## BT7481-1 Laboratorio de Técnicas Modernas en Biotecnología

***Sección 1, Semestre Otoño, Año 20011***

***Profesores: B.Andrews, M.E. Lienqueo O.Salazar***

***Profesor Auxiliar: Felipe Zuñiga***

***Horario Miércoles 14:30-16:00***

## Etapa 2 Producción y purificación de la celulasa recombinante (6 semanas)

## Fermentación y Recuperación (3 sesiones)

Sección 1: Preparación del material (ojala en la misma semana de la fermentación)

Sección 2: Fermentación

Sección 3: Recuperación del sobrenadante

## Purificación cromatográfica (2 sesiones)

Sección 4 Cromatografía

Sección 5 Monitoreo

## Caracterización (2 sesión)

Sección 6 Caracterización de mw y zimogramas

***Protocolos***

1. **Fermentación**

Para inducir la expresión del gen de la celulasa Cel5A modificada, en un tubo falcón estéril con 8 L de LB más Amp, se coloca una colonia de las células *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el gen de la endoglucanasa modificada en pET-22b(+) y se deja toda la noche a 37°C y 200 rpm.

Se mide la absorbancia a 600 nm, utilizando como blanco medio estéril y se determina el volumen requerido para inocular 100 mL de medio TB estéril, suplementado con Amp, a una D.O. final de 0,05. El cultivo se crece a 30°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de 1.

Una vez alcanzada la D.O. deseada, se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se incubó toda la noche a 18°C y 200 rpm (alrededor de 4 h).

1. **Extracción de celulasas**

La fracción extracelular se recuperó centrifugando el cultivo 7 min a 4°C y 3300 g.

Se debe guardar una muestra para análisis de concentración de proteína y actividad. En caso de ser necesario el resto se concentra por precipitación con sulfato de amonio al 80% (Ver punto 3).

3.-Precipitación con Sulfato de Amonio

Si es necesario se concentran las muestras de sobrenadante, para ello se puede utilizar concentración con Sulfato de Amonio. Para ello para realizar una precipitación al 80 % de sulfato de amonio. Se añaden 561 grs de Sulfato de Amonio pulverizado para precipitar 1.000 mL de sobrenadante, en forma lenta, sobre un agitador magnético y en frío.

**4.-Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC)**

Se utiliza una columna empacada HR5-5 con 1 mL de resina Butil Sefarosa Fast Flow 6FF (GE Healthcare, Alemania), cuyas dimensiones son 5 cm de altura y 5 mm de diámetro interno. El cromatógrafo utilizado es un ÄKTA Purifier 10 y el Software UNICORN 5.1.

Buffers

Los buffers utilizados son:

Buffer A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,0

Buffer B: Buffer A + 2M Sulfato de Amonio.

Ambos fueron filtrados con filtros Millipore de 0,22 μm y desgasificados con helio durante 5 min.

Preparación de muestras

Para la preparación de las muestras se realiza el siguiente protocolo:

En el caso que se tome directamente del sobrenadante:

Se toma un volumen de 4 ml de muestra y se adiciona la cantidad necesario de sulfato de amonio para que la concentración final sea de 2 M sulfato de amonio. En el caso que se forme precipitado la muestra se debe centrifugar a 10.000 g por 5 minutos para obtener una muestra transparente que será inyectada al cromatógrafo.

En el caso de Precipitado de sobrenadante: Resuspender el precipitado en 4 ml de Buffer B. En el caso que se forme precipitado la muestra se debe centrifugar a 10.000 g por 5 minutos para obtener una muestra transparente que será inyectada al cromatógrafo.

Las muestras que se inyecten en la cromatografía no deben contener sólidos, usar centrifuga de epperndorf.

**5.- Cromatografìa de interacción Hidrofóbica**

Se programa iniciar la cromatografía con una concentración de sal equivalente al 100% con respecto al Buffer B, y lentamente se fue mezclando con Buffer A, generando un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna, hasta llegar a 0% de concentración de sal. El flujo se mantiene constante durante todo el proceso, a 0,8 mL/min.

Se inyectan 4 mL de muestra a la columna utilizando un loop de 2 mL para su inyección.

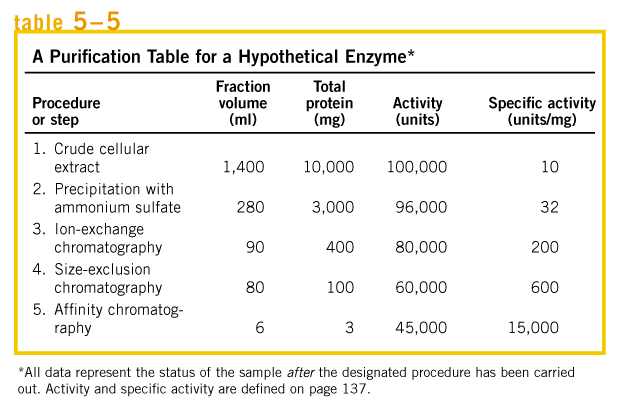
Se colectan fracciones de 0,5 mL y una vez finalizada la cromatografía se regenera la resina con 5 volúmenes de columna del Buffer B.

