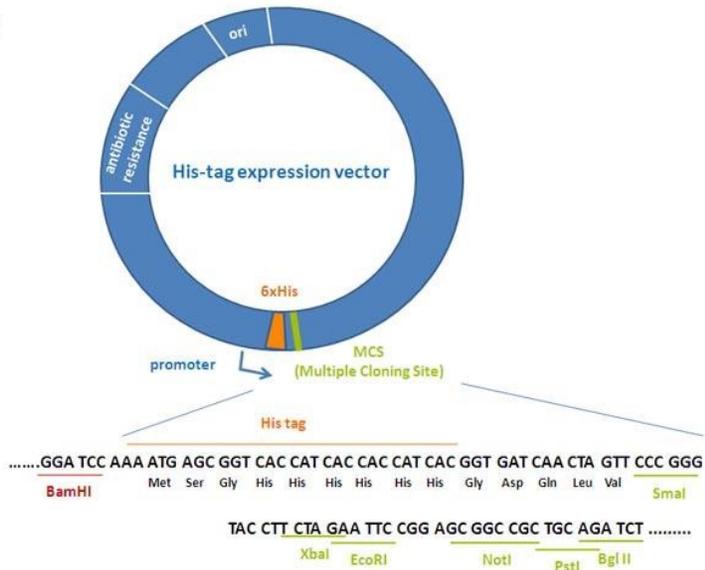


Purificación de proteínas recombinantes

A



La purificación por afinidad depende de la presencia de “etiquetas” sobre la proteína analizada. Una etiqueta de polihistidina típica consiste en 6 histidinas en el extremo N o C de una proteína. Por lo tanto, la proteína etiquetada con His puede ser purificado usando la afinidad de las histidinas a un metal como el níquel o el cobalto. Las histidinas presentes en la etiqueta mostrarán afinidad por el níquel en la resina inerte y, por lo tanto, se retendrán en la misma, mientras que todas las otras proteínas estarán en el sobrenadante y por lo tanto pueden ser descartadas.

B

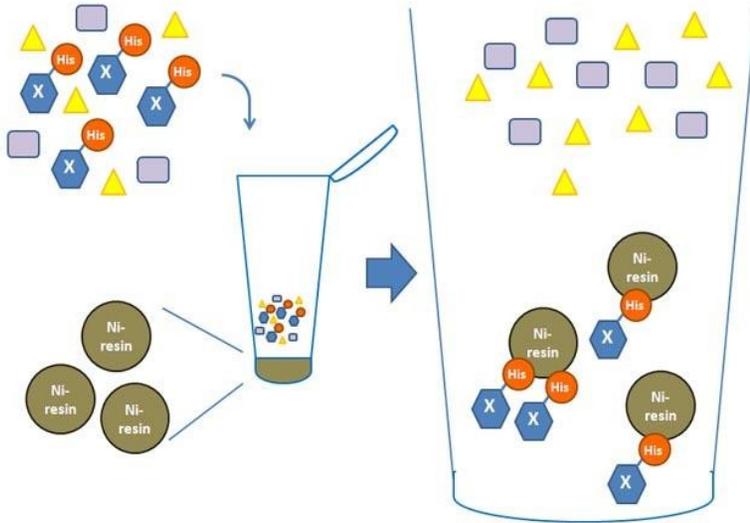
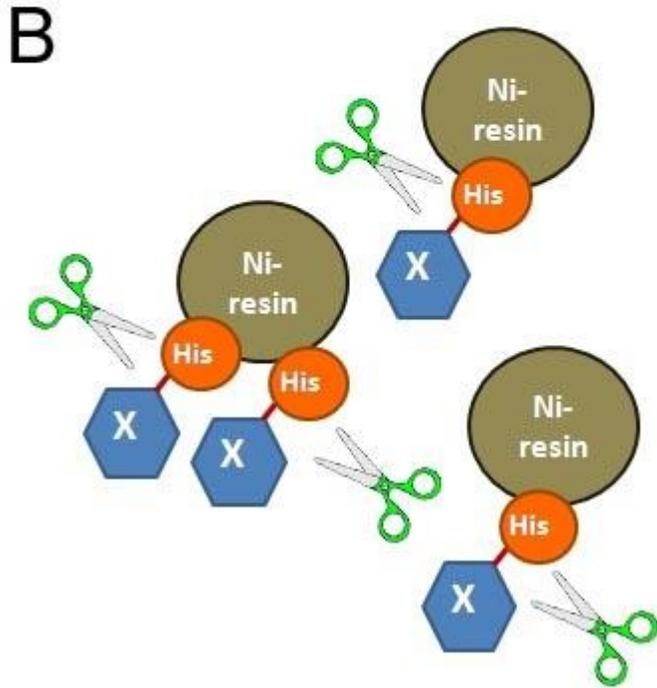
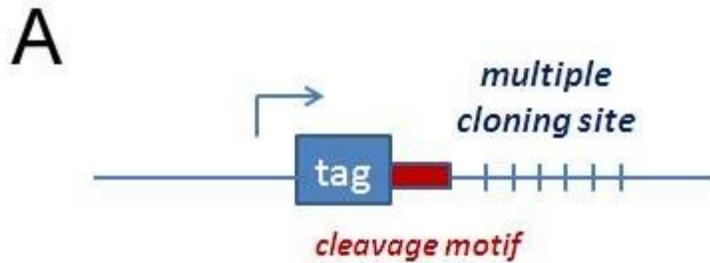


