: TrizmaTM o tris(hidroximetil) aminometano), KH_2PO_4 136.086g/mol y NaH_2PO_4 137.99g/mol.

- **Método 1**

8 M	Urea	240.25 g
10 mM	Tris-Base	0.6 g
100 mM	KH_2PO_4	6.9 g

Aforar a 500mL con H_2O , solo ajustar pH cuando se vaya a usar.

- **Método 2**

Solución stock 5X contiene.

0.5 M	Tris
50 mM	NaH_2PO_4

De la solución stock se prepara:

8 M	Urea	240.25 g
Sol. Stock 5x	10 mL	

Aforar a 500mL con H_2O , solo ajustar pH cuando se vaya a usar.

2. De la solución stock se toma el volumen que se vaya a utilizar y se ajusta el pH dependiendo del buffer, no esterilizar, almacenar a 25°C.
 - Buffer de Lisis B, pH 8.0
 - Buffer de Lavado C, pH 6.3
 - Buffer de Lavado D, pH 5.9
 - Buffer de Elusión E, pH 4.5

5.2.5 Buffer para digerir 6xHis-Proteínas

i) Buffer para enzima Proteasa Aspártica

4 M	NaCl	10 mL
1 M	CaCl ₂	20 mL

Aforar a 2L y ajustar a pH 6.2.

ii) Buffer para enzima Facto Xa

50 M	NaCl	50 mL
1 M	CaCl ₂	1 mL

Aforar a 2L y ajustar a pH 4.5 a 5.0.

5.3 Marcadores de Masa Molecular

5.3.1 Marcadores de Masa Molecular de DNA

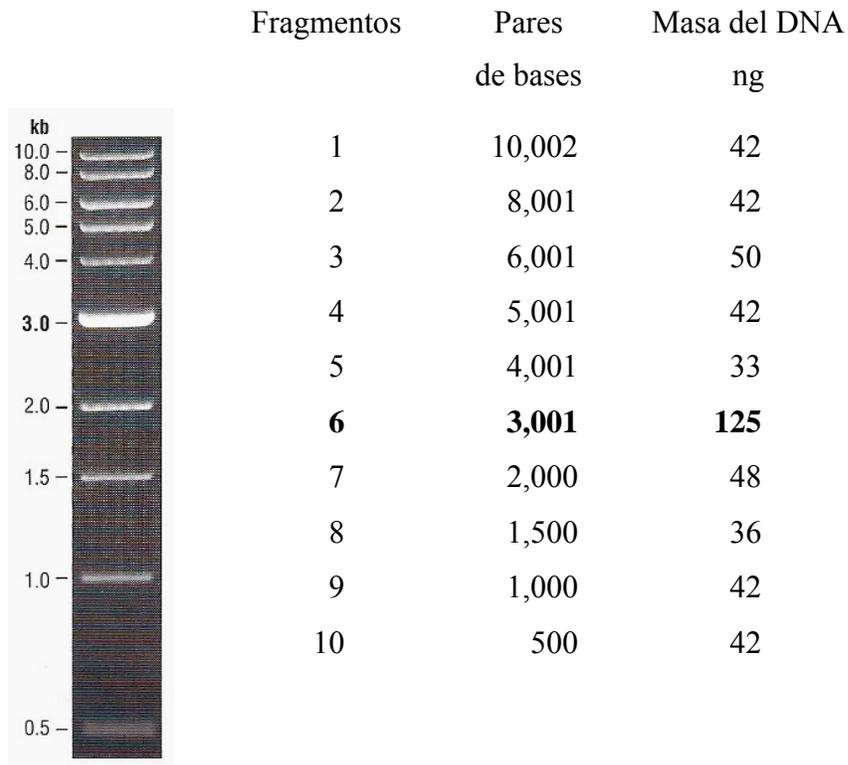


Figura 5.1 Gel TAE-agarosa 0.8%, visualizado con Bromuro de Etidio, Marca: BioLabs Ing, Almacenar a -20°C. Marcador de Masa Molecular de ADN de 1kpb.¹

¹ Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

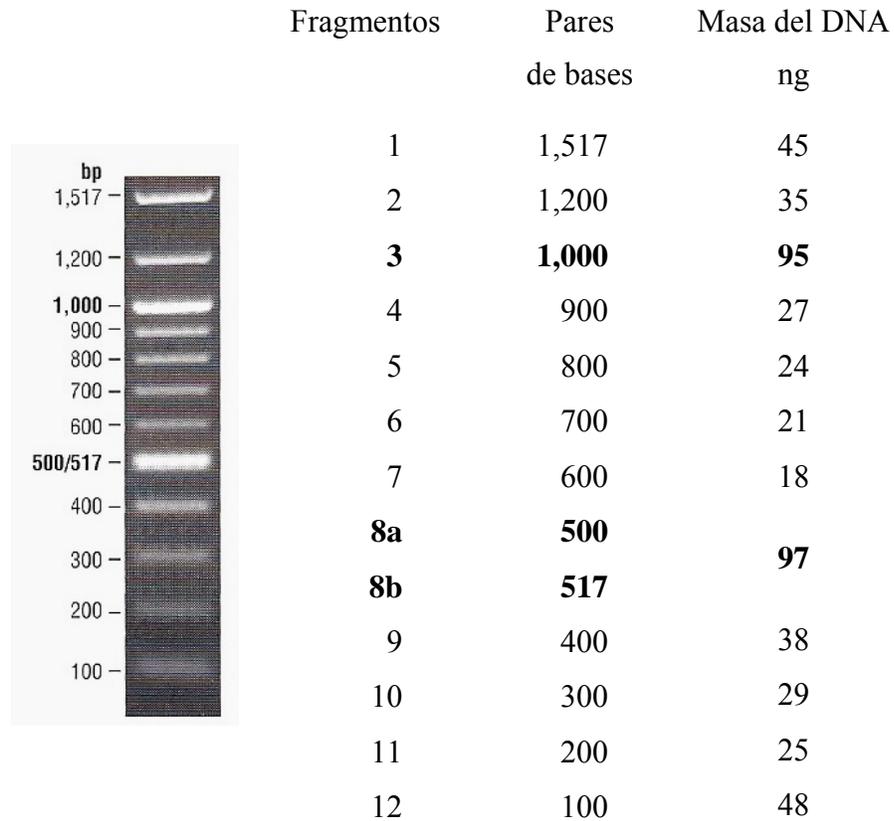


Figura 5.2 Gel TAE-agarosa 1.3%, visualizado con Bromuro de Etidio, Marca: BioLabs Ing, Almacenar a -20°C. Marcador de Masa Molecular de DNA de 100pb.²

² Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

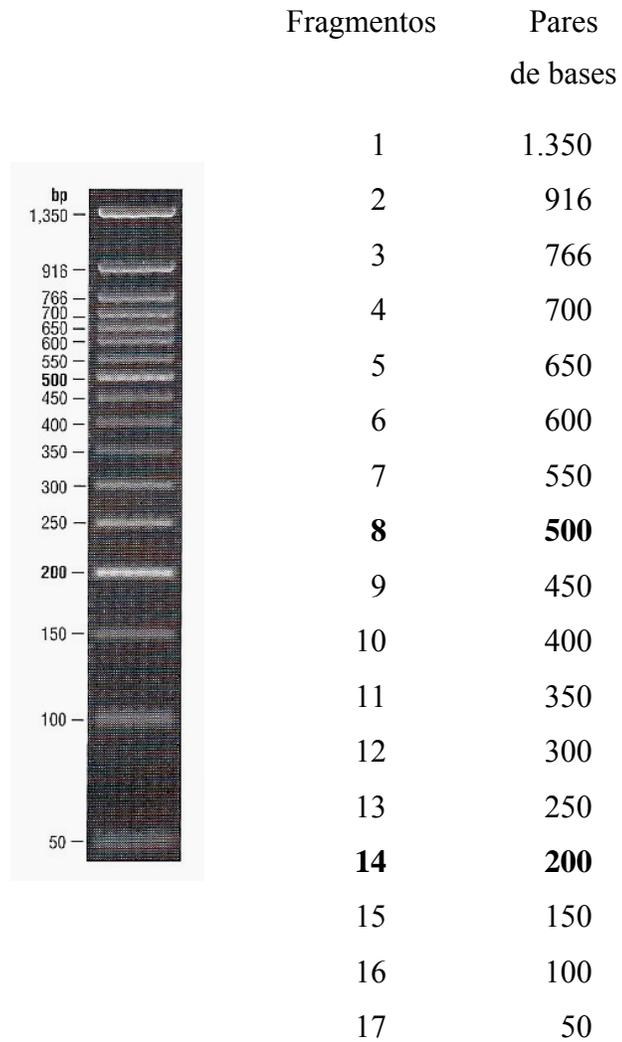


Figura 5.3 Gel TAE-agarosa 1.8%, visualizado con Bromuro de Etidio, Marca: BioLabs Ing. Almacenar a -20°C. Marcador de Masa Molecular de DNA de 50pb.³

³ Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

5.3.2 Marcadores de Masa Molecular de proteínas

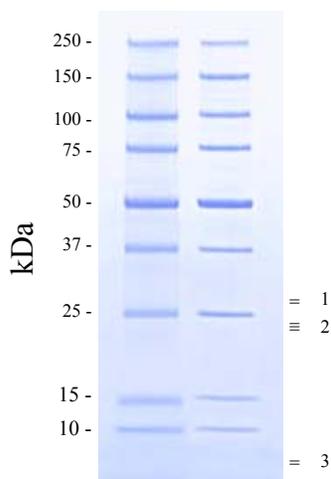


Figura 5.4 Gel 20% Tris-HCl SDS-PAGE, cargados a la columna 10 μ L, Teñido con Azul de Coomassie R-250. Compañía Bio-Rad, Número de catalogo 161-0372, almacenar a -20°C.

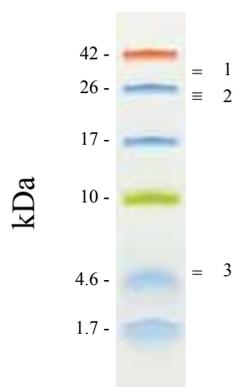


Figura 5.5 Gel 18% Tris-HCl SDS-PAGE, Marcador de Masa Molecular de bajo rango (2.5 a 45kDa), Compañía: Fermentas, número de catalogo: SM1861, almacenar a -20°C.⁴

⁴ Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

	Péptidos	Calculada kDa	Aparente kDa
2	6xH-DEFR	24.739	26
1	6xH-DEFR-Proteasa Aspártica-Lunasin	28.790	28
2	6xH-DEFR-F	23.631	23
3	M-Lunasin	5.159	---
1	6xH-DEFR-Factor Xa-Lunasin	28.968	29
2	6xH-DEFR-Factor Xa	23.940	---
3	Lunasin	5.028	4.8

Tabla 5.12 Péptidos esperados y sus Masas Moleculares.

5.4 Enzimas

5.4.1 Enzimas de restricción

Nombre: *KpnI*

Origen del gen: *Klebsiella pneumoniae* 0K8 (ATCC 49790)

Marca: New England BioLabs Inc.

Sitio de restricción:



Condiciones de reacción:

NE Buffer 1 + BSA

10 mM Bis Tris Propane-HCl

10 mM MgCl₂

1 mM Dithiothreitol (pH 7.9 a 25°C)

100 µg/mL BSA

Temperatura de incubación: 37°C Almacenar: -20°C

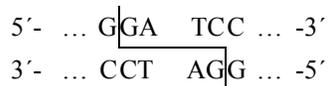
Tiempo de incubación: 5min Termo sensible

Nombre: *BamHI*

Origen del gen: *Bacillus amyloliquefaciens* H (ATCC 49763)

Marca: New England BioLabs Inc.

Sitio de restricción:



Condiciones de reacción:

100 mM NaCl

50 mM Tris-HCl

10 mM MgCl₂

1 mM Dithiothreitol (pH 7.9 a 25°C)

100 µg/mL BSA

Temperatura de incubación: 37°C Almacenar: -20°C

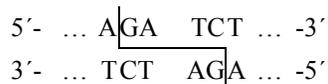
Tiempo de incubación: 5 min Termo sensible

Nombre: *Bgl*III

Origen del gen: *Basillus globigii* (ATCC 49760)

Marca: New England BioLabs Inc.

Sitio de restricción:



Condiciones de reacción:

100 mM NaCl
50 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol (pH 7.9 a 25°C)

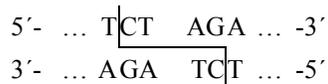
Temperatura de incubación: 37°C Almacenar: -20 °C
Tiempo de incubación: 5 min Termo estable.

Nombre: *Xba*I

Origen del gen: *Xanthomonas badrii* (ATCC 11672)

Marca: New England BioLabs Inc.

Sitio de restricción:



Condiciones de reacción:

NE Buffer 2 + BSA
50 mM NaCl
10 mM Tris-HCl
10 mM MgCl₂
1 mM Dithiothreitol (pH 7.9 a 25°C)
100 µg/mL BSA

Temperatura de incubación: 37 °C Almacenar: -20 °C
Tiempo de incubación: 5 min Se inactiva a 65°C por 20min.

5.4.2 Enzima *Taq* DNA polimerasa, Sambrook and Russel (2001)

Descripción: *Taq* ADN polimerasa es una polimerasa termoestable *Taq* purificada de la cepa de *Thermus aquaticus* por varias sucesiones de cromatografía de líquidos, puede amplificar fragmentos de ADN de 100pb a 5kpb. La enzima tiene actividades 5'→3' polimerasa y exonucleasa, puede añadir un único residuo de deoxiadenosin (A) al extremo 3' de productos de PCR de ADN dúplex. Esta propiedad permite una ligadura fácil y eficiente de productos de PCR en vectores de clonación TA.

Aplicaciones: La enzima puede ser usada para PCR, termosecuenciación y otras aplicaciones de diagnóstico. *Taq* ADN polimerasa es apropiada para aplicaciones de rutina diaria. Las aplicaciones de PCR con poca abundancia de ADN molde (menos de 100 moléculas de ADN molde) son limitadas.

Unidades Enzimáticas:

Concentración: 5u/μL

Definición: Una unidad se define como la cantidad de enzima que incorpora 10 nmoles de dNTPs en forma de ácido insoluble en 30min a 72°C, bajo las condiciones siguientes.

25 mM	TAPS (Tris-(hidroximetil) ácido metil-amino-propano-sulfónico, sal de sodio pH 9.3 a 25°C
50 mM	KCl
2 mM	MgCl ₂
1 mM	β-mercaptoetanol
	ADN activado de timo de ternera como sustrato

Almacenamiento: -20°C.

10x Buffer de reacción:

160 mm	(NH ₄) ₂ SO ₄
670 mM	Tris-HCl, pH 8.8 a 25°C
15 mM	MgCl ₂
0.1 %	Tween 20

5.4.3 Proteasas

i) Proteasa Aspártica²

Rizomucor miehei

- **Tipo L:** Nativa, se caracteriza por tener una alta estabilidad térmica y más proteolítica que el cuajo de ternero.
- **Tipo TL:** Es una enzima desestabilizada, elaborada por oxidación de la enzima nativa, es termolábil, de mayor dependencia al pH y menos proteolítica que la tipo L
- **Tipo XL:** Es extra termolábil, elaborada mediante una mayor oxidación que la tipo TL, es de mayor dependencia al pH y tiene marcada menor proteólisis que la tipo TL.

Se usan con fines industriales para la producción de quesos

La empleada fue la tipo TL

Se llama Proteasa Aspártica debido a que tiene dos ácidos aspárticos en el sitio de catálisis

Proviene del hongo *Rizomucor miehei*

Su pH óptimo es ácido

Biotec Especialidades Alimenticias, S.A. de C.V.

Temperatura recomendada 4 - 15°C, p roteger de la luz solar directa

Fromase 750 TL

Corta entre feni alanina y metionina Met

² Consultar fuentes electrónicas.

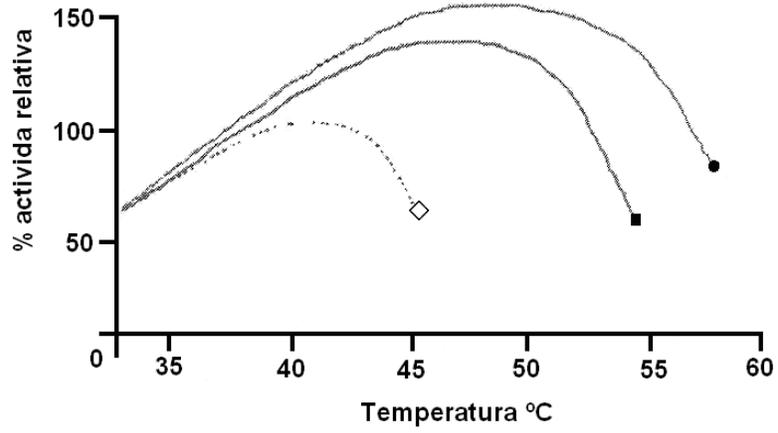


Figura 6.6 Tipo TL (●) Cuajo de ternera (■) y Tipo XL (◇)

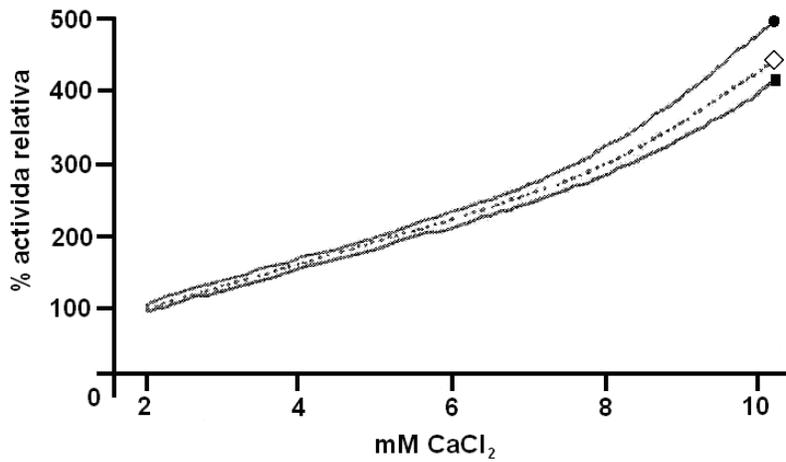


Figura 6.7 Tipo TL (●), Tipo XL (◇) y Cuajo de ternera (■).

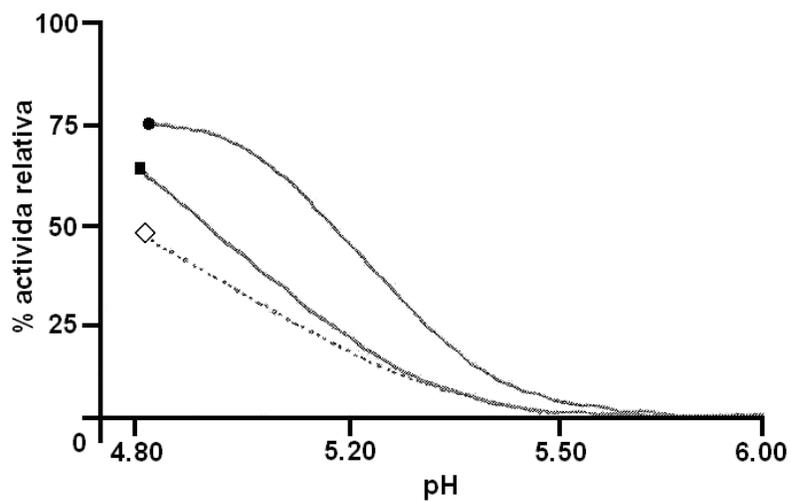


Figura 6.8 Tipo TL (●), Cuajo de ternera (■) y Tipo XL (◇)

ii) Factor Xa

5.5 Oligos

Todos los oligos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM campus Morelos.

5.5.1 Forward

Nombre: Lun-*Xba*-F1

Sitios del oligo	<i>Xba</i> I		Inic.	Lunasin								
Secuencia Oligo	5'-	TCT	AG	A	TG	TCC	AAA	TGG	CAG	CAC	CA	-3'
Cadena Comp.	3'-	AGA	TC	T	AC	AGG	TTT	ACC	GTC	GTG	GT	-5'
Péptido 3 Letras				Met	Ser	Lys	Trp	Gln	His	Gln		
Péptido 1 Letra				M	S	K	W	Q	H	Q		

Longitud =	25	Bases	Masa Molecular =	8,043.00 g/mol
Volumen =	500	µL	Concentración =	3.55 µg/µL
T _{m1} =	68.02	°C		440.91 pmol/µL
T _{m2} =	74.00	°C	C+G =	48.00 %

Tabla 5.13 Secuencia y características del oligo forward, 1723 Unidad de Síntesis y Secuenciación.