A las muestras colectadas se les realizan ensayo de actividad y medición de la concentración de proteína total.

Finalmente, se realiza una electroforesis de gel de poliacrilamida 12.5% en condiciones denaturantes para determinar la pureza de las distintas fracciones y determinar el mw de la celulasa.

En base a todos los datos se realiza una tabla de recuperación del proceso (Ver Indicación).

Indicación

Ejemplo tabla de Purificación

**Caracterización de las celulasas modificadas**

**Medición de la actividad celulolítica en medio líquido**

La actividad celulolítica se mide utilizando el método DNS con CMC al 1% p/v en buffer HEPES 50 mM pH=7,5.

Los azúcares reductores obtenidos con el método DNS son calculados midiendo la D.O. a 550 nm, luego con este valor de absorbancia se usa la curva de calibración construida con distintas concentraciones de glucosa y, de esta manera, se obtiene la concentración que existe en las muestras.

Para este ensayo se incuban 50 μL de muestra con 100 μL de CMC por 1 h a 37°C, luego a 50 μL de la reacción se le adiciona la misma cantidad de DNS y se incuba a 100°C por 10 minutos. Una vez enfriadas 5 min en hielo, se traspasan 50 μL a microplacas desechables de 96 pocillos y se lee la D.O. a 550 nm en un lector de placas.

**Determinación de la concentración de proteína**

La concentración de proteína total para las diferentes muestras se determina usando el ensayo de Bradford modificado. Se mezclaron 1,2 mL de agua destilada, 500 μL de reactivo de Bradford (1 gr/L Coomasi preparado en HCl 2,2% v/v) y 50 μL de muestra.

Se realizó una curva de calibración con BSA (ver Anexo D), utilizando como blanco agua destilada. Se midió absorbancia a 465 nm y 595 nm, calculándose la razón entre ellas.

**Determinación de peso molecular por electroforesis en Gel de Acrilamida (SDS-)PAGE**

Para realizar las electroforesis se utiliza una cámara vertical MiniProtean II (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA) y el gel se prepara según la siguiente tabla:

Volúmenes de los reactivos para la preparación de gel separador.

|  |  |
| --- | --- |
| Reactivo | Volumen |
| Acrilamida Bisacrilamida 29:1 | 1,58 mL |
| Tampón Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4 % | 0,95 mL |
| Agua destilada | 1,27 mL |
| PSA 10% | 20 µL |
| TEMED | 2 µL |

Tabla # 1: Volúmenes de los reactivos para la preparación de gel concentrador.

|  |  |
| --- | --- |
| Reactivo | Volumen |
| Acrilamida Bisacrilamida 29:1 | 0,17 mL |
| Tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4 % | 0,25 mL |
| Agua destilada | 0,58 mL |
| PSA 10% | 7,5 µL |
| TEMED | 1,25 µL |

Las muestras se mezclan en proporción 4:1 con tampón de carga 5X (Tris-HCl 60 mM, glicerol 25 % v/v, SDS 2 % p/v, 2-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1 % p/v pH 6,8) y posteriormente se cargan en gel de acrilamida. Las electroforesis se realiza bajo voltaje constante de 200 V (fuentes de poder Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA). Se utiliza tampón de corrida Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, Glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v)

Se utiliza un marker de estándar de peso molecular (Fermentas, Cat. No. SM0441).

Una vez terminada la electroforesis, se tiñe el gel con una solución de azul de Coomasie durante 1 hora, se deja destiñendo en solución de distinción (metanol-ácido acético) toda la noche, se observa el gel sobre un transiluminador UV y se fotografía. Posteriormente se analiza la imagen para determinar concentración y peso molecular de cada banda con programas para analizar geles tales como Sigma gel.

\*\*

**Zimograma de celulasas**

Se prepara un gel de poliacrilamida y se una solución CMC al 0,2%. Se usa un buffer de carga 5X (Tris-HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, 2-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1% p/v pH 6,8), con lo cual se mezclaron 20 μL de muestra y 5 μL de buffer de carga, para luego cargar 20 μL en el pocillo. La corrida del gel se realizó de la misma forma que la electroforesis de proteínas, con la única diferencia que la cámara se introdujo en un recipiente con hielo para no denaturar las proteínas por el calor

Luego de finalizada la electroforesis, el gel se lava 1 h con Tritón X-100 al 2,5% v/v con agitación. Posteriormente se enjuaga con agua destilada por 5 min, para luego incubarlo por 1 h a 37°C con buffer HEPES 50 mM pH=7,5. Para finalizar y poder visualizar las bandas de actividad, el gel es teñido con Rojo Congo al 1% p/v por 20 minutos, y luego desteñido con NaCl 1 M por 5 min.