



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Clonación y caracterización de la Superóxido
Dismutasa de Amaranto expresada en respuesta a
estrés abiótico”**

Tesis que presenta

QFB. Lizeth Berenice Ortega Cruz

Para obtener el grado de

Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto 2009



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Clonación y caracterización de Superóxido Dismutasa de Amarantho expresada en respuesta a estrés abiótico**" presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Lizeth Berenice Ortega Cruz** y aprobada el **4 de agosto del 2009** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ana Paulina Barba de la Rosa
(Director de la tesis)

Dr. Ma Fabiola León Galván
(Codirector de la tesis)

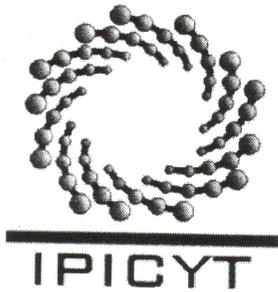
Dr. Antonio De León-Rodríguez
(Sinodal de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y expresión génica de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (211460) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 067 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 4 días del mes de agosto del año 2009, se reunió a las 10:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Ma. Fabiola León Galván	Presidenta	IPICYT
Dr. Antonio De León Rodríguez	Secretario	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Lizeth Berenice Ortega Cruz

sobre la Tesis intitulada:

Clonación y caracterización de Superóxido Dismutasa de Amaranto expresada en respuesta a estrés abiótico

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba De la Rosa
Dra. Ma. Fabiola León Galván

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 11:37 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 4 días del mes de agosto de 2009.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



El presente trabajo se lo dedico a mis padres Angelina Cruz Pérez y Juan

Mario Ortega Martínez

A mis hermanas Angela, Liliana Y Miriam

A Federico Israel García

Por la paciencia y el apoyo que mostraron durante esta etapa de mi vida.

Agradecimientos

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Dra. Ma Fabiola León Galván

Dr. Antonio de León Rodríguez

Compañeros del laboratorio de Proteómica y Expresión génica

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT)

**Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca
número 211460**

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	Ix
ÍNDICE DE FIGURAS	Ix
LISTA DE ABREVIATURAS	Xi
RESUMEN	Xii
ABSTRACT	Xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Respuesta de las plantas al estrés abiótico	2
1.2 Superóxido dismutasa y su clasificación en base a su cofactor	6
1.3 SOD en el estrés abiótico	7
1.4 Amaranto como modelo de estrés abiótico	7
1.5 Antecedentes directos del proyecto	8
II. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo General	10
2.2 Objetivos particulares	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Extracción de ARN de raíz de Amaranto	11
3.2 Síntesis de la doble Cadena de ADN	11
3.3 Diseño de oligonucleótidos para un fragmento de SOD	11
3.4 Amplificación mediante PCR	12
3.5 Amplificación Rápida de Extremos de ADNc (RACE)	12
3.6 Análisis bioinformático de SOD	13
3.7 Modelamiento de la proteína SOD	13
3.8 Clonación de la proteína recombinante SOD	13
3.8.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para el ORF SOD.	13
3.8.2 Digestión con enzimas de restricción	14
3.8.3 Ligación y Transformación	14
3.9 Expresión de proteína recombinante SOD	15
3.9.1 Ensayos de Expresión	15
3.9.2 Cuantificación y análisis de proteína total	16
3.10 Western blot	16
3.11. Purificación por columna de afinidad	16

3.11.1 Tratamiento de la muestra en condiciones nativas	16
3.11.2 Preparación de la columna con la resina NI-NTA agarose	17
3.11.3 Purificación	17
3.12 Ensayos de Actividad SOD	17
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Extracción de ARNm	19
4.2 Síntesis de la doble cadena de ADNc de amaranto	19
4.3 Obtención del ORF de SOD de Amaranto	20
4.4 Análisis bioinformático de la <i>AhSOD</i>	23
4.5 Modelamiento de <i>AhSOD</i> de Amaranto	26
4.6 Clonación de SOD en PCR4 topo y pET22b(+)	30
4.7 Analisis electroforético de las proteínas de la fracción soluble e insoluble y cinética de crecimiento de <i>E. coli</i>	32
4.9 Purificación de <i>AhSOD</i>	34
4.10 Detección de la proteína <i>AhSOD</i> mediante Western Blot	35
4.11 Actividad de <i>AhSOD</i>	36
V. CONCLUSIONES	38
VI. PERSPECTIVAS	38
VII. REFERENCIAS	39
VIII. APÉNDICE A	42

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Sistema de protección antioxidante enzimático	4
Tabla 2. Sistema de protección antioxidante no enzimático.	5
Tabla 3. Oligonucleótidos degenerados para la amplificación de SOD	12
Tabla 4. Oligonucleótidos para la subclonación SOD en el vector pET22b(+) para su expresión.	13

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ruta de Halliwell-Asada. Sistema de eliminación del oxígeno activo en plantas superiores	3
Figura 2. Localización de SOD en célula vegetal.	6
Figura 3a. Análisis 2D de raíz de amaranto en estrés por sequía.	9
Figura 3b. Proteína identificada Superóxido Dismutasa CuZn	9
Figura 4. Visualización de bandas de ARN de raíz de amaranto en un gel de agarosa.	19
Figura 5. ADNc de doble cadena de amaranto	20
Figura 6. Homología de SOD de amaranto con SODs de otras plantas	21
Figura 7a Amplificación de un fragmento de SOD con oligos degenerados	23
Figura 7b RACE para la obtención de los extremos 5 y 3' para la obtención del ORF de SOD de amaranto.	23
Figura 7c Amplificación del ORF completo de SOD.	23
Figura 8. Secuencia del ORF de <i>AhSOD</i>	23
Figura 9. Múltiple alineamiento de Cu,Zn SODs de diversas plantas	25
Figura 10 Dominios conservados en <i>AhSOD</i>	26
Figura 11. Alineamiento de la secuencia en aminoácidos <i>AhSOD</i> con la cadena beta de Cu,Zn SOD de <i>P. atrosanguinea</i> .	28
Figura 12. Modelamiento de la estructura secundaria de <i>AhSOD</i>	29

	Pág.
Figura 13. Análisis de restricción de las clonas que contienen la construcción pCR4-TOPO- <i>AhSOD</i> con las enzimas <i>M</i> scl y <i>X</i> hoI	30
Figura 14. a Vector de expresión pET22b(+) indicando el sitio de inserción del fragmento del gen <i>AhSOD</i> . b Escrutinio por PCR de las clonas que contienen la construcción pET22b(+)- <i>AhSOD</i>	31
Figura 15. Análisis de la fracción soluble e insoluble de la expresión de <i>AhSOD</i> por SDS-PAGE	33
Figura 16. Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> conteniendo el plásmido pET22b(+)- <i>AhSOD</i>	34
Figura 17. Gel SDS-PAGE de la purificación de <i>AhSOD</i> empleando columnas de afinidad a Ni-NTA	35
Figura 18. Análisis Western-blot de la sobre expresión de <i>AhSOD</i> recombinante	36
Figura 19. Visualización de la actividad de <i>AhSOD</i> en un zimograma	36

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
D.O.	densidad óptica
g	gramos
h	horas
kDa	kilodalton
lb	libras
M	molar
mA	miliamper
µg	microgramos
min	minutos
mL	mililitros
µL	microlitro
mM	milimolar
µM	micromolar
nm	nanómetros
pb	pares de bases
pH	potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
U	unidad
V	volt

RESUMEN

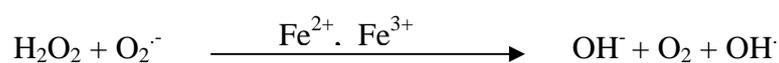
El estrés oxidativo o incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO) en plantas generalmente acompaña a diferentes tipos de estrés abiótico como sequía, altas temperaturas y salinidad, afectando la productividad de los cultivos y debido a esto se ha incrementado el estudio de estrés en plantas. Por otro lado, existe el interés mundial de contar con cultivos alternos capaces de producir alimentos. El amaranto es una planta que produce semillas de alta calidad nutritiva y nutraceútica, la planta puede crecer en zonas áridas donde los cultivos tradicionales no logran sobrevivir. En nuestro grupo de trabajo se ha realizado un estudio proteómico comparativo sobre la respuesta de la planta al déficit de agua. De este estudio se encontró el aumento de concentración de una Superóxido Dismutasa (SOD). Las SOD son la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo, ocasiona la dismutación del anión superóxido produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno. Existen isoformas de SOD que varían por el co-factor al cual se unen: Cu,Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD y Ni-SOD. A partir de los datos de proteínas se diseñaron oligonucleótidos para SOD y se obtuvo un fragmento de 263 pb con homología a Cu,Zn SOD. A partir del fragmento de 263 pb se realizó un RACE al extremo 3' y 5' obteniendo un ORF de 459 pb de SOD de amaranto (*AhSOD*). *AhSOD* mostró una identidad mayor del 80% con otras Cu,Zn SOD. El gen se clonó en el vector de expresión pET22b(+) y se transformó la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3) para su sobreexpresión. La proteína recombinante se encontró en la fracción soluble y fue purificada por cromatografía de afinidad. El ensayo de actividad mostró que la *AhSOD* puede expresarse de forma activa en *E. coli*. *AhSOD* puede ser empleado para la transformación de plantas con el fin de incrementar su capacidad de acción contra las especies reactivas de oxígeno con el resultado en el aumento de productividad.

ABSTRACT

Oxidative stress or increased of reactive oxygen species (ROS) in plants generally is related with different abiotic stress as water deficit, high temperatures and salinity, affecting the crop productivity and hence, the interest in the research of stress in plants. By other hand, there is interest worldwide to have alternative crops able to produce food with high nutritive and nutraceutical properties. The amaranth is a plant that produces seeds of high quality; the plants grows in arid zones where traditional plants are not able to grow. In our research group has reported a comparative proteomic study of the amaranth response to water deficit. From this, it was found the increased concentration of one superoxide dismutase (SOD) in drought conditions. SOD is the first line of defense against oxidative stress caused by the dismutation of superoxide anion and hydrogen peroxide to produce oxygen. SOD isoforms exist which differ by the factor which co-bind: Cu,Zn-SOD, Fe-SOD, and Mn-SOD. From MS data it was designed the oligonucleotides for SOD amplification from cDNA,, obtaining a fragment of 263 bp corresponding to Cu,Zn-SOD. From the fragment of 263 bp were amplified by RACE at 5' and 3' end obtaining the complete ORF of 459 bp for amaranth SOD (*AhSOD*). The multiple alignments *AhSOD* and SODs from various plants showed an identity above 80 % with Cu,Zn-SOD. *AhSOD* was cloned on the expression vector pET22b(+) and the strain of *Escherichia coli* BL21(DE3) was transformed. The recombinant protein, found in the soluble fraction was purified by ion exchange chromatography. The activity assay showed that recombinant *AhSOD* was active. *AhSOD* could be used for plant transformation to increased the capacity against reactive oxygen species with the resulting increased in productivity.

I. INTRODUCCIÓN

La vida en la tierra evolucionó hacia un metabolismo aerobio, por lo cual algunos microorganismos redefinieron sus mecanismos enzimáticos y rutas metabólicas. El metabolismo aerobio y en consecuencia la utilización de oxígeno también implicó la producción de intermediarios, llamados especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO son formas reducidas de oxígeno atmosférico resultado de la excitación del O_2 a la forma singlete de oxígeno (O_2^{\cdot}) o por la transferencia de uno, dos o tres electrones formando radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o radical hidroxil (OH^{\cdot}), respectivamente (Mittler, 2002). La especie más reactiva es el radical hidroxil que reacciona indiscriminadamente causando la peroxidación de lípidos, la desnaturalización de proteínas y la mutación del DNA. El radical hidroxil se forma cuando reaccionan iones metálicos como el hierro con superóxido y peróxido de hidrógeno mediante la reacción de Haber-Weiss (Bowler y col, 1992).