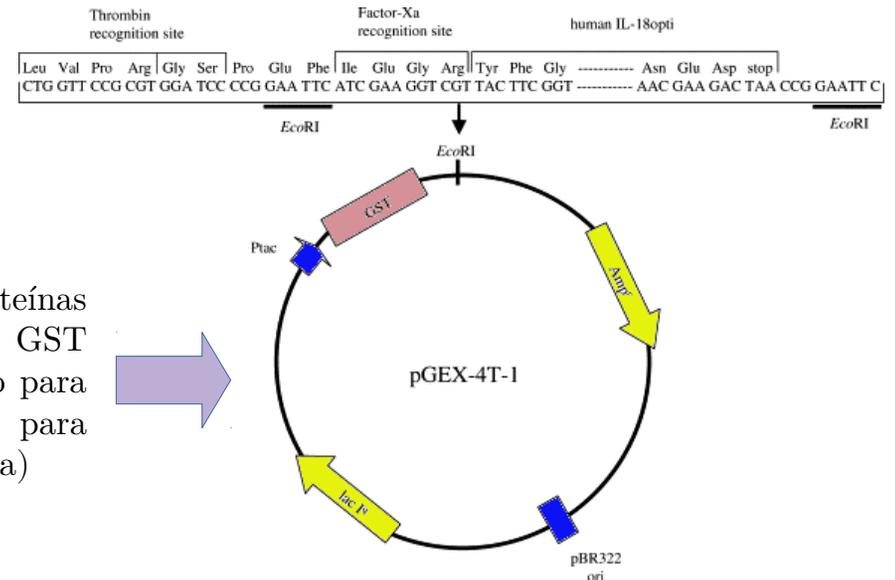
Figura 4.5. Un esquema de la estrategia de purificación de proteínas de fusión His-tag. (a) Un vector de expresión His-tag; (b) Purificación de proteínas marcadas con His usando afinidad de níquel.



Vector pGEX 4T1 para expresión de proteínas como fusión con GST en el N-terminal. GST es una proteína “grande” de 22kDa pero para la cual existe una columna específica para facilitar su purificación (glutation-sefarosa)

Después de la purificación, la columna puede usarse directamente para la identificación de proteínas que interaccionen con ella haciendo pasar un extracto proteico de células eucariotas, o la proteína de interés, se pueden eluir y separar (escindir) de su etiqueta para obtener la proteína pura. Si se desea esta última opción, es necesario la presencia de un sitio de corte para una enzima proteolítica como la trombina en el vector.

Figura 4.6. Es un esquema de la escisión enzimática de la proteína clonada después de purificación. (a) Un esquema general de la incorporación de un sitio de proteasas para la escisión entre una etiqueta y el sitio de clonado múltiple; (b) Remoción de la proteína X (proteína de interés) de su etiqueta de histidina que está unida por afinidad a una resina modificada funcionalmente con Ni⁺².