Nombre: Lun-Bam-F2

Sitios del oligo	BamHI	Lunasin
Secuencia Oligo	5'- GGA TCC TCC AAA TGG CAG CAC CAG CAA GAT A -3'	
Cadena Comp.	3'- CCT AGG	-5'
Péptido 3 Letras	Gly Ser Ser Lys Trp Gln His Gln Gln Asp Ser	
Péptido 1 Letra	G S S K W Q H Q Q D S	

Longitud =	31 Bases	Masa Molecular =	10,017.20 g/mol
Volumen =	500 μ L	Concentración =	3.28 μ g/ μ L
T _{m1} =	72.31 °C		327.86 pmol/ μ L
T _{m2} =	94.00 °C	C+G =	51.61 %

Tabla 5.14 Secuencia y características del oligo forward, 4555 Unidad de Síntesis y Secuenciación.**Nombre:** Lun-Bgl-F3

Sitios del oligo	BglIII	Proteasa Aspártica	Lunasin
Secuencia Oligo	5'- AGA TCT TTC ATG TCC AAA TGG CAG CAC CAG CAA GAT A -3'		
Cadena Comp.	3'- TCT AGA		-5'
Péptido 3 Letras	Arg Ser Phe	Met Ser Lys Trp Gln His Gln Gln Asp Ser	
Péptido 1 Letra	R S F	M S K W Q H Q Q D S	

Longitud =	37 Bases	Masa Molecular =	11,962.40 g/mol
Volumen =	500 μ L	Concentración =	2.93 μ g/ μ L
T _{m1} =	71.53 °C		245.07 pmol/ μ L
T _{m2} =	106.00 °C	C+G =	43.24 %

Tabla 5.15 Secuencia y características del oligo forward, 1120 Unidad de síntesis y secuenciación.

Nombre: Lun-*Bgl*-F4

Sitios del oligo	<i>Bgl</i> III	Factor Xa	Lunasin
Sec. Oligo	5'- AGA TCT ATC GAG GGG CGC	TCC AAA TGG CAG CAC CAG CAA GAT A	-3'
Cad. Com.	3'- TCT AGA		-5'
Péptido 3L	Arg Ser Ile Glu Gly Arg	Ser Lys Trp Gln His Gln Gln Asp Ser	
Péptido 1L	R S I E G R	S K W Q H Q Q D S	

Longitud =	43 Bases	Masa Molecular =	13,993.60 g/mol
Volumen =	500 μ L	Concentración =	2.34 μ g/ μ L
T _{m1} =	76.50 °C		167.45 pmol/ μ L
T _{m2} =	132.00 °C	C+G =	53.49 %

Tabla 5.16 Secuencia y características del oligo forward, 1119 Unidad de síntesis y secuenciación.

5.5.2 Rivers

Nombre: Lun-*Kpn*-R1

Sitios del oligo	Lunasin	Paro	<i>Kpn</i> I
Cadena Comp.	5'- C GAT GAT GAT GAT GAC GAC GAC	TAA	GT ACC -3'
Secuencia Oligo	3'- G CTA CTA CTA CTA CTG CTG CTG	ATT	CCA TGG -5'
Péptido 3 Letras	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp		
Péptido 1 Letra	D D D D D D D D		

Longitud =	31 Bases	Masa Molecular =	9,947.20 g/mol
Volumen =	500 μ L	Concentración =	2.55 μ g/ μ L
T _{m1} =	71.21 °C		256.66 pmol/ μ L
T _{m2} =	92.00 °C	C+G =	48.39 %

Tabla 5.17 Secuencia y características del oligo rivers, 1724 Unidad de síntesis y secuenciación.

Nombre: Lun-*Kpn*-R2

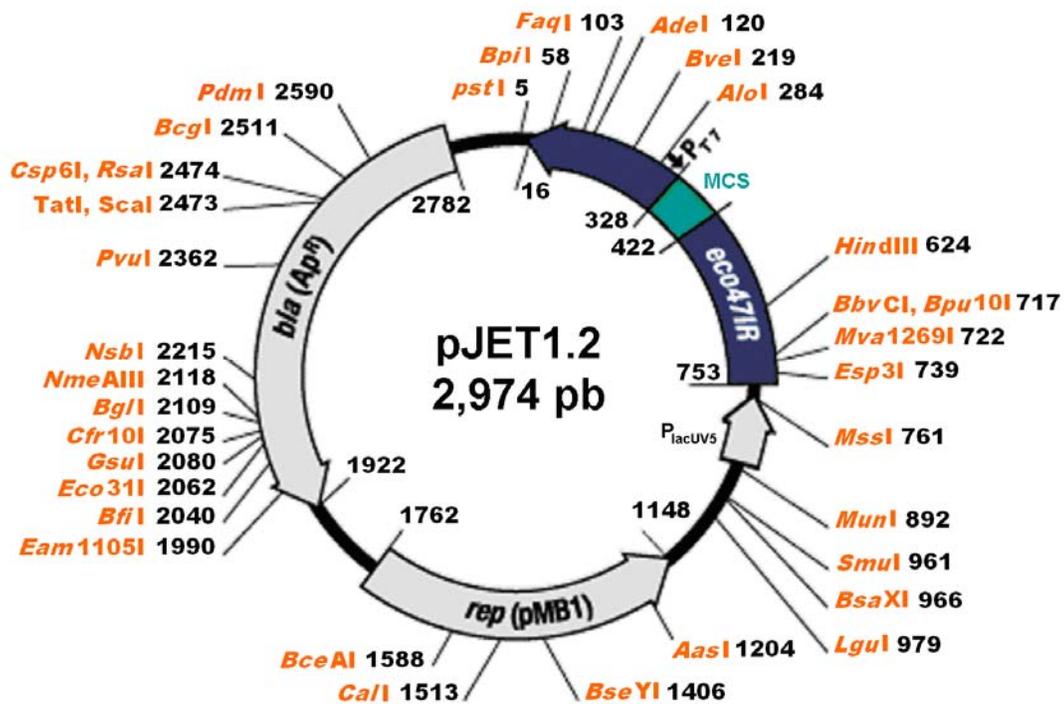
Sitios del oligo	Lunasin										Paro	<i>Kpn</i> I		
Cadena Comp.	5'-GGC	GAT	GAC	GAT	GAT	GAT	GAT	GAC	GAC	GAC	TAA	GT	ACC	-3'
Secuencia Oligo	3'-CCG	CTA	CTG	CTA	CTA	CTA	CTA	CTG	CTG	CTG	ATT	CCA	TGG	-5'
Péptido 3 Letras	Gly	Asp												
Péptido 1 Letra	G	D	D	D	D	D	D	D	D	D				

Longitud =	39	Bases	Masa Molecular =	12,490.80	g/mol
Volumen =	500	μL	Concentración =	2.79	μg/μL
T _{m1} =	74.81	°C		223.02	pmol/μL
T _{m2} =	118.00	°C	C+G =	51.28	%

Tabla 5.18 Secuencia y características del oligo rivers, 1121 Unidad de síntesis y secuenciación.

5.6 Vectores para clonar

5.6.1 Vector pJET1.2/blunt



Bases		310	332
Forward	23 bases	5'- CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC -3'	

Bases		428	405
Reverse	24 bases	5'- AA GAA CAT CGA TTT TCC ATG GCA G -3'	

Figura 5.9 Plásmido pJET1.2/Blunt y Primers.

Elemento	Posición pb	Función
<i>rep</i> (pMB1)	1762-1148	Sitio <i>ori</i> o replicon, <i>rep</i> es derivado del vector pMB1, es el sitio de inicio de la replicación del vector pJET1.2.
<i>bla</i> (Ap ^R)	1162 ±1	Gen β-lactamasa, que confiere resistencia a ampicilina.
<i>Eco47IR</i>	753-16	Gene que permite la selección de las bacterias positivas.
P _{LacUV5}	892-769	Promotor modificado de P _{lac} que permite la expresión de <i>Eco47IR</i> .
T7 promotor	305-324	Codifica para una RNA polimerasa del bacteriófago T7 que cataliza la formación del RNA en la dirección 5'→3'.
Multiple Cloning Site (MCS)	422-328	Sitio Múltiple de Clónaje.
Insertion site Blunt DNA ends	371-372	Sitio para la unión con el inserto con extremos rectos.

Tabla 5.19 Elementos genéticos del vector pJET1.2/blunt.

<i>AasI</i>	1204	<i>Cfr10I</i>	2075	<i>HindIII</i>	624	<i>PstI</i>	5
<i>AdeI</i>	120	<i>Csp6I</i>	2474	<i>Kpn2I</i>	343	<i>PvuI</i>	2362
<i>AloI</i>	284	<i>Eam1105I</i>	1990	<i>LguI</i>	979	<i>RsaI</i>	2474
<i>BfiI</i>	2040	<i>Eco130I</i>	408	<i>MssI</i>	761	<i>ScaI</i>	2473
<i>BglI</i>	2109	<i>Eco31I</i>	2062	<i>MunI</i>	892	<i>SmuI</i>	951
<i>BpiI</i>	58	<i>Eco52I</i>	329	<i>Mva1269I</i>	722	<i>TatI</i>	2473
<i>Bpu10I</i>	717	<i>Eco88I</i>	352	<i>NcoI</i>	408	<i>XbaI</i>	377
<i>Bsu15I</i>	417	<i>Esp3I</i>	739	<i>NotI</i>	328	<i>XhoI</i>	352
<i>BveI</i>	219	<i>Faq I</i>	103	<i>NsbI</i>	2215		
<i>CaiI</i>	1513	<i>Gsu I</i>	2080	<i>PdmI</i>	2590		

Tabla 5.20 Enzimas que cortan a pJET1.2/blunt.

<i>AarI</i>	<i>BpII</i>	<i>BstXI</i>	<i>Eco91I</i>	<i>MlsI</i>	<i>Pfl 23II</i>	<i>SgsI</i>
<i>Acc65I</i>	<i>Bpu1102I</i>	<i>Cfr9I</i>	<i>Eco105I</i>	<i>MluI</i>	<i>PfoI</i>	<i>SmaI</i>
<i>AjiI</i>	<i>BseII</i>	<i>Cfr42I</i>	<i>Eco147I</i>	<i>Mph1103I</i>	<i>Ppu21I</i>	<i>TstI</i>
<i>AjuI</i>	<i>BshTI</i>	<i>CpoI</i>	<i>EcoO109I</i>	<i>NdeI</i>	<i>Psp5II</i>	<i>Van91I</i>
<i>AlfI</i>	<i>Bsp68I</i>	<i>Ecl136II</i>	<i>EcoRI</i>	<i>NheI</i>	<i>PsyI</i>	<i>XagI</i>
<i>Apal</i>	<i>Bsp119I</i>	<i>Eco24I</i>	<i>EheI</i>	<i>OliI</i>	<i>SacI</i>	<i>XcmI</i>
<i>BamHI</i>	<i>Bsp120I</i>	<i>Eco32I</i>	<i>FspAI</i>	<i>PaeI</i>	<i>Sall</i>	<i>XmaII</i>
<i>BclI</i>	<i>Bsp1407I</i>	<i>Eco47III</i>	<i>HincII</i>	<i>PasI</i>	<i>SdaI</i>	
<i>BcuI</i>	<i>BspTI</i>	<i>Eco72I</i>	<i>KpnI</i>	<i>Paul</i>	<i>Sfi I</i>	
<i>BoxI</i>	<i>Bst1107I</i>	<i>Eco81I</i>	<i>KspAI</i>	<i>PdiI</i>	<i>SgfI</i>	

Tabla 5.21 Enzimas que no cortan a pJET1.2/blunt.

Sitios del oligo		T7 Promotor Comienzo de la transcripción T7→			<i>Eco52I</i> <i>NotI</i>	<i>BglIII</i>	
Número de pb	301	310	316	328	337		
MCS	5'-GGC GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GCC GC C AGA TCT -3'						
Cad. Com.	3'-CCG CAT TAT GCT GAG TGA TAT CCC TCT CGC CGG CG G TCT AGA-5'						
	Forward →						

Sitios del oligo	<i>Kpn2I</i>	<i>Eco88I</i> <i>XhoI</i>		Producto PCR Extremos rectos	
Número de pb	343	349 352	361	371	372
MCS	5'-TCC GGA TGG CTC GAG TTT TTC AGC AAG AT				
Cad. Com.	3'-AGG CCT ACC GAG CTC AAA AAG TCG TTC TA				
	A -3' T -5'				

Sitios del oligo		<i>XbaI</i>	<i>BglIII</i>		<i>Eco130I</i> <i>NcoI</i>	
Número de pb	373	383	391	400 403	412	
MCS	5'- TCT TTC TAG AAG ATC TCC TAC AAT ATT CTC AGC TGC CAT GGA -3'					
Cad. Com.	3'-AGA AAG ATC TTC TAG AAG ATG TTA TAA GAG TCG ACG GTA CCT -5'					
	← Reverse					

Sitios del oligo		<i>Bsu</i> 15I		
Número de pb	415	422	428	430
MCS	5'- AA A TCG ATG TTC TTC T -3'			
Cad. Com.	3'- TTT AGC TAC AAG AAG A -5'			
	Reverse			

Tabla 5.22 Sitio Múltiple de Clónaje (MCS) de pJET1.2/blunt.

5.6.2 Vector pQE-30

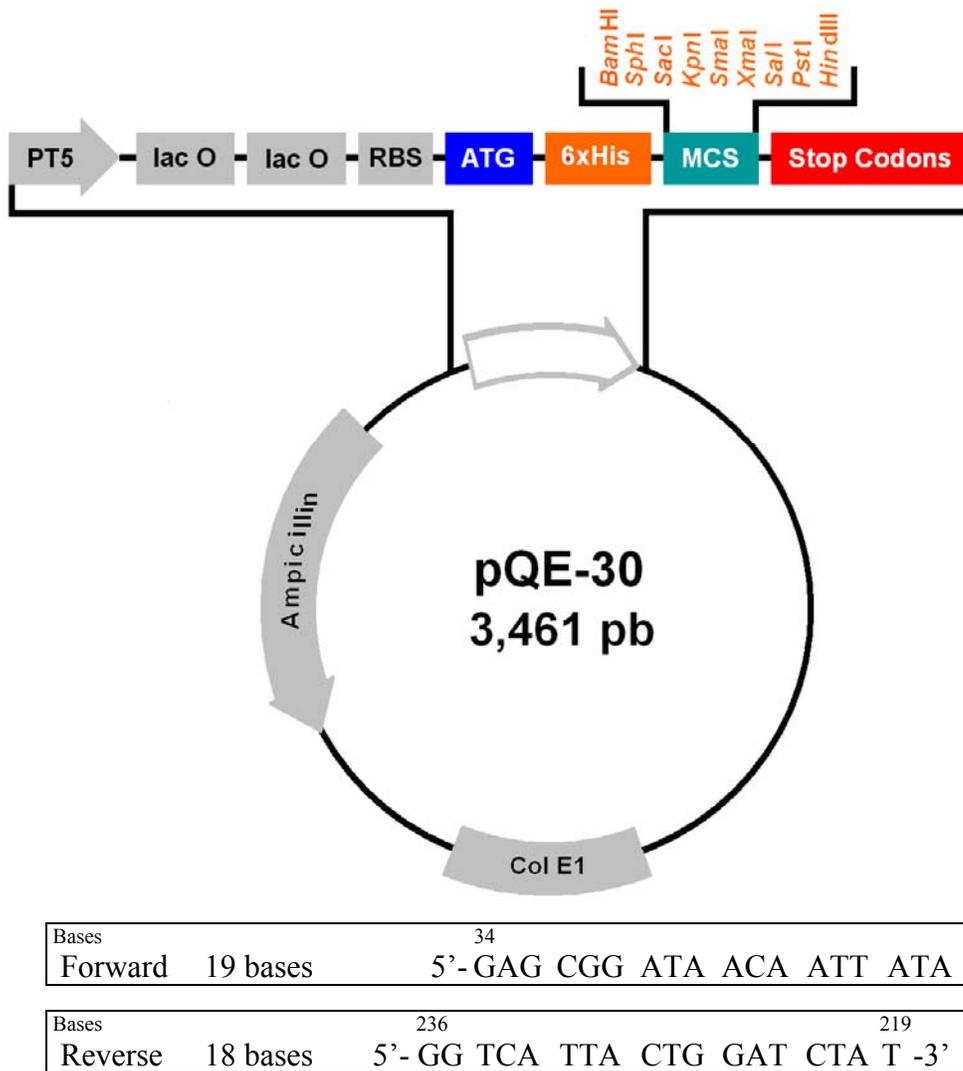


Figura 5.10 Vector pQE-30 y sus primers.

Elementos	Posición pb
Tamaño del Vector	3461
Inicio de la numeración en <i>XhoI</i> (CTC GAG)	1-6
Elemento operador lac/promotor T5 (PT5)	7-87
Comienzo de la transcripción T5	61
Sitio de unión a ribosomas (RBS)	88-117
Secuencia del código 6xHis	127-144
Sitio múltiple de clonaje (MCS)	145-192
Región de la terminación de la transcripción λt_0	208-302
Región de la terminación de la transcripción <i>rrnB</i> T1	1064-1162
Origen de la replicación <i>ColEI</i>	1638
Código de secuencia de la β -lactamasa (Confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos como la ampicilina)	3256-2396

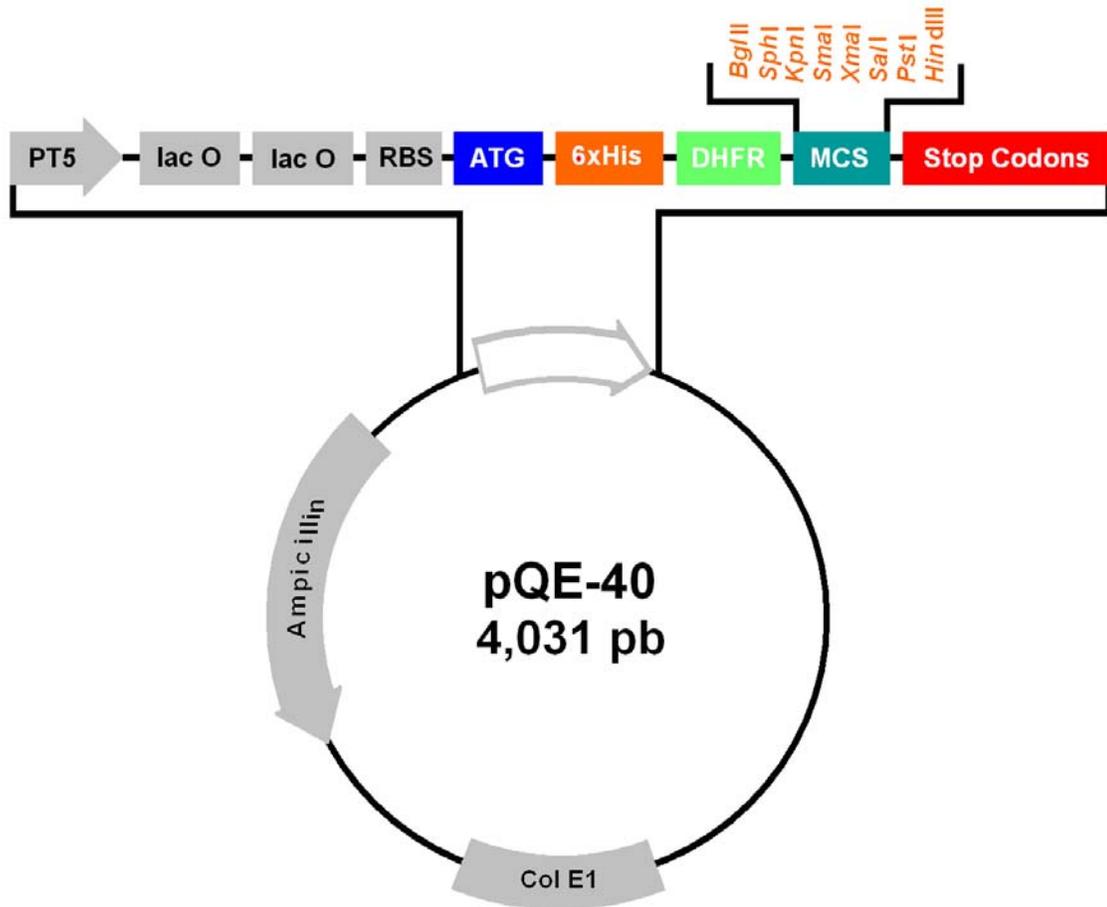
Tabla 5.23 Posición de los elementos en bases del Vector pQE-30.