La producción de ERO puede sobrepasar la capacidad celular de eliminación de estas ERO originado por la sequía, metales pesados, choque térmico, bajas temperaturas, radiación ultravioleta, contaminantes del aire como el ozono Y SO_2 , estrés mecánico, falta de nutrientes, ataque de patógenos y estrés por alta intensidad de luz ocasionando un estrés oxidativo. El estrés oxidativo esta interconectado con el estrés abiótico. Se considera al estrés oxidativo un estrés secundario al abiótico. El estrés abiótico incluye sequía, salinidad, extremas temperaturas, toxicidad química etc. (Wang y col, 2003).

La disponibilidad de agua y la salinización del suelo, constituyen dos de las limitantes más importantes para la productividad de las plantas de cultivo. La sequía se ha convertido paulatinamente en un factor de estrés abiótico limitante (Moffat, 2002). En plantas resistentes a la sequía, se ha observado una mayor actividad de enzimas antioxidantes y/o una mayor concentración de compuestos antioxidantes. La variabilidad en la respuesta de sistemas de antioxidantes es un punto promisorio para el mejoramiento de la producción bajo condiciones de estrés, dado que a pesar de la tendencia a la uniformidad genética en los cultivos, pudiera pensarse que aun existe cierto nivel de variabilidad explotable en estas características.

La tolerancia al estrés hídrico y a la salinidad ha sido relacionada con una mayor protección frente al estrés oxidativo (Boyer, 1982).

1.1 Respuesta de las plantas al estrés abiótico

Los mecanismos de defensa en las plantas implican muchos genes y mecanismos bioquímicos-moleculares. Los genes inducidos por el estrés aumentan la resistencia de las plantas, estos genes codifican para la síntesis de osmolitos, componentes orgánicos de bajo peso molecular incluyen a la prolina, tetralosa, fructanos, manitol y glicina betaína (Shanvindra y col 1999), componentes con funciones de chaperonas que incluyen proteínas Heat shock (HSPs), proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA), proteínas que participan en la homeostasis iónica y el transporte de agua como por ejemplo las acuaporinas (Wang y col 2003) y la biosíntesis de enzimas con capacidad antioxidante que reducen el estrés mediante la detoxificación de especies activas de oxígeno en las que se incluyen la Superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa, la catalasa y la glutatión reductasa (Zhang y col, 2000).

En la Figura 1 se muestra el sistema de eliminación del oxígeno activo en las plantas superiores propuesto por Halliwell-Asada, en donde se observa que una de las primeras líneas de defensa es la SOD.

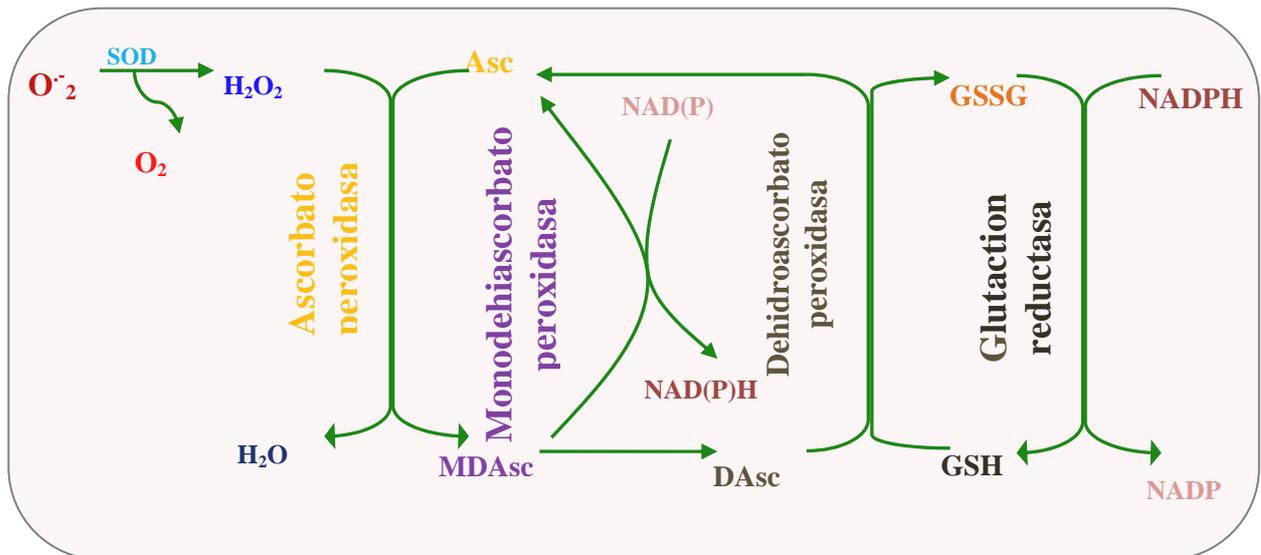


Figura 1. Ruta de Halliwell-Asada. Sistema de eliminación del oxígeno activo en plantas superiores. Asc=ascorbato; MDAsc=monodehidroascorbato; DAsc=dehidroascorbato; GSH=glutación reducido; GSSG=glutación oxidado (Bowler y col, 1992; Zhang y col, 2000).

Los sistemas de protección antioxidante de las plantas pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos.

a) Los *enzimáticos* están conformados por un número de proteínas catalizadoras de las reacciones de desintoxicación de las especies activas de oxígeno, algunas de estas enzimas se describen en la Tabla 1.

b) Los *no enzimáticos*, están constituidos por metabolitos (Tabla 2) que sirven de sustrato en las reacciones de desintoxicación.

Tabla 1. Enzimas involucradas en el sistema de protección antioxidante en plantas.

Enzima antioxidante	Localización celular	Estrés promotor
Ascorbato peroxidasa (APX)	Citosol, estroma, membrana plasmática, nódulos radicales	Sequía,, salinidad,, \uparrow [CO ₂], \uparrow irradiación,, O ₃
Catalasa (CAT) Dehidroascorbato reductasa (DHAR)	Citosol, glioxisomas, Peroxisomas Citosol, estroma, nódulos radicales	Bajas temperaturas ?
Superóxido dismutasa Cu/ZnSOD* MnSOD* FeSOD	Citosol, peroxisoma, plastidos, nódulos radicales Mitocondria Plastidos	Sequía**,, salinidad,, \uparrow [CO ₂], \uparrow [O ₂]*, \uparrow irradiación*, bajas temperaturas*, O ₃ *
Glutación reductasa (GR)*	Citosol, mitocondria, estroma, nódulos radicales	Sequía*, \uparrow [CO ₂], O ₃ , Glutaciona reductasa (GR)* bajas temperaturas*
Monodehidroascorbato reductasa (MDHAR)	Estroma, nódulos radicales	?

Tabla 2. Algunos de los metabolitos involucrados en el sistema de protección antioxidante no enzimático en plantas.

Metabolitos antioxidantes	Localización celular
Ascorbato (Vitamina C)	Apoplasma, citosol, plastidios, vacuolas
β-caroteno	Membrana de tilacoide
Glutación reducido (GSH)	Citosol, mitocondria
Poliaminas	Citosol, mitocondria, núcleo, plastidos
α-tocoferol (Vitamina E)	Membranas celulares
Xantofilas	Cloroplastos, membrana de tilacoide

1.2 SOD

Las Superoxido Dismutasas (SODs), son la primera línea de defensa en contra del daño oxidativo y han sido aisladas de organismos de todos los reinos (Ludmil, 1994; Folz, 1997; Karpinska, 2001; Amo, 2003; Dolashka-Angelova, 2004; Wu, 2006).

La enzima SOD origina la dismutación del anión superóxido mediante la reacción (McCord y Fridovich, 1969):



La SOD se clasifica en base al co-factor que utiliza: Fierro-SOD, Cobre,Zinc-SOD y Manganeso-SOD.

Fierro-SOD (Fe-SOD). A este grupo de SOD se les considera el más antiguo; se ha encontrado en procariontas y eucariontes. La forma homodímera de 20 kDa se ha localizado en *Escherichia coli* y la tetrámera con un peso molecular de 80-90 kDa en plantas superiores (Alscher, 2002). Fe-SOD se caracteriza porque se inhibe con H_2O_2 y resiste el cianuro de potasio (KCN).

Manganeso-SOD (Mn-SOD). Este tipo de SOD se ha encontrado en procariotas y eucariotas, su estructura está más relacionada con la Fe-SOD que con la Cu,Zn-SOD, es resistente al H_2O_2 y KCN (Fridovich, 1995).

Cobre,Zinc-SOD (Cu,Zn-SOD). Este grupo de SOD se encuentra principalmente en los eucariontes en dos formas: la forma homodímera que se localiza en el citoplasma y la homotetrámera en el espacio extracelular (Fridovich, 1995; Alscher, 2002; Zelko, 2002).

En la figura 2 se muestra la localización de SOD en la célula de una planta (Alscher, 2002).

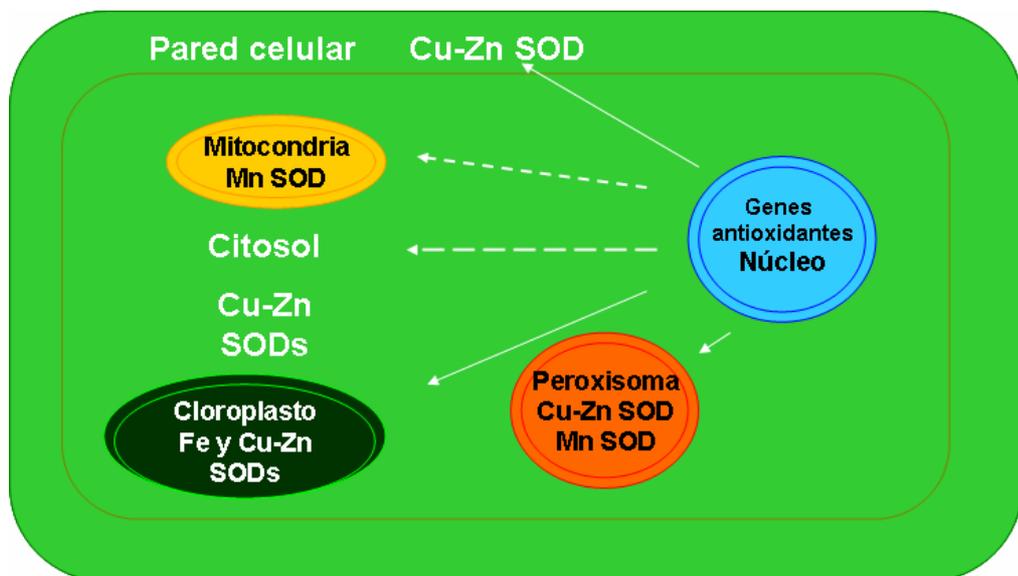


Figura 2. Localización de SOD en célula vegetal.

1.3 SOD en el estrés abiótico

El estrés abiótico se ha estudiado en plantas que sobre-expresan enzimas antioxidantes de las cuales se destaca SOD. Entre estos estudios podemos mencionar que la sobre-expresión de Cu,Zn-SOD protege en plantas de tabaco del daño oxidativo ocasionado por el estrés de bajas temperaturas y alta intensidad de luz (Gupta, y col, 1993). También se ha sobre-expresado la MnSOD en alfalfa en condiciones de estrés hídrico y temperaturas bajas observándose la mejoría a la tolerancia al estrés oxidativo (McKersie y col, 1996; McKersie y col, 1999). Fe-SOD también se ha sobre expresado en alfalfa en plantas sometidas a estrés por bajas temperaturas, en este caso la tolerancia no se debe a una protección directa contra el estrés oxidativo debido a que no observaron un incremento de la protección contra el estrés oxidativo ocasionado por el paraquat (Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) en las hojas de alfalfa con respecto al control, la protección es propuesta por dos mecanismos el primero es resultado del incremento de la eliminación del anión superóxido producido como daño primario en la raíz y/o indirectamente por el incremento del flujo de peróxido de hidrógeno el cual tiene un papel regulatorio que incrementa el proceso de aclimatación (McKersie y col, 2000). La sobre-expresión de SOD en plantas bajo un estrés oxidativo generalmente protege a la planta del daño oxidativo lo cual genera una tolerancia cruzada a diversos tipos de estrés abióticos.