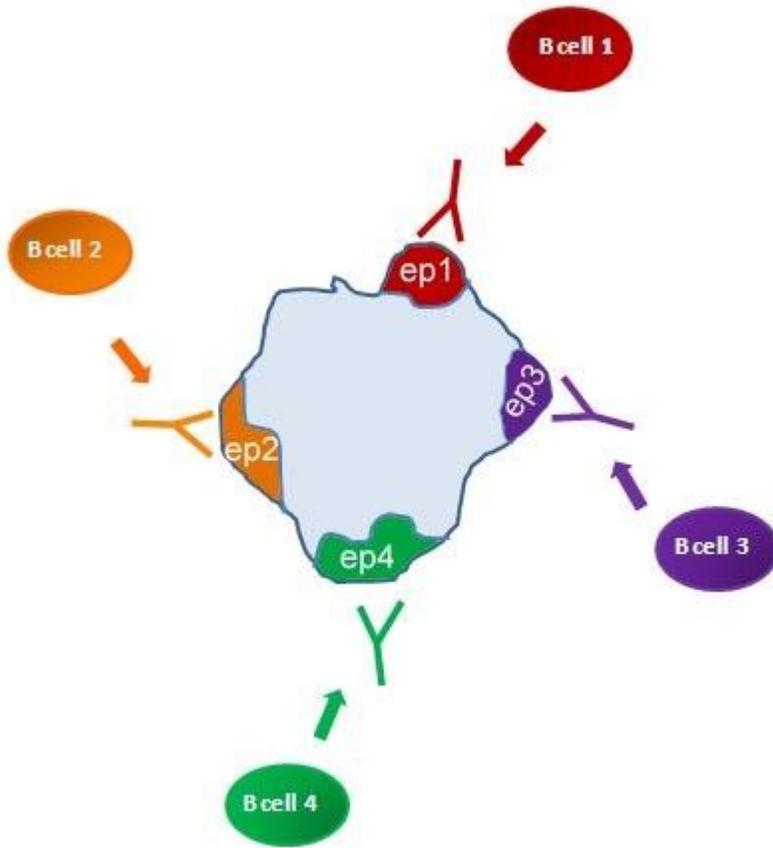


Purificación de afinidad utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales

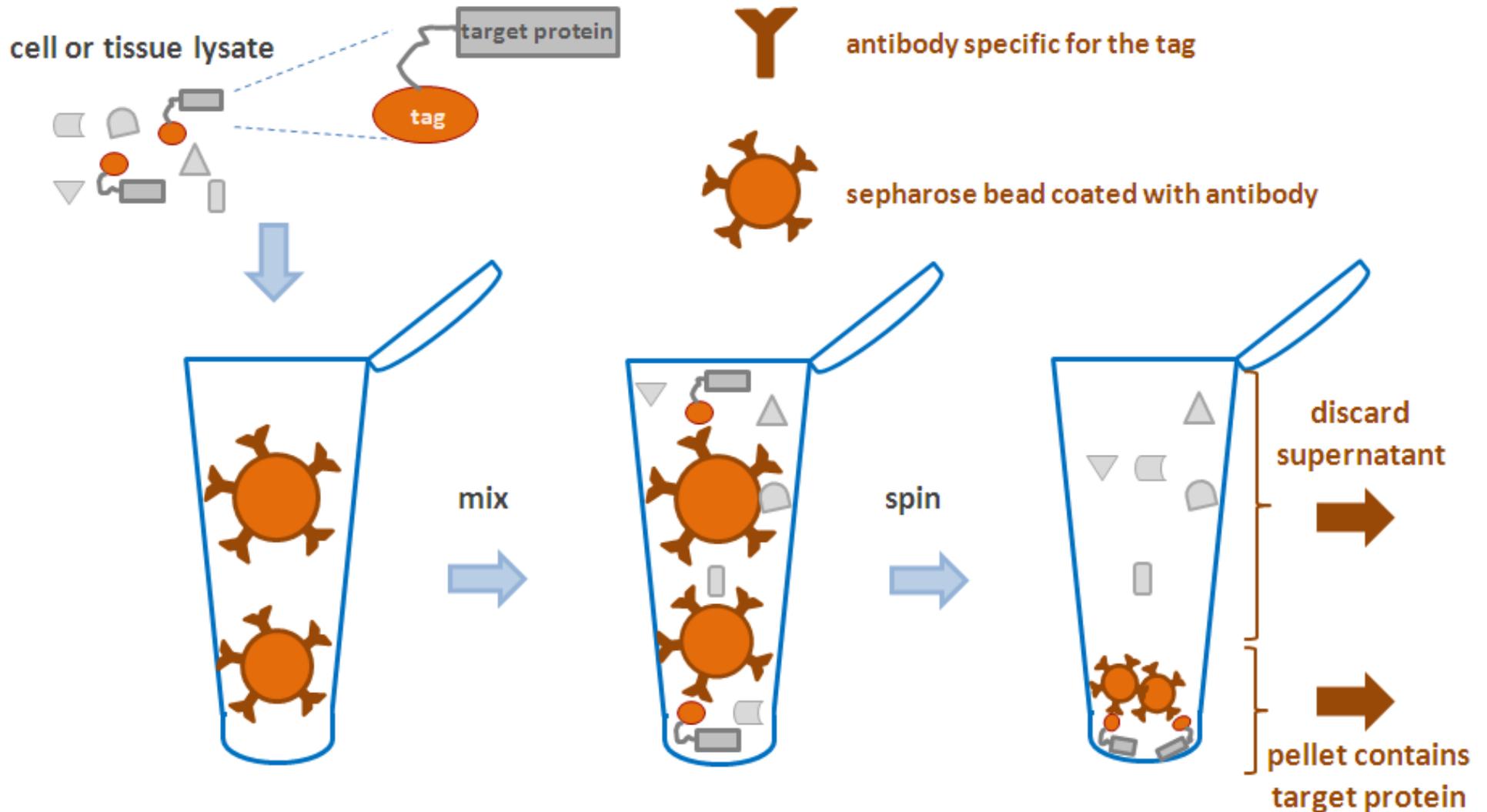
En muchos casos, utilizaremos métodos de detección indirecta para el análisis o la purificación de proteínas. Los anticuerpos son producidos por las células inmunes. En particular, los linfocitos B. La inmunidad adaptativa produce anticuerpos específicos para los antígenos. Anticuerpo policlonal se refiere a una mezcla de anticuerpos (más comúnmente, inmunoglobulina IgG) de diferentes células B que circulan en la sangre del animal inmunizado. Los anticuerpos son específicos para un epítipo diferente del antígeno, en nuestro caso este antígeno es principalmente la proteína que queremos estudiar.