Sitios del oligo	Inic.	6xHis	<i>Bam</i> HI	<i>Sph</i> I										
Número de pb	115 118	127	145	151										
MCS	5'-ATG AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC GCA TGC -3'													
Cad. Com.	3'-CCT AGG CGT ACG -5'													
Proteína 3L	Met	Arg	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Gly	Ser	Asp	Cys
Proteína 1L	M	R	G	S	H	H	H	H	H	H	G	S	D	C

Sitios del oligo	<i>Sac</i> I	<i>Kpn</i> I	<i>Sma</i> I, <i>Xma</i> I	<i>Sal</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III	Alto						
Número de pb	157	163	169	175	181	187	193 196						
MCS	5'-GAG CTC GGT ACC CCG GGT CGA CCT GCA GCC AAG CTT AAT TAG -3'												
Cad. Com.	3'-CTC GAG CCA TGG GGC CCA GCT GGA CGT C TTC GAA -5'												
Proteína 3L	Glu	Leu	Gly	Thr	Pro	Gly	Arg	Pro	Ala	Ala	Lys	Leu	Asn
Proteína 1L	E	L	G	T	P	G	R	P	A	A	K	L	N

Tabla 5.24 Sitio Múltiple de Clonaje (MCS) del Vector pQE-30.

5.6.3 Vector pQE-40



Bases		34	52
Forward	19 bases	5'-GAG CGG ATA ACA ATT ATA A -3'	
Bases		806	789
Reverse	18 bases	5'-GG TCA TTA CTG GAT CTA T -3'	

Figura 5.11 Vector pQE-40 y sus primers.

Elementos	Posición pb
Tamaño del Vector	4031
Inicio de la numeración en <i>Xho</i> I (CTC GAG)	1-6
Elemento operador lac/promotor T5 (PT5)	7-87
Comienzo de la transcripción T5	61
Sitio de unión a ribosomas (RBS)	88-117
Secuencia del código 6xHis	127-144
Código de secuencia de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR)	157-714
Sitio múltiple de clonaje (MCS)	721-762
Región de la terminación de la transcripción Lambda t_0	778-872
Región de la terminación de la transcripción <i>rrnB</i> T1	1634-1732
Origen de la replicación <i>ColE1</i>	2238
Código de secuencia de la β -lactamasa (Confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos como la ampicilina)	3826-2966

Tabla 5.25 Posición de los elementos en bases del Vector pQE-40.

Sitios del oligo	Inic.		6xHis	<i>Bam</i> HI										
Número de pb	115	118	127	145	151									
MCS	5'- ATG AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC GGC ATC -3'													
Cad. Com.	3'- CCT AGG -5'													
Proteína 3L	Met	Arg	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Gly	Ser	Gly	Ile
Proteína 1L	M	R	G	S	H	H	H	H	H	H	G	S	G	I

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	157 178													
MCS	5'- ATG GTT CGA CCA TTG AAC TCG ATC GTC GCC GTG TCC CAA AAT -3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Met	Val	Arg	Pro	Leu	Asn	Ser	Ile	Val	Ala	Val	Ser	His	Asn
Proteína 1L	M	V	R	P	L	N	S	I	V	A	V	S	H	N

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	199							220						
MCS	5'-ATG GGG ATT GGC AAG AAC GGA GAC CTA CCC TGG CCT CCG CTC-3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Met	Gly	Ile	Gly	Lys	Asn	Gly	Asp	Leu	Pro	Trp	Pro	Pro	Leu
Proteína 1L	M	G	I	G	K	N	G	D	L	P	W	P	P	L

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	241							262						
MCS	5'-AGG AAC GAG TTC AAG TAC TTC CAA AGA ATG ACC ACA ACC TCT-3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Arg	Asn	Glu	Phe	Lys	Tyr	Phe	His	Arg	Met	Thr	Thr	Thr	Ser
Proteína 1L	R	N	E	F	K	Y	F	H	R	M	T	T	T	S

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	283							304						
MCS	5'-TCA GTG GAA GGT AAA CAG AAT CTG GTG ATT ATG GGT AGG AAA-3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Ser	Val	Glu	Gly	Lys	His	Asn	Leu	Val	Ile	Met	Gly	Arg	Lys
Proteína 1L	S	V	E	G	K	H	N	L	V	I	M	G	R	K

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	325							346						
MCS	5'-ACC TGG TTC TCC ATT CCT GAG AAG AAT CGA CCT TTA AAG GAC-3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Thr	Trp	Phe	Ser	Ile	Pro	Glu	Lys	Asn	Arg	Pro	Leu	Lys	Asp
Proteína 1L	T	W	F	S	I	P	E	K	N	R	P	L	K	D

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	367							388						
MCS	5'-AGA ATT AAT ATA GTT CTC AGT AGA GAA CTC AAA GAA CCA CCA-3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Arg	Ile	Asn	Ile	Val	Leu	Ser	Arg	Glu	Leu	Lys	Glu	Pro	Pro
Proteína 1L	R	I	N	I	V	L	S	R	E	L	K	E	P	P

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	409 430													
MCS	5'-CGA GGA GCT CAT TTT CTT GCC AAA AGT TTG GAT GAT GCC TTA-3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Arg	Gly	Ala	His	Phe	Leu	Ala	Lys	Ser	Leu	Asp	Asp	Ala	Leu
Proteína 1L	R	G	A	H	F	L	A	K	S	L	D	D	A	L

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	451 472													
MCS	5'-AGA CTT ATT GAA CAA CCG GAA TTG GCA AGT AAA GTA GAC ATG-3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Arg	Leu	Ile	Glu	His	Pro	Glu	Leu	Ala	Ser	Lys	Val	Asp	Met
Proteína 1L	R	L	I	E	H	P	E	L	A	S	K	V	D	M

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	493 514													
MCS	5'-GTT TGG ATA GTC GGA GGC AGT TCT GTT TAC CAG GAA GCC ATG-3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Val	Trp	Ile	Val	Gly	Gly	Ser	Ser	Val	Tyr	His	Glu	Ala	Met
Proteína 1L	V	W	I	V	G	G	S	S	V	Y	H	E	A	M

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	535 556													
MCS	5'-AAT CAA CCA GGC CAC CTT AGA CTC TTT GTG ACA AGG ATC ATG-3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Asn	His	Pro	Gly	His	Leu	Arg	Leu	Phe	Val	Thr	Arg	Ile	Met
Proteína 1L	N	H	P	G	H	L	R	L	F	V	T	R	I	M

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	577 598													
MCS	5'-CAG GAA TTT GAA AGT GAC ACG TTT TTC CCA GAA ATT GAT TTG-3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	His	Glu	Phe	Glu	Ser	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Glu	Ile	Asp	Leu
Proteína 1L	H	E	F	E	S	D	T	F	F	P	E	I	D	L

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	619							640						
MCS	5'-GGG AAA TAT AAA CTT CTC CCA GAA TAC CCA GGC GTC CTC TCT -3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Gly	Lys	Tyr	Lys	Leu	Leu	Pro	Glu	Tyr	Pro	Gly	Val	Leu	Ser
Proteína 1L	G	K	Y	K	L	L	P	E	Y	P	G	V	L	S

Sitios del oligo	... DHFR ...													
Número de pb	661							682						
MCS	5'-GAG GTC CAG GAG GAA AAA GGC ATC AAG TAT AAG TTT GAA GTC -3'													
Cad. Com.	3'- -5'													
Proteína 3L	Glu	Val	His	Glu	Glu	Lys	Gly	Ile	Lys	Tyr	Lys	Phe	Glu	Val
Proteína 1L	E	V	H	E	E	K	G	I	K	Y	K	F	E	V

Sitios del oligo	... DHFR				<i>Bgl</i> III	<i>Sph</i> I	<i>Xma</i> I, <i>Sma</i> I	<i>Kpn</i> I	<i>Sal</i> I...					
Número de pb	703		715		721	727	733		739					
MCS	5'-TAC GAG AAG AAA GGT TCC AGA TCT GCA TGC GGT ACC CCG GGT -3'													
Cad. Com.	3'- TCT AGA CGT ACG CCA TGG GGC CCA -5'													
Proteína 3L	Tyr	Glu	Lys	Lys	Gly	Ser	Arg	Ser	Ala	Cys	Gly	Thr	Pro	Gly
Proteína 1L	Y	E	K	K	G	S	R	S	A	C	G	T	P	G

Sitios del oligo	... <i>Sal</i> I	<i>Pst</i> I	<i>Hind</i> III	Alto	Secuencia de paro ...									
Número de pb	745	749 751	755 757	763 766 769	778									
MCS	5'-CGA CCT GCA GCC AAG CTT AAT TAG CTG AGC TTG GAC TCC TGT -3'													
Cad. Com.	3'-GCT GGA CGT C TTC GAA -5'													
Proteína 3L	Arg	Pro	Ala	Ala	Lys	Leu	Asn	Stop	Leu	Ser	Leu	Asp	Ser	Cys
Proteína 1L	R	P	A	A	K	L	N		L	S	L	D	S	C

Sitios del oligo	... Secuencia de paro	
Número de pb	787	804
MCS	5'- TGA TAG ATC CAG TAA TGA -3'	
Cad. Com.	3'-	-5'
Proteína 3L	Stop Stop	Stop Stop
Proteína 1L		

Tabla 5.26 Sitio Múltiple de Clónaje (MCS) del Vector pQE-40.

5.6.4 Vector pREP-4

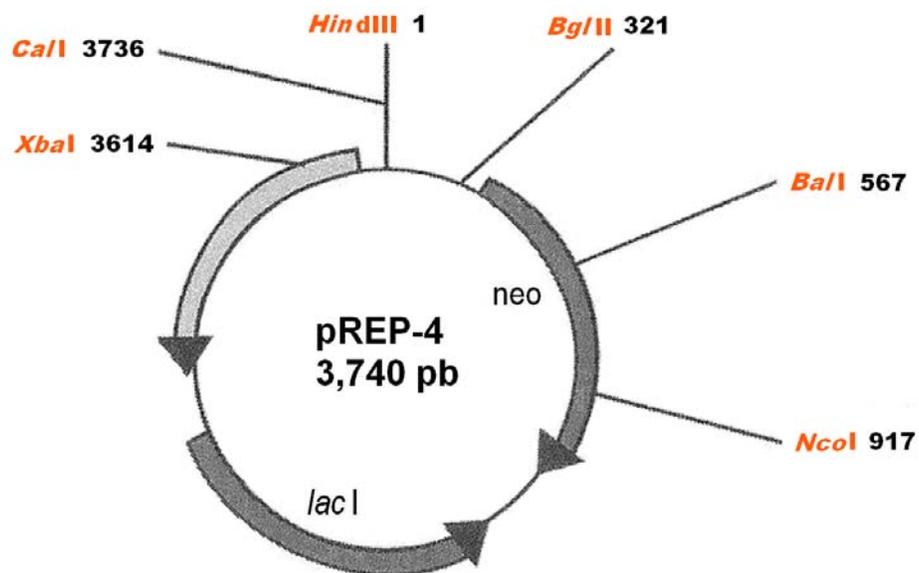


Figura 5.12 Vector pREP-4, con las enzimas de restricción que lo cortan.

5.7 Secuencias

5.7.1 Gen PGR97-103 de *Glycine max*

Bases	0 0 1	2	5	8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	38	41	44	47	50
	0 1 2	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	
	0 0 0	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	50

Triplete	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----

0+ 0+	A	CCC	ATC	AAT	AGC	AAA	ATG	ACC	AAG	TTC	ACA	ATC	CTC	CTC	ATC	TCT	CTT	C
							Met	Thr	Lys	Phe	Thr	Ile	Leu	Leu	Ile	Ser	Leu	Leu
							M	T	K	F	T	I	L	L	I	S	L	L
							1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Albúmina Gm2S-1																	
50+ 17+	TC	TTC	TGC	ATC	GCC	CAC	ACT	TGC	AGC	GCC	TCC	AAA	TGG	CAG	CAC	CAG	CAA	
		Phe	Cys	Ile	Ala	His	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Lys	Trp	Gln	His	Gln	Gln	
		F	C	I	A	H	T	C	S	A	S	K	W	Q	H	Q	Q	
		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
											1	2	3	4	5	6	7	
	Lunasin																	
100+ 34+	GAT	AGC	TGC	CGC	AAG	CAG	CTC	CAG	GGG	GTG	AAC	CTC	ACG	CCC	TGC	GAG	AA	
	Asp	Ser	Cys	Arg	Lys	Gln	Leu	Gln	Gly	Val	Asn	Leu	Thr	Pro	Cys	Glu	Lys	
	D	S	C	R	K	Q	L	Q	G	V	N	L	T	P	C	E	K	
	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	
	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
150+ 50+	G	CAC	ATC	ATG	GAG	AAG	TAC	CAA	GGC	CGC	GGC	GAT	GAC	GAT	GAT	GAT	G	
	His	Ile	Met	Glu	Lys	Ile	Gln	Gly	Arg	Gly	Asp							
	H	I	M	E	K	I	Q	G	R	G	D	D	D	D	D	D	D	
	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61		
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
200+ 67+	AC	GAC	GAC	AAT	CAC	ATT	CTC	AGG	ACC	ATG	CGG	GGA	AGA	ATC	AAC	TAC	ATA	
	Asp	Asp	Asn	His	Ile	Leu	Arg	Thr	Met	Arg	Gly	Arg	Ile	Asn	Tyr	Ile		
	D	D	N	H	I	L	R	T	M	R	G	R	I	N	Y	I		
	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77		
	42	43																
	Lunasin																	
250+ 84+	AGG	AGG	AAC	GAA	GGA	AAA	GAC	GAA	GAC	GAA	GAA	GAA	GAA	GGA	CAC	ATG	CA	
	Arg	Arg	Asn	Glu	Gly	Lys	Asp	Glu	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	His	Met	Gln	
	R	R	N	E	G	K	D	E	D	E	E	E	E	G	H	M	Q	
	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	
300+ 100+	G	AAG	TGC	TGC	ACA	GAA	ATG	AGC	GAG	CTG	AGA	AGC	CCC	AAA	TGC	CAG	TGC	A
	Lys	Cys	Cys	Thr	Glu	Met	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Pro	Lys	Cys	Gln	Cys	Lys
	K	C	C	T	E	M	S	E	L	R	S	P	K	C	Q	C	K	
	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	

Bases	0 0 1	2	5	8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	38	41	44	47	50
	0 1 2	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	
	0 0 0	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	50

Triplete	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
350+ 117+	AA	GCG	CTG	CAG	AAG	ATA	ATG	GAG	AAC	CAG	AGC	GAG	GAA	CTG	GAG	GAG	AAG	
		Ala	Leu	Gln	Lys	Ile	Met	Glu	Asn	Gln	Ser	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Lys	
		A	L	Q	K	I	M	E	N	Q	S	E	E	L	E	E	K	
		112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	
400+ 134+		CAG	AAG	AAG	AAA	ATG	GAG	AAG	GAG	CTC	ATT	AAC	TTG	GCT	ACT	ATG	TGC	AG
		Gln	Lys	Lys	Lys	Met	Glu	Lys	Glu	Leu	Ile	Asn	Leu	Ala	Thr	Met	Cys	Arg
		Q	K	K	K	M	E	K	E	L	I	N	L	A	T	M	C	R
		128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
450+ 150+	G	TTT	GGA	CCC	ATG	ATC	CAG	TGC	GAC	TTG	TCC	TCC	GAT	GAC	TAA	GAA	GTT	A
		Phe	Gly	Pro	Met	Ile	Gln	Cys	Asp	Leu	Ser	Ser	Asp	Asp	stop			
		F	G	P	M	I	Q	C	D	L	S	S	D	D				
		145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	Albúmina Gm2S-1			
500+ 167+	AA	AGC	AAT	GTT	GTC	ACT	TGT	CGT	ACT	AAC	ACA	TGA	TGT	GAT	TCA	TCA	CTG	
550+ 184+		GTG	AAT	GGT	GAT	CGT	GTA	CGT	ACC	CTA	CTT	AGT	AGG	CAA	TGG	AAG	CAC	TT
600+ 200+	A	GAG	TGT	GCT	TTG	TGC	ATG	GCC	TTG	CCT	CTG	TTT	TGA	GAC	TTT	TGT	AAT	G
650+ 217+	TT	TTC	GAG	TTT	AAA	TCT	TTG	CCT	TTG	CAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	
700+ 234+		AAA	AAA	AAA	A													

Tabla 5.27 Gen PGR97-103 de *Glycine max*, con sus elementos genéticos.

5.7.2 Vector pQE-30

Bases	0 0 0	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	50
	0 0 1	2	5	8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	38	41	44	47	50
	0 1 2	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	

Triplete	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----

0+		CTC GAG	AAA TCA TAA AAA ATT TAT TTG CTT TGT GAG CGG ATA ACA ATT AT
0+		<i>XhoI</i>	Elemento operador lac/promotor T5 (PT5)
50+	A	ATA GAT TCA ATT GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA	GAA TTC ATT AAA G
17+		Elemento operador lac/promotor T5 (PT5) RBS	
100+	AG	GAG AAA TTA ACT ATG AGA GGA TCG	CAT CAC CAT CAC CAT CAC GGA TCC
34+		RBS	
		6xHis	
		<i>BamHI</i>	
150+		GCA TGC	GAG CTC GGT ACC CCG GGT CGA CCT GCA GCC AAG CTT AAT TAG CT
50+		<i>SphI</i>	<i>SacI</i> <i>KpnI</i> <i>SmaI, XmaI</i> <i>SalI</i> <i>PstI</i> <i>HindIII</i>
200+	G	AGC TTG	GAC TCC TGT TGA TAG ATC CAG TAA TGA CCT CAG AAC TCC ATC T
67+		<i>t₀</i>	
250+	GG	ATT TGT TCA GAA CGC TCG GTT GCC GCC GGG CGT TTT TTA TTG GTG AGA	
84+			
300+	A	TC CAA GCT AGC TTG GCG AGA TTT TCA GGA GCT AAG GAA GCT AAA ATG GA	
100+		<i>t₀</i>	
350+	G	AAA AAA ATC ACT GGA TAT ACC ACC GTT GAT ATA TCC CAA TGG CAT CGT A	
117+			
400	AA	GAA CAT TTT GAG GCA TTT CAG TCA GTT GCT CAA TGT ACC TAT AAC CAG	
134+			
450+		ACC GTT CAG CTG GAT ATT ACG GCC TTT TTA AAG ACC GTA AAG AAA AAT AA	
150+			
500+	G	CAC AAG TTT TAT CCG GCC TTT ATT CAC ATT CTT GCC CGC CTG ATG AAT G	
167+			
550	CT	CAT CCG GAA TTT CGT ATG GCA ATG AAA GAC GGT GAG CTG GTG ATA TGG	
184+			
600+		GAT AGT GTT CAC CCT TGT TAC ACC GTT TTC CAT GAG CAA ACT GAA ACG TT	
200+			
650+	T	TCA TCG CTC TGG AGT GAA TAC CAC GAC GAT TTC CGG CAG TTT CTA CAC A	
217+			
700+	TA	TAT TCG CAA GAT GTG GCG TGT TAC GGT GAA AAC CTG GCC TAT TTC CCT	
234+			
750+		AAA GGG TTT ATT GAG AAT ATG TTT TTC GTC TCA GCC AAT CCC TGG GTG AG	
250+		Región de la terminación de la transcripción <i>rrnB</i> T1	
800+	T	TTC ACC AGT TTT GAT TTA AAC GTG GCC AAT ATG GAC AAC TTC TTC GCC C	
265+			
850+	CC	GTT TTC ACC ATG GGC AAA TAT TAT ACG CAA GGC GAC AAG GTG CTG ATG	
284+			
900+		CCG CTG GCG ATT CAG GTT CAT CAT GCC GTT TGT GAT GGC TTC CAT GTC GG	
300+			
950+	C	AGA ATG CTT AAT GAA TTA CAA CAG TAC TGC GAT GAG TGG CAG GGC GGG G	
317+			
1000+	CG	TAA TTT TTT TAA GGC AGT TAT TGG TGC CCT TAA ACG CCT GGG GTA ATG	
334+			
1050+		ACT CTC TAG CTT GAG GCA TCA AAT AAA ACG AAA GGC TCA GTC GAA AGA CT	
350+			
1100+	G	GGC CTT TCG TTT TAT CTG TTG TTT GTC GGT GAA CGC TCT CCT GAG TAG G	
367+		Región de la terminación de	
1150+	AC	AAA TCC GCC CTC TAG AGC TGC CTC GCG CGT TTC GGT GAT GAC GGT GAA	
384+		la transcripción <i>rrnB</i> T1	

Bases	0 0 0	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	50
	0 0 1	2	5	8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	38	41	44	47	50
	0 1 2	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	
Triplete	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
2400+ 800+	AAT GCT TAA TCA GTG AGG CAC CTA TCT CAG CGA TCT GTC TAT TTC GTT CA																	
	β-Lactamasa																	
2450+ 817+	T	CCA	TAG	TTG	CCT	GAC	TCC	CCG	TCG	TGT	AGA	TAA	CTA	CGA	TAC	GGG	AGG	G
2500+ 834+	CT	TAC	CAT	CTG	GCC	CCA	GTG	CTG	CAA	TGA	TAC	CGC	GAG	ACC	CAC	GCT	CAC	
2550+ 850+		CGG	CTC	CAG	ATT	TAT	CAG	CAA	TAA	ACC	AGC	CAG	CCG	GAA	GGG	CCG	AGC	GC
2600+ 867+	A	GAA	GTG	GTC	CTG	CAA	CTT	TAT	CCG	CCT	CCA	TCC	AGT	CTA	TTA	ATT	GTT	G
2650+ 884+	CC	GGG	AAG	CTA	GAG	TAA	GTA	GTT	CGC	CAG	TTA	ATA	GTT	TGC	GCA	ACG	TTG	
2700+ 900+		TTG	CCA	TTG	CTA	CAG	GCA	TCG	TGG	TGT	CAC	GCT	CGT	CGT	TTG	GTA	TGG	CT
2750+ 917+	T	CAT	TCA	GCT	CCG	GTT	CCC	AAC	GAT	CAA	GGC	GAG	TTA	CAT	GAT	CCC	CCA	T
2800+ 934+	GT	TGT	GCA	AAA	AAG	CGG	TTA	GCT	CCT	TCG	GTC	CTC	CGA	TCG	TTG	TCA	GAA	
2850+ 950+		GTA	AGT	TGG	CCG	CAG	TGT	TAT	CAC	TCA	TGG	TTA	TGG	CAG	CAC	TGC	ATA	AT
2900+ 967+	T	CTC	TTA	CTG	TCA	TGC	CAT	CCG	TAA	GAT	GCT	TTT	CTG	TGA	CTG	GTG	AGT	A
2950+ 984+	CT	CAA	CCA	AGT	CAT	TCT	GAG	AAT	AGT	GTA	TGC	GGC	GAC	CGA	GTT	GCT	CTT	
3000+ 1000+		GCC	CGG	CGT	CAA	TAC	GGG	ATA	ATA	CCG	CGC	CAC	ATA	GCA	GAA	CTT	TAA	AA
3050+ 1017+	G	TGC	TCA	TCA	TTG	GAA	AAC	GTT	CTT	CGG	GGC	GAA	AAC	TCT	CAA	GGA	TCT	T
3100+ 1034+	AC	CGC	TGT	TGA	GAT	CCA	GTT	CGA	TGT	AAC	CCA	CTC	GTG	CAC	CCA	ACT	GAT	
3150+ 1050+		CTT	CAG	CAT	CTT	TTA	CTT	TCA	CCA	GCG	TTT	CTG	GGT	GAG	CAA	AAA	CAG	GA
3200+ 1067+	A	GGC	AAA	ATG	CCG	CAA	AAA	AGG	GAA	TAA	GGG	CGA	CAC	GGA	AAT	GTT	GAA	T
																		β-Lactamasa
3250+ 1084+	AC	TCA	TAC	TCT	TCC	TTT	TTC	AAT	ATT	ATT	GAA	GCA	TIT	ATC	AGG	GTT	ATT	
3300+ 1100+		GTC	TCA	TGA	GCG	GAT	ACA	TAT	TTG	AAT	GTA	TTT	AGA	AAA	ATA	AAC	AAA	TA
3350+ 1117+	G	GGG	TTC	CGC	GCA	CAT	TTC	CCC	GAA	AAG	TGC	CAC	CTG	ACG	TCT	AAG	AAA	C
3400+ 1134+	CA	TTA	TTA	TCA	TGA	CAT	TAA	CCT	ATA	AAA	ATA	GGC	GTA	TCA	CGA	GGC	CCT	
3450+ 1150+		TTC	GTC	TTC	AC													

Tabla 5.28 Vector pQE-30 con sus elementos genéticos.¹

¹ Consúltese el apartado de fuentes electrónicas.

5.7.3 Vector pQE-40

Bases	0 0 0	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	50
	0 0 1	2	5	8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	38	41	44	47	50
	0 1 2	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	

Triplete	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----

0+	CTC GAG	AAA TCA TAA AAA ATT TAT TTG CTT TGT GAG CGG ATA ACA ATT AT
0+	<i>XhoI</i>	Elemento operador lac/promotor T5 (PT5)
50+	A ATA GAT	TCA ATT GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GAA TTC ATT AAA G
17+		Elemento operador lac/promotor T5 (PT5) RBS
100+	AG GAG AAA TTA ACT ATG	AGA GGA TCG CAT CAC CAT CAC CAC GGA TCC
34+		RBS 6xHis BamHI
150+	GGC ATC	ATG GTT CGA CCA TTG AAC TCG ATC GTC GCC GTG TCC CAA AAT AT
50+		DHFR
200+	G GGG ATT	GGC AAG AAC GGA GAC CTA CCC TGG CCT CCG CTC AGG AAC GAG T
67+		
250+	TC AAG TAC TTC CAA AGA ATG ACC ACA ACC TCT TCA GTG GAA GGT AAA CAG	
84+		
300+	AAT CTG GTG ATT ATG GGT AGG AAA ACC TGG TTC TCC ATT CCT GAG AAG AA	
100+		
350+	T CGA CCT TTA AAG GAC AGA ATT AAT ATA GTT CTC AGT AGA GAA CTC AAA G	
117+		
400	AA CCA CCA CGA GGA GCT CAT TTT CTT GCC AAA AGT TTG GAT GAT GCC TTA	
134+		
450+	AGA CTT ATT GAA CAA CCG GAA TTG GCA AGT AAA GTA GAC ATG GTT TGG AT	
150+		
500+	A GTC GGA GGC AGT TCT GTT TAC CAG GAA GCC ATG AAT CAA CCA GGC CAC C	
167+		
550	TT AGA CTC TTT GTG ACA AGG ATC ATG CAG GAA TTT GAA AGT GAC ACG TTT	
184+		
600+	TTC CCA GAA ATT GAT TTG GGG AAA TAT AAA CTT CTC CCA GAA TAC CCA GG	
200+		
650+	C GTC CTC TCT GAG GTC CAG GAG GAA AAA GGC ATC AAG TAT AAG TTT GAA G	
217+		
700+	TC TAC GAG AAG AAA	GGT TCC AGA TCT GCA TGC GGT ACC CCG GGT CGA CCT
234+		DHFR BglII SphI KpnI SmaI, XmaI SalI
750+	GCA GCC AAG CTT	AAT TAG CTG AGC TTG GAC TCC TGT TGA TAG ATC CAG TA
250+	<i>PstI</i> <i>HindIII</i>	t_0
800+	A TGA CCT CAG AAC TCC ATC TGG ATT TGT TCA GAA CGC TCG GTT GCC GCC G	
265+		
850+	GG CGT TTT TTA TTG GTG AGA AT	C CAA GCT AGC TTG GCG AGA TTT TCA GGA
284+		t_0
900+	GCT AAG GAA GCT AAA ATG GAG AAA AAA ATC ACT GGA TAT ACC ACC GTT GA	
300+		
950+	T ATA TCC CAA TGG CAT CGT AAA GAA CAT TTT GAG GCA TTT CAG TCA GTT G	
317+		
1000+	CT CAA TGT ACC TAT AAC CAG ACC GTT CAG CTG GAT ATT ACG GCC TTT TTA	
334+		
1050+	AAG ACC GTA AAG AAA AAT AAG CAC AAG TTT TAT CCG GCC TTT ATT CAC AT	
350+		
1100+	T CTT GCC CGC CTG ATG AAT GCT CAT CCG GAA TTT CGT ATG GCA ATG AAA G	
367+		
1150+	AC GGT GAG CTG GTG ATA TGG GAT AGT GTT CAC CCT TGT TAC ACC GTT TTC	
384+		

Bases	0 0 0	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	50
	0 0 1	2	5	8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	38	41	44	47	50
	0 1 2	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	

Triplete	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----

1200+	CAT GAG CAA ACT GAA ACG TTT TCA TCG CTC TGG AGT GAA TAC CAC GAC GA
400+	
1250+	T TTC CGG CAG TTT CTA CAC ATA TAT TCG CAA GAT GTG GCG TGT TAC GGT G
417+	
1300+	AA AAC CTG GCC TAT TTC CCT AAA GGG TTT ATT GAG AAT ATG TTT TTC GTC
434+	
1350+	TCA GCC AAT CCC TGG GTG AGT TTC ACC AGT TTT GAT TTA AAC GTG GCC AA
450+	
1400+	T ATG GAC AAC TTC TTC GCC CCC GTT TTC ACC ATG GGC AAA TAT TAT ACG C
467+	
1450+	AA GGC GAC AAG GTG CTG ATG CCG CTG GCG ATT CAG GTT CAT CAT GCC GTT
484+	
1500+	TGT GAT GGC TTC CAT GTC GGC AGA ATG CTT AAT GAA TTA CAA CAG TAC TG
500+	
1550+	C GAT GAG TGG CAG GGC GGG GCG TAA TTT TTT TAA GGC AGT TAT TGG TGC C
517+	
1600+	CT TAA ACG CCT GGG GTA ATG ACT CTC TAG CTT GAG GCA TCA AAT AAA ACG
534+	
1650+	AAA GGC TCA GTC GAA AGA CTG GGC CTT TCG TTT TAT CTG TTG TTT GTC GG
550+	Región de la terminación de la transcripción <i>rrnB</i> T1
1700+	T GAA CGC TCT CCT GAG TAG GAC AAA TCC GCC CTC TAG AGC TGC CTC GCG C
567+	Región de la terminación de la transcripción <i>rrnB</i> T1
1750+	GT TTC GGT GAT GAC GGT GAA AAC CTC TGA CAC ATG CAG CTC CCG GAG ACG
584+	
1800+	GTC ACA GCT TGT CTG TAA GCG GAT GCC GGG AGC AGA CAA GCC CGT CAG GG
600+	
1850+	C GCG TCA GCG GGT GTT GGC GGG TGT CGG GGC GCA GCC ATG ACC CAG TCA C
617+	
1900+	GT AGC GAT AGC GGA GTG TAT ACT GGC TTA ACT ATG CGG CAT CAG AGC AGA
634+	
1950+	TTG TAC TGA GAG TGC ACC ATA TGC GGT GTG AAA TAC CGC ACA GAT GCG TA
650+	
2000+	A GGA GAA AAT ACC GCA TCA GGC GCT CTT CCG CTT CCT CGC TCA CTG ACT C
667+	
2050+	GC TGC GCT CGG TCG TTC GGC TGC GGC GAG CGG TAT CAG CTC ACT CAA AGG
684+	
2100+	CGG TAA TAC GGT TAT CCA CAG AAT CAG GGG ATA ACG CAG GAA AGA ACA TG
700+	
2150+	T GAG CAA AAG GCC AGC AAA AGG CCA GGA ACC GTA AAA AGG CCG CGT TGC T
717+	
2200+	GG CGT TTT TCC ATA GGC TCC GCC CCC CTG ACG AGC ATC ACA AAA ATC GAC
734+	
2250+	GCT CAA GTC AGA GGT GGC GAA ACC CGA CAG GAC TAT AAA GAT ACC AGG CG
750+	
2300+	T TTC CCC CTG GAA GCT CCC TCG TGC GCT CTC CTG TTC CGA CCC TGC CGC T
767+	
2350+	TA CCG GAT ACC TGT CCG CCT TTC TCC CTT CGG GAA GCG TGG CGC TTT CTC
784+	

Bases	0 0 0	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	50
	0 0 1	2	5	8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	38	41	44	47	50
	0 1 2	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	

Triplete	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
----------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----

2400+ 800+	ATA	GCT	CAC	GCT	GTA	GGT	ATC	TCA	GTT	CGG	TGT	AGG	TCG	TTC	GCT	CCA	AG	
2450+ 817+	C	TGG	GCT	GTG	TGC	ACG	AAC	CCC	CCG	TTC	AGC	CCG	ACC	GCT	GCG	CCT	TAT	C
2500+ 834+	CG	GTA	ACT	ATC	GTC	TTG	AGT	CCA	ACC	CGG	TAA	GAC	ACG	ACT	TAT	CGC	CAC	
2550+ 850+	TGG	CAG	CAG	CCA	CTG	GTA	ACA	GGA	TTA	GCA	GAG	CGA	GGT	ATG	TAG	GCG	GT	
2600+ 867+	G	CTA	CAG	AGT	TCT	TGA	AGT	GGT	GGC	CTA	ACT	ACG	GCT	ACA	CTA	GAA	GGA	C
2650+ 884+	AG	TAT	TTG	GTA	TCT	GCG	CTC	TGC	TGA	AGC	CAG	TTA	CCT	TCG	GAA	AAA	GAG	
2700+ 900+	TTG	GTA	GCT	CTT	GAT	CCG	GCA	AAC	AAA	CCA	CCG	CTG	GTA	GCG	GTG	GTT	TT	
2750+ 917+	T	TTG	TTT	GCA	AGC	AGC	AGA	TTA	CGC	GCA	GAA	AAA	AAG	GAT	CTC	AAG	AAG	A
2800+ 934+	TC	CTT	TGA	TCT	TTT	CTA	CGG	GGT	CTG	ACG	CTC	AGT	GGA	ACG	AAA	ACT	CAC	
2850+ 950+	GTT	AAG	GGA	TTT	TGG	TCA	TGA	GAT	TAT	CAA	AAA	GGA	TCT	TCA	CCT	AGA	TCC	
2900+ 967+	C	TTT	TAA	ATT	AAA	AAT	GAA	GTT	TTA	AAT	CAA	TCT	AAA	GTA	TAT	ATG	AGT	AAA
2950+ 984+	AA	CTT	GGT	CTG	ACA	GTT	ACC	AAT	GCT	TAA	TCA	GTG	AGG	CAC	CTA	TCT	CAG	
3000+ 1000+	CGA	TCT	GTC	TAT	TTC	GTT	CAT	CCA	TAG	TTG	CCT	GAC	TCC	CCG	TCG	TGT	AG	
3050+ 1017+	A	TAA	CTA	CGA	TAC	GGG	AGG	GCT	TAC	CAT	CTG	GCC	CCA	GTG	CTG	CAA	TGA	T
3100+ 1034+	AC	CGC	GAG	ACC	CAC	GCT	CAC	CGG	CTC	CAG	ATT	TAT	CAG	CAA	TAA	ACC	AGC	
3150+ 1050+	CAG	CCG	GAA	GGG	CCG	AGC	GCA	GAA	GTG	GTC	CTG	CAA	CTT	TAT	CCG	CCT	CC	
3200+ 1067+	A	TCC	AGT	CTA	TTA	ATT	GTT	GCC	GGG	AAG	CTA	GAG	TAA	GTA	GTT	CGC	CAG	T
3250+ 1084+	TA	ATA	GTT	TGC	GCA	ACG	TTG	TTG	CCA	TTG	CTA	CAG	GCA	TCG	TGG	TGT	CAC	
3300+ 1100+	GCT	CGT	CGT	TTG	GTA	TGG	CTT	CAT	TCA	GCT	CCG	GTT	CCC	AAC	GAT	CAA	GG	
3350+ 1117+	C	GAG	TTA	CAT	GAT	CCC	CCA	TGT	TGT	GCA	AAA	AAG	CGG	TTA	GCT	CCT	TCG	G
3400+ 1134+	TC	CTC	CGA	TCG	TTG	TCA	GAA	GTA	AGT	TGG	CCG	CAG	TGT	TAT	CAC	TCA	TGG	
3450+ 1150+	TTA	TGG	CAG	CAC	TGC	ATA	ATT	CTC	TTA	CTG	TCA	TGC	CAT	CCG	TAA	GAT	GC	
3500+ 1167+	T	TTT	CTG	TGA	CTG	GTG	AGT	ACT	CAA	CCA	AGT	CAT	TCT	GAG	AAT	AGT	GTA	T
3550+ 1184+	GC	GGC	GAC	CGA	GTT	GCT	CTT	GCC	CGG	CGT	CAA	TAC	GGG	ATA	ATA	CCG	CGC	

Bases	0 0 0	1	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	50	
	0 0 1	2	5	8	11	14	17	20	23	26	29	32	35	38	41	44	47	50	
	0 1 2	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48		
Triplete	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
3600+		CAC	ATA	GCA	GAA	CTT	TAA	AAG	TGC	TCA	TCA	TTG	GAA	AAC	GTT	CTT	CGG	GG	
1200+																			
3650+		C	GAA	AAC	TCT	CAA	GGA	TCT	TAC	CGC	TGT	TGA	GAT	CCA	GTT	CGA	TGT	AAC	C
1217+																			
3700+		CA	CTC	GTG	CAC	CCA	ACT	GAT	CTT	CAG	CAT	CTT	TTA	CTT	TCA	CCA	GCG	TTT	
1234+																			
3750+		CTG	GGT	GAG	CAA	AAA	CAG	GAA	GGC	AAA	ATG	CCG	CAA	AAA	AGG	GAA	TAA	GG	
1250+																			
3800+		G	CGA	CAC	GGA	AAT	GTT	GAA	TAC	TCA	TAC	TCT	TCC	TTT	TTC	AAT	ATT	ATT	G
1267+																			
		β-Lactamasa																	
3850+		AA	GCA	TTT	ATC	AGG	GTT	ATT	GTC	TCA	TGA	GCG	GAT	ACA	TAT	TTG	AAT	GTA	
1284+																			
3900+		TTT	AGA	AAA	ATA	AAC	AAA	TAG	GGG	TTC	CGC	GCA	CAT	TTC	CCC	GAA	AAG	TG	
1300+																			
3950+		C	CAC	CTG	ACG	TCT	AAG	AAA	CCA	TTA	TTA	TCA	TGA	CAT	TAA	CCT	ATA	AAA	A
1317+																			
4000+		TA	GGC	GTA	TCA	CGA	GGC	CCT	TTC	GTC	TTC	AC							
1334+																			

Tabla 5.29 Secuencia del Vector pQE-40 con sus elementos genéticos.¹

¹ Consúltense el apartado de fuentes electrónicas.

5.8 Gliceroles

Todos los gliceroles se encuentran almacenados a -80°C.

5.8.1 *E. coli* DH5 α

Nombre: D-Lun-1

Plásmido 1:	pJET/Blunt	Antibiótico 1:	Ampicilina 100 μ g/mL
Plásmido 2:	---	Antibiótico 2:	---
Inserto:	<i>Bam</i> HI-Lunasin-Paro- <i>Kpn</i> I		
Tamaño:	144pb	Secuenciado:	Si

Tabla 5.30 Características del glicerol de *E. coli* DH5 α , creado el 22/sep./2009.

Nombre: D-PA-Lun-1

Plásmido 1:	pJET/Blunt	Antibiótico 1:	Ampicilina 100 μ g/mL
Plásmido 2:	---	Antibiótico 2:	---
Inserto:	<i>Bgl</i> II-Proteasa Aspártica-Lunasin-Paro- <i>Kpn</i> I		
Tamaño:	150pb	Secuenciado:	Si

Tabla 5.31 Características del glicerol de *E. coli* DH5 α , creado el 30/abr./2010.

Nombre: D-QE30-1

Plásmido 1:	pQE-30	Antibiótico 1:	Ampicilina 100 μ g/mL
Plásmido 2:	---	Antibiótico 2:	---
Inserto:	---		
Tamaño:	---	Secuenciado:	No

Tabla 5.32 Características del glicerol de *E. coli* DH5 α , creado el 08/oct./2009.

5.8.2 *E. coli* M15 [pREP4]

Nombre: M-QE40-1

Plásmido 1:	pQE-40	Antibiótico 1:	Ampicilina 100µg/mL
Plásmido 2:	pREP4	Antibiótico 2:	kanamicina 25µg/mL
Inserto P 1:	- - -		
Tamaño:	- - -	Secuenciado:	No
<p>Proteína: MRGS-6xH-Corte Enzima de restricción (2aa)-GI-DHFR (186aa)-GS-Corte Enzima de restricción (14aa)-N</p> <p>Secuencia aa: MRGSHHHHHHGGSGIMVRPLNSIVAVSHNMGIGKNGDLPWPPLRNEFKYFHR MTTSSVEGKHNLVIMGRKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLA KSLDDALRLIEHPELASKVDMVWIVGGSSVYHEAMNHPGHLRLFVTRIMHEFE SDTFFPEIDLKGYKLLPEYPGVLSEVHEEKGIKYKFEVYEKKGSR SACGTPGR PAAKLN</p>			
MM	24739 g/mol 24.739 kDa	Número aa:	217
Proteína: MM	DHFR 21546 g/mol 21.546 kDa	Número aa:	186

Tabla 5.33 Características del glicerol de *E. coli* M15 [pREP4], creado el 14/oct./2009.

Nombre: M-Lun-1

Plásmido 1:	pQE-30	Antibiótico 1:	Ampicilina 100µg/mL
Plásmido 2:	pREP4	Antibiótico 2:	kanamicina 25µg/mL
Inserto P. 1:	<i>Bam</i> HI-Lunasin-Paro- <i>Kpn</i> I		
Tamaño:	138pb	Secuenciado:	Glicerol D-Lun-1
<p>Proteína: MRGS-6xH-Corte enzima de restricción (2aa)-Lunasin (43aa)</p> <p>Secuencia aa: MRGSHHHHHHGSKWQHQQDSCRKQLQGVNLTPEKHIMEKIQGRGDDDDDD DDDD</p>			
MM	6427 g/mol 6.427 kDa	Número aa:	55

Tabla 5.34 Características del glicerol de *E. coli* M15 [pREP4], creado el 14/oct./2009.

Nombre: M-PA-Lun-1

Plásmido 1:	pQE-40	Antibiótico 1:	Ampicilina 100µg/mL
Plásmido 2:	pREP4	Antibiótico 2:	kanamicina 25µg/mL
Inserto P. 1:	<i>Bgl</i> II-Proteasa Aspártica-Lunasin-Paro- <i>Kpn</i> I		
Tamaño:	144pb	Secuenciado:	D-PA-Lun-2

Proteína:	MRGS-6xH-Corte Enzima de restricción (2aa)-GI-DHFR (186aa)-GS-Corte Enzima de restricción (2aa)-Proteasa Aspártica (2aa)-Lunasin (43aa)		
Secuencia aa:	MRGSHHHHHHGGSGIMVRPLNSIVAVSHNMGIGKNGDLPWPPLRNEFKYFHR MTTSSVEGKHNLVIMGRKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGHAFLA KSLDDALRLIEHPELASKVDMVWIVGGSSVYHEAMNHPGHLRLFVTRIMHEFE SDTFFPEIDLKGYKLLPEYPGVLSEVHEEKGIKYKFEVYEKKGSRFSMSKWQH QQDSCRKQLQGVNLTPEKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD		
MM	28790 g/mol 28.790 kDa	Número aa:	249
Proteína:	M-Lunasin		
MM	5159 g/mol 5.159 kDa	Número aa:	44

Tabla 5.35 Características del glicerol de *E. coli* M15 [pREP4], creado el 31/mar./2010.

Nombre: M-FXa-Lun-1

Plásmido 1:	pQE-40	Antibiótico 1:	Ampicilina 100µg/mL
Plásmido 2:	pREP4	Antibiótico 2:	kanamicina 25µg/mL
Inserto:	<i>Bgl</i> II-Factor Xa-Lunasin-Paro- <i>Kpn</i> I		
Tamaño:	150pb	Secuenciado:	Si
Proteína:	MRGS-6xH-Corte Enzima de restricción (2aa)-GI-DHFR (186aa)-GS-Corte Enzima de restricción (2aa)-Factor Xa (4aa)-Lunasin (43aa)		
Secuencia aa:	MRGSHHHHHHGS GIMVRPLNSIVAVSHNMGIGKNGDLPWPPLRNEFKYFHR MTTSSVEGKHNLVIMGRKTWFSIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPRGAHFLA KSLDDALRLIEHPELASKVDMVWIVGGSSVYHEAMNHPGHLRLFVTRIMHEFE SDTFFPEIDLGKYKLLPEYPGVLSEVHEEKGIKYKFEVYEKKGSR SIEGRSKWQ HQQDSCRKQLQGVNLTPEKHIMEKIQGRGDDDDDDDDDD		
M. M.	28968 g/mol 28.968 kDa	Número aa:	251
Proteína:	Lunasin		
M. M.	5028 g/mol 5.028 kDa	Número aa:	43

Tabla 5.36 Características del glicerol de *E. coli* M15 [pREP4], creado el 06/mayo/2010.

Nombre: M-FXa-Lun-2

Plásmido 1:	pQE-40	Antibiótico 1:	Ampicilina 100µg/mL
Plásmido 2:	pREP4	Antibiótico 2:	kanamicina 25µg/mL
Inserto:	<i>Bgl</i> II-Proteasa Aspártica-Lunasin-Paro- <i>Kpn</i> I		
Tamaño:	150pb	Secuenciado:	Si

Proteína:	MRGS-6xH-Corte Enzima de restricción (2aa)-GI-DHFR (186aa)-GS-Corte Enzima de restricción (2aa)-Factor Xa (4aa)-Lunasin (43aa)
Secuencia aa:	Desconocida, el inserto tiene una base cambiada TxC que cambia el aminoácido.

Tabla 5.37 Características del glicerol de *E. coli* M15 [pREP4], creado el 12/mayo/2010.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron tres métodos distintos para obtener la proteína recombinante lunasin, 1) Clonando en el vector pQE-30, donde la proteína esperada es MRGS-6xH-GS-Lunasin, 2) clonando en el vector pQE-40 con sitio de corte para la enzima proteasa aspártica, la proteína expresada es MRGS-6xH-DHFR-Proteasa Asp.-Lunasin y digerida con Proteasa Aspártico es M-Lunasin y 3) Clonando en el vector pQE-40 con sitio de corte para la proteasa Factor Xa, la proteína expresada es MRGS-6xH-DHFR-Factor Xa-Lunasin y digerida con Factor Xa es Lunasin.

6.1 Obtención de la proteína recombinante MRGS-6xH-GS-Lunasin

Primero se extrajo el ADN genómico de soya (*Glycine max* var. Bragg) en hoja y raíz (protocolo 5.1). En la figura 6.1 se muestran las bandas purificadas del ADN de soya extraído en 2) hoja y 3) raíz. Se prepararon 10 μ L de ADN de hoja y otro de raíz dilución 1/10v/v, empleando H₂O Milli-Q.

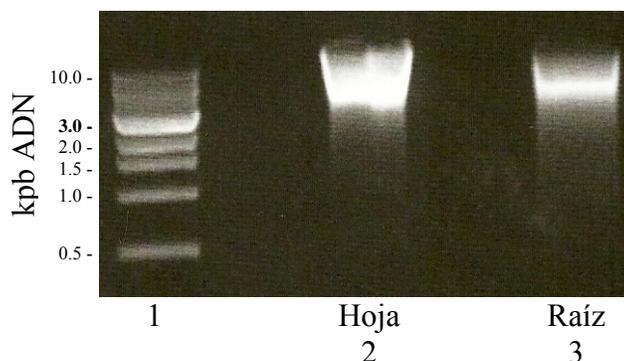


Figura 6.1 Electroforesis en gel de agarosa 2x, corrido a 100V durante \approx 40min. La columna 1) es el marcador de MM, la 2) ADN genómico extraído en hoja de soya y 3) de raíz.

Enseguida se diseñaron los oligos Forwad Lun-Bam-F2 y Revers Lun-Kpn-R2 (sesión 5.5), para que reconozcan la secuencia que codifica para lunasin en ADN genómico de *Glycine max* var. Bragg y pueda ser clonado en el plásmido pQE-30, posteriormente se mandaron a sintetizar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM Campus Morelos, una vez obtenidos se prepararon 100 μ L de cada uno diluyéndolos con agua milli-Q a 5pmol/ μ L.

Se corrió un PCR (sesión 5.1.4) con el ADN genómico de soya extraído de hoja y raíz, concentrado y diluido 1/10v/v, con los oligos Lun-*Bam*-F2 y Lun-*Kpn*-R2 (sesión 5.5), para amplificar la secuencia de lunasin. El producto de PCR esperado es el de la figura 6.2.

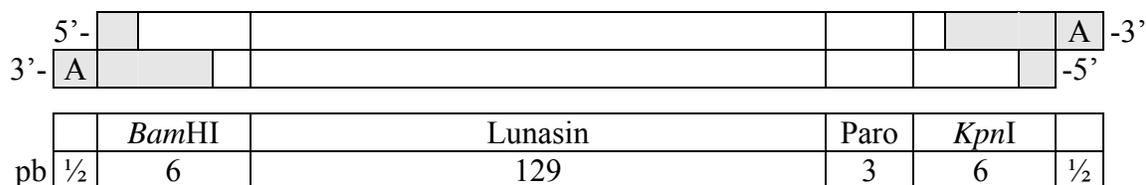


Figura 6.2 Secuencia de ADN lunasin de 145pb, con sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I, así como su secuencia de paro para la transcripción del mRNA.

Una vez obtenido el producto de PCR se corrió un gel de agarosa 2x el cual se muestra en la figura 6.3, las bandas más intensas de las columnas 2, 3, 4 y 5 corresponden a la secuencia de la figura 6.2.

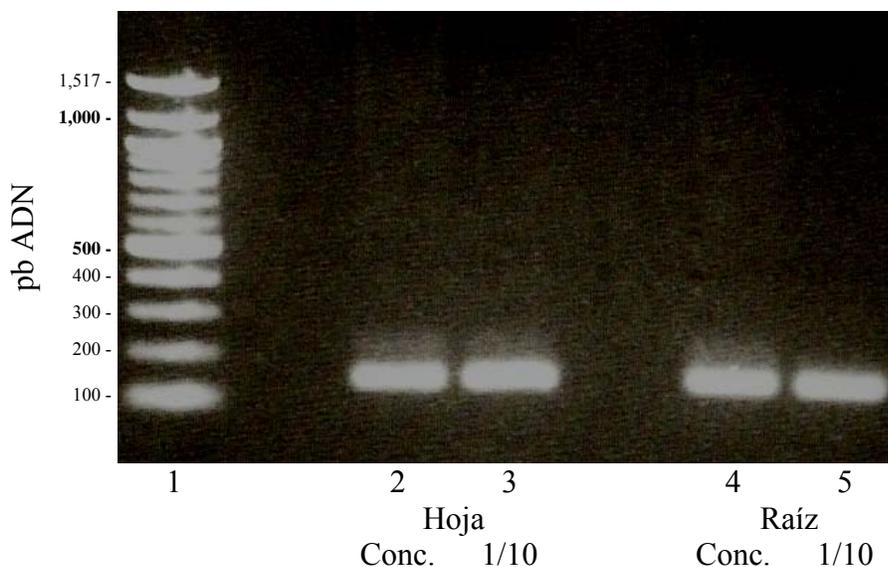


Figura 6.3 Electroforesis en gel de agarosa 2x corrido a 100V de producto de PCR, corrido con ADN de soya y los oligos forward Lun-*Bam*-F2 y revers Lun-*Kpn*-R2, columna 1) Marcador de MM, columnas 2, 3, 4 y 5) corresponden a la secuencia (½A-*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I-½A) de 145pb.

Del gel de la figura 6.3, las bandas de las columnas 2 y 3 se purificaron juntas (producto de PCR corrido con ADN de hoja de soya) y las columnas 4 y 5 también (Producto de PCR corrido con ADN de raíz de soya), en la figura 6.4 se tiene en la columna 2) el producto de PCR corrido con ADN purificado de hoja y en la 3) producto de PCR corrido con ADN purificado de raíz (protocolo 5.1.2), las bandas corresponden a 145pb.

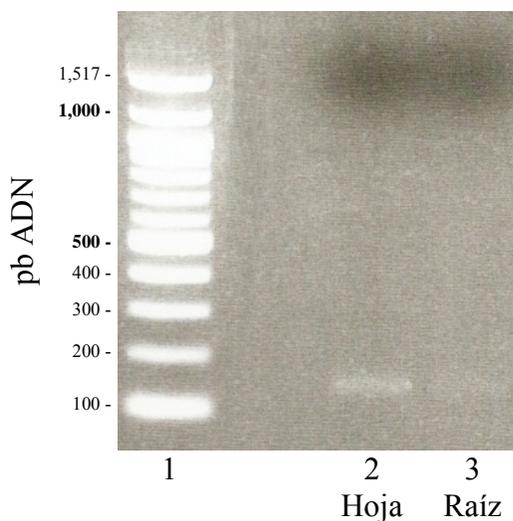


Figura 6.4 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V de la banda purificada: $\frac{1}{2}$ A-*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I- $\frac{1}{2}$ A. Columna 1) Marcador de MM, 2) producto de PCR corrido con ADN purificado de hoja, 3) producto de PCR corrido con ADN purificado de raíz.

La secuencia de la figura 6.4, columna 2, se clono (protocolo 5.1.5) en el vector pJet1.2/blunt (sección 5.6.1), con esta construcción se transformaron células competentes *E. coli* DH5a y se seleccionaron células transformadas, (protocolo 5.1.6), en la figura 6.5 se muestra un gel de agarosa con el producto de PCR realizado con colonias que crecieron después de transformadas y los oligos Forwad Lun-*Bam*-F2 y Revers Lun-*Kpn*-R2 (sesión 5.5), con la colonia de la columna 6 se realizo un glicerol y se guardo etiquetado como D-Lun-1.

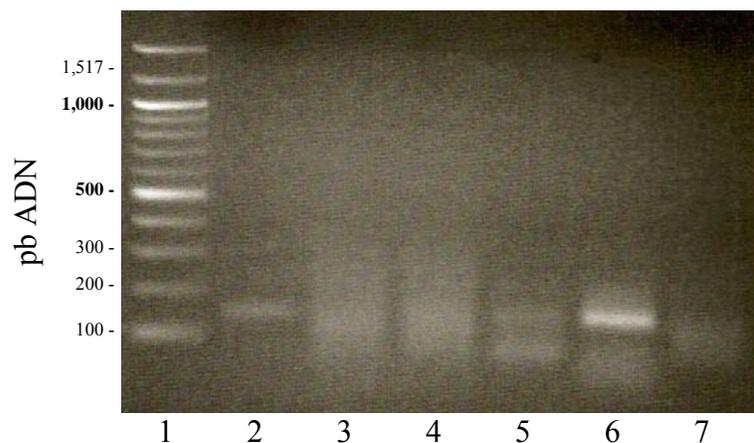


Figura 6.5 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V de producto de PCR de colonias *E. coli* DH5 α transformadas con pJET+(*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I), la columna 1) Marcador de MM, 6) colonia positiva, secuencia de 145 pb.

De los gliceroles D-Lun-1 y D-QE30-1 (sección 5.8.1) se procedió a extraer los plásmidos (protocolo 5.1.3), el plásmido del glicerol D-Lun-1 tiene un tamaño de 3.118kpb (2,974pb pJET + 144pb *Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I) del cual se realizaron dos extracciones ($v \approx 600 \mu\text{L}$) y se mando a secuenciar con sus oligos Forwad y Revers (sección 5.6.1) en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de la UNAM campus Morelos, una vez obtenida la secuencia se comprobó que corresponda con la secuencia de la figura 6.2, con el plásmido pJET+(*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I) del glicerol D-Lun-1 se corrió un PCR con los oligos Lun-*Bam*-F2 y Lun-*Kpn*-R2 para asegurarnos que contiene la secuencia clonada, en la figura 6.6 se muestra un gel de este producto de PCR.

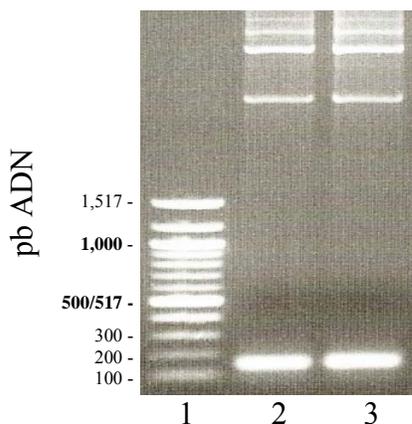


Figura 6.6 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V, columna 1) Marcador de Masa Molecular, 2 y 3) producto de PCR del plásmido pJET+(*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I) de 145pb.

En la figura 6.7 columna 2 y 3 se muestra un gel de agarosa del plásmido pJET+(*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I) extraído del glicerol D-Lun-1 y en la columna 4 del plásmido pQE-30 (sección 5.6.2) extraído del glicerol D-QE30-1.

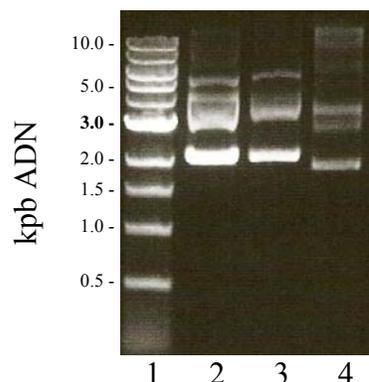


Figura 6.7 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V con plásmidos sin digerir, columna 1) Marcador de MM, 2 y 3) Plásmido pJET+(*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I) de 3,118 pb, 4) Plásmido pQE-30 de 3,461pb.

En seguida se procedió a digerir el plásmido (protocolo 5.1.5, inciso ii) pJET+(*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I) con las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I (sección 5.4.1). En la figura 6.8 columna 3 y 4, se muestra un gel de agarosa del plásmido y la construcción digerida (*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I). El plásmido pQE-30 fue digerido con las mismas enzimas de restricción.

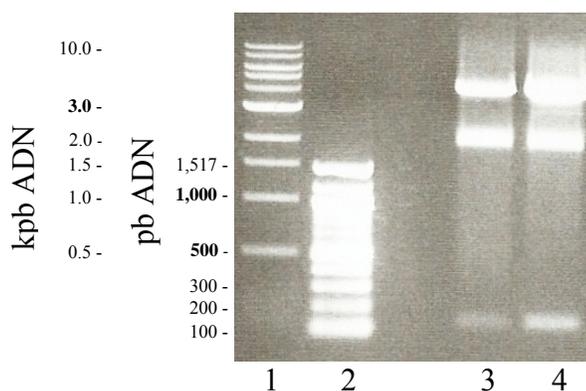


Figura 6.8 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V, columna 1 y 2) Marcador de MM, 3 y 4) construcción (*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I) digerida del plásmido pJET1.2/Blunt con las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I de 138pb, la banda de 2,974pb corresponde al vector pJET1.2/Blunt.

De la figura 6.8, columna 3 y 4, las bandas de 138pb, fue cortada del gel y purificada (protocolo 5.1.2). Para el plásmido pQE-30 digerido igualmente se corto de un gel de agarosa y se purifico (gel no mostrado).

En la figura 6.9, inciso a, columnas 2 y 3 se muestra un gel de la banda purificada del gel de agarosa de la figura 6.8 (*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I) y en el inciso b, columna 2 al plásmido pQE-30 digerido de 3,443pb (3,461pb pQE-30 circular - 18pb perdidos por la digestión). La secuencia de 138 pb se clono en el plásmido pQE-30 y con esta construcción se trasformaron células competentes *E. coli* M15 [pREP4] (protocolo 5.1.6).

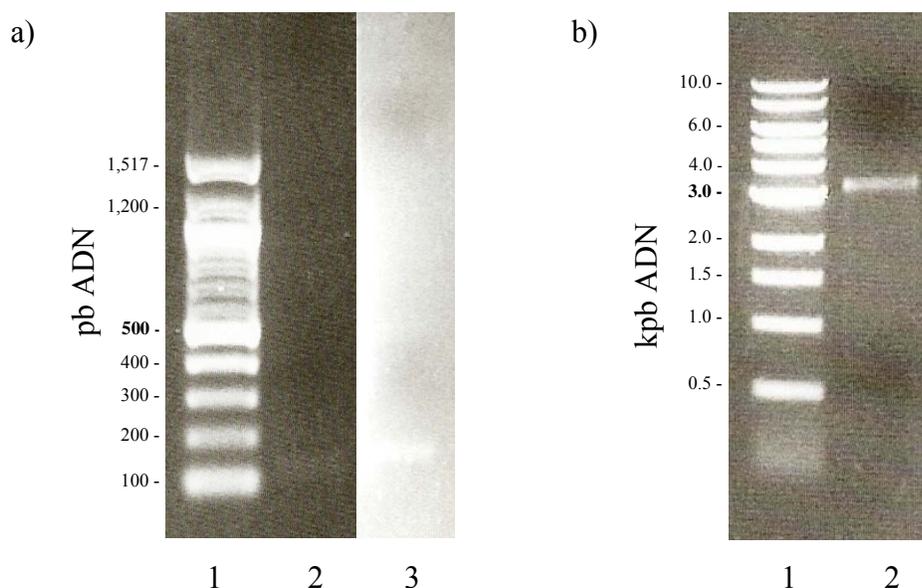


Figura 6.9 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V. a) columna 1) Marcador de M. M., 2) y 3) banda purificada (*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I) de 138pb, 2) exposición normal y 3) sobre expuesta. b) Columna 1) Marcador de MM, 2) pQE-30 digerido con *Bam*HI y *Kpn*I y purificado de 3.443kpb.

En la figura 6.10 se muestra un gel de agarosa con el producto de PCR realizado con colonias que crecieron después de trasformadas y los oligos Forwad Lun-*Bam*-F2 y Revers Lun-*Kpn*-R2 (sesión 5.5), con la colonia de la columna 7 se realizo un glicerol (sección 5.8) y se guardo etiquetado como M-Lun-1 (sección 5.8.2).

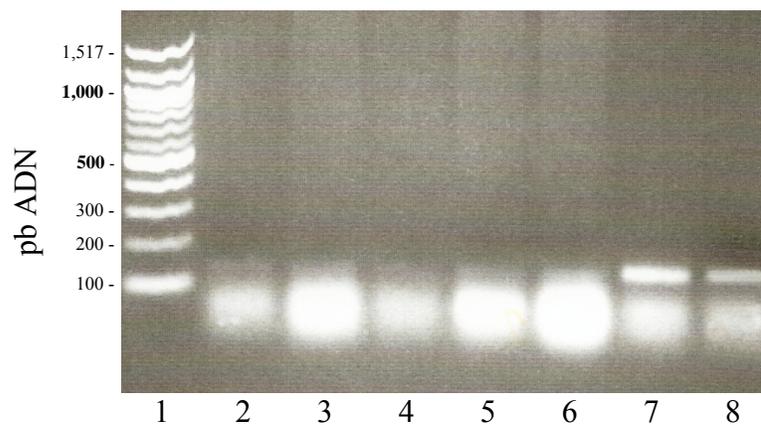


Figura 6.10 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V, con producto de PCR de colonias *E. coli* M15 [pREP4] transformadas con pQE-30+(*Bam*HI-Lunasin-Paro-*Kpn*I), columna 1) Marcador de MM, 2 a 6) Colonias negativas 7 y 8) Colonias positivas.

De la colonia del glicerol M-Lun-1 se procedió a la expresan de la proteína recombinante MRGS-6xH-GS-Lunasin de 6.427kDa, de 55 aminoácidos.

6.2 Obtención de la proteína recombinante Lunasin

Del DNA genómico de soya, purificado de hoja de la figura 6.1, se corrieron 5 PCRs, con los oligos Forward Lun-*Bgl*-F4 y Rivers Lun-*Kpn*-R2 (sección 5.5), en la figura 6.26 se muestra la secuencia esperada y en la figura 6.11 se tienen los productos de PCR.

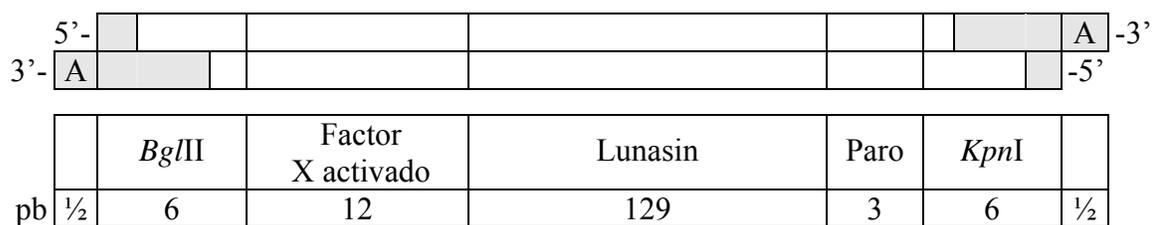


Figura 6.11 Secuencia de ADN lunasin de 157pb con sitios de restricción para las enzimas *Bgl*III y *Kpn*I, así como su secuencia de corte en la proteína expresada con la enzima Factor Xa y su secuencia de paro.

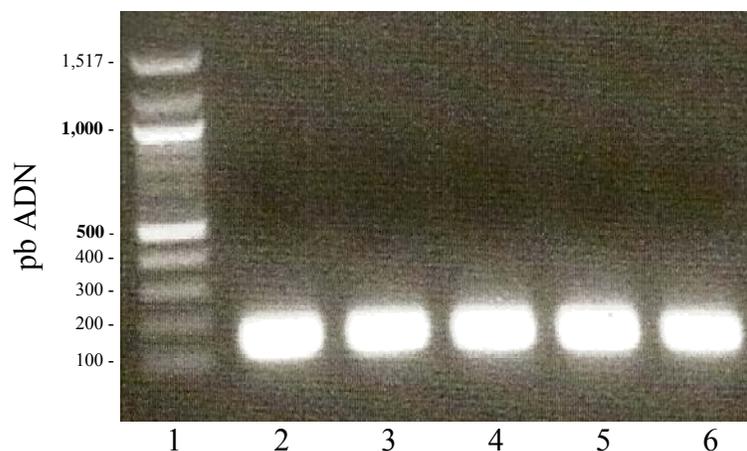


Figura 6.12 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V de producto de PCR, corrido con ADN de soya y los oligos Forward Lun-*Bgl*-F4 y Revers Lun-*Kpn*-R2. Columna 1) Marcador de MM, 2 a 6) Producto de PCR de la construcción (½A-*Bgl*III-Factor Xa-Lunasin-Paro-*Kpn*I-½A) de 157pb.

Se cortó el gel de la figura 6.12, columnas 2 a 6, bandas de 157pb y se purificaron del gel (protocolo 5.1.2), del total purificado ($\approx 600\mu\text{L}$) se tomaron $5\mu\text{L}$ y se corrió un gel, en la figura 6.23 columna 2 se muestra la banda purificada y en la columna 3 al vector pQE-40 (sección 5.6.3).

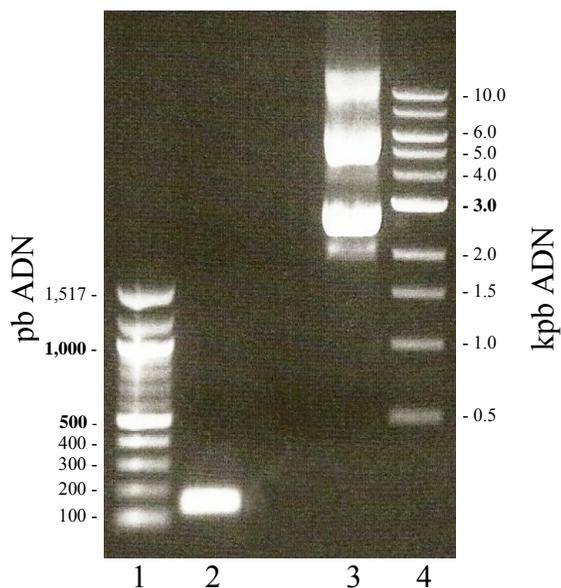


Figura 6.13 Electroforesis en gel de agarosa 1x corrido a 100V, Columnas 1 y 4) Marcador de Masa Molecular, 2) Banda purificada ($\frac{1}{2}$ A-*Bgl*III-Factor Xa-Lunasin-Paro-*Kpn*I- $\frac{1}{2}$ A) de 157 pb, 3) Vector pQE-40 de 4,031pb.

De la figura 6.13 la secuencia de la columna 2 y el plásmido pQE-40 columna 3 se digirieron con las enzimas de restricción *Bgl*III y *Kpn*I (protocolo 5.1.5, inciso *ii*), con el total de las digestiones se corrió un gel figura 6.14.

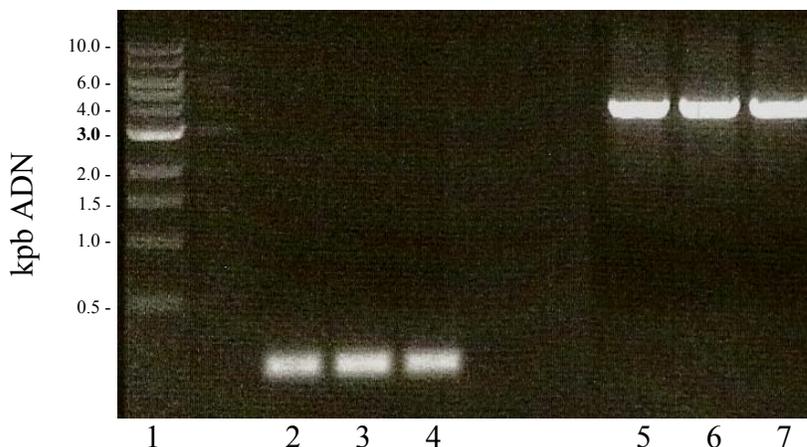


Figura 6.14 Electroforesis en gel de agarosa 1x corrido a 100V de digestiones con *Bgl*III y *Kpn*I, Columna 1) Marcador de Masa Molecular, 2 a 4) Banda con extremos escalonados *Bgl*III-Factor Xa-Lunasin-Paro-*Kpn*I de 151pb y 5 a 7) Vector pQE-40 digerido de 4,019pb.

De la figura 6.14 se cortó del gel, la banda de 151pb columnas de 2 a 4 y columnas 5 a 7 de 4,019 pb, enseguida fueron purificadas (protocolo 5.1.2) en la figura 6.15 se tiene la banda de 151pb purificada, posteriormente se procedió a clonar (protocolo 5.1.5, inciso *ii*), con esta contricción se transformaron células competentes *E. coli* M15 [pREP4].

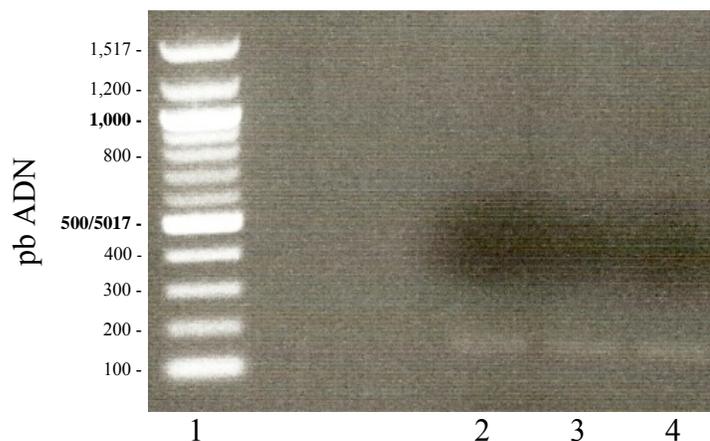


Figura 6.15 Electroforesis en gel de agarosa 1x corrido a 100V de banda digerida con *Bgl*III y *Kpn*I y purificada, Columna 1) Marcador de MM, 2 a 4) Banda con extremos escalonados (*Bgl*III-Factor Xa-Lunasin-Paro-*Kpn*I) de 151pb.

Con las colonas que crecieron al siguiente día y los oligos forward Lun-*Bgl*-F4 y rivers Lun-*Kpn*-R2, se procedió a realizar un PCR (protocolo 5.1.4) con temperatura de alineación de 69°C.

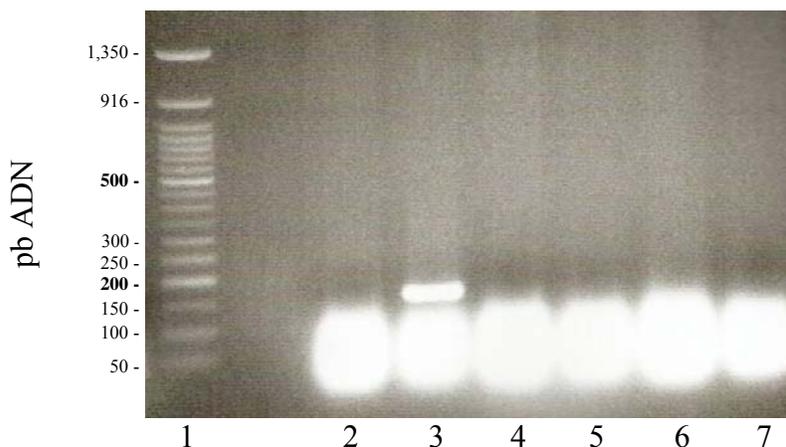


Figura 6.16 Electroforesis en gel de agarosa 2x corrido a 100V de producto de PCR de colonas *E. coli* M15 [pREP4], transformadas con el vector pQE-40 (*Bgl*III-Factor Xa-Lunasin-Paro-*Kpn*I). Columna 2 a 7) Grupos de 3 colonas.

En la figura 6.16 se tiene el producto de PCR, cada columna corresponde a 3 colonias, en la columna 3 se tiene un grupo de 3 colonias donde por lo menos una es positiva, en la figura 6.17 se muestra un PCR del grupo de las colonias de la columna 3.

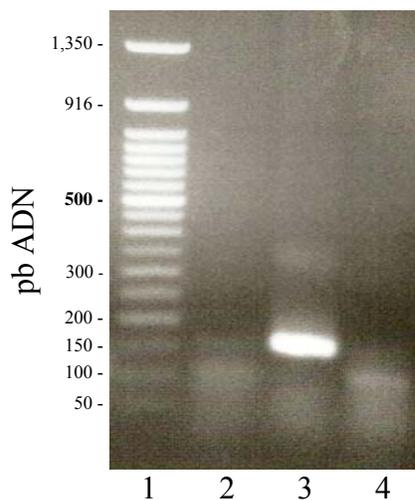


Figura 6.17 Electroforesis en gel de agarosa 2x corrido a 100V de producto de PCR del grupo 3 de la figura 6.26 de colonias *E. coli* M15 [pREP4], transformadas con el vector pQE-40 (*Bgl*III-Factor Xa-Lunasin-Paro-*Kpn*I). Columna 3) Secuencia esperada de 157pb.

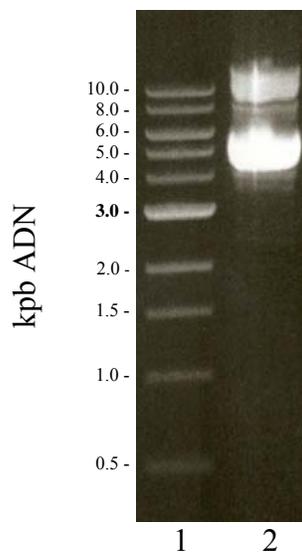


Figura 6.18 Electroforesis en gel de agarosa 1x corrido a 100V, columna 2) plásmido pQE-40 (*Bgl*III-Factor Xa-Lunasin-Paro-*Kpn*I) purificado de 4,163pb.

De la colonia de la figura 6.17 columna 3, se procedió a extraer el plásmido (protocolo 5.1.3), figura 6.18, se realizó un PCR con los oligos Forward Lun-*Bgl*-F4 y Rivers Lun-*Kpn*-R2 (sección 5.5), en la figura 6.19 se muestra el producto de PCR esperado de 157pb.

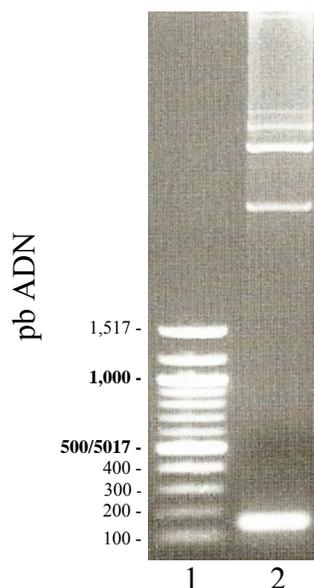


Figura 6.19 Electroforesis en gel de agarosa 1x corrido a 100V de producto de PCR del vector pQE-40 (*Bgl*III-Factor Xa-Lunasin-Paro-*Kpn*I), columna 2) banda esperada de 157pb.

Enseguida se procedió a realizar un glicerol con la colonia de la figura 6.17 columna 3, el cual se etiqueto como M-FXa-Lun-1 (sección 5.8.2).

Del glicerol M-FXa-Lun-1 se procedió a la expresión de la proteína recombinante (MRGS-6xH-GSGI-**DHFR**-GSRS-Factor Xa-Lunasin) de 28.968kDa, de 251 aminoácidos, que para fines prácticos nombraremos como 6xHis-DHFR-F. Xa-Lunasin.

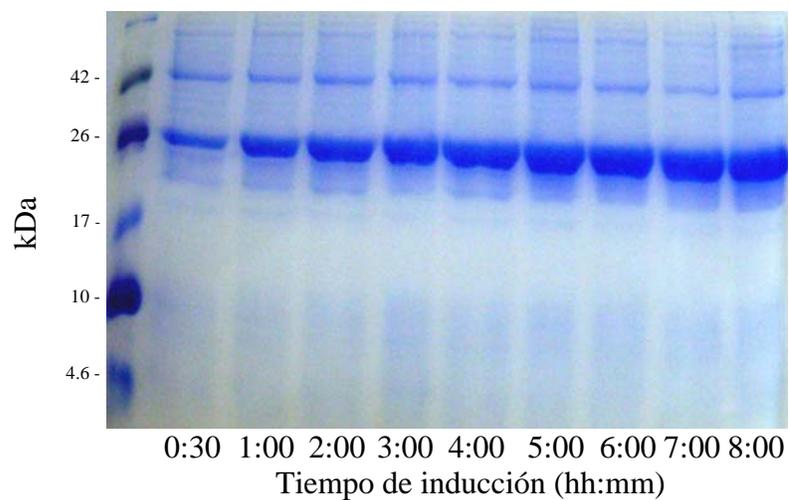


Figura 6.20 Electroforesis en gel de Glicina SDS-PAGE al 15% corrido a 100V, Primera columna Marcador de Masa Molecular, tiempo de inducción con IPTG 6xHis-DHFR-F. Xa-Lunasin de 28.968kDa

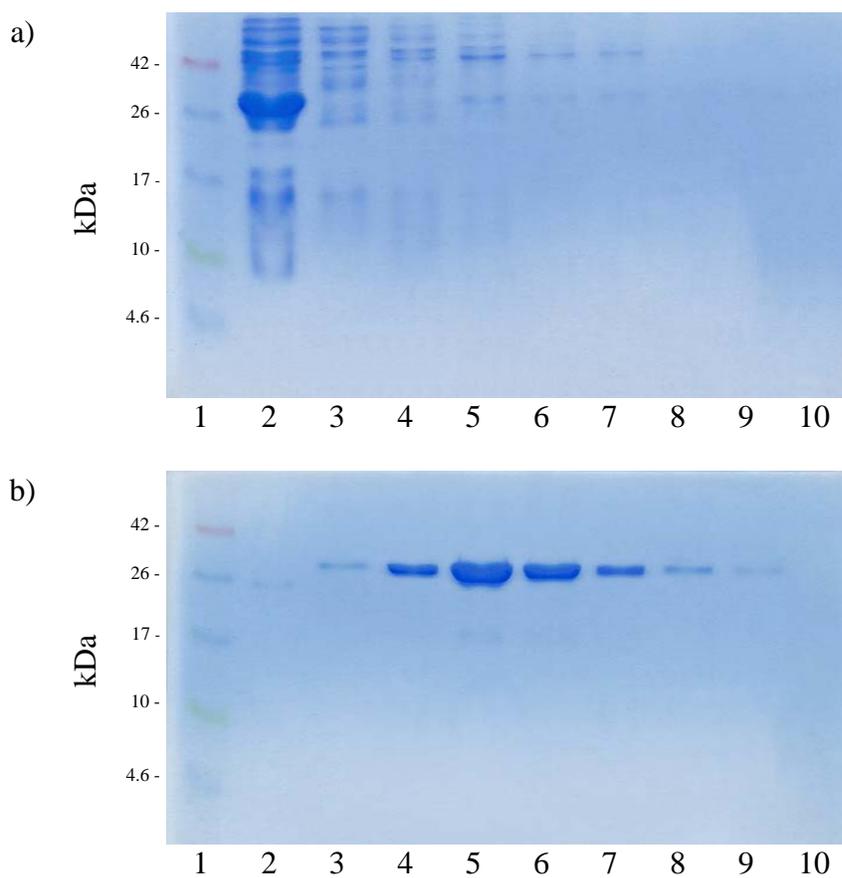


Figura 6.21 Electroforesis en gel de Glicina SDS-PAGE al 15% corrido a 100V, Primera columna Marcador de Masa Molecular, tiempo de inducción con IPTG. Columna 1) Marcador de Masa Molecular, 2) 6xHis-DHFR de 24.739 y 3 a 9) Elución de la proteína 6xHis-DHFR-F. Xa-Lunasin de 28.968kDa.

		6xHis										DHFR																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1		M	R	G	S	H	H	H	H	H	H	G	S	G	I	M	V	R	P	L	N	S	I	V	A	V	S	H	N	M	G
2		NP	+	Po	Po	+	+	+	+	+	+	Po	Po	Po	NP	NP	NP	+	NP	NP	Po	Po	NP	NP	NP	NP	Po	+	Po	NP	Po

		DHFR																													
		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1		I	G	K	N	G	D	L	P	W	P	P	L	R	N	E	F	K	Y	F	H	R	M	T	T	T	S	S	V	E	G
2		NP	Po	+	Po	Po	-	NP	NP	NP	NP	NP	NP	+	Po	-	NP	+	Po	NP	+	+	NP	Po	Po	Po	Po	Po	NP	-	Po

		DHFR																													
		61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
1		K	H	N	L	V	I	M	G	R	K	T	W	F	S	I	P	E	K	N	R	P	L	K	D	R	I	N	I	V	L
2		+	+	Po	NP	NP	NP	NP	Po	+	+	Po	NP	NP	Po	NP	NP	-	+	Po	+	NP	NP	+	-	+	NP	Po	NP	NP	NP

		DHFR																													
		91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
1		S	R	E	L	K	E	P	P	R	G	A	H	F	L	A	K	S	L	D	D	A	L	R	L	I	E	H	P	E	L
2		Po	+	-	NP	+	-	NP	NP	+	Po	NP	+	NP	NP	NP	+	Po	NP	-	-	NP	NP	+	NP	NP	-	+	NP	-	NP

		DHFR																													
		121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
1		A	S	K	V	D	M	V	W	I	V	G	G	S	S	V	Y	H	E	A	M	N	H	P	G	H	L	R	L	F	V
2		NP	Po	+	NP	-	NP	NP	NP	NP	NP	Po	Po	Po	Po	NP	Po	+	-	NP	NP	Po	+	NP	Po	+	NP	+	NP	NP	NP

		DHFR																													
		151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
1		T	R	I	M	H	E	F	E	S	D	T	F	F	P	E	I	D	L	G	K	Y	K	L	L	P	E	Y	P	G	V
2		Po	+	NP	NP	+	-	NP	-	Po	-	Po	NP	NP	NP	-	NP	-	NP	Po	+	Po	+	NP	NP	NP	-	Po	NP	Po	NP

		DHFR																		Corte F. Xa				Lun...							
		181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
1		L	S	E	V	H	E	E	K	G	I	K	Y	K	F	E	V	Y	E	K	K	G	S	R	S	I	E	G	R	S	K
2		NP	Po	-	NP	+	-	-	+	Po	NP	+	Po	+	NP	-	NP	Po	-	+	+	Po	Po	+	Po	NP	-	Po	+	Po	+

		Lunasin																													
		211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
1		W	Q	H	Q	Q	D	S	C	R	K	Q	L	Q	G	V	N	L	T	P	C	E	K	H	I	M	E	K	I	Q	G
2		NP	Po	+	Po	Po	-	Po	Po	+	+	Po	NP	Po	Po	NP	Po	NP	Po	NP	Po	-	+	+	NP	NP	-	+	NP	Po	Po

		Lunasin										
		241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251
1		R	G	D	D	D	D	D	D	D	D	D
2		+	Po	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6.1 Proteína 6xHis-DHFR-Factor Xa-Lunasin de MM 28.968 kDa, fila 1) Secuencia de aminoácidos, 2) Aminoácidos polares (Po) 68 aa, 27.1%, no polares (NP) 92 aa, 36.7%, cargados entre pH 6.0 a 7.0, con carga (+) 54 aa, 21.5% y con carga (-) 37 aa, 14.7%.

6.3 Obtención de la proteína recombinante M-Lunasin

Del DNA genómico de *Glycine max* var. Bragg, purificado de hoja de la figura 6.1, se corrieron 5 PCRs, con los oligos forward Lun-*Bgl*-F3 y revers Lun-*Kpn*-R2, (fueron 5 PCRs debido a que la secuencia esperada es pequeña de 151pb y por lo tanto difícil de visualizarse en el gel después de purificada) en la figura 6.22 se tiene la secuencia esperada y en la figura 6.23 se muestra un gel con los productos de PCR.

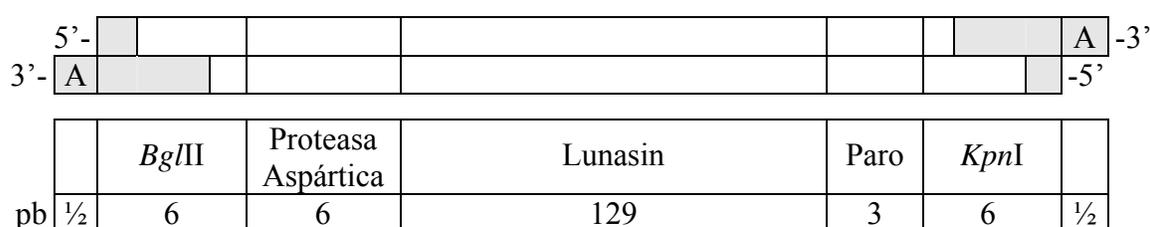


Figura 6.22 Secuencia de ADN lunasin de 151pb con sitios de restricción para las enzimas *Bgl*III y *Kpn*I, así como su secuencia de corte en la proteína expresada con la enzima Proteasa Aspártica y su secuencia de paro.

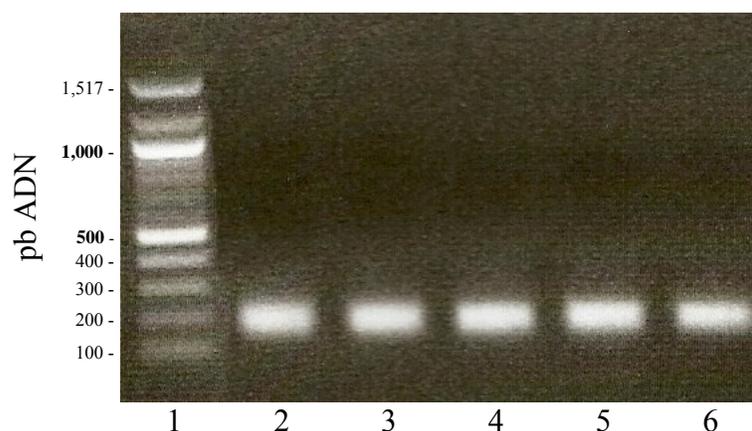


Figura 6.23 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V de producto de PCR, corrido con ADN de soya y los oligos Forwad Lun-*Bgl*-F3 y Revers Lun-*Kpn*-R2. Columna 1) Marcador de M. M., 2 a 6) Producto de PCR de la construcción (½A-*Bgl*III-Proteasa Aspártica-Lunasin- Paro-*Kpn*I-½A) de 151pb.

Se corto el gel de la figura 6.23, columnas 2 a 6, bandas de 151pb y se purifico del gel (protocolo 5.1.2), del total purificado ($V \approx 600 \mu\text{L}$) se tomaron $5 \mu\text{L}$ y se corrió un gel, en la figura 6.24 columna 2 se muestra la banda purificada de 151pb.

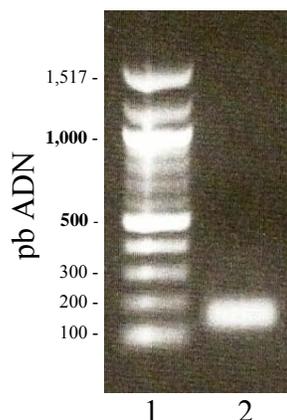


Figura 6.24 Electroforesis en gel de agarosa 2x corrido a 100V, Columna 1) Marcador de Masa Molecular, 2) Banda purificada ($\frac{1}{2}$ A-*Bgl*II-Proteasa Aspártica-Lunasin-Paro-*Kpn*I- $\frac{1}{2}$ A) de 151pb.

La secuencia de la figura 6.24 columna 2, se clono (protocolo 5.1.5) en el vector pJet1.2/blunt (sección 5.6.1) con la construcción se trasformaron células competentes *E. coli* DH5 α (protocolo 5.1.6) en la figura 6.25 se muestra el producto de PCR corrido con los oligos Forward Lun-*Bgl*-F3 y Rivers Lun-*Kpn*-R2 de 6 colonias que crecieron al siguiente día de trasformadas, de la columna 2 a 6 son colonias positivas.

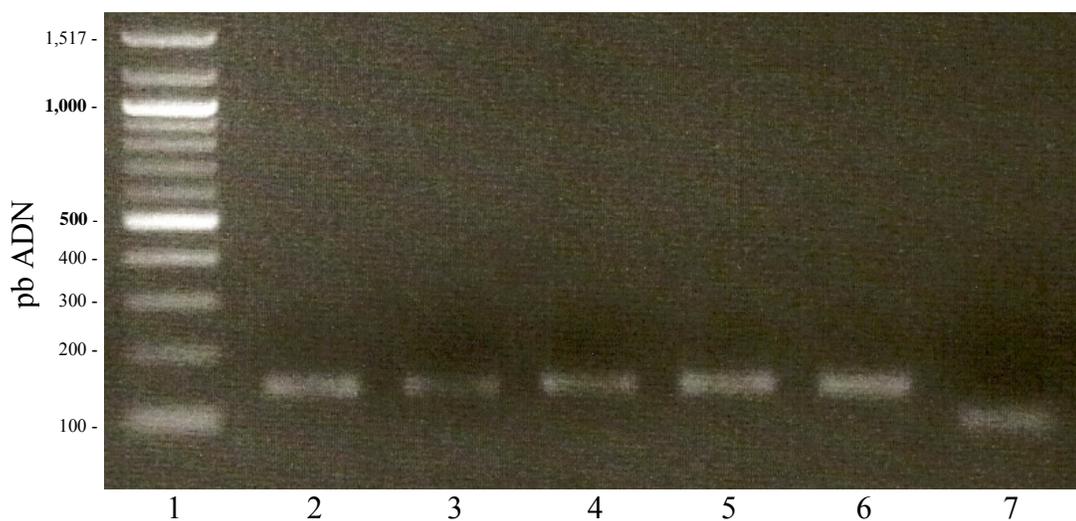


Figura 6.25 Electroforesis en gel de agarosa 2x, corrido a 100V de producto de PCR, corrido con colonias trasformadas *E. coli* DH5 α con el vector pJET1.2/Blunt+(*Bgl*II-Proteasa Aspártica-Lunasin-Paro-*Kpn*I), corrido con los oligos Lun-*Bgl*-F3 y Lun-*Kpn*-R2.

Con la colonia de la figura 6.25 columna 6 se hizo un glicerol y se guardo etiquetado como D-PA-Lun-1 (sección 5.8.1), simultáneamente se extrajo el plásmido (protocolo 5.1.3) y se corrió un PCR con los oligos forward Lun-*Bgl*-F3 y rivers Lun-*Kpn*-R2 (sección 5.5) para comprobar la presencia del inserto, ver figura 6.26, posteriormente se mando a secuenciar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de la UNAM Camus Morelos, con sus oligos forward y reverse (sección 5.6.1), una vez que se obtuvo la secuencia se comprobó que correspondiera con la secuencia de la figura 6.22, en la figura 6.27 columna 2 se muestra el plásmido purificado de 3.124 kpb (2,974pb pJET1.2/blunt + 150pb *Bg*III-Proteasa Aspártica-Lunasin- Paro-*Kpn*I).

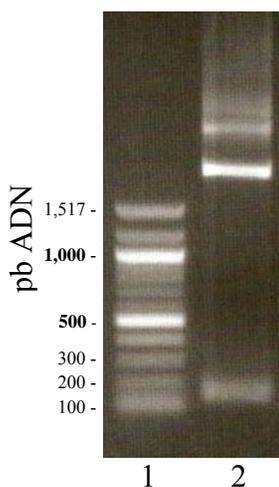


Figura 6.26 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V, Columna 1) Marcador de Masa Molecular 2) Producto de PCR del plásmido pJET1.2/blunt+(*Bg*III-Proteasa Aspártica-Lunasin-Paro-*Kpn*I) de 3.124kpb, la banda de 151pb corresponde al tamaño esperado.

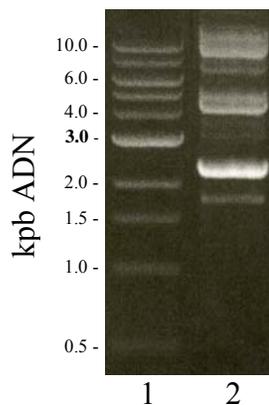


Figura 6.27 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V del plásmido secuenciado pJET1.2/blunt+(*Bg*III-Proteasa Aspártica-Lunasin- Paro-*Kpn*I) de 3.124kpb.

Enseguida se procedió a digerir el plásmido pJET1.2/blunt+(*Bgl*II-Proteasa Aspártica-Lunasin-Paro-*Kpn*I) de la figura 6.27 y el plásmido pQE-40 extraído del glicerol M-QE40-1 figura 6.28 con las enzimas *Bgl*II y *Kpn*I (sección 5.4.1).

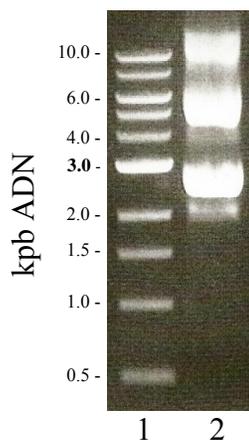


Figura 6.28 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V, columna 1) Marcador de Masa Molecular 2) Plásmido pQE-40 sin digerir.

En la figura 6.29 se muestra un gel de la digestión del plásmido de la figura 6.27.

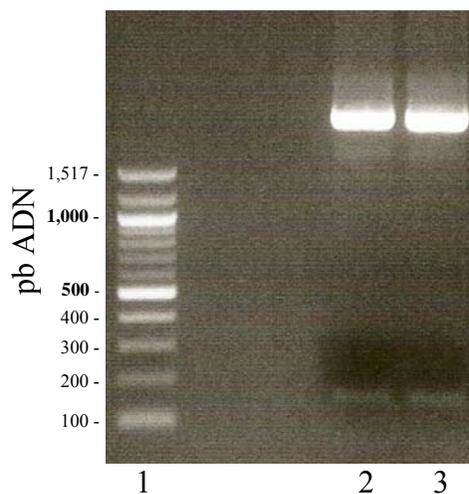


Figura 6.29 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V del plásmido pJET1.2/blunt+(*Bgl*II-Proteasa Aspártica-Lunasin-Paro-*Kpn*I) digerido con las enzimas *Bgl*II y *Kpn*I, columna 1) Marcador de Masa Molecular 2 y 3) banda de 144pb con extremos escalonados *Bgl*II-Proteasa Aspártica-Lunasin-Paro-*Kpn*I.

Del gel de la figura 6.29 columnas 2 y 3 se cortaron las bandas de 144pb y purificaron (protocolo 5.1.2), en la figura 6.30 columna 2 se tiene esta banda purificada y en la columna 3 el plásmido pQE-40 digerido con extremos escalonados. 4,019pb (4,031pb pQE-40 - 12pb perdidos por la digestión), enseguida se clono esta secuencia en el plásmido pQE-40 y se transformaron células competentes *E. coli* M15 [pREP4] (protocolo 5.1.6).

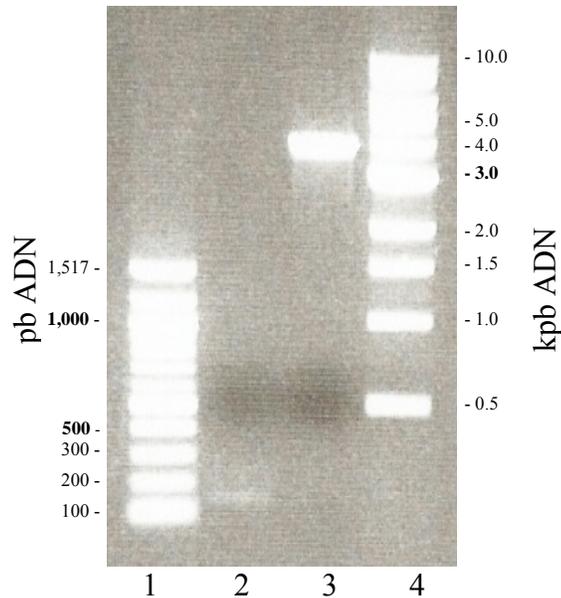


Figura 6.30 Electroforesis en gel de agarosa 1x, corrido a 100V del vector pQE-40 e inserto digeridos con las enzimas *Bgl*III y *Kpn*I, columna 1 y 4) Marcador de Masa Molecular, 2) Banda (*Bgl*III-Proteasa Aspártica-Lunasin- Paro-*Kpn*I) de 144pb con extremos escalonados y 3) pQE-40 de 4,019pb con extremos escalonados.

En la figura 6.31 se muestra un gel de agarosa con el producto de PCR realizado con colonias que crecieron después de transformadas y los oligos forward Lun-*Bgl*-F3 y revers Lun-*Kpn*-R2 (sesión 5.5), con la colonia de la columna 8 se realizó un glicerol y se guardó etiquetado como M-PA-Lun-1 (sección 5.8.2).

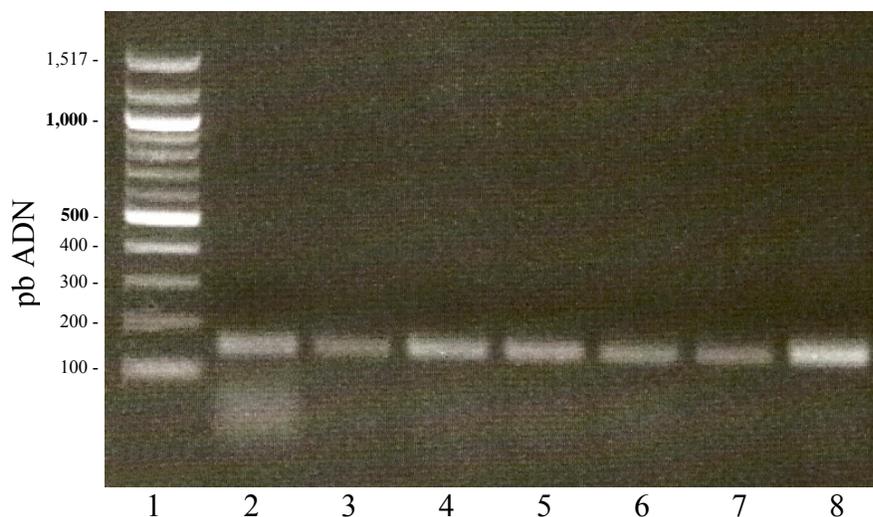


Figura 6.31 Electroforesis en gel de agarosa 2X, corrido a 100V, con colonias de *E. coli* M15 [pREP4] transformadas con pQE-30+(*Bgl*II-Proteasa Aspártica-Lunasin-Paro-*Kpn*I), columna 1) Marcador de MM, 2 a 8) Colonias positivas.

Del glicerol M-PA-Lun-1 se procedió a la expresión de la proteína recombinante (MRGS-6xH-GSGI-DHFR-GSRS-Proteasa Aspártica-Lunasin) de 28.790kDa, de 249 aminoácidos, que para fines prácticos nombraremos como 6xHis-DHFR-P. Asp.-Lunasin, enseguida se purificó (protocolo 5.1.8),

En la figura 6.21 inciso a se muestra en la columna 2 el total del extracto proteico, 3 a 6 el lavado con buffer de p36.3 y de la 7 a 10 el lavado con buffer D de pH 5.9. En el inciso b columnas 2 a 7 se tiene las eluciones con buffer E pH 4.5

Inducción de la expresión con IPTG

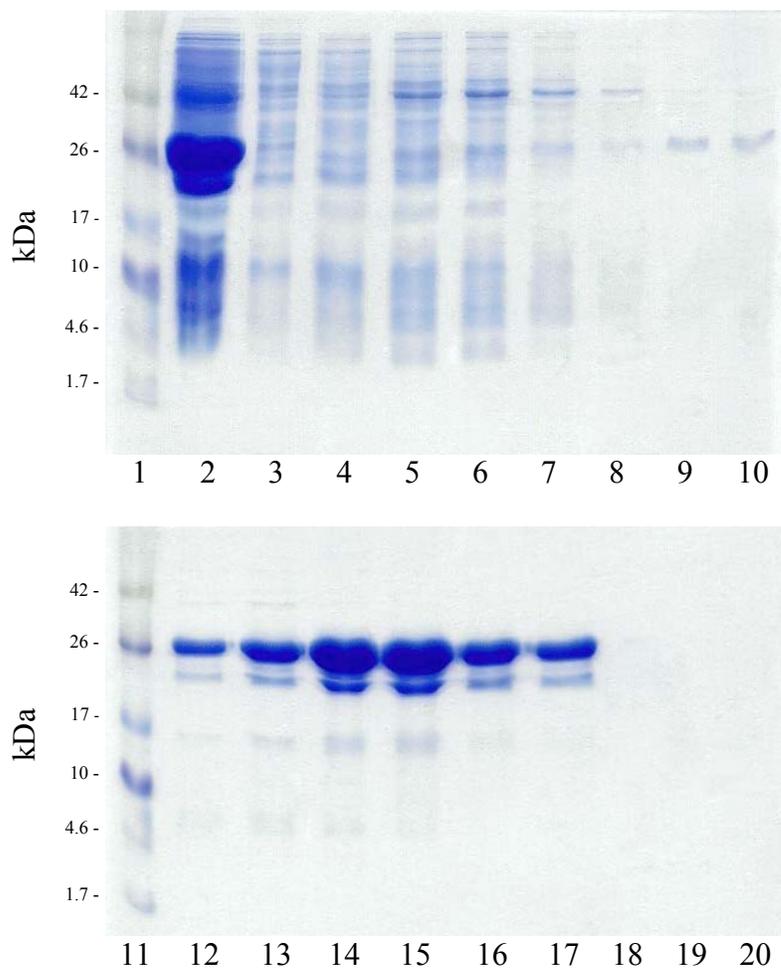


Figura 6.32 Electroforesis en gel de Glicina SDS-PAGE al 15% corrido a 100V, a) columna 1) Marcador de M. M., 2) Total de extracto proteico, 3 a 6) lavado con buffer C, 7 a 10) lavado con buffer D, b) 2 a 7) son las eluciones con Buffer E. El tiempo de inducción con IPTG fue de 4h, la proteína purificada es 6xHis-DHFR-Proteasa Aspártica-Lunasin de 28.790kDa.

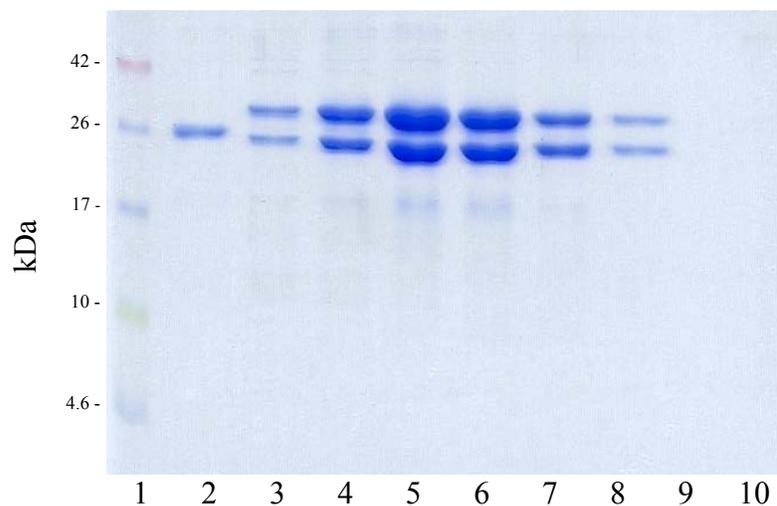


Figura 6.33 Electroforesis en gel de Glicina SDS-PAGE al 15% corrido a 100V, columna 1) Marcador de Masa Molecular, Eluidas con buffer E pH 4.5

El tiempo de inducción con IPTG fue de 7h, las proteínas purificadas son: 6xHis-DHFR-Proteasa Aspártica-Lunasin de 28.790kDa y 6xHis-DHFR 24.739kDa

Prueba para ver la resistencia de la proteína Proteasa 6xHis-Aspártica-Lunasin al pH de 4.5 y 8.0

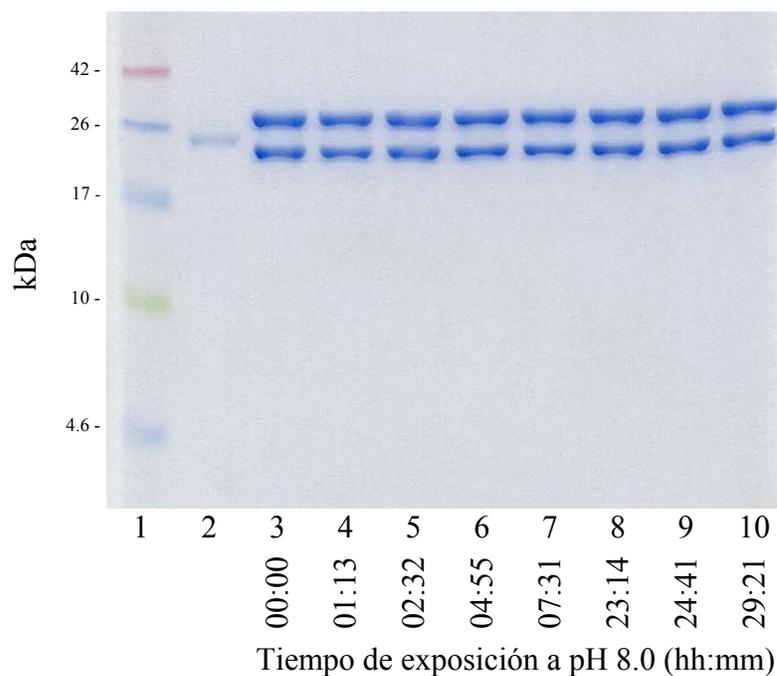


Figura 6.34 Electroforesis en gel de Tricina SDS-PAGE AB-3, columna 1) Marcador de Masa Molecular, 2) Proteína 6xHis-DHFR de 24.739kDa, 3 a 10) tiempo de exposición a pH 8.0 y temperatura 37°C de la 6xHis-DHFR-Protease Aspártica-Lunasin de 28.790kDa, con concentración de 1.572mg/mL.

Tiempo de inducción es de 9h
El buffer de lisis pH 8.0

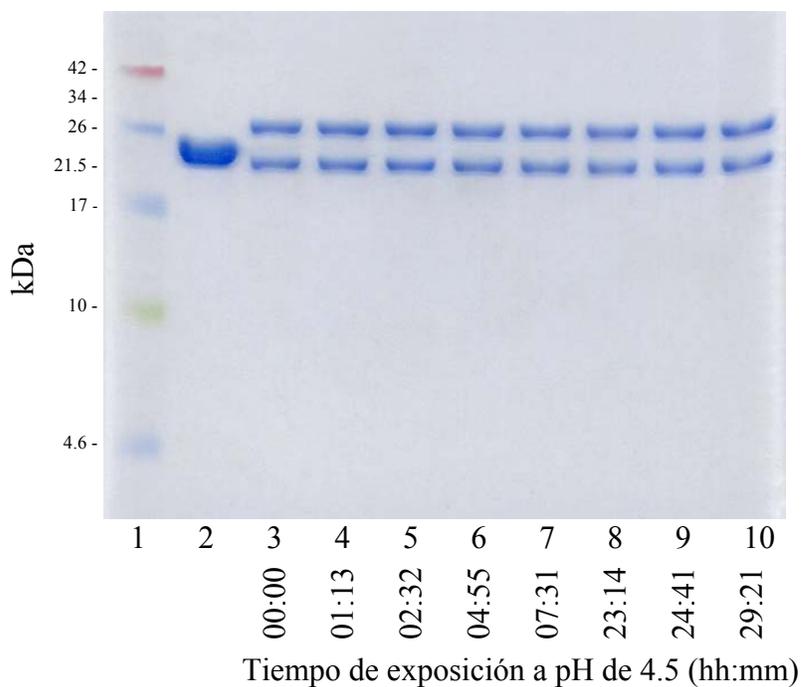


Figura 6.35 Electroforesis en gel de Tricina SDS-PAGE AB-3, columna 1) Marcador de Masa Molecular, 2) Proteína 6xHis-DHFR de 24.739 kDa, 3 a 10) tiempo de exposición a pH 4.5 y temperatura 37°C de la 6xHis-DHFR-Proteasa Aspártica-Lunasin de 28.790 kDa, con concentración de 1.572 mg/mL.

Tiempo de inducción 9h

6xHis-DHFR-F 23.649 kDa

M-Lunasin de 5.159 kDa

La banda de 2.2kDa de Masa Molecular aparente, no se produce por causa de un pH demasiado ácido pH4.5 por ser guardado en el buffer ni por un pH alcalino 8.0 de elución, ni durante la lisis de las células pH... y si esta relacionado con el tiempo de inducción

Al incrementar el tiempo de inducción el grosor de esta banda se incrementa y la de kDa disminuye.

Esto también tiene que ver con los aminoácidos M-F ya en el caso en el que estos aminoácidos No se presenta esta banda

DHFR-M-F-Lunasin

Digestión con la enzima Proteasa Aspártica

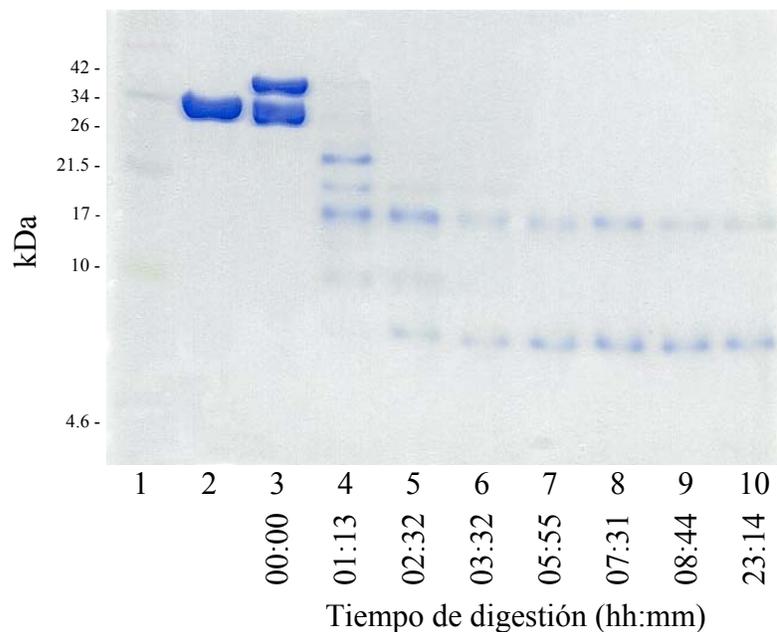


Figura 6.36 Electroforesis en gel de Tricina SDS-PAGE al 16 %, 6M Urea,

columna 1) Marcador de Masa Molecular, 2) Proteína 6xHis-DHFR de 24.739kDa, 3 a 10) tiempo de digestión a pH 5.5 con la enzima Proteasa Aspártica

volumen de enzima Proteasa Aspártica/Masa de sustrato 0.636 $\mu\text{L}/\text{mg}$

y temperatura 37 °C de la 6xHis-DHFR-Proteasa Aspártica-Lunasin de 28.790kDa, con concentración de 1.572 mg/mL.

Sitios probables de corte por la proteasa aspartica

Sitios inespesificos 48-49, 72-73, 162-163,

Sitio espesifico 205-206

		6xHis										DHFR																			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1		M	R	G	S	H	H	H	H	H	H	G	S	G	I	M	V	R	P	L	N	S	I	V	A	V	S	H	N	M	G
2		NP	+	Po	Po	+	+	+	+	+	+	Po	Po	Po	NP	NP	NP	+	NP	NP	Po	Po	NP	NP	NP	NP	Po	+	Po	NP	Po

		DHFR																													
		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
1		I	G	K	N	G	D	L	P	W	P	P	L	R	N	E	F	K	Y	F	H	R	M	T	T	T	S	S	V	E	G
2		NP	Po	+	Po	Po	-	NP	NP	NP	NP	NP	NP	+	Po	-	NP	+	Po	NP	+	+	NP	Po	Po	Po	Po	Po	NP	-	Po

		DHFR																													
		61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
1		K	H	N	L	V	I	M	G	R	K	T	W	F	S	I	P	E	K	N	R	P	L	K	D	R	I	N	I	V	L
2		+	+	Po	NP	NP	NP	NP	Po	+	+	Po	NP	NP	Po	NP	NP	-	+	Po	+	NP	NP	+	-	+	NP	Po	NP	NP	NP

		DHFR																													
		91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
1		S	R	E	L	K	E	P	P	R	G	A	H	F	L	A	K	S	L	D	D	A	L	R	L	I	E	H	P	E	L
2		Po	+	-	NP	+	-	NP	NP	+	Po	NP	+	NP	NP	NP	+	Po	NP	-	-	NP	NP	+	NP	NP	-	+	NP	-	NP

		DHFR																													
		121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150
1		A	S	K	V	D	M	V	W	I	V	G	G	S	S	V	Y	H	E	A	M	N	H	P	G	H	L	R	L	F	V
2		NP	Po	+	NP	-	NP	NP	NP	NP	Po	Po	Po	Po	NP	Po	+	-	NP	NP	Po	+	NP	Po	+	NP	+	NP	NP	NP	NP

		DHFR																													
		151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
1		T	R	I	M	H	E	F	E	S	D	T	F	F	P	E	I	D	L	G	K	Y	K	L	L	P	E	Y	P	G	V
2		Po	+	NP	NP	+	-	NP	-	Po	-	Po	NP	NP	NP	-	NP	-	NP	Po	+	Po	+	NP	NP	NP	-	Po	NP	Po	NP

		DHFR																				P. Asp		Lun...							
		181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210
1		L	S	E	V	H	E	E	K	G	I	K	Y	K	F	E	V	Y	E	K	K	G	S	R	S	F	M	S	K	W	Q
2		NP	Po	-	NP	+	-	-	+	Po	NP	+	Po	+	NP	-	NP	Po	-	+	+	Po	Po	+	Po	NP	NP	Po	+	NP	Po

		Lunasin																													
		211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
1		H	Q	Q	D	S	C	R	K	Q	L	Q	G	V	N	L	T	P	C	E	K	H	I	M	E	K	I	Q	G	R	G
2		+	Po	Po	-	Po	Po	+	+	Po	NP	Po	Po	NP	Po	NP	Po	NP	Po	-	+	+	NP	NP	-	+	NP	Po	Po	+	Po

		Lunasin								
		241	242	243	244	245	246	247	248	249
1		D	D	D	D	D	D	D	D	D
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6.2

Proteína 6xHis-DHFR-Proteasa Aspártica-Lunasin ■■ Sitios de corte para la enzima proteasa aspártico

de M. M. 28.968 kDa, fila 1) Secuencia de aminoácidos, 2) Aminoácidos polares (Po) 68 aa, 27.1%, no polares (NP) 92 aa, 36.7%, cargados entre pH 6.0 a 7.0, con carga (+) 54 aa, 21.5% y con carga (-) 37 aa, 14.7%.

7 CONCLUSIONES

Lunasina es un péptido con una gran actividad anticancerígena ya comprobada en cáncer de mama, colon, leucemia, próstata y piel, no toxico, pero con el inconveniente que no es rentable económicamente, a pesar de diversas pruebas que se han realizado al respecto, con respecto de los resultados que obtuvimos durante esta tesis pensamos que estamos en el camino correcto para poder obtenerla a precios accesibles. Las razones en las que nos basamos son que la enzima que utilizamos para digerir proteasa apartica es muy económica y no corta al péptido lunasina, el camino sigue siendo el mismo obtener a la proteína lunasina por un mecanismo recombinante.

8 RECOMENDACIONES

Al tratar de obtener a la proteína recombinante tuvimos el problema que es pequeña, prologando proponemos que siempre tenga alguna proteína de anclaje.

En el proceso de purificación no se debe de realizar con las 6xHis debido a las cargas positivas que este grupo proporciona las cuales reaccionan con los 9xAsp de lunasin impidiendo su solubilidad

10 REFERENCIAS

10.1 Hemerografía

- Shoji Odai, Takehiko Koide and Teruo Ono; (1987), Amino Acid Sequence of a Soybean (*Glycine max*) Seed Polypeptide Having a Poly (L-Aspartic Acid) Structure, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 262, 22, 10502-10505.
- Alfredo F. Galvez, Na Chen, Janet Macasieb, and Ben O. de Lumen; (2001), Chemopreventive property of a soybean peptide (lunasin) that binds to deacetylated histones and inhibits acetylation, *Cancer Res*, Vol. 61 (20):7473-7478.
- Alfredo F. Galvez and Ben O. de Lumen; (1999), A soybean cDNA encoding a chromatin-binding peptide inhibits mitosis of mammalian cells, *Nature America Ing. Vol. 17: 495-500*
- Ben-Sasson, S.A., Sheman, Y. & Gavireli, Y.; (1995), Identification of dying cells- in situ staining, *Methods Cell. Biol.*, Vol. 46, 29-39
- Vernon P. Dia and Elvira Gonzalez de Mejia (2011), Lunasin induces apoptosis and modifies the expression of genes associated with extracellular matrix and cell adhesion in human metastatic colon cancer cells, *Mol Nutr Food Res.*, 54, 1-12
- Ben O. de lumen (2005), Lunasin: A Cancer-Preventive Soy Peptide, *Nutrition Reviews*, Vol. 63, No. 1, 16-21.
- Elaine A. Hisieh, Christine M. Chain, Benito O. de Lumen, Richard A. Neese, Marc K. Hellerstein (2004), Dynamics of Keratinocytes *in Vivo* using $^2\text{H}_2\text{O}$ Labeling: A Sensitive Marker of Epidermal Proliferation State, *J. Invest Dermatol.*, 123: 530-536.
- Yi Lam, Alfredo Galvez and Ben O. de Lumen (2003), LunasinTM Suppresses E1A-Mediated Transformation of Mammalian Cells but Does Not Inhibit Growth of Immortalized and Established Cancer Cell Lines, *Nutrition and Cancer*, 47(1), 88-94.
- Alfredo F. Galvez, Na Chen, Janet Macasied and Ben O. de Lumen (2001), Chemopreventive Property of a Soybean Peptide (Lunasin) That Binds to Deacetylated Histones and Inhibits Acetylation, *Cancer Research*, 61, 7473-7478.
- Fernando Geu-Flores, Carl Erik Olsen and Barbara Ann Halkier (2008), Towards engineering glucosinolates into non-cruciferous plants, *Planta*, 229:261-270
- Concepción Navarro Moll, (2005), Mecanismo de acción de las isoflavonas, *Ginecología y Obstetricia Clínica*, 6(3):159-165

- Lori Rice, Renita Handayani, Yuehua Cui, Theresa Medrano, Von Samedi³, Henry Baker, Nancy J. Szabo, Charles J. Rosser, Steve Goodison, and Kathleen T. Shiverick, (2008), Soy Isoflavones Exert Differential Effects on Androgen Responsive Genes in LNCaP Human Prostate Cancer Cells, *National Institutes of Health*, 137(4): 964–972.
- Steven Sullivan, Daniel W. Sink, Kenneth L. Trout, Izabela Makalowska, Patrick M. Taylor, Andreas D. Baxevanis and David Landsman, (2002), Nucleic Acids Research, *The Histone Databas*, Vol. 30, No. 1, 341-342.
- Ngan Vo and Richard H. Goodman, (2002), CREB-binding Protein and p300 in Transcriptional Regulation, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, No. 17, 13505–13508.
- Nika N. Danial and Stanley J. Korsmeyer, (2004), Cell Death: Critical Control Points, *Cell*, Vol. 116, 205–219.
- Juan Carlos Herrera Patiño, Gonzalo Vásquez Palacio, José Luis Ramírez Castro, y Carlos Mario Muñetón Peña (2004), Papel del gen TP53 en la oncogénesis, *Salud UIS*, 36: 88-99.
- Hermann Schägger, (2006), Tricine–SDS-PAGE, *Nature Protocols*, Vol.1 No.1, 16-22.
- Hermann Schägger and Gebhard Von Jagow, (1987), Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa, *Analytical Biochemistry*, 166, 368-379.

10.3 Fuentes electrónicas

1. <http://www.un.org/es/>
ONU
(consultado: 11/nov/2011)
2. <http://www.zymoresearch.com/zrc/pdf/D6020i.pdf>
ZRPlant/Seed DNA MiniPrepTM, #D6020
(Consultado: 2/oct./2011).
3. http://openwetware.org/images/5/5e/QIAquick_Gel_Extraction_Kit_Protocol.pdf
http://kirschner.med.harvard.edu/files/protocols/QIAGEN_QIAquickSpin_EN.pdf
QIAquick Gel Extraction Kit Protocol, #28704
(Consultado: 2/oct./2011).
4. <http://www.zymoresearch.com/zrc/pdf/D4036i.pdf>
Zyppy Plant Miniprep #D4036S
(Consultado: 2/oct./2011).
5. http://www.bio-rad.com/cmc_upload/Literature/111756/Bulletin_07512.pdf
PTC-100® Thermal Cycler
(Consultado: 2/oct./2011).
6. <http://biotec-ea.com/>
Biotec Especialidades Alimenticias, S.A. de C.V.

-
- (Consultado: 11/nov./2011).
 7. <http://www.fermentas.com/en/products/all/protein-electrophoresis/prestained-ladders/sm186-spectra-low>
Spectra™ Multicolor Low Range Protein Ladder #SM1861
(Consultado: 15/sep./2011).
 8. http://www.fermentas.com/templates/files/tiny_mce/coa_pdf/coa_k1231.pdf
CloneJET™ PCR Cloning Kit
#K1231, #K1232
(Consultado: 2/oct./2011).
 9. <http://130.15.90.245/methods/handbooks%20and%20manuals/qiaexpressionist%202002.pdf>, The QIAexpressionist™, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, QIAexpress Kit Type IV, Catalog No. 32149
(Consultado: 2/oct./2011).

PRODUCTOS