



INVESTIGACIÓN ORIGINAL

PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO HSC70 RECOMBINANTE EN *Escherichia Coli* BL21(DE3) PARA GENERAR ANTICUERPOS POLICLONALES

PRODUCTION OF RECOMBINANT HEAT SHOCK PROTEIN HSC70 IN *Escherichia coli* BL21 (DE3) TO OBTAIN POLYCLONAL ANTIBODIES

Rocio Cely Castro¹, Julia Díaz Gómez², Diana Pulido³,
Orlando Acosta L.⁴, Carlos A. Guerrero F.⁵

1. Estudiante de Microbiología Industrial Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia.
2. Estudiante de Microbiología Industrial Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia.
3. Estudiante de Maestría Biología Molecular, Facultad Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá
4. MSc, PhD. Químico, Biólogo. Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
5. MSc, PhD. Profesor Asociado, Laboratorio de Biología Molecular y Celular de virus, Unidad de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Correspondencia: guerra039@yahoo.com

Resumen

Antecedentes. Los organismos vivos responden al estrés aumentando la síntesis de proteínas. El estrés por choque térmico ha sido el más estudiado y las proteínas que se inducen, se han denominado genéricamente como proteínas de choque térmico.

Objetivo. En este trabajo se establecieron las condiciones óptimas de producción de la proteína HSC70, expresada en *E.coli* BL21 (DE3) y de los anticuerpos policlonaes que permitan identificarla.

Material y métodos. Mediante varios ensayos se establecieron las concentraciones óptimas del agente inductor isopropil-b-D-thiogalactopiranosido

(PTG), del inóculo bacteriano, de empleo de los plásmidos de expresión pET-3a y pET-28a (+); y el método más eficiente para la recuperación de las formas soluble o insoluble de la proteína y de anticuerpos policlonaes que la identifiquen.

Resultados. Encontramos que el inóculo de cinco colonias con IPTG (2mM) en tubos con cinco mililitros de medio modificado e incubadas por 24 horas a 37°C con agitación constante (200 r.p.m) y tratamiento de sonicación, produce el mejor rendimiento de HSC70. La calidad de la proteína inducida se estableció mediante “Western blotting”.

Conclusión. La proteína recombinante así obtenida permitió, generar anticuerpos policlonaes que a su vez permiten detectar la proteína

HSC70 natural en la membrana citoplasmática de diferentes células por inmunofluorescencia, en ELISA, en Western Blot y en pruebas de bloqueo de infección de rotavirus.

Palabras clave: formación de anticuerpos, proteínas de choque térmico HSC70, *Escherichia coli*.

Summary

Background. Live organisms respond against stressing conditions raising the production of stress proteins. The heat shock stress is a very well known condition that produces heat shock proteins.

Objective. In this work we determined the optimum conditions to produce HSC70 protein in *E. coli* BL12 (DE3) under stress conditions, and the best way to obtain its polyclonal antibodies.

Materials and methods. The best concentrations for isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), bacterial inoculum, type of vector plasmid used pET-3a and pET28a (+) and recovery method of soluble and insoluble forms of HSC70 protein and its polyclonal antibodies were established.

Results. Five-colony bacteria inoculum, 2 mM IPTG and sonication treatment were found as best conditions with either expression plasmid. We also produced polyclonal antibodies against the HSC70 protein by inoculating rabbits with this purified protein.

Conclusions. Specificity and titer of antiserum was determined by ELISA, Western blotting and immunofluorescence assays. Antiserum was also tested by its

inhibition ability of rotavirus infection.

Key words: antibody formation, HSC70 heat-shock proteins, *Escherichia coli*.

Introducción

Los organismos vivos responden a estímulos de estrés aumentando la síntesis de un grupo de proteínas llamadas proteínas de estrés. El estrés por choque térmico es el más estudiado y en este caso, las proteínas que se inducen, se han denominado genéricamente como proteínas de choque térmico o HSPs por sus siglas en inglés (“heat shock protein”) (1-5). También se inducen en otras condiciones de estrés como concentración reducida de oxígeno, cambios en el potencial osmótico, radiación ionizante y presencia de toxinas (3,6,7). Estas proteínas son ubicuas, están muy conservadas en la naturaleza y tienen funciones esenciales en la célula como ayudar al correcto plegamiento de péptidos, transporte y ensamble de otras proteínas y translocación de polipéptidos en diferentes compartimientos celulares por lo que se les conoce como chaperonas moleculares (5,8). La familia de HSPs de 70 kDa incluye las proteínas HSC70 y HSC73 que son de expresión constitutiva en la célula y las proteínas HSP70 y HSP72 que son inducibles por incremento de temperatura. La proteína HSC70, se caracteriza por tener un dominio N terminal-ATPasa que tiene una estructura terciaria similar a la de la actina y un dominio C-terminal con una estructura secundaria similar al dominio de unión de péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I (7, 9). El dominio N terminal-ATPasa es el más conservado (alrededor de 64% con respecto a las demás proteínas HSP) mientras que el dominio C-terminal es el más variable y es la zona de unión con el péptido (10). Ambos dominios están unidos por una región sensible a proteasas.

Es necesario conocer cuáles son las condiciones



óptimas de producción para obtener buenas cantidades de proteína recombinante y así poder hacer ensayos de unión a ligandos específicos o producción de anticuerpos contra dicha proteína. En este artículo describimos las condiciones óptimas para obtener la proteína recombinante HSC70.

Material y métodos

Cepas bacterianas: se utilizó la cepa bacteriana de *E. coli* BL21(DE3), cedida por el Dr. Ernesto Méndez del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México. Unas bacterias utilizan el plásmido de 6440 pb, el pET-3a, que posee un gen que codifica para la resistencia a ampicilina. Este vector posee un sistema de expresión basado en el promotor de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (pret, pCR T7 y pET) (11,12) Otras bacterias están transformadas con el plásmido pET-28a, que tiene 5369 pb y codifica para la resistencia al antibiótico kanamicina, además posee una secuencia amino-terminal que contiene His-Tag/trombina/T73Tag más una configuración adicional en el C-terminal el cual lleva una cola de histidinas para su purificación.