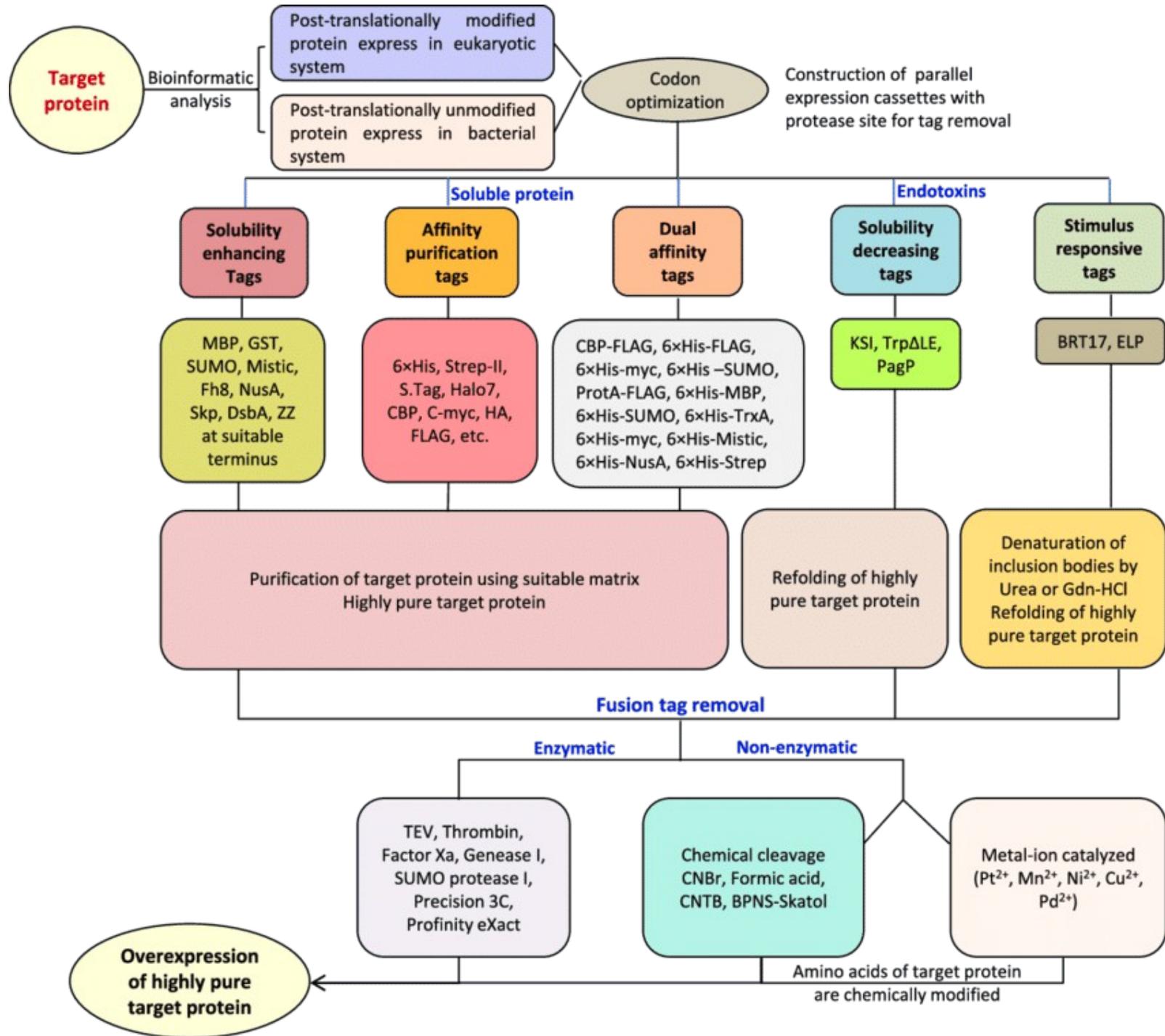
Los anticuerpos monoclonales se derivan de un solo clon de células B contra un solo epítipo.

En la figura se muestra un esquema de cuatro epítipos hipotéticos de una proteína antígeno y cuatro anticuerpos diferentes producidos por diferentes clones de células B contra cada epítipo.



Similar a las columnas de Ni^{2+} , la purificación por afinidad de anticuerpos depende de columnas de sefarosa o agarosa recubiertas anticuerpo específico para la etiqueta (como también las etiquetas Flag, HA o Myc), a la que se fusiona la proteína de interés. El lisado celular o tisular (de tejido) que contiene el producto de fusión proteína-etiqueta se mezcla con la columna, y después de una breve centrifugación, la proteína de interés se encuentra en el pellet, mientras que el resto de las proteínas se encuentran en el sobrenadante y puede descartarse.



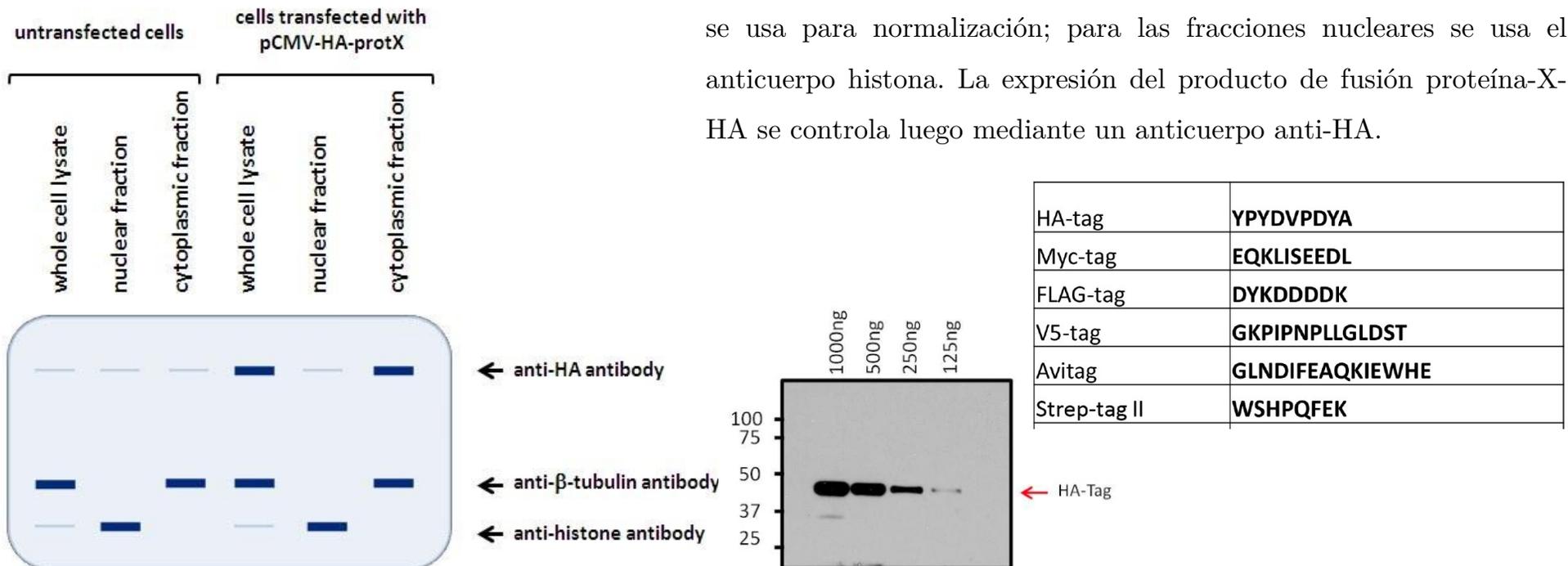


Monitoreando la expresión de proteínas recombinantes en células

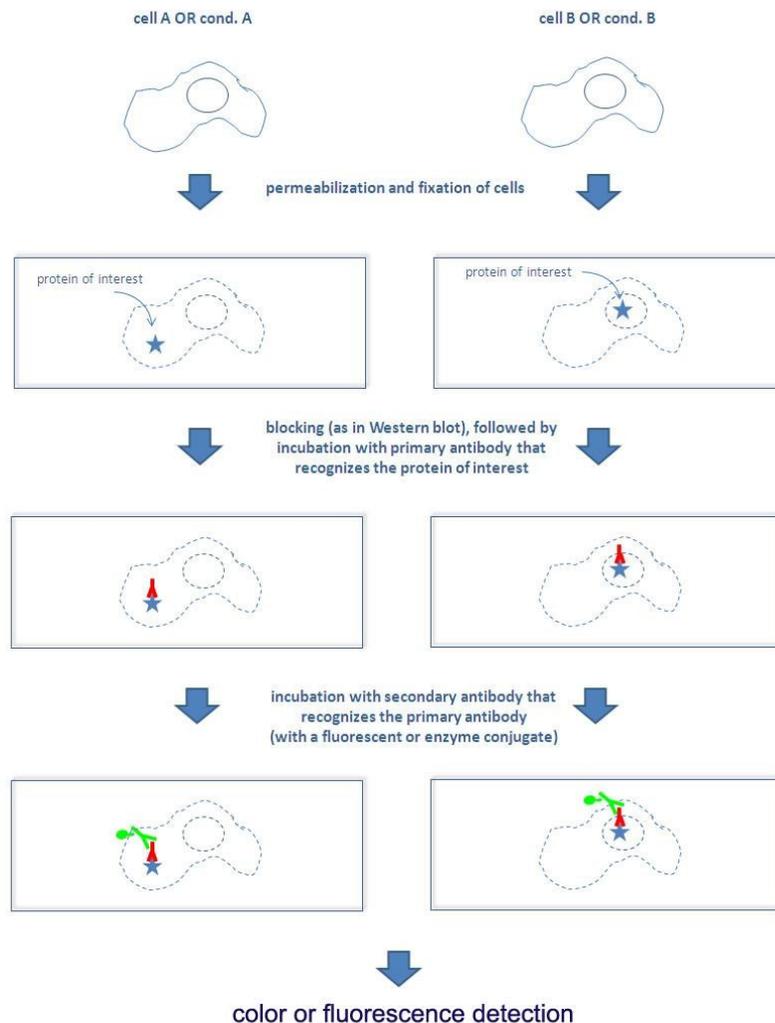
Para controlar la expresión de proteínas, una vez más se usa la especificidad de la interacción antígeno-anticuerpo. En los experimentos de *Western blots*, solo es posible una semicuantificación, por lo que se utiliza un gen de expresión constante para normalizar la expresión de mi proteína de estudio, como la actina o la b-tubulina.