1.4 Amaranto como modelo en estrés abiótico

El amaranto es una dicotiledónea de rápido crecimiento que produce grandes cantidades de semillas. El amaranto es tolerante a la sequía, altas

temperaturas y pestes (Paredes y col 1991). El Amaranto en condiciones donde existe baja cantidad de agua tiene varios mecanismos que evitan la pérdida del agua como el cierre de estomas, barreras cuticulares para la disminución de pérdida de agua y decremento de la superficie de transpiración (Espitia-Rangel, 1994). Estos mecanismos de conservación de agua tienden a disminuir el crecimiento de la planta debido a una baja transpiración y menor índice de fotosíntesis ocasionado por el cierre de estomas y reducción del área de la hoja (Espitia-Rangel, 1994). El amaranto es una planta con metabolismo C4, presenta una alto índice de fotosíntesis en condiciones de alta temperatura y alta intensidad de luz además presenta baja foto-respiración y alta eficiencia en el uso del agua. Entre otras características tiene un alto índice de absorción de agua y la capacidad de recuperación posterior a un estrés hídrico. En consecuencia a las características mencionadas y a su rápido crecimiento el amaranto es propuesto como modelo de estudio en estrés abiótico.

Es importante estudiar los mecanismos así como las enzimas que participan en la tolerancia al estrés oxidativo para buscar el mejoramiento genético para evitar la pérdida de cultivos utilizando plantas modelos como el Amaranto.

1.5 Antecedentes directos del proyecto

En estudios previos se analizó mediante un enfoque proteómico la respuesta de la raíz amaranto al estrés por sequía (Huerta-Ocampo, 2008). En este estudio mediante electroforesis bidimensional se encontraron alrededor de 400 manchas de proteínas, de las cuales 20 presentaron un cambio de concentración significativo entre la condición control y condición de estrés figura 3a. El análisis por espectrometría de masas reveló que la mancha

numero 19 corresponde a una SOD, cuya expresión se encuentra incrementada en respuesta a sequía como puede observarse en la Figura 3b y c. A partir de este trabajo se propuso el estudio de SOD de amaranto.

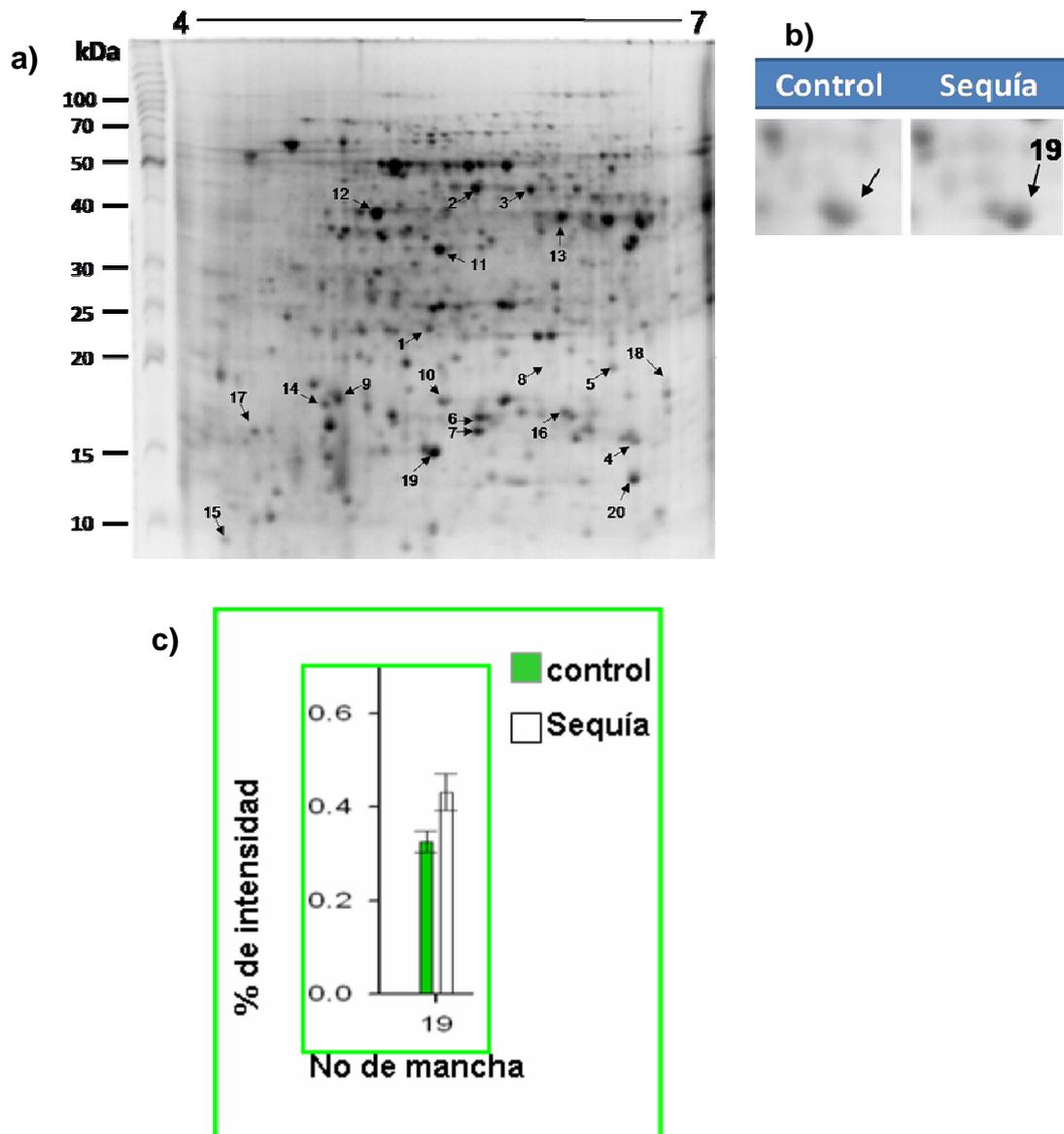


Figura 3. Patrón 2D de expresión de proteínas solubles totales de raíz de amaranto. El recuadro muestra la mancha de proteína no. 19 identificada por espectrometría de masas como superóxido-dismutasa. También se muestra la intensidad de la mancha 19 del control y en sequía (3 c). (Huerta-Ocampo, 2008).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Clonar y caracterizar la Superóxido Dismutasa de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.).

2.2 Objetivos particulares.

- ✓ Obtener el ORF de SOD de Amaranto expresado en condiciones de estrés hídrico.
- ✓ Clonar SOD en el vector pET22b(+) para la sobre-expresión de SOD recombinante en *Escherichia coli*.
- ✓ Caracterizar la SOD

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del gen completo de SOD.

3.1 Extracción de ARN de raíz de Amaranto

Previamente se lavó un mortero, espátula y tijeras con agua milliQ con DEPC dejando 3 horas y posteriormente se esterilizó a 121 °C 15 min a 15 lb.

La extracción de ARN se llevó a cabo de acuerdo al protocolo de RNeasy de QIAGEN (apéndice A).

El ARN obtenido se analizó en gel de agarosa desnaturalizante al 1.2% teñido con bromuro de etidio y se visualizó en el fotodocumentador Gel Logic 100 Imaging System (Bio-Rad).

3.2 Síntesis de la doble Cadena de ADN

El ARN obtenido se cuantificó a una absorbancia de 260 nm y se utilizó una concentración inicial de ARN de 2 µg para la síntesis del ADNc.

La síntesis de ADNc se realizó de acuerdo a lo descrito en el protocolo SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit User Manual de Clontech (apéndice A).

3.3 Diseño de oligonucleótidos para un fragmento de SOD

A partir de la secuencia de la proteína similar a SOD identificada en el análisis proteómico de raíz de amaranto bajo estrés hídrico, se diseñaron oligonucleótidos degenerados (Tabla 3) para amplificar un fragmento del gen que codifica para la proteína tipo SOD.

Tabla 3. Oligonucleótidos degenerados para la amplificación de un fragmento del gen SOD de amaranto.

Oligo	Secuencia
SODF	5' CCTGGNCTYCAYGGVTTYCAYGT 3'
SODR	5' CCWAGRTCATCRGGATCAGCRTGVAC 3'

3.4 Amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La mezcla de reacción se preparó con 1 µg de ADN, 0.2 µM de cada oligo, 0.3 mM de dNTPs, 1.5mM de MgCl₂, 1 U de Taq ADN polimerasa abm y agua milliQ. El programa de amplificación fue a 94 °C durante 5 min, enseguida 30 ciclos a 94°C 1 min, 58°C 45 s, 72 1 min y un ciclo a 72°C durante 10 min.

El producto de la amplificación se envió a secuenciar y se analizaron los resultados comparando con la base de datos BLAST de NCBI.

3.5 Amplificación Rápida de Extremos de ADNc (RACE)

RACE se utilizó para la obtención de los extremos del gen hacia el extremo 5' y 3'. En la primera reacción se utilizó el oligo SMART II A y SOD reverse, este par de oligos copia en dirección 3' a 5' con respecto al templado (5' RACE-PCR). El 3' RACE-PCR se obtuvo utilizando el par de oligos SODF y 3' SMART CDS Primer II A, el ciclo de PCR se realizó con una temperatura de alineamiento de 58 °C durante 1 min y una extensión a 72 °C durante 2 min. Los fragmentos obtenidos mediante PCR se enviaron a secuenciar.

Las secuencias obtenidas mediante el RACE se secuenciaron y se analizaron en el programa DNASTAR y BLASTx para la obtención de la secuencia completa codificante para el gen SOD de Amaranto.

3.6 Análisis bioinformático de SOD

El análisis bioinformático se realizó en la base de datos de NCBI en Blast para la comparación de *AhSOD* con otras SODs. El empalme de secuencias para la obtención del ORF, y el alineamiento múltiple a nivel de aminoácidos se realizó en el programa DNASTar.

3.7. Modelamiento de la proteína SOD

El modelamiento de la proteína se realizó en la base de datos de SWISS-MODEL, a través de la comparación de modelos de estructuras tridimensionales de proteínas a las cuales se ha determinado su estructura tridimensional.

3.8 Clonación de la proteína recombinante SOD

3.8.1 Diseño de oligonucleótidos específicos para la clonación del ORF.

A partir de las integraciones de secuencias 5' y 3' de las cuales se obtuvo el ORF SOD, se diseñaron oligonucleótidos para la clonación de SOD en el sistema de expresión, a estos oligonucleótidos se les añadieron sitios de restricción *MscI* y *XhoI* (Tabla 4).

Tabla 4. Oligonucleótidos para la subclonación SOD en el vector pET22b+ para su expresión.

Oligo	Secuencia
SODBF	5' TGGCCATGGGCAAGGGCGTACTG 3'
SODBR	5' CATAATAACCAGAAGTTCCAGAGCTC 3'

Los oligos específicos se utilizaron para la amplificación de SOD mediante PCR con una temperatura de alineamiento de 51°C y fue subclonado en el vector PCR 4-TOPO.

3.8.2 Digestión con enzimas de restricción

La SOD y el vector de expresión pET22b(+) fueron digeridos con las enzimas *MscI* y *XhoI* en las siguientes condiciones: la reacción de digestión se llevo a cabo con 10 µg de ADN plasmídico, Buffer de reacción 1X a un volumen de 20 µL de acuerdo a las especificaciones del proveedor. La reacción se incubó a 37°C durante 1 h y 30 min.

3.8.3 Ligación y Transformación.

La relación vector inserto fue de 1:3 respectivamente y se determinó mediante análisis visual comparativo en gel de agarosa. La ligación se realizó con 1U de T4 ligasa (Promega) a un volumen final de 20µL, se incubó a 16°C durante 3 h. El producto de la ligación fue transformado por choque térmico en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) esta cepa tiene el gen T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*, además produce lac permeasa y β-galactosidasa para la expresión en sistemas de autoinducción de promotores T7.

De las clonas transformantes se extrajo DNA plasmídico siguiendo el protocolo propuesto por Qiagen (apéndice A), el DNA plasmídico fue digerido con *MscI* y *XhoI*, de las clonas positivas se hicieron respaldos en glicerol con 300 µL de medio de cultivo D.O.₆₀₀ ≈ 0.5, se mezcló con 700 µL de glicerol estéril absoluto. Las alícuotas se almacenaron a -70°C.