Los genes clonados en el plásmido pET se transcriben bajo el control del promotor del bacteriófago T7, cuando se activa la T7 RNA polimerasa en la célula huésped. La expresión se induce con IPTG, el cual remueve al represor del operador para que se lleve a cabo la transcripción y se promueva la expresión de la proteína de interés. Adicionalmente el sistema posee un segundo plásmido, el pLysS, el cual produce bajas cantidades de lisozima T7 que se une a la T7 ARN polimerasa inhibiendo la transcripción de la proteína, en este caso HSC70.

Cultivo de *E. coli* recombinante BL21 (DE3): la bacteria liofilizada se reconstituyó

transfiriéndola a dos tubos con 5ml de medio modificado lauril sulfato triptosa con MUG 4-metil umberifenil glucónico (LST)(Oxoid) y se agitaron durante toda la noche a 37°C. A partir de cada tubo se sembraron en cajas con agar modificado LST con MUG, con los respectivos antibióticos y se incubaron por 24 horas a 37°C. Posteriormente se evaluaron macroscópicamente bajo la lámpara de luz ultravioleta el color, el tamaño y la forma de las colonias (13).

Curvas de crecimiento bacteriano: se sembraron dos, cinco, 10 y 20 colonias bacterianas en tubos con 5ml de medio modificado LST con MUG, kanamicina y ampicilina y se incubaron por 24 horas a 37°C con agitación constante (200r.p.m). Se hicieron mediciones de la densidad óptica cada hora hasta cuando ésta disminuyó. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Hewlett Packard a una longitud de 600nm (13).

Monitoreo de la presencia de los plásmidos pET 3a y pET 28a(+): la presencia de los plásmidos dentro de *E. coli* se determinó sembrando cuatro colonias de cada cepa, tomadas del cultivo anterior, en cuatro cajas de Petri con medio de agar modificado LST, el cual contiene MUG, los respectivos antibióticos y el agente inductor IPTG (0.4mM). El crecimiento bacteriano en presencia del antibiótico indica que las bacterias poseen el respectivo plásmido.

Ensayo de las concentraciones de inóculo: como inóculo se utilizaron dos, cinco, 10 y 20 colonias que fueron inoculadas en 15ml de medio líquido modificado LST con antibióticos. Las colonias crecieron con agitación durante la noche a 37°C y el crecimiento se detuvo cuando la densidad óptica del medio fue de 0,5 a 0,6, utilizando como blanco medio de cultivo no inoculado. De estos cultivos se tomaron 7,5ml y se adicionaron a 150ml de medio modificado LST

con MUG y antibiótico y se incubó por dos horas a 37°C con agitación y luego se hizo inducción de la proteína.

Inducción de la producción de la proteína: la producción de la proteína se indujo adicionando IPTG al cultivo en concentraciones finales de 0.5mM, 1.0mM, 2.0mM y 3.0mM. Se constituyó un control negativo al cual no se le adicionó IPTG. Los cultivos se incubaron a 37°C por cuatro horas con agitación y cada hora se tomó 1ml de medio con el fin de realizar la cinética de inducción. Cada alícuota se centrifugó a 13800g por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en 5ml de buffer de lisis PBS/EDTA, preparado mediante la adición de 0.4ml de 2mM de EDTA a 100ml de PBS.

Tratamientos de lisis celular: se utilizaron los tratamientos de lisis celular por sonicación y choque térmico para determinar su eficiencia. Sonicación: se llevó a cabo en un equipo Ultrasonic Homogenizer (Cole Parmer), en ciclos de dos minutos con pulsos de 9.9 segundos y cinco segundos de descanso a temperatura de 4°C, con una amplitud de 35 por ciento; cada ciclo se repitió tres veces. Luego se tomó una muestra de cada replica de sonificado con un asa y se transfirió a una caja de Petri con medio modificado LST con MUG, para determinar el crecimiento de colonias.

Choque térmico-lisis enzimática: un precipitado celular de 600ml de cultivo se colocó en buffer de lisis más lisozima (1mg/ml), se agitó con vortex y se dejó en hielo durante 10 minutos. Luego en agitación durante una hora a 37°C para que la enzima alcanzará su máximo de actividad. Las células se recuperaron por centrifugación a 12000g por un minuto a 4°C, el sobrenadante que corresponde a la fracción periplásmica se retiró y se guardó a 4°C hasta

que las muestras fueron analizadas por electroforesis. El pellet se resuspendió en Tris-HCl 0.1M (pH 8.0) con vortex y las muestras se sometieron a choque térmico colocándolas en hielo por 10 minutos y a 37°C por 15 minutos. Este procedimiento se realizó tres veces y las muestras se centrifugaron a 12000g por cinco minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante que corresponde a la fracción citoplasmática, el cual se almacenó a 4°C hasta que la muestra se analizó por electroforesis. El precipitado que contiene la fracción membranal y los cuerpos de inclusión se resuspendió en Triton X-100 al uno por ciento, se incubó a 4°C por 10 minutos y se analizó por electroforesis SDS-PAGE.

Electroforesis SDS-PAGE: se tomaron 100 μ l de muestra de proteína obtenida de células por los dos métodos de lisis y se centrifugaron a 8000g durante 12 minutos. La muestra fue sometida a proceso de alquilación para estabilizar grupos sulfhidrilo (14). La muestra fue analizada en electroforesis SDS-PAGE y se condujo a 20 mA por lámina de gel (8x7 cm y 0.75 de grosor) y se detuvo cuando el marcador azul de bromofenol alcanzó el extremo del gel. Los geles se tiñeron con nitrato de plata o azul de Coomassie al 0.15 por ciento.

Western blotting: la transferencia se hizo en condiciones semisecas siguiendo el protocolo del fabricante (Sigma-Aldrich). El gel que se transfirió se coloreó con nitrato de plata y la membrana se reveló. La membrana se incubó con el anticuerpo comercial contra HSC70 (SC1059 Santa Cruz) en PBS con azida de sodio al 0.02 por ciento durante toda la noche a 4°C con una dilución 1:1000. El anticuerpo secundario conjugado con proteína peroxidasa (1:2000) se incubó durante hora y media a temperatura ambiente en PBS. La solución reveladora contenía 6mg de 3,3-diaminobenzidina por cada 10 ml del buffer de revelado, junto con 3mg de cloruro de



cobalto y 100 ì l de H₂O₂ al 3 por ciento; la reacción se detuvo cuando se visualizó la banda correspondiente.

Medición semicuantitativa de la proteína HSC70: la cantidad de proteína HSC70 presente en las bandas en el gel de electroforesis se midió empleando un digitalizador de imágenes (Bio-Rad modelo Gel-Doc).

Electroforesis preparativa: se utilizó la misma metodología que en el ensayo de las concentraciones de inóculo, pero en este caso se partió de cinco colonias de *E.coli* pET28 HSC70/BL21(DE3) inducidas con 0.5mM de IPTG. El volumen total de cultivo fue de 1200 ml manejado en alícuotas de 150ml. El lisado se centrifugó a 13800g por 15 minutos para separar la fracción soluble de la insoluble. La fracción soluble se precipitó con tres volúmenes de etanol a menos 20°C toda la noche y se centrifugó a 10000g por 20 minutos. Ambas fracciones se mezclaron con buffer de carga reductor desnaturante (Tris-HCl 0.065M, pH 6.8, SDS 2% p/v, 2-â- mercaptoetanol 5% v/v, EDTA 2 mM, Glicerol 10% v/v y azul de bromofenol 0.025%), la muestra no se hirvió y se corrieron 5ml en un gel preparativo SDS-PAGE al 10 por ciento de 16cm de largo, 3mm de espesor y de un bolsillo. Los 5ml del lisado corresponden al precipitado de 170 ml de medio de cultivo. Una vez concluida la electroforesis los extremos derechos de cada gel se cortaron (1cm de ancho) para análisis por “Western blotting”. La porción restante del gel se tiñó con Blue Stain (Beckman Coulter) en ácido acético al 5 por ciento en agua. La porción de un cm fue transferida a papel PVDF del mismo tamaño como ya se describió. La membrana se reveló con un anticuerpo primario específico contra HSC70 (SC1059 Santa Cruz) en dilución 1:750 y como anticuerpo secundario se usó uno conjugado con proteína peroxidasa en dilución 1:2000. La porción del gel transferida se tiñó con azul

Coomasie para comparar con la membrana e identificar la proteína HSC70 en la porción transferida y en el resto del gel. Una vez identificadas las bandas, estas se cortaron y se destiñeron parcialmente con ácido acético al 5 por ciento a 37 °C y se guardaron a menos 20 °C.

Producción de anticuerpos policlonales contra HSC70: las fracciones del gel que contenían las proteínas HSC70, procedentes del gel donde se corrió el precipitado y el sobrenadante, fueron maceradas con buffer PBS pH 7,2 en un mortero y luego se pasaron varias veces a través de agujas de diferentes calibres (No.15,19 y 21). La fracción se mantuvo refrigerada a 2°C hasta la inmunización y las dosis que se emplearon en cada inoculación fueron de aproximadamente de 1mg. Se inocularon conejos blancos hembras, raza Nueva Zelandia de 3kg. Ocho días antes de la inoculación se les extrajo 10 ml de sangre total para obtener suero pre-inmune. Se aplicaron subcutáneamente tres dosis del antígeno distribuidas paralelamente a la columna vertebral. Las dosis fueron administradas con intervalos de dos semanas en la misma concentración. Después de la segunda inoculación se evaluó la producción de anticuerpos, mediante la técnica de Inmunodot, utilizando como antígeno proteína comercial. Los conejos fueron sangrados a blanco ocho días después de la tercera inmunización.

La sangre de las dos fracciones (pellet y sobrenadante) fue incubada a 37°C por media hora, luego fueron mantenidas a 4°C por dos horas. Después se centrifugó por separado cada fracción a 4°C a 5000g por 20 minutos para separar el coagulo y recuperar el suero hiperinmune, que fue alícuotado en tubos Eppendorf con glicerol estéril (1:1) y almacenado a menos 20°C.

ELISA: siete millones de células MA104 cre-

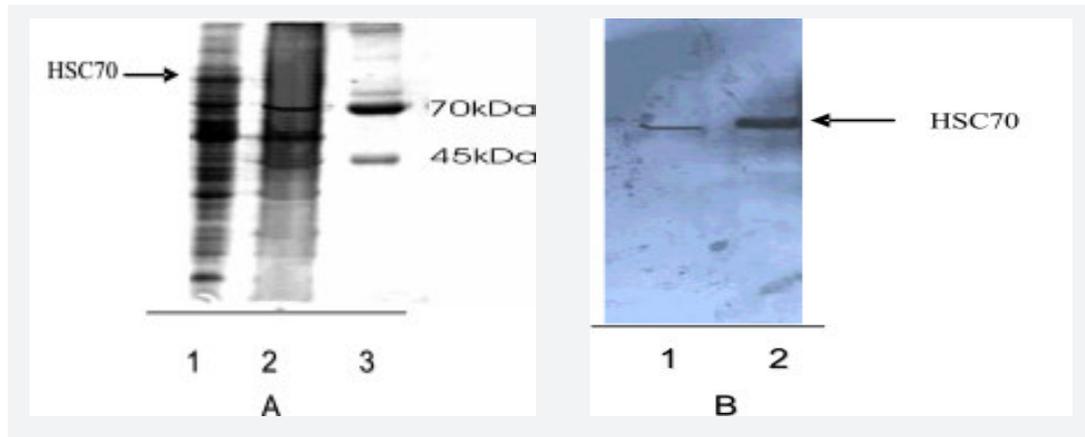


Figura 1. Expresión de la proteína HSC70 en *E.coli* pET 28a, HSC70/BL21(DE3) y *E.coli* pET-3a, HSC70/BL21(DE3)pLysS. A) Lisado bacteriano analizado por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie. 1, Fracción insoluble; 2, fracción soluble; 3, marcadores de peso molecular (Albumina-ovoalbumina 0.625i g). B) Western blot de la electroforesis mostrada en A, utilizando un anticuerpo policlonal en dilución 1:1000 (SC1059 Santa Cruz). (Ver anexo).

cidas en cultivo, se lavaron con PBS-EDTA (0,539 mM de EDTA), se desprendieron en el mismo buffer, se centrifugaron y el concentrado se lisó en 0,5 ml del detergente β -octil glucósido al 0,8 por ciento. El lisado se diluyó hasta un volumen de 3.5 ml de PBS y se incubó toda la noche a 4°C en la placa de ELISA en un volumen final de 50 μ l por pozo. Posteriormente se realizaron tres lavados con 200 μ l de PBS, se bloqueó la placa con 200 μ l de BSA (albúmina sérica bovina) al 2 por ciento, se incubó una hora a 37°C, se lavó con PBS y se adicionó el suero hiperinmune en diluciones 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000, y 1:8000 en PBS con un volumen final de 50 μ l. Se lavó cuatro veces con PBS, se adicionó el conjugado anti-IgG de conejo peroxidasa en un volumen de 50ml, dilución 1:5000, se incubó por 1h a 37°C, se lavó cuatro veces con PBS, se adicionó el sustrato para peroxidasa TMB (Laboratorio KPL), la reacción se paró con ácido sulfúrico (2.5 M) y se leyó a 490 nm.

Inmunofluorescencia indirecta: se fijaron células MA104 crecidas en cubre objetos con paraformaldehído al 4 por ciento durante 20 minutos a temperatura ambiente o 30 minutos con

acetona fría, se lavaron tres veces con PBS y se adicionó 20 μ l de suero hiperinmune en diluciones 1:1000, 1:1500, y 1:2000. El suero se incubó una hora a 37°C, se lavó cinco veces con PBS y se adicionó 20ml de anti-IgG de conejo con isotiocianato de fluoresceína en dilución 1:250, se incubó 30 minutos a 4°C, se lavó cinco veces con PBS y se analizó en un microscopio de fluorescencia (Vanguard).

Resultados

Expresión en las bacterias. Al analizar el lisado bacteriano por electroforesis se observó una banda conspicua a la altura de 70 kDa que corresponde a la proteína HSC70 tanto para *E. coli* pET HSC70/BL21(DE3)pLysS como para *E. coli* pET28 HSC70/BL21(DE3). Esta banda fue detectada en un ensayo de “Western blotting” por el anticuerpo comercial específico contra la proteína HSC70. El resultado fue similar para las dos cepas (Figura 1).

Concentración del inóculo y cantidad de proteína obtenida. Para determinar qué concentración del agente inductor era la más adecuada para

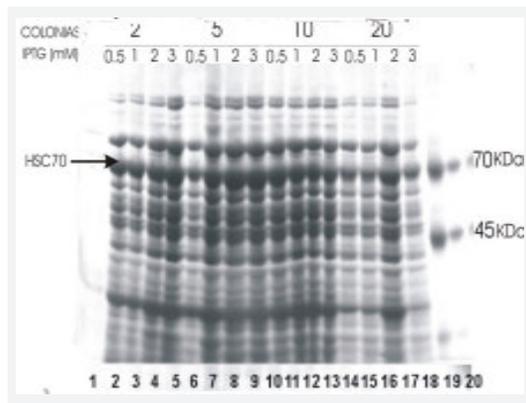


Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE al 12% del lisado bacteriano. El cultivo bacteriano de *E. coli* pET-3a HSC70/BL21(DE3)pLysS se centrifugó, el precipitado se lisó por sonicación y una porción de la muestra fue alquilada con iodo acetamida. 1, control negativo de la expresión de HSC70. Carriles 1-17: lisados de cultivos bacterianos que se iniciaron con 2, 5, 10 y 20 colonias y con la expresión de la proteína inducida con 0.5 mM, 1 mM, 2 mM y 3 mM de IPTG. Carriles 2-5: dos colonias. Carriles 6-9: cinco colonias. Carriles 10-13: 10 colonias. Carriles 14-17: 20 colonias. Carriles 18-19: marcadores de peso molecular Albúmina-Ovoalbúmina, 0.625 g, 0.3125 g y 0.15625 g respectivamente.

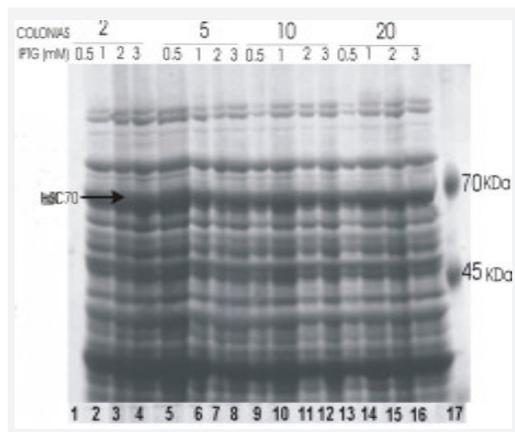


Figura 3. Electroforesis SDS-PAGE 12% del lisado bacteriano. El cultivo bacteriano de *E. coli* pET28a, HSC70/BL21(DE3) se centrifugó, el precipitado se lisó por sonicación y una porción de la muestra fué alquilada con Iodoacetamida. 1-16 lisados de cultivos bacterianos que se inició con dos, cinco, 10 y 20 colonias y se indujo la expresión de la proteína con 0.5 mM, 1 mM, 2 mM y 3 mM de IPTG. 1-4: dos colonias. 5-8: cinco colonias. 9-12: 10 colonias. 13-16: 20 colonias. 17: marcadores de peso molecular, Albúmina-Ovoalbúmina.

permitir la expresión de la proteína HSC70, se realizaron cinco réplicas por cada concentración de agente inductor (0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mM) y por cada número de colonias (2,5,10 y 20). Cuando se partió de dos y cinco colonias de *E. coli* pET-3a, HSC70/BL21(DE3)pLysS y *E. coli* pET28a, HSC70/BL21(DE3), se produjo en promedio igual cantidad de proteína HSC70, para los dos plásmidos (4,33 mg/600 ml) independientemente de la concentración del agente inductor. Cuando se partió de 10 y 20 colonias de *E. coli* pET-3a HSC70/BL21(DE3)pLysS y *E. coli* pET28a, HSC70/BL21(DE3), se produjo en promedio menor cantidad de proteína (2.43 mg/600 ml) que con dos y cinco colonias, produciéndose la menor cantidad con 20 colonias de *E. coli* pET28HSC70/BL21(DE3) (1.26 mg/600ml). La cantidad de proteína HSC70 que se produjo fue independiente de la concentración del agente inductor.

La *E. coli* pET28a, HSC70/BL21(DE3) produjo la mayor concentración de HSC70 (4.44mg/600mL) cuando se utilizó una concentración de inóculo de cinco colonias, 0.5mM de IPTG y con el tratamiento de sonicación. Concentraciones mayores de 0.5mM de IPTG no presentaron un aumento en la expresión de la proteína HSC70 (Figuras 2 y 3).

Cuando no se adicionó el inductor de la expresión, IPTG al cultivo bacteriano no se detectó expresión de la proteína recombinante HSC70 (Figura 4).

Bacterias sometidas a estrés. Con esta técnica se obtuvo una concentración de 1.07 mg/600 ml de HSC70 utilizando un inóculo de 20 colonias y 3.0 mM de IPTG. Las fracciones bacterianas (membranal, citoplasmática y periplásmica) obtenidas se analizaron por electroforesis SDS-PAGE y se encontró que las bandas de la fracción membranal procedente de 10 y 20 colonias

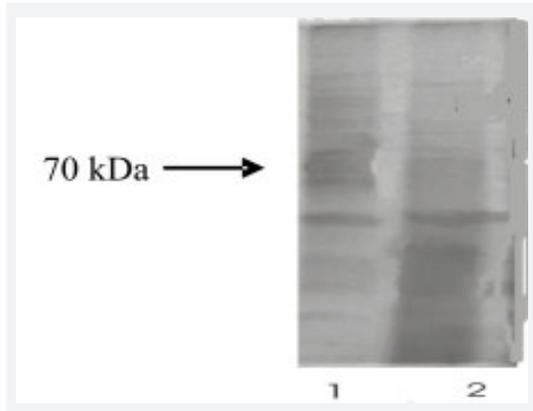


Figura 4. Electroforesis SDS-PAGE al 12%. Controles negativos sin adición de IPTG. Carril 1: lisado proveniente de dos colonias de *E.coli* pET-3a, HSC70/BL21(DE3)pLysS; carril 2: lisado proveniente de dos colonias de pET28a HSC70/BL21(DE3). Empleando cinco, 10 y 20 colonias no se obtuvo expresión de la proteína HSC70.

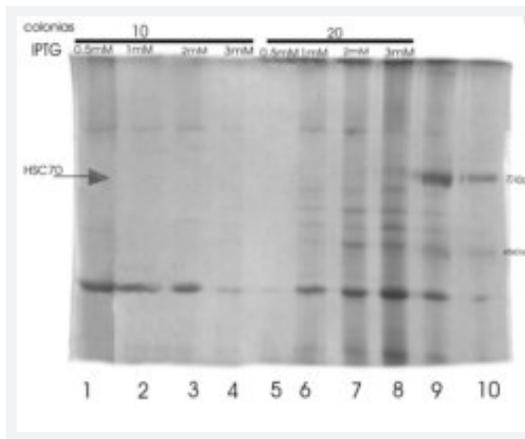


Figura 5. Electroforesis SDS-PAGE al 12% del lisado bacteriano obtenido por choque térmico-lisis enzimática de *E.coli* pET-3a, HSC70/BL21(DE3)pLysS. Las muestras fueron sometidas a condiciones denaturantes, alquiladas y hervidas a 100°C por 5 minutos. En cada carril se adicionó igual cantidad de la muestra. Carriles 1-8: muestras del lisado membranal incubado con diferente número de colonias inducidas con diferentes concentraciones de IPTG. Carriles 9 y 10: marcadores de peso molecular (Albúmina-Ovoalbúmina, 0.625mg y 0.3125mg respectivamente).

de ambos vectores eran las mejor definidas. Debido a esto se repitió la electroforesis solo con las muestras de la fracción membranal de 10 y

20 colonias utilizando todas las concentraciones del agente inductor (Figuras 5 y 6).

Los dos métodos empleados para lisar las células fueron igual de eficientes en producir muerte bacteriana, ya que al sembrar los lisados en placas de petri, creció una sola colonia. La D.O_{600nm} antes de lisar las bacterias fue de 3 -6.

Recuperación de la proteína HSC70. La HSC70 detectada por “Western blotting” utilizando un anticuerpo comercial (SC1059 Santa Cruz) y un segmento del gel de la electroforesis preparativa (Figura 7), permitió identificar las bandas correspondientes en el gel restante teñido con Blue Stain (Beckman Coulter). Al cortar estas bandas se obtuvo de cada gel aproximadamente 1,38 mg de proteína.

Obtención de anticuerpos policlonales. Terminado el periodo de inmunización, los conejos fueron sangrados obteniéndose aproximadamente 35 ml de suero de cada conejo. El anticuerpo generado identificó en “Western blotting” la proteína HSC70 recombinante y la proteína endógena procedente de líneas celulares en diluciones de 1:2000 hasta 1:6000 (figura 8). El anticuerpo también reconoció la proteína recombinante en la fracción soluble e insoluble del lisado bacteriano que expresa la HSC70 recombinante.

Caracterización parcial del suero hiperinmune. Para determinar la dilución a la cual se puede utilizar el anticuerpo en la técnica de “Western blotting”, se corrió en una electroforesis aproximadamente 9mg de proteína total, la dilución óptima del anticuerpo fue de 1:4000, aunque la banda es visible hasta dilución 1:10000. En la concentración máxima 1:1000, el anticuerpo reconoció otras bandas aunque con una intensidad muy tenue (Figura 9).

Para la técnica de ELISA se emplearon las dilu-

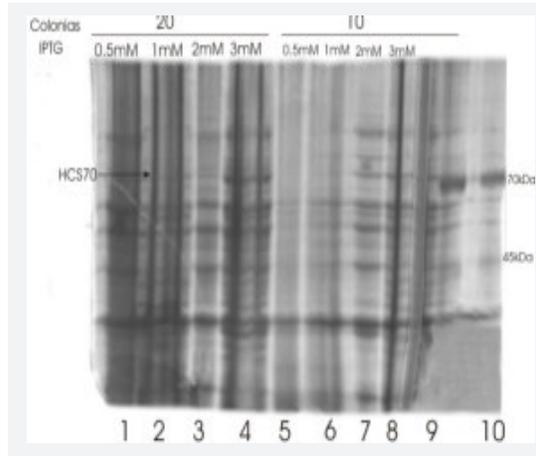


Figura 6. Electroforesis SDS-PAGE al 12% del lisado bacteriano obtenido por choque térmico-lisis enzimática de *E.coli* pET 28 HSC70/BL21(DE3). Las muestras fueron sometidas a condiciones denaturantes, alquiladas y hervidas a 100°C por 5 minutos. En cada carril se adicionó igual cantidad de la muestra. Carriles 1-8 contienen muestras del lisado membranar de los diferentes números de colonias señalados y con las diferentes concentraciones de IPTG. Carriles 9 y 10: marcadores de peso molecular (Albumina-Ovoalbúmina, 0.625 ìg y 0.3125 ìg respectivamente).

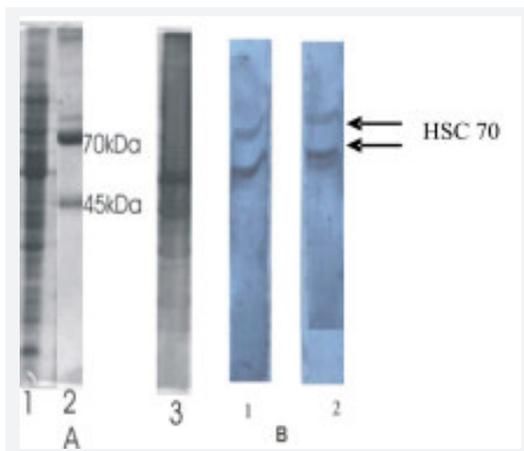


Figura 7. Obtención de la proteína HSC70 por electroforesis preparativa. A,1: muestra de *E.coli* pET 28 HSC70/BL21(DE3); 2 marcadores de peso molecular (Albumina-Ovoalbúmina 0.625 ìg); 3: gel teñido con azul de Coomassie después de la transferencia. B. "Western blotting" de la electroforesis de la Figura A utilizando un anticuerpo comercial contra HSC70 (SC1059 Santa Cruz). 1, Lisado de la fracción soluble; 2, Lisado de la fracción insoluble. (Ver anexo).

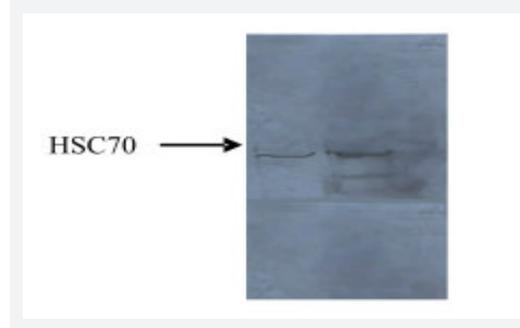


Figura 8. "Western blotting" con el anticuerpo generado utilizando el antígeno procedente del gel SDS-PAGE. La proteína se separó en condiciones no reductoras y la dilución del anticuerpo utilizado fue de 1: 4000. 1, lisado de células MA104. 2, lisado bacteriano de la fracción soluble de *E.coli* pET 28 HSC70/BL21(DE3). (Ver anexo).

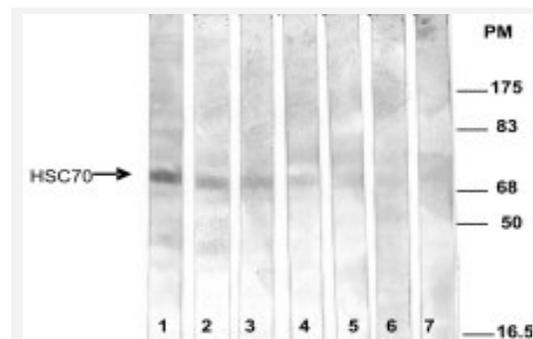


Figura 9. Titulación del anticuerpo por "Western blotting" empleando aproximadamente 9 ìg de proteína total. Carril 1, dilución 1:1000; carril 2, dilución 1:2000; carril 3, dilución 1:4000; carril 4, dilución 1:6000, carril 5, dilución 1:8000, carril 6, dilución 1:9000; carril 7, dilución 1:10000.

ciones de anticuerpo 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:4000. Como se muestra en la figura 10, el mejor título es el correspondiente a 1:1000, aunque hay buena lectura hasta una dilución 1:4000. En este caso se utilizó como antígeno un lisado de aproximadamente 100.000 células MA104 en 50 ùl por pozo.

Para la inmunofluorescencia indirecta el título que dió fluorescencia claramente positiva fue de 1:1000 hasta 1:1500, siendo ideal el primero en el cual se observó una fluorescencia definida

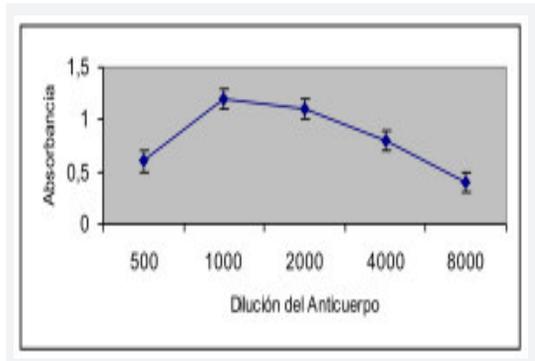


Figura 10. Titulación del suero hiperinmune contra HSC70 mediante la técnica de ELISA. El lisado de células MA104 se incubó toda la noche a 4°C en la placa de ELISA. Las diluciones del suero hiperinmune se hicieron en PBS en un volumen final 50 μ l. El conjugado anti-IgG de conejo-peroxidasa se usó en dilución 1:5000 y se reveló con sustrato TMB (Laboratrio KPL). La reacción se paró con 2.5 M de ácido sulfúrico y se leyó a 490 nm.

en el citoplasma y la membrana citoplasmática de las células MA104 (Figura 11). Con diluciones superiores a 1:1500 la fluorescencia se tornó tenue o negativa.

Discusión

Para demostrar que *E. coli* pET3a HSC70/BL21(DE3)pLysS y *E. coli* pET28 HSC70/BL21(DE3) expresan la proteína HSC70,

después de la adición del agente inductor, el lisado bacteriano se analizó por electroforesis (SDS-PAGE) y “Western blotting”, utilizando un anticuerpo policlonal comercial. La expresión de HSC70 indica que el agente inductor IPTG modificó y removió el represor *lac* permitiéndole a la RNA polimerasa transcribir los genes estructurales (*lac Z*, *lac Y*, *lac A*). Esto se confirmó porque no hay expresión de la proteína HSC70 en la ausencia de IPTG, sugiriendo que hay represión completa por parte del represor *lac*, el cual impide que la RNA polimerasa transcriba los genes estructurales (*lac Z*, *lac Y*, *lac A*).

Nuestros resultados sugieren que cuando se parte de dos y cinco colonias de *E. coli* pET 3a HSC70/BL21(DE3)pLysS y *E. coli* pET 28HSC70/BL21(DE3), se produce aproximadamente igual cantidad de la proteína HSC70, para los dos plásmidos (4,33 mg/600 ml) independiente de la concentración del agente inductor. Con 10 y 20 colonias de *E. coli* pET3a HSC70/BL21(DE3)pLysS y *E. coli* pET 28 HSC70/BL21(DE3) se produce menor cantidad de proteína (2.43 mg/600 ml) en comparación con dos y cinco colonias, produciéndose la menor cantidad (1.26 mg/600ml) con 20 colonias de *E. coli* pET28HSC70/BL21(DE3) independientemente de la concentración del

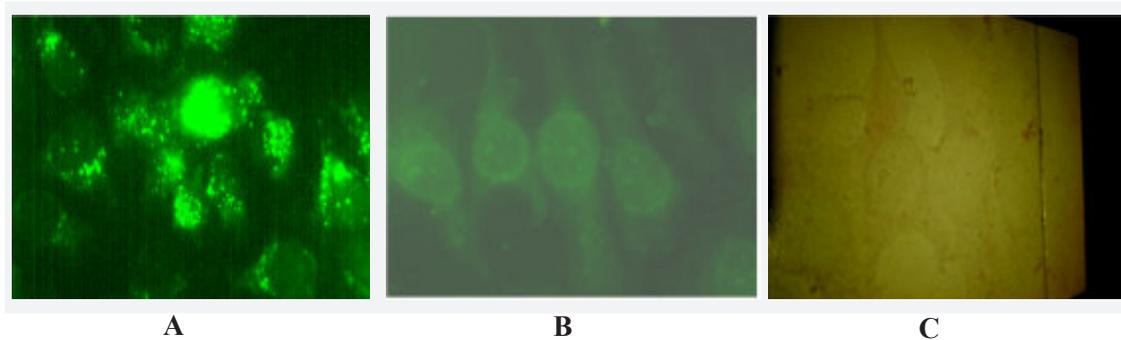


Figura 11. Caracterización del suero hiperinmune por inmunofluorescencia en células MA104. Las células se crecieron en cubre-objetos, se fijaron con acetona fría y se adicionó 20 μ l de suero hiperinmune en diluciones 1:1000. El suero se incubó una hora a 37°C y se adicionó 20 μ l de anti-IgG de conejo con Isotiocianato de fluoresceína en dilución 1:250, durante 30 minutos a 4°C. **A** Células infectadas con rotavirus y reveladas con Ac anti HSC70. **B** Células no infectadas (100x). **C** Control negativo. (Ver anexo).



inóculo. Esto sugiere que con la menor concentración del inductor (0.5mM) el gen tiene una alta tasa de transcripción y explica porque no se obtiene más cantidad de proteína al aumentar la concentración del inductor. Con 10 y 20 colonias la cantidad de proteína HSC70 disminuyó con respecto a dos y cinco colonias, posiblemente debido a que la fase estacionaria es más corta ya que el número de bacterias de partida satura el medio de cultivo rápidamente, reduciéndose el número de células viables que expresan la proteína HSC70. Probablemente la saturación bacteriana permite que se degrade más fácilmente el antibiótico, ya sea por aumento en la producción de las enzimas que lo degradan o por los cambios en el pH del medio. Esto puede conducir a la inestabilidad del plásmido y por consiguiente a reducir la producción de HSC70. La casa comercial (Novagen 2002) reporta que a pH bajo, el vector de expresión pET 28a(+) resistente a kanamicina, se inestabiliza y se expulsa de la bacteria afectando la producción de la proteína; esto se debe a que el metabolismo bacteriano, especialmente aquel que fermenta los azúcares, acidifica el medio de cultivo conduciendo a un pH incompatible con la viabilidad bacteriana.

El tratamiento de choque térmico-lisis enzimática no permitió recuperar la HSC70, mientras que al sonicar se obtuvo en promedio 4.33 mg/600 ml para el caso en que se utilizó un inóculo de dos y cinco colonias. En el tratamiento de choque térmico probablemente la proteína HSC70 queda expuesta a las proteasas bacterianas (1 hora a 37 °C) mientras la lisozima degrada la pared bacteriana. En cambio con el sonicado la HSC70 no se degrada o se degrada poco, quizá porque no queda expuesta a la acción de proteasas bacterianas por la rápida desintegración bacteriana.

La técnica de electroforesis preparativa demos-

tró ser adecuada para separar una proteína específica de lisados celulares y para aislarla en cantidad apropiada. Esta técnica ya ha sido empleada en el laboratorio con éxito y ha sido reportada en la literatura (16-19). En este caso, con el propósito de producir anticuerpos, no utilizamos ningún adyuvante adicional puesto que el gel de poliacrilamida cumple la función de potencializar la respuesta inmune. Con este método se pudo separar del lisado bacteriano suficiente cantidad de proteína HSC70 la cual se utilizó para inmunizar a los conejos.

El “Western blotting” es importante para determinar en qué sector del gel se ubica la proteína, dado que el lisado celular se corre en condiciones reductoras desnaturizantes. La proteína generalmente se distribuye en dos bandas, aunque algunas veces se ubicaba en tres, siendo una de ellas la más intensa. En estas condiciones las proteínas no se ubican en una sola banda porque la proteína se puede asociar con proteínas bacterianas o consigo misma, formando diferentes oligómeros explicando su distribución no homogénea en el gel (20). Los ensayos de caracterización de los anticuerpos sugieren que la inmunización fue adecuada para reconocer la HSC70 endógena en líneas celulares, cuando se utilizó el anticuerpo en “Western blotting” (1:2000 o 1:6000, dependiendo de la concentración del antígeno). Igualmente el anticuerpo reconoce el antígeno conformacional nativo o en suspensión cuando se analizó por técnicas inmunoquímicas como ELISA e inmunofluorescencia o en forma desnaturizada en el “Western blotting”. Sin embargo, el anticuerpo no se puede utilizar en muestras que posean proteínas bacterianas de *E. Coli*, dado que estos anticuerpos policlonales reconocen algunas de estas proteínas, debido probablemente a que la HSC70 inoculada estaba contaminada con proteínas del hospedero donde se expresó. En la actualidad los anticuerpos se utilizan para detectar la HSC70 en células de ma-

míferos y para inhibir la infección de rotavirus en la línea celular MA104 (21-27) y en cultivo primario de enterocitos.

Conclusión

Siempre que desee obtener proteína recombinante utilizando un vector de expresión, es necesario conocer las condiciones óptimas de producción para obtener buenas cantidades de proteína recombinante. En nuestro caso, encontramos que las condiciones óptimas para obtener la proteína recombinante HSC70, el inóculo de 5 colonias con 2mM de IPTG en tubos con 5ml de medio modificado e incubadas por 24 horas a 37°C con agitación constante (200r.p.m) y empleando el tratamiento de sonicación de las bacterias con los vectores de expresión producen el mejor rendimiento de HSC70. La proteína HSC70 fue separada por electroforesis preparativa del lisado bacteriano y utilizada para generar anticuerpos policlonales. Dicho suero hiperinmune se caracterizó para su uso mediante las técnicas de ELISA, Western blot e inmunofluorescencia.

Agradecimientos

A COLCIENCIAS por el apoyo a la investigación y porque financió este trabajo con el proyecto “caracterización molecular de receptores para rotavirus en la membrana citoplasmática del enterocito del intestino delgado” (código 1101-04-12011).

Referencias

1. **Srivastava PK, Ménoret A, Basu S, Binder R, Mcquade KL.** Heat shock proteins come of age : Primitive function acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 1998; 8: 657 – 665
2. **Becker F, Craig E.** Heat shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 1994; 219: 11-23
3. **Wilbanks SM, Chen L, Tsuruta H, Hodgson KO, McKay DB.** Solution small - angle X – ray scattering study of the molecular chaperone HSC70 and its subfragments. *Biochemistry* 1995; 34: 12095-12106
4. **Snoeckx LH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ.** 2001 Heat Shock Proteins and Cardiovascular Pathophysiology. *Physiol Rev* 2001; 81: 1461-1497
5. **Lindquist S.** The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631- 677.
6. **Frydman J, Hartl FU.** Molecular chaperone functions of hsp70 and hsp60 in protein folding. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring, New York, NY. 1994; 251-283.
7. **Haus U, Trommeler P, Hartmann H, Lottpeich F, Noegel A, Schleicher M.** The heat shock cognate protein from Dictyostelium affect actin polymerization through interaction with the actin-binding protein cap32/34. *J Embo* 1993; 12: 3763-3771.
8. **Chouchane L, Bowers S, Sawasdirosol S, Simpson RM, Kindt TJ.** Heat-shock proteins expressed on the surface of human T cell leukemia virus type-I-infected cell lines induce autoantibodies in rabbits. *J infect Dis.* 1994; 169: 253-259.
9. **Flaherty KM, McKay DB, Kabsch W, Holmes KC.** Similarity of the tree-dimensional structures of actin and the ATPase fragment of a 70-kDa heat shock cognate protein. *Pro. Natl. Acad. USA* 1999; 88: 5041 - 5045.
10. **Wu SJ, Liu FH, Hu SM, Wang C.** Different combination of the hsc70 C-terminal functional groups are utilized to interact with distinct tetratricopeptide – containing proteins. *Biochem J* 2001; 359: 419-426
11. **Moffatt BA, Studier FW.** Use of Bacteriophage T-7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes. *J Mol Biol* 1986; 189:113-130.
12. **Tabor S, Richardson CC.** A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Biotechnology* 1985. 1992; 24:280-4.
13. **Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF.** *Molecular Cloning.* Segunda edición. Editorial Cold Springs Harbor Laboratory Press, New York, United States. 1989; 15. 109p.
14. **Lane CL.** A simple method for stabilizing protein sulfhydryl groups during SDS-gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 1978; 86:655
15. **Kristine KM, Daniel CB, Simon RC, Jeffery OB, Paul AO.** Primary Murine Small intestinal epithelial Cell, Maintained in long-term culture, are susceptible



- to rotavirus infection. *J Virol* 2000; 55:597-5603.
16. **Harlow E, Lane D.** *Antibodies A Laboratory Manual.* Cold spring Harbor Laboratory 1998; 62
 17. **Gordon AH.** *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels.* Laboratory Techniques biochemistry and molecular Biology. 1985; 1:75
 18. **Guerrero CA, Zárate S, Corkidi G, López S, Arias C.** Biochemical characterization of rotavirus receptor in MA104 cells. *J Virol.* 2000;15:93-102.
 19. **Ochoa F, Trujillo G.** Metodología sencilla para la obtención antisuero al virus de la tristeza de los cítricos. *Fitopatol Venez.* 1994; 7:1-2
 20. **Fouchaq B, Benaroudj N, Ebel C, Ladjimi MM.** Oligomerization of the 17-Kda peptide-binding domain of the molecular chaperone Hsc 70. *Eur J Biochem.* 1999; 259: 379-384.
 21. **Arias C, Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, Isa P, López S.** Early events of rotavirus infection: The search for the receptor(s). *Gastroenteritis virus.* Novartis Foundation. Inglaterra . 2000.
 22. **Guerrero CA, Méndez E, Zárate S, Isa P, López S, Arias C.** Integrin alpha V Beta-3 mediates rotavirus cell entry *Pro Natl Acad USA* 2000; 97: 14644-14649
 23. **Zárate S, Espinosa R, Romero P, Guerrero CA, Arias C, López S.** Integrin alpha 2 Beta 1 mediates the cell attachment of the rotavirus neuraminidase-resistant variant nar3. *Virology.* Vol 278. 2000; 50 - 54
 24. **Guerrero CA, Bouyssounade D, Zárate S, Isa P, López T, Espinosa R, Romero P, Méndez E, López S, Arias C.** The Heat Shock Cognate Protein 70 Is Involved in Rotavirus Cell Entry. *J Virol* 2002; 76: 4096-4102.
 25. **Guerrero CA, Bouysspimade D, Zárate S, Isa P, López T, Espinosa R, Romero P, Méndez E, López S, Arias C.** Heat Shock Cognate Protein 70 is Involved in Rotavirus Cell Entry. *J Virol* 2002; 76:4096-102
 26. **Guerrero C.** Identificación y caracterización de receptores celulares para Rotavirus. Cuernavaca: México D.F., Tesis (Doctorado en Bioquímica). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Departamento de genética y fisiología molecular. 2000.
 27. **Zugel U, Kaufmann S.** Role of heat shock protein in protection from in pathogenesis of infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 1999;12:19 -39