Figura 4.7. Muestra una transferencia *Western blot* hipotética para controlar la expresión de proteína X fusionada a la etiqueta HA (epitope de la hemaglutina del virus de gripe). La expresión se estudia en lisados celulares totales, así como en fracciones nucleares y citoplasmáticas por separado.

Por célula entera y fracción citoplasmática, el anticuerpo b-tubulina se usa para normalización; para las fracciones nucleares se usa el anticuerpo histona. La expresión del producto de fusión proteína-X-HA se controla luego mediante un anticuerpo anti-HA.



Monitoreando la expresión de proteínas recombinantes en células II (Inmunofluorescencia)



En la figura se muestra una breve descripción de los pasos de la técnica de inmunofluorescencia. Por esta técnica se puede estudiar la cantidad y la localización en la célula de una proteína. En esencia, la lógica básica es la misma que en las transferencias de *Western blot*: estamos intentando detectar la expresión de una proteína. Sin embargo, como se usan células, la información sobre la localización subcelular de proteínas también puede ser obtenida además del nivel de expresión. La base de la inmunofluorescencia está en principio igual a *Western blot*, usando anticuerpos primarios como sondas para reconocer e identificar proteínas de interés y anticuerpos secundarios (en forma indirecta de fluorescencia) contra el anticuerpo primario para amplificar su señal.

Creación de proteínas de fusión: proteína verde fluorescente GFP

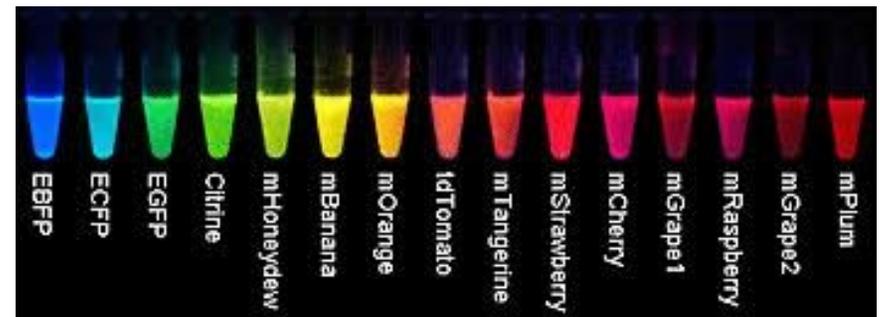
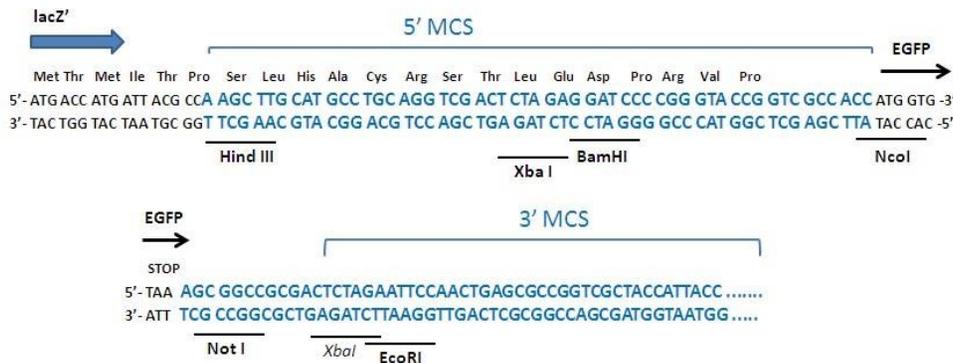
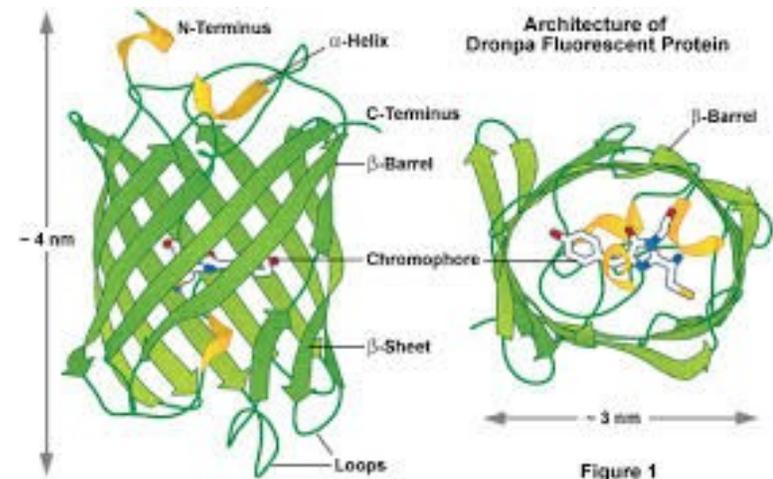
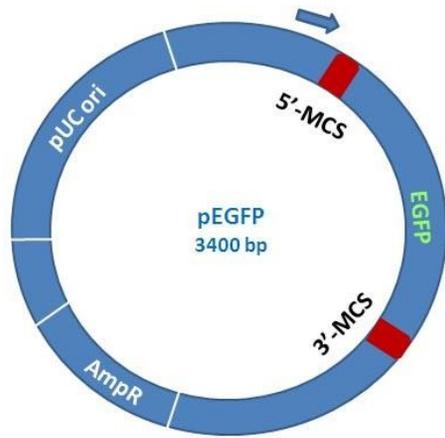
La inmunofluorescencia es un método útil para controlar la expresión de proteínas en las células, así como sus localizaciones subcelulares en organelas. Sin embargo, como con la inmunohistoquímica, la inmunofluorescencia también se basa en el uso de anticuerpos, pero para que éstos puedan penetrar a través de la bicapa lipídica es necesario la fijación con paraformaldehído y permeabilización con TritonX100 de las células.

El problema con estos tratamientos es que las células ya no están vivas después de este tratamiento y, por lo tanto, el ensayo solo puede mostrar la presencia y/o ubicación de la proteína en una foto instantánea en el tiempo. Dado que las proteínas exhiben dinamismo dentro de las células, esto no representaría el panorama general.

El descubrimiento de proteínas fluorescentes ha sido, por lo tanto, invaluable para el estudio de proteínas en células vivas y para por esa razón han sido galardonados con el Premio Nobel de Química en 2008 a sus descubridores, Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien, "por el descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente, GFP"

La GFP, aislada por primera vez de la medusa *Aequorea victoria*, se ha convertido en una herramienta popular en biología molecular. Más tarde, también se aislaron proteínas fluorescentes rojas de otras especies, así como nuevas proteínas mejoradas de GFP como eGFP, CFP (proteína fluorescente azul cian en realidad) y YFP (fluorescente amarilla). Dado que todas estas proteínas tienen un dominio fluoróforo que emite fluorescencia tras la excitación en una determinada longitud de onda, la fijación de las células no es necesaria y, por lo tanto, se pueden realizar ensayos en vivo.

Figura 4.8. Un mapa genérico del vector pEGFP, que incluye secuencias MCS los extremos 5' y 3'. Diferentes variantes de pEGFP, como pEGFP-N1 o pEGFP-C3, etc., existen que contienen en el MCS en 5' o 3' y en los tres marcos de lectura.



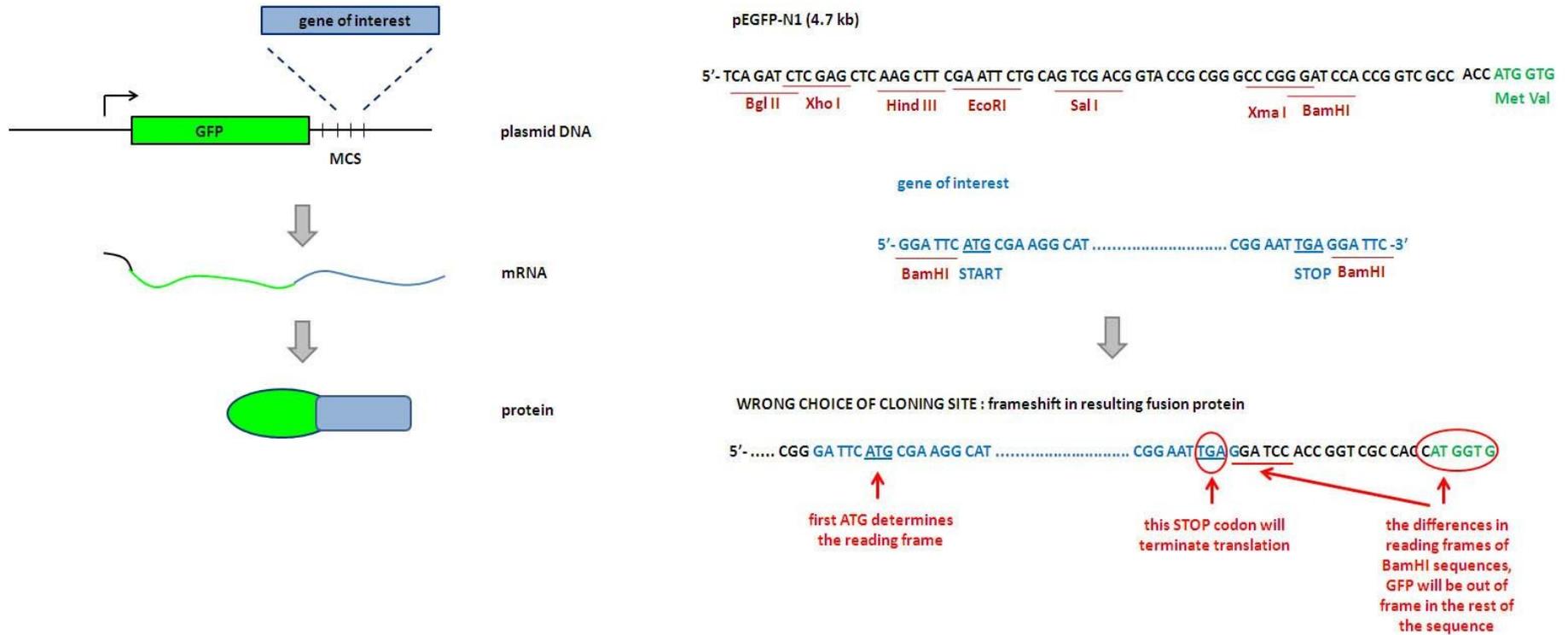


Figura 4.9. Un diagrama esquemático que muestra que se debe prestar atención a los codones START y STOP, así como a los marcos de lectura, mientras se clonan las proteínas de fusión. El panel izquierdo muestra un plásmido donde, tras la transcripción y traducción, GFP está en el extremo N y la proteína de interés está en el extremo C del producto final. El panel derecho muestra una sección del plásmido pEGFP-N1, que GFP en el extremo C, y un gen hipotético de interés (en azul). Una elección incorrecta del sitio de restricción para el clonado (*BamHI* en este caso) da como resultado un codón de STOP en el medio de la proteína de fusión y un desplazamiento de marco de lectura en la secuencia que codifica para GFP

Expresión bicistrónica en eucariotas

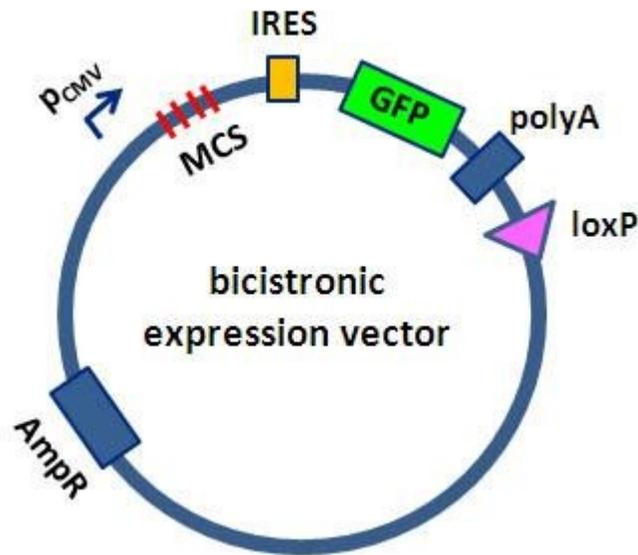


Figura 4.10. Un diagrama esquemático de una expresión bicistrónica genérica. El gen de interés es clonado en el sitio de clonado múltiple (MCS) y es transcrito en un solo ARNm junto con GFP bajo el promotor fuerte CMV (citomegalovirus). Esta transcripción se usará para traducir dos diferentes proteínas, la proteína de interés y GFP. El sitio IRES es un sitio de entrada al ribosoma independiente por lo que si bien se produce un solo ARNm se traducen dos proteínas independientes no fusionadas.

a) Cuales son las ventajas sobre los productos de fusión? Y las debentajas?

b) Ya estas en condiciones de describir para que sirven cada uno de los elementos de siguiente plásmido real de la compañía “Life-invitrogen”