3.9 Expresión de la proteína recombinante SOD

3.9.1 Ensayos de Expresión

El preinoculo de la clona transformada se creció a 37°C toda la noche en un medio con sales basales suplementado con glucosa (BSG) (apéndice A). El preinoculo se utilizó para inocular 100 mL de BSG con su respectivo antibiótico y se ajustó a una $D.O_{.600} \approx 0.2$. El cultivo se creció a 37°C hasta una $D.O_{.600} \approx 0.6$ alcanzando esta D.O se llevo a cabo la inducción con IPTG 1mM y el cultivo se creció a 31°C. Después de las cuatro horas de inducción se tomaron muestras de 5 mL cada 3 h hasta las 24 h y se almacenaron a -20 °C.

Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en 500 μ L de PBS. Las células se rompieron utilizando sonicador con una amplitud de 30% y pulsos de 9.9 durante dos minutos, enseguida se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 min. La fracción soluble se separó de la insoluble y esta se resuspendió nuevamente en PBS.

3.9.2 Cuantificación y análisis de proteína total.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando el reactivo Protein Assay (Bio-Rad) basado en la técnica de Bradford, se utilizó 10 μ L de muestra (fracción soluble y fracción insoluble) con 10 μ L de PBS y se les agregó 1 mL de Protein Assay diluido (dilución 1:5). Para el blanco se utilizaron 20 μ L de PBS, después se incubaron 5 min protegido de la luz y se leyó la absorbancia a 595 nm. Las lecturas se interpolaron en una curva estándar de albúmina de suero bovino.

Muestras de proteína (7.5 μ g/ μ L) de las diferentes fracciones a diferentes tiempos de expresión se prepararon con 10 μ L de buffer Laemmli y se hirvieron 5 min, se analizaron en un gel de SDS-PAGE con gradiente de 4 a 20%. La

separación de proteínas se llevó a cabo a 10 mA 20 min y 20 mA 30 min. Los geles se tiñeron con Azul Coomassie (apéndice A).

3.10 Western-blot

Dos papeles filtros gruesos se humedecieron durante 15 min en buffer de transferencia Towbin (en su defecto 3 filtros delgados). La membrana sequi-Blot PVDF (0.2 μm) se humedeció en metanol al 80 % y posteriormente en buffer de transferencia durante 10 min, entre los papales filtros se colocó la membrana y el gel SDS-PAGE. La transferencia se llevo a cabo a 25 V durante 1 h en cámara semi-húmeda (BIO-Rad). La membrana se lavo con TBST (describir el nombre, apéndice A) 3 veces durante 5 min y se bloqueo con leche al 5% en TBST a temperatura ambiente 2 h, después se hicieron 3 lavados con TBST y se incubo durante 4h a temperatura ambiente con el anticuerpo primario con una dilución de 1:1000. La membrana se lavó nuevamente con TBST, enseguida se incubó con el anticuerpo secundario con dilución 1:3000 durante 90 min, nuevamente se hicieron lavados con TBST y dos con el buffer AP. El revelado se hizo con NBT/BCIP, la reacción se detuvo con agua destilada.

3.11 Purificación por cromatografía de afinidad

La purificación se realizo por afinidad a resina de Níquel, siguiendo las instrucciones del protocolo ProBond Purification System de Invitrogen.

3.11.1 Tratamiento de la muestra en condiciones nativas

50 mL de cultivo se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min y se resuspendió en 8 mL de buffer de unión nativo. Después se le agregó 8 mg de lisozima y se

incubó en hielo durante 30 min. Las células se sonicaron con 7 pulsos de 10 s con 10 s de descanso entre pulsos y finalmente se centrifugaron a 10000 rpm durante 15 min. La fracción soluble se separó y se almacenó a -20°C.

3.11.2 Preparación de la columna con la resina NI-NTA agarose

La resina (2 mL) se colocaron en una columna de 10 mL, se dejó asentar la columna por gravedad y se aspiró el sobrenadante. La resina se lavó 3 veces con agua destilada estéril resuspendiendo por inversión y aspirando el sobrenadante. Finalmente se hicieron 2 lavados con buffer de unión nativo.

3.11.3 Purificación

El lisado celular de la fracción soluble se agregó a la columna y se dejó durante la noche para su unión a la resina, después se dejó asentar la columna y se aspiró el sobrenadante. La columna se lavó con el buffer de lavado nativo buffer de imidazol 20 mM de durante 30 min, enseguida se dejó asentar la resina y se aspiró el sobrenadante. El segundo lavado se realizó con buffer de lavado nativo de imidazol 50 mM y el último lavado fue con buffer de lavado de imidazol 20 mM. La elución se realizó con buffer de elución nativa que contiene imidazol 250 mM de, se mezcló por inversión durante 30 min y la columna se colocó de manera vertical y se permitió asentar la columna para finalmente eluir y coleccionar.

3.12 Ensayo de Actividad SOD

El zimograma se realizó en un gel nativo de acrilamida de acuerdo a lo descrito por Beauchamp, (1971). La proteína se separó en un gel nativo con un gradiente de 4 a 20 %, al terminar la corrida el gel se incubó 25 min con buffer

de fosfatos a pH 7.5 (apéndice A) que contenía NBT 2.5 mM , posteriormente el gel se lavó con agua destilada. El revelado se realizó con buffer de fosfatos que contenía Riboflavina 28 μ M y TEMED 28 mM durante 20 min. Los geles se lavaron con agua destilada y se colocaron en una fuente de luz suave.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Extracción de ARNm

La calidad del ARNm es importante para poder obtener el mensajero de interés. A partir de la raíz de plantas de amaranto sometidas a estrés por sequía y plantas control se extrajo el ARNm. En la Figura 4 se muestra el ARNm obtenido, las flechas señalan los ARN ribosomales, al observar estas dos bandas es un indicativo que el ARN extraído es de buena calidad, está íntegro y se encuentra libre de ADN.

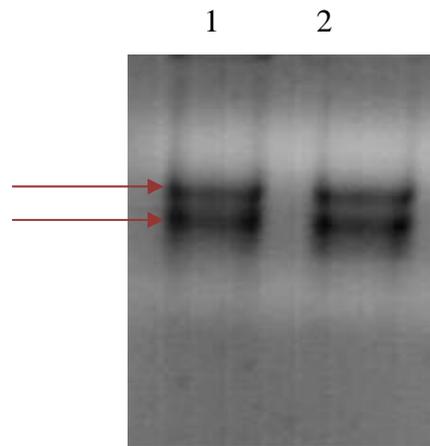


Figura 4. Visualización de bandas de ARN ribosomal de raíz de amaranto en un gel de agarosa.

4.2 Síntesis de la doble cadena de ADNc de amaranto

En la síntesis de la primera cadena se utilizó el oligo dT que se une a la cola de poliA del ARNm y a partir de esta primera cadena se sintetizó la segunda cadena. El número de ciclos para la síntesis de ADNc se optimizó para asegurar que esta se encontraba en su fase exponencial de amplificación. Un total de 30 ciclos fue el óptimo para el caso de raíz de amaranto. La Figura 5 muestra el

ADNc sintetizado, el barrido que se observa a lo largo del carril indica que todos los mensajeros de alto y bajo peso molecular están representados.

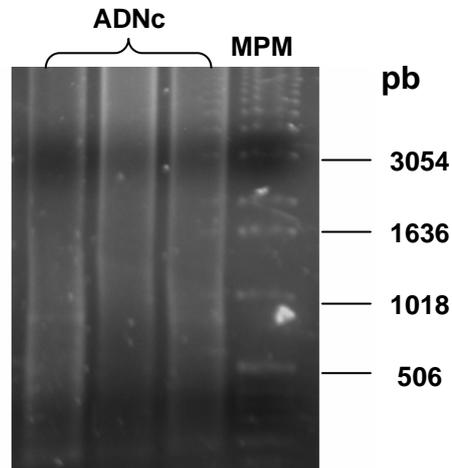


Figura 5. ADNc de doble cadena sintetizado a partir del ARN extraído de raíz de amaranto. MPM=marcador de peso molecular

4.3 Obtención del ORF de SOD de Amaranto

A partir de la secuencia de la proteína obtenida del análisis proteómico de raíz de amaranto bajo estrés por sequía, se realizó un alineamiento con las diferentes SODs con las que presento homología y se diseñaron los oligonucleótidos degenerados Figura 6.

Con estos oligonucleótidos se logró obtener por PCR un fragmento de la SOD de 263 pb (Figura 7a), que fue confirmada por secuenciación. Bajo la premisa que el fragmento obtenido efectivamente correspondía a la SOD Cu,Zn se realizó el RACE para la obtención de los extremos 5' y 3' de SOD, en la Figura 7b se observa el fragmento de SOD de 263 pb, el extremo 3' de SOD y el extremo 5' de SOD, estos dos últimos, como era de esperarse son de mayor tamaño. Los fragmentos se secuenciaron y se analizaron con el programa DNASTar, para el caso del extremo 3' es importante resaltar que se observan 2 fragmentos muy juntos ambos fueron secuenciados y analizados, correspondían a la misma secuencia, la mayor de ellas únicamente la región de poliA era más grande. El ensamble de las secuencias 5'SOD – SOD – SOD 3' nos permitió diseñar oligos específicos con sitios para las enzimas de restricción *MscI* y *XhoI*, lo que hizo posible la clonación del ORF. La amplificación del ORF obtenido fue de 459 pb (Figura 7 c).

El ORF de SOD obtenido de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L) es de 152 aminoácidos, es la primer superóxido dismutasa reportada en amaranto y lo denominamos *AhSOD*. El tamaño del ORF de *AhSOD* (Figura 8), es similar al de las SOD reportadas.

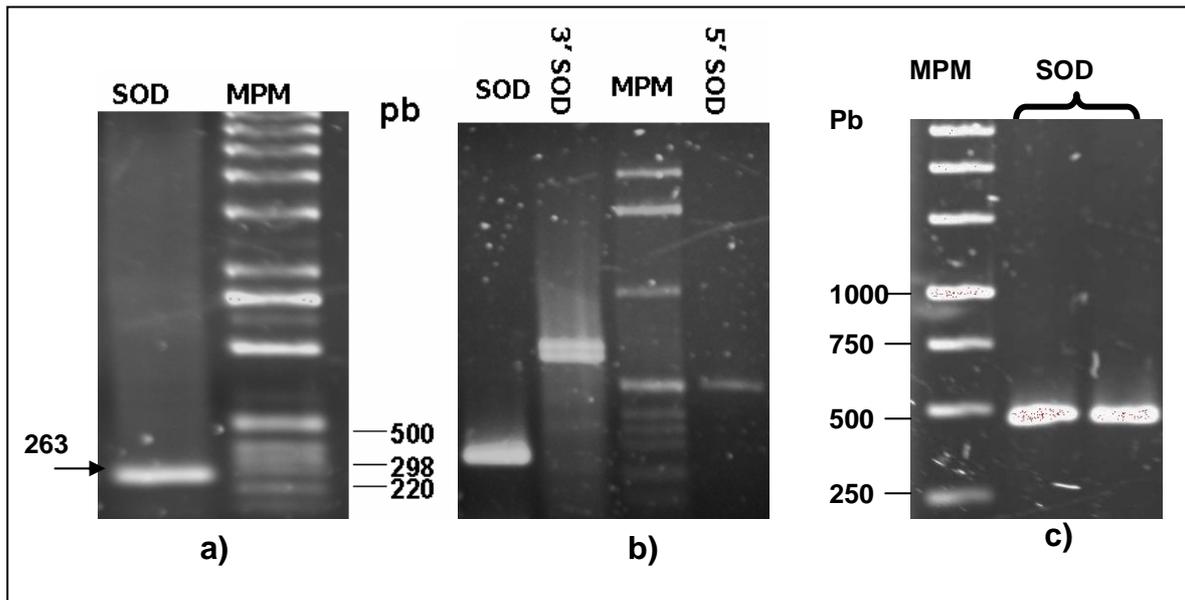


Figura 7. a) Amplificación de un fragmento de SOD con oligos degenerados **b)** RACE para la obtención de los extremos 5 y 3' **c)** Amplificación del ORF completo de SOD.

MGKGVTVLNSSEGVTGTIYFTQEGDGPTTVSGNISGLKPGLHGFHVHALG	50
DTTNGCMSTGPHFNPAGKEHGSPEGDVRHAGDLGNITAGDDGTATFTLID	100
SQIPLSGANSIVGRAVVVHADPDDLGRGGHELCKTTGNAGGRIACGIIGL	150
QG	152

Figura 8. Secuencia del ORF completo de SOD de amaranto (*AhSOD*).

4.4 Análisis bioinformático de la *AhSOD*

El múltiple alineamiento de SODs de diversas plantas a nivel de aminoácidos mostró que la *AhSOD* de amaranto tiene un porcentaje de identidad arriba del 80% con las otras SODs excepto con *Pisum sativum* con la cual tiene un porcentaje de 76.3%. Con la Cu,Zn-SOD de *Spinacia oleracea* posee una identidad del 88%, 86.2% con la de *Potentilla Atrosanguinea*, 84.9 % con la de *Arabidopsis thaliana*, 82.2 % con *Citrus limon* y *Ipomoea batatas* y por ultimo 80.3% con *Oryza sativa* y *Solanum lycopersicum* (Figura 9).

La *AhSOD* conserva las características estructurales y funcionales de enzimas superóxido dismutasa Cu,Zn que han sido estudiadas hasta el momento por comparación de las estructuras tridimensionales y el análisis de las secuencias de aminoácidos conocidas actualmente. Entre las SOD Cu,Zn más estudiadas destacan la bovina, la de espinaca y las enzimas de levadura, de estas, su estructura tridimensional se ha superpuesto a la estructura basada en la alineación de secuencias de 38 diferentes superóxido dismutasas reportadas (Bordo, 1994).

Los residuos conservados de los dominios de actividad en Cobre (Histidina 45, 47 62 y 119) y Zinc (histidina 62, 70, 70 y aspartato 82) (Bordo, 1994) se encuentran en todas las SODs incluyendo la de amaranto, también se encuentran dos residuos de cisteína (56 y 145) que forman un puente disulfuro.

En la Figura 10, se presenta el análisis detallado de los dominios conservados de *AhSOD*: Sitio activo: dominio de unión a Cu, dominio de unión a Zn.

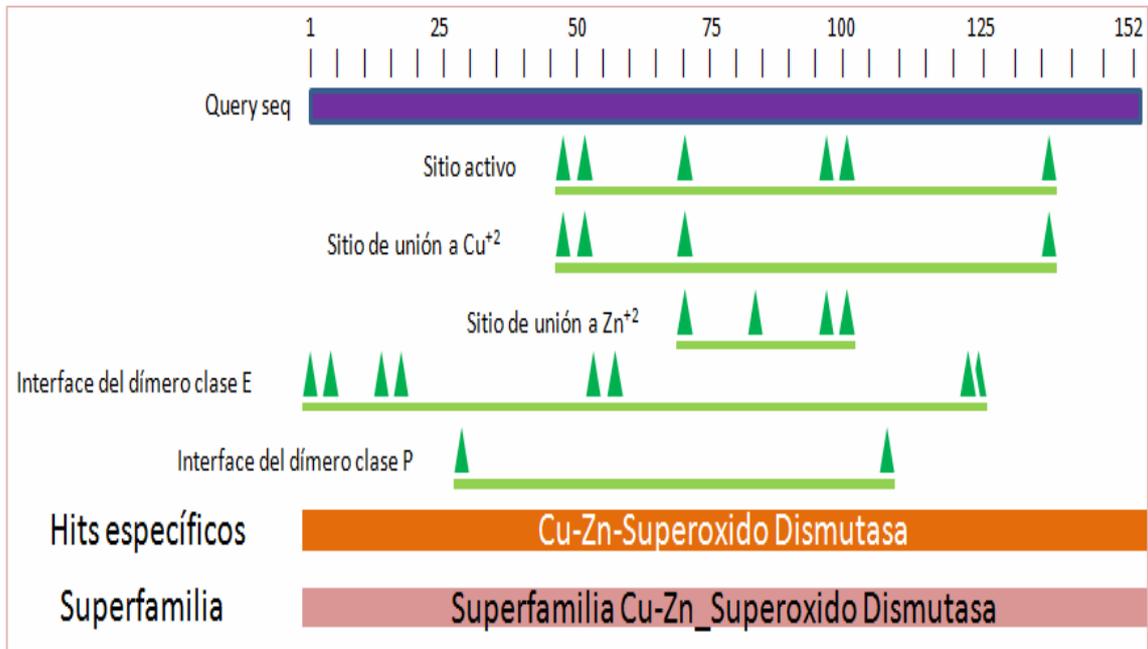


Figura 10. Dominios conservados *AhSOD*. Query (secuencia de *AhSOD*)

4.5 Modelamiento de SOD de Amarantho

La caracterización funcional de la secuencia de proteínas es básica para cuestiones biológicas. Esto se consigue gracias a un modelo tridimensional (3-D) de la estructura de interés. Usualmente, la estructura de una proteína se determina por medio de cristalografía de rayos X, o por espectroscopia NMR, que se almacenan en la base de datos de proteínas (PDB) (<http://www.expasy.org/spdbv/>).

En la ausencia de una estructura determinada experimentalmente, el modelamiento comparativo, o por homología, puede proveer un modelo 3-D útil, relacionado al menos con una estructura conocida. El modelamiento por homología predice la estructura 3-D de una secuencia proteína dada basada en su alineamiento a una o más proteínas de estructura conocida. El modelamiento de la proteína *AhSOD* se realizó por modelaje molecular con el software SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>). La estructura primaria de mayor homología con la *AhSOD* fue la SOD de *P. atrosanguinea* con la cual tiene una identidad del 86.184% y un E-value de

1.55512e-57. El alineamiento de la secuencia problema (*target*) con la SOD de *P. atrosanguinea* (2q21b), así como el análisis de la estructura secundaria que consta básicamente de láminas beta y una pequeña alfa hélice (Figura 11)

Una vez que el programa selecciona el molde basado en la homología de la estructura primaria, la secuencia primaria de la proteína problema se cambia por la de la secuencia de la estructura molde en la estructura tridimensional. En la Figura 12a se muestra la estructura tridimensional de *P. atrosanguinea* (2q21b) utilizado como molde y en la Figura 12b se muestra la estructura tridimensional de la AhSOD modelada donde se puede observar las His 70, 79, 62 y Asp 82 en el sitio de unión a Zinc y los residuos de His45, His 47, His 119 en el sitio de unión a cobre, sitios conservados en todas las SOD Cu,Zn (Bordo 1994). En la Figura 12C se muestra el diagrama de la estructura secundaria donde se observa con mayor claridad la estructuras laminas beta y la pequeña alfa hélice.

TARGET	1	MGKGVTVL	NSSEGVTGTI	YFTQEGDPT	TVSGNISGLK	PGLHGFHVHA
2q21B	1	makgvavl	sssegvagti	lftqegdgpt	tvtnisglk	pghghfvha
TARGET		SSSSSSS	SSSS	SSSS	S	SSSSSSSS
2q21b		SSSSSSS	SSSS	SSSS	S	SSSSSSSS
TARGET	49	LGDTTNGCMS	TGPHFNPAGK	EHGSPEGDVR	HAGDLGNITA	GDDGTATFTL
2q21B	49	lgdttngcms	tgphfnpagk	ehgspedetr	hagdlgnitv	gddgtacfti
TARGET			sss		SSSSSSSS	SSSSSSS
2q21B		hh	sss		SSSSSSSS	SSSSSSS
TARGET	99	IDSQIPLSGA	NSIVGRAVVV	HADPDDLGRG	GHELCKTTGN	AGGRIACGII
2q21B	99	vdkqipltgp	hsiigravvv	hadpddlkg	ghelskstgn	aggriacgii
TARGET		ss	SSSSS	ss	hh	SSSSSSSS
2q21B		ss	SSSSS	ss	hh	SSSSSSSS
TARGET	149	QGLG				
2q21B	149	glqg				

Figura 11. Alineamiento de la secuencia en aminoácidos *AhSOD* (target) con la cadena beta de Cu,Zn SOD de *P. atrosanguinea* (2q21b). S (láminas- β) h (alfa hélice).

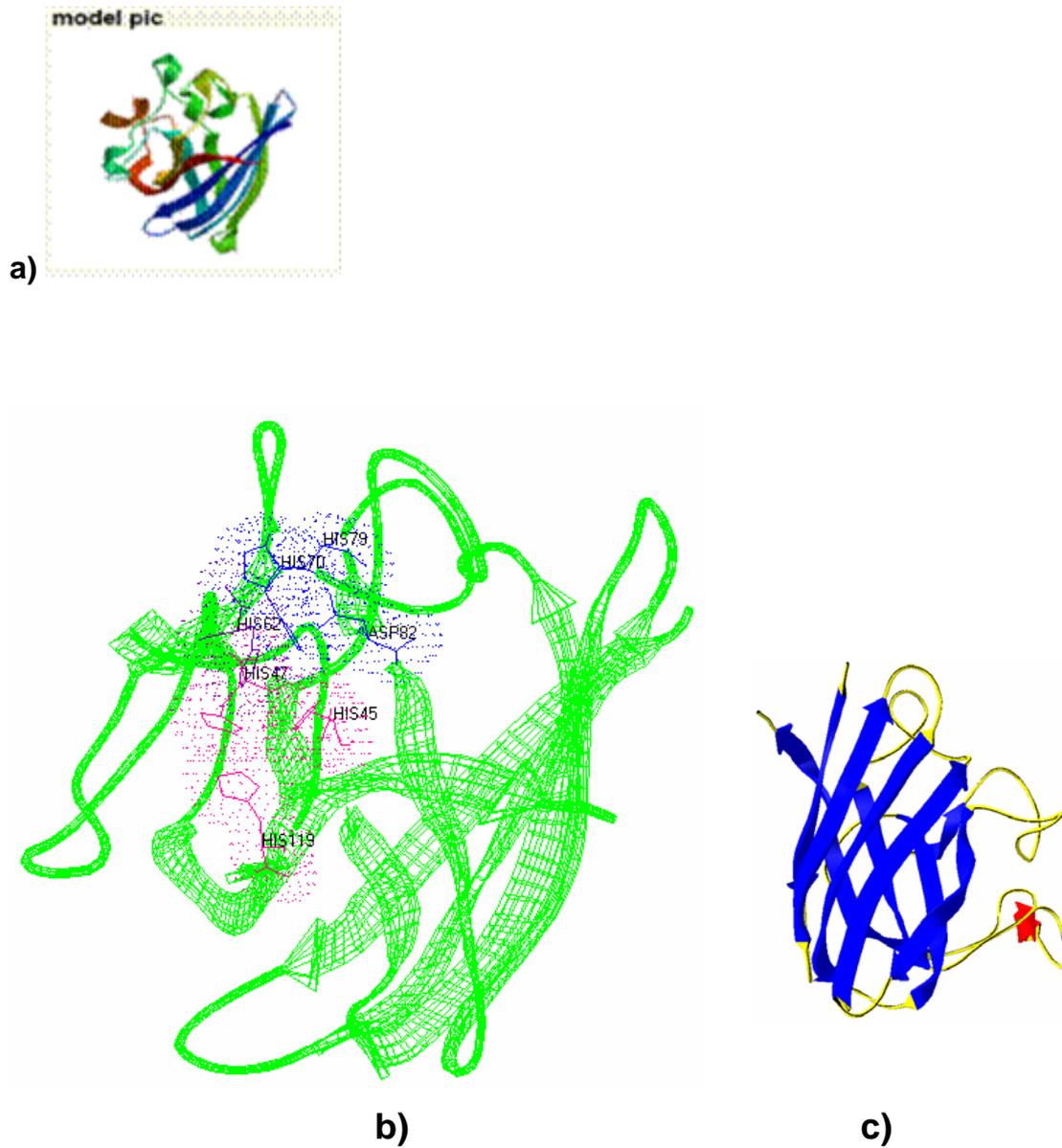


Figura 12. Modelamiento de la estructura secundaria de *AhSOD*. Los sitios de unión a cobre se muestra en color rosa y los de zinc en azul con sus respectivos residuos de aminoácidos (12 b), ambos forman el sitio activo de la proteína. La estructura secundaria de *AhSOD* consiste básicamente en láminas beta (azul) y una alfa hélice (rojo) (12 c).

4.6 Clonación de SOD en PCR4 topo y pET22b(+)

El ORF obtenido de *AhSOD* de 459 pb fue subclonado en el vector pCR4-TOPO y con esta construcción se transformó la células competentes de *E.coli* BL21(D3). La Figura 13 muestra algunas de las clonas analizadas que contienen el vector pCR4-Topo de 4 kb y el inserto de 459 pb correspondiente a *AhSOD* que fue liberado al digerir el plásmido con las enzimas *MscI* y *XhoI*.

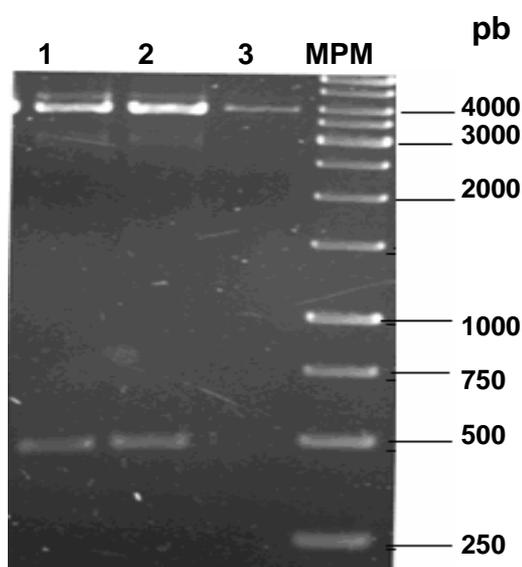
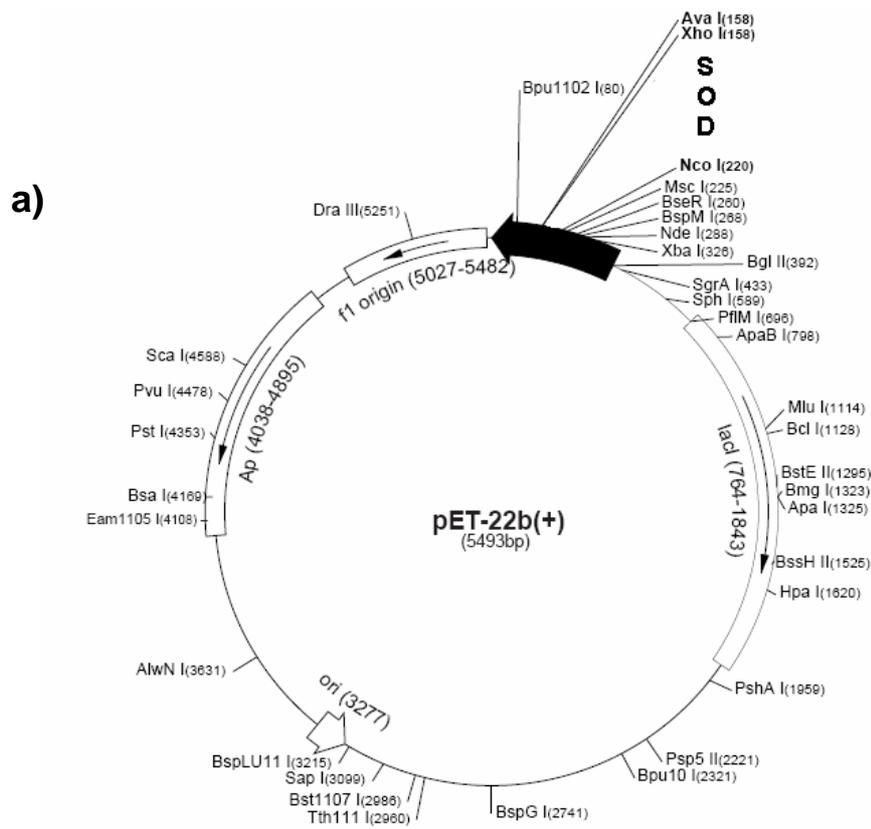


Figura 13. Análisis de restricción de las clonas que contienen la construcción pCR4-TOPO-*AhSOD* con las enzimas *MscI* y *XhoI*. Carriles 1-3 diferentes clonas analizadas, carril 4, marcador de peso molecular.

El fragmento liberado de *AhSOD* fue subclonado en el vector de expresión pET22b(+) (Figura 14 a) y con él se transformó la cepa de *E.coli* BL21(DE3). En la Figura 14 b se muestra las clonas que contenían el pET22b(+) con el inserto *AhSOD*. Las colonias fueron analizadas mediante PCR utilizando los oligos T7 primer y SODR, con los cuales se amplifica el SOD de amaranto (459 pb) y un fragmento del vector pET22b(+) (141 pb) obteniéndose una banda de 600 pb que indica la inserción de SOD en el vector.



b)

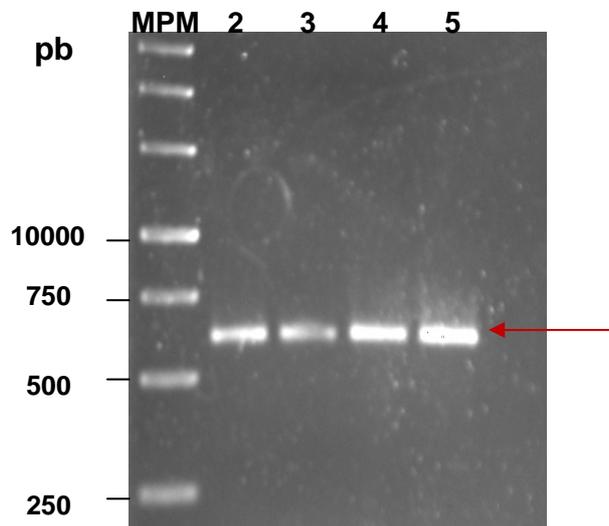


Figura 14. a) Vector de expresión pET22b(+) indicando el sitio de inserción del fragmento del gen *AhSOD*. b) Escrutinio por PCR de las clonas que contienen la construcción pET22b(+)-*AhSOD*. Carril 1 marcador de peso molecular, carriles 2-5 clonas analizadas.

4.7 Análisis electroforético de las proteínas de la fracción soluble e insoluble y cinética de crecimiento de *E.coli* .

La sobre-expresión de la proteína recombinante *AhSOD* se evaluó a diferentes temperaturas (22, 28, 31 y 37 °C), en medio mínimo. Se observó mayor producción de proteína recombinante a una temperatura de 31 °C con una concentración de 1 mM de IPTG. Se analizaron la fracción soluble e insoluble de extractos celulares de *E. coli*, y se encontró proteína recombinante en ambas fracciones. En la Figura 15 a y b se muestra los extractos celulares de la fracción soluble e insoluble respectivamente, se señala la banda correspondiente a la proteína recombinante de *AhSOD* de aproximadamente 16 kDa a diferentes tiempos de inducción con IPTG. La producción de proteínas solubles para la purificación es el paso limitante para el análisis bioquímico y estructural de las proteínas (Esposito, 2006). El porcentaje de proteína total soluble que corresponde a *AhSOD* recombinante se calculo por densitometría el mayor porcentaje de la proteína recombinante (23%) es a las 10 horas post-inducción, después la producción se mantiene en fase estacionaria. Esto también se puede observar en las cinéticas de crecimiento de *E. coli* BL21 DE3 que la mayor cantidad de proteína que expresa *E. coli* es entre las 4 y las 9 horas después de la inducción (Figura16). Los resultados obtenidos del porcentaje de SOD recombinante, concuerdan con el 10-30% de proteína recombinante producida en sistemas de expresión (Dyson et al., 2004).

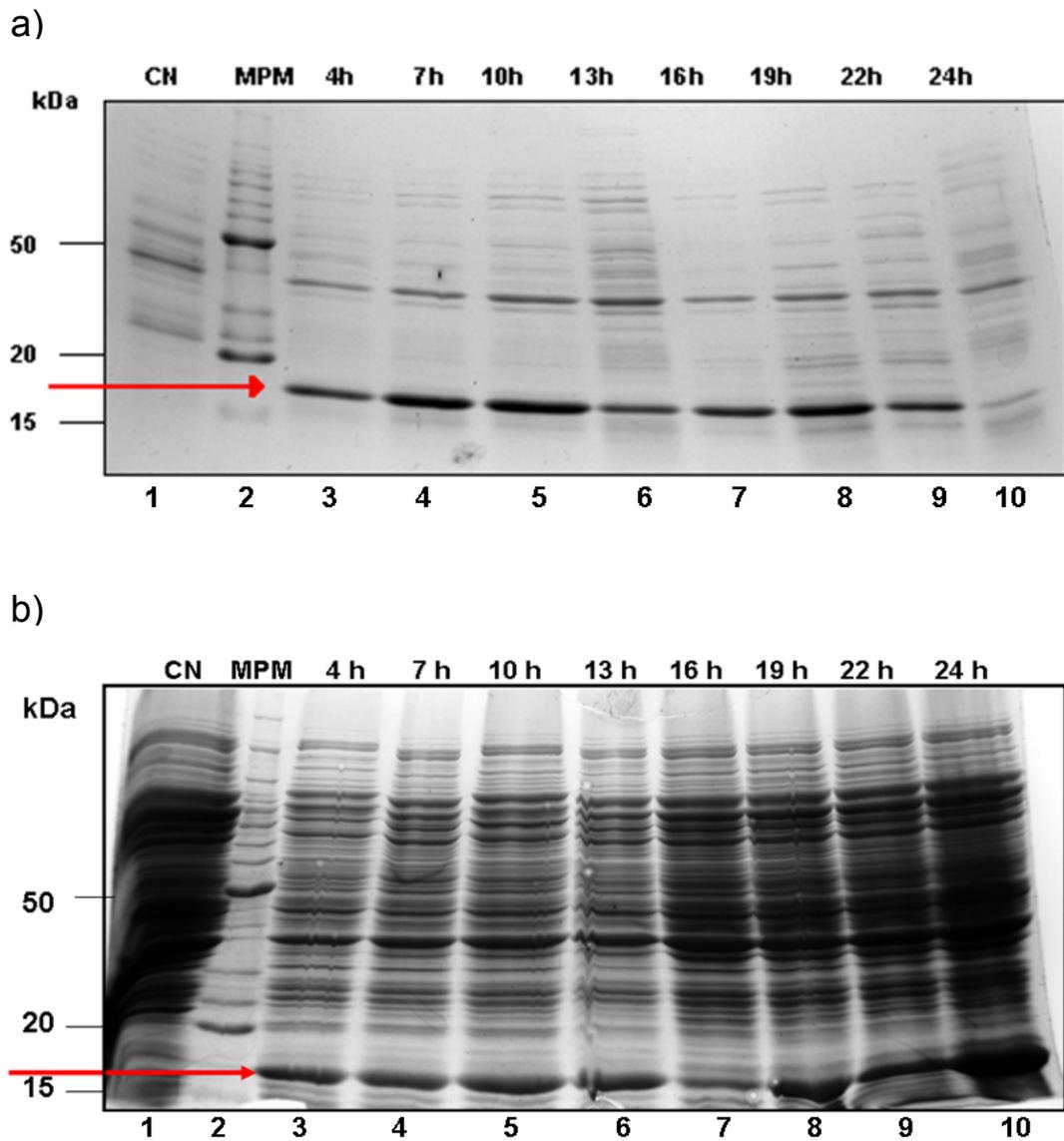


Figura 15. Análisis SDS-PAGE de extractos de a) la fracción soluble y b) de la fracción insoluble de *Escherichia coli* sobre-expresando AhSOD. Carril 1 control negativo (CN), carril 2 marcador de peso molecular, carril 3-10 expresión a las 4, 7, 10, 13, 15, 18, 21 y 24 horas de inducción, respectivamente. La flecha indica la proteína recombinante.

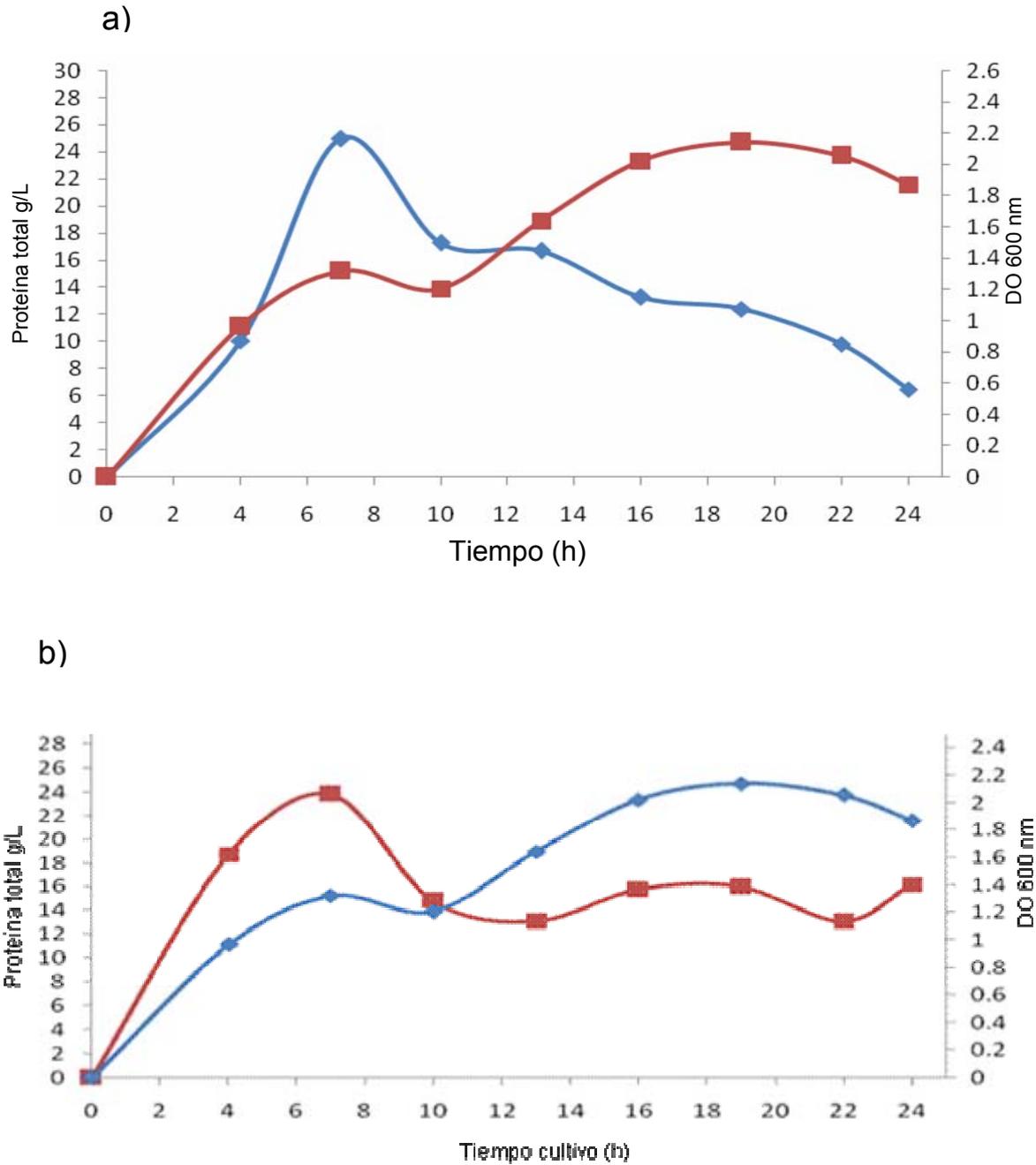


Figura 16. Cinética de crecimiento de *E. coli* conteniendo el plásmido pET22b(+)-AhSOD. a) la fracción soluble. OD_{600 nm} (■) y contenido total de proteína (♦). b) Fracción insoluble. OD_{600 nm} (■) y contenido total de proteína (♦).

4.9 Purificación de AhSOD

La purificación de AhSOD se realizó en columnas de afinidad de Ni-NTA, esto fue posible debido a que la proteína recombinante se fusionó con colas de

histidina en el extremo C-terminal. Para la purificación se inició con las recomendaciones del fabricante, posteriormente se realizaron modificaciones en los lavados y concentraciones de algunos componentes de las soluciones. En la Figura 17 se observa en el carril 2 la fracción soluble total del lisado celular de *E. coli* y en los carriles 3 y 4 la proteína eluida (imidazol 50 y 250 mM de respectivamente). La concentración de la proteína purificada fue baja, por lo que es necesario mejorar las condiciones de unión a la columna debido a que las proteínas solubles del lisado celular se fueron eliminando en los lavados, pero también la proteína recombinante fue disminuyendo.

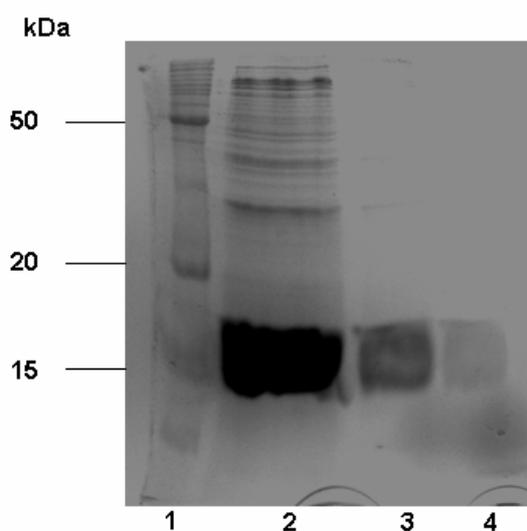


Figura 17. Gel SDS-PAGE de la purificación de *AhSOD* empleando columnas de afinidad a Ni-NTA. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 fracción total soluble del lisado celular, carril 3 elusión de *AhSOD* (imidazol 50 mM), carril 4 elusión de *AhSOD* (imidazol 250 mM).

4.10 Detección de la proteína mediante Western Blot.

Debido a que *E. coli* posee varias SOD, se hizo un análisis mediante western blot utilizando el anticuerpo Anti-His(c-term)-AP (Invitrogen), con este análisis

se confirmó que con la enzima que estamos trabajando efectivamente es la *AhSOD* de amaranto. El western además permitió evaluar la producción de *AhSOD* a diferentes tiempos, confirmando que la máxima expresión de nuestra proteína es a las 7 horas post-inducción (Figura 18).

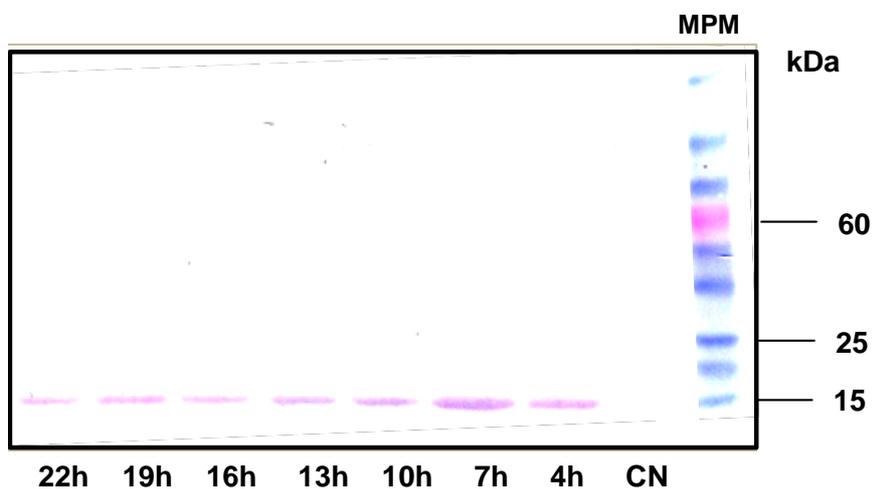


Figura 18. Análisis Western-blot de la sobre expresión de *AhSOD* recombinante.

4.10 Ensayos de Actividad.

Los ensayos de actividad de *AhSOD* recombinante se llevaron a cabo a temperatura ambiente (23°C), por densitometría se determinó la actividad específica de 657 U/mg de proteína recombinante, como control positivo de SOD se utilizó la SOD comercial de bovino, en la Figura 19 se observa la zona acromática correspondiente a la actividad de *AhSOD*.

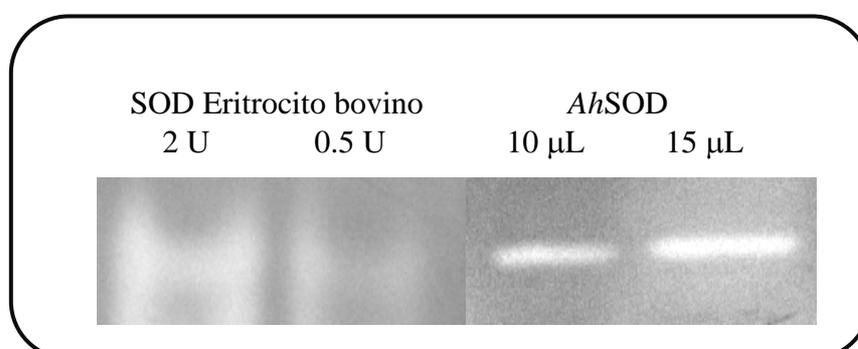


Figura 19. Visualización de la actividad de *AhSOD* en un zimograma. Se utilizó SOD comercial de bovino como control.

Esto indica que ADNc recombinante de *AhSOD* puede expresarse de forma activa en *Escherichia coli* como otras SODs reportadas en arroz (*Oryza sativa*), papa (*Ipomoea batatas*) y papaya (*Carica papaya* L.) (Lin Chi-Tsai y col 1997; Lin Ming-Tse y col 1998; Pan Shu-Mei y col 1999). El rendimiento obtenido fue mayor, pero no en actividad que lo reportado para Cu,Zn de limón y Cu,Zn de papaya (Lin Chi-Tsai y col 1999; Lin Miao-Wen y col 2002). La actividad se puede aumentar si se mejora la purificación de SOD y se obtiene mayor concentración.

V. CONCLUSIONES

- ✓ El ADNc completo de la SOD de amaranto aislado comprende un marco de lectura de 152 aminoácidos.
- ✓ Se realizó la construcción de SOD en el sistema de expresión pET22b(+).
- ✓ El tiempo máximo de expresión de *AhSOD* recombinante fue a las 7 horas post-inducción con IPTG, 1mM, la producción fue de 5.52 g/L (23%) de *AhSOD* respecto a la proteína total.
- ✓ La *AhSOD* expresada en *E. coli* BL21(DE3) es biológicamente activa.

VI. PERSPECTIVAS

- ✓ Modificar las condiciones de purificación para obtener mayor concentración y grado de pureza de *AhSOD*.
- ✓ Ensayos de inhibición con H₂O₂ y cianuro de potasio.
- ✓ Realizar los ensayos de actividad a diferentes temperaturas y pH.
- ✓ Realizar ensayos de cristalización de esta proteína.

VII. REFERENCIAS

Alscher Grene R (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1331-1341.

Beauchamp C y Fridovich I (1971) Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry* 44: 276-287.

Bordo D, Djinovic-Carugo K, Bolognesi M (1994) Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase. *J. Mol. Biol.* 238: 366-368.

Bowler Chris, Montagu Van Marc y Inzé Dirk (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.

Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science.* 218: 443-448.

Dayson MR., Shadbolt SP Vicent KJ., Perera RL., McCfferty J. 2004. Production of soluble mammalian proteins en Echerichia coli: Identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol.* Dec14;4:32.

Espitia Rangel (1994) Breeding of Grain Amaranth. *In amaranth Biology, Chemistry and Technology* (O. Paredes-López, ed.) CRC Press Inc., Boca Raton, FL 34-35.

Esposito D y Chatterjee DK (2006) Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags. *Current Opinion in Biotechnology.* 17: 353–358.

Fridovich Irwin (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.

Gupta Sen A, Webb P Robert, Holaday Scott A y Allen D Randy (1993) Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.* 103: 1067-1073.

Henry (2000) Genetic Engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 36: 108-114.

Lin CT., Lin MT y Shaw J F (1997) Cloning and Characterization of a cDNA for Manganese Superoxide Dismutase from Callus of Sweet Potato. *J. Agric. Food Chem.* 45 :521-525.

Lin MT, Kuo TJ y Lin CT (1998) Molecular Cloning of a cDNA Encoding Copper/Zinc Superoxide Dismutase from Papaya Fruit and Overexpression in *Escherichia coli*. *J. Agric. Food Chem.* 46 :344-348.

McCord Joe E y Fridovich Irwin (1969) An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.

Mckersie D. Bryan, Bowley R Stephen, Harjanto Erni y Leprince Oliver (1996) Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 111:1177-1181.

Mckersie D. Bryan, Bowley R Stephen y Jones S. Kim (1999) Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 119: 839-847.

Mckersie D. Bryan, Murnaghan Julia, Jones S Kim, y Bowley R. Stephen (2000) Iron-Superoxide Dismutase Expression in Transgenic Alfalfa Increases Winter Survival without a Detectable Increase in Photosynthetic Oxidative Stress Tolerance. *Plant Physiol.* 122: 1427-1437.

Moffat S. Anne (2002) Finding new ways to protect drought-stricken plants. *Science.* 296: 1226-1229.

Pan SM, Hwang GB, Liu HC (1999) Over-expression and characterization of copper/zinc-superoxide dismutase from rice in *Escherichia coli*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 40: 275-281.

Paredes López O, Barba de la rosa AP, Hernández López D, Carabez A. Características Alimentarias Y Aprovechamiento agronómico. *Secretaría General de la Organización de Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo científico y Tecnológico.* Washington D.C. 1991 pp 1-20.

Ron Mittler (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7: 405-410.

Shanvindra Bajaj, Jayaprakash Targolli, Li-Fe Lui, Tuan-Hua David Ho y Ray Wu (1999) Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Molecular Breeding.* 5: 493-503.

Tang L., Kwon S.Y., Kim S.H., Kim J.S., Choi J.S., Cho K.Y., Sung C.K., Kwak S.S., Lee H.S. 2006. Enhanced tolerance of potato plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against oxidative stress and high temperature. *Plant Cell Report.* 25, 1380-1386.

Wang Wangxia, Vinocur Basia y Altman Arie (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Review Planta*. 218: 1-14.

Wang F.Z., Wang Q.B., Kwon S.Y., Kwak S.S., Su W.A. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology*. 162, 465-472.

Zelko N Igor, Thomas J Mariani y Rodney J Folz (2002) Superoxide dismutase multigene Family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1) Mn-SOD (SOD2), and ec-SOD (SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radic Biol Med*. 33: 337-349.

Zhang Jingxian, Klueva Y Natalya, Wu Ray Wang, Ho David Tuan-hua y Nguyen T (2000) Genetic engineering for abiotic stress resistance in crop plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 36: 108-114.

APÉNDICE A

PROTOCOLOS

I Extracción de RNA protocolo RNeasy Plus Mini (QIAGEN)

1. En un mortero se colocó nitrógeno líquido el cual se dejó 1 min,
2. En el mortero congelado se trituró la raíz agregando más nitrógeno líquido hasta obtener una cantidad aproximada de 20-30 mg. En un tubo eppendorf se colocó el polvo de raíz
3. Se agregó 600 µL de buffer de lisis RTL (tiocianato de guanidina), se mezcló en el vortex.
4. El lisado obtenido se colocó en la columna RNeasy midi spin column, la cual se ensambló con el tubo colector y se centrifugó a 13 000 rpm durante 3 min,
5. Seguida se recolectó el sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf y se le añadió 600 µL de etanol al 70%, se mezcló por pipeteo y después se colocó en una nueva columna para centrifugar a 10,000 rpm durante 1 min, el filtrado se descartó.
6. A la columna se le adicionó 700 µL de buffer de lavado RW1 (contiene etanol) y se centrifugo a 10 000 rpm durante 1 min y se realizó un segundo lavado.
7. La columna se colocó en un tubo colector nuevo y se le adicionó 500 UL de RPE, se centrifugó a 10,000 rpm por 1 min y el filtrado se descartó, se repitió el lavado con buffer de lavado RPE (contiene etanol)
8. La columna se colocó en un tubo nuevo y se centrifugo a 12,000 durante 1 min.
9. Para la elusión de ARN se transfirió la columna a un tubo eppendorf limpio nuevo y se le adicionó de 50 µL de agua libre de RNAsa, se centrifugó a 12,00 rpm durante 1 min.
10. El ARN obtenido se almacenó a -70°C.

II Síntesis de ADNc

2a. Síntesis de primera cadena de ADN

Reactivo	Volumen (µL)
ARN (2µg)	1
3' oligonucleótido SMART CDS Primer II A (10 Mm)	1
Oligonucleótido SMART II A (10 mM)	1
Agua desionizada	2
Volumen total	5

La mezcla de reacción se colocó en un tubo para PCR se centrifugó brevemente. La reacción se incubó a 70°C durante 2 min.

Reactivo	Volumen (μL)
Regulador de primera cadena 5X	2
DTT (20 mM)	1
dNTPs 50X (10mM)	1
Transcriptasa Reversa super script II	1
Volumen total	5

La primera y la segunda reacción se mezclaron y se incubó a 42°C durante 1h. El producto de la reacción se diluyó con 40 μL de agua milliQ. El producto de la primera cadena se incubó a 72°C y se utilizó para la síntesis de la segunda cadena (Se pueden almacenar a -20°C).

2b. Síntesis de la segunda cadena

Reactivo	Volumen (μL)
MgCl ₂	5
Agua desionizada	74
Regulador 10X buffer PCR	10
dNTPs 50X (10 mM)	2
Oligo 5' PCR Primer II A (10 μM)	2
Taq ADN polimerasa abm	2
Volumen total	95

A la reacción se le agregó 10 μL de ADNc de cadena sencilla. Posteriormente se llevó a cabo la amplificación en el termociclador a las condiciones de amplificación descritas en la siguiente tabla:

No de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	1 min
*30	95	15 s
	65	30 s
	74	7 min
1	74	7 min
1	4	∞

III Células competentes (método de cloruro de rubidio)

1. Las células de *E. coli* se crecieron en 5 mL de LB a 37°C en agitación durante la noche.
2. El preinoculó de 5mL se utilizó para inocular 25 mL de LB, se ajustó a una densidad óptica (D.O.) a 600 nm de 0.1 y se incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar una $D.O._{600} \approx 0.6$.
3. Las células se transfirieron a un tubo centrifuga y se dejaron incubando 15 min en hielo,
4. Se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min
5. Enseguida las células se resuspendieron en RF1
6. Se incubaron nuevamente en hielo y se centrifugaron.
7. Finalmente las células se resuspendieron en RF2 y se distribuyeron en alicotas de 200 μ L para almacenar a -70°C.

IV Transformación choque térmico.

1. Las células competentes se incubaron 15 min en hielo con 1-2 μ L de ADN
2. Se pasaron a 42°C 1 min y enseguida se colocaron nuevamente en hielo durante 10 min.
3. Las células se resuspendieron en 500 μ L de medio de cultivo y se incubaron a 37°C 1h,
4. Se plaquearon en cajas con el medio de cultivo y el antibiótico apropiado
5. Se incubó toda la noche.

V Extracción de ADN plasmídico (QIAprep Spin Miniprep kit)

1. La pastilla celular se resuspendió en 250 μ L de buffer de resuspensión P1 (contiene RNasa A)
2. Se agregó 250 μ L de buffer de lisis P2 (hidróxido de sodio) y se mezcló por inversión,
3. Se agregó 350 μ L de buffer de neutralización N3 (hidroclorido de guanidina, ácido acético), se mezcló.
4. Se centrifugo a 13,000 rpm durante 10 min.

5. El sobrenadante se transfirió a la columna ensamblada al tubo colector y se centrifugo a 13,000 durante 1 min.
6. El filtrado se descartó y se agrego 500 μ L del buffer de unión PB (hidroclorido de guanidina, isopropanol) a la columna y se centrifugo descartando el filtrado.
7. A la columna se le agrego 750 μ L de buffer de lavado PE (contiene etanol) y se centrifugo descartando del filtrado.
8. Se centrifugo nuevamente para eliminar el resto de PE.
9. La columna se colocó en un tubo eppendorf y se le agrego 20-30 μ L de agua milliQ,
10. Se centrifugo y se recupero el filtrado.

SOLUCIONES PARA ARN

Gel desnaturalizante para ARN

10XFA

Reactivo	Cantidad (mM)
MOPS	200
Acetato de sodio	50
E.D.T.A	10
Ajustar pH 7.0 con NaOH. Utilizar agua con DEPC	

MOPS 0.5 M

Reactivo	Cantidad
MOPS	5.235 g
Agua destilada	50 mL
Ajustar a pH 6.8 con NaOH (esterilizar)	

Buffer de corrida

Reactivo	Cantidad (mL)
10XFA	100
Formaldehído al 37% (12.3 M)	20
Agua con DEPC	880

Buffer de carga 5X

Reactivo	Cantidad (mL)
Solución saturada de azul de bromofenol	0.016
E.D.T.A. 250 Mm pH 8	0.160
Formaldehído al 37% (12.3 M)	0.720
Glicerol al 100%	2
Formamida	3.08
10XFA	4
Ajustar con agua con DEPC a 10 mL y guardar a 4°C (es estable 3 meses)	

Agua con DEPC

Reactivo	Cantidad (mL)
Agua milliQ	999
DEPC	1

SOLUCIONES PARA ADN

Reactivos para electroforesis de ADN

Buffer de carga

Reactivo	Cantidad %
Azul de bromofenol	0.25
Xileno cyanol FF	0.25
Glicerol	30

TAE 50X

Reactivo	Cantidad
Tris	242 g
Ácido acético	57.1 mL
E.D.T.A 0.5 M pH 8	100 mL
Ajustar a un volumen de 1L	

Células competentes

Acetato de potasio 1M

Reactivo	Cantidad
Acetato de potasio	4.91 g
Agua destilada	50 mL
Ajustar a pH 7.5 con ácido acético glacial (esterilizar)	

RF1

Reactivo	Cantidad
RbCl	1.2 g
MgCl . H ₂ O	0.99 g
CaCl ₂	0.15 g
Glicerol	15 mL
Esterilizar y agregar 3 mL de acetato de potasio (para un volumen de 100 mL)	

RF2

Reactivo	Cantidad
RbCl	0.12 g
CaCl ₂	1.1 g
Glicerol	15 mL
Esterilizar y agregar 2 mL de MOPS 0.5 M (para un volumen de 100 mL)	

MEDIOS DE CULTIVO**Medio LB**

Reactivo	Cantidad (g/L)
Bactotripton	10
Extracto de levadura	5
NaCl	10
pH final 7.0	

Medio BSG

Reactivo	Cantidad
Solución A	95 %
Solución B	5 %
Agregar 0.1 % de tiamina (preinoculo 5 g/L)	

Solución A

Reactivo	Cantidad
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.32
KH ₂ PO ₄	3.32
Ajustar a pH 7.4 con NaOH	

Solución B

Reactivo	Cantidad (g/L)
Glucosa	5
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1

Buffer de fosfatos (PBS)

Reactivo	Cantidad mM
NaCl	140
Na ₂ HPO ₄	7.2
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2.8
Disolver en agua miliQ y ajustar pH a 7.5	

REACTIVOS SDS-PAGE

Buffer de corrida 10X

Reactivo	Cantidad (g)
250 mM Tris	30
0. 250M Glicina	18.75
0.1 % SDS	10
Disolver y ajustar a un volumen de 1L en agua desionizada	

Tinción con Coomassie

Reactivo	Cantidad
Agua	500 mL
Ácido acético glacial	100 mL
Metanol	400 mL
Azul de coomassie	1 g

Solución de desteñido

Reactivo	Cantidad
Metanol	45 mL
Ácido acético	10 mL
Agua	45 mL

REACTIVOS WESTERN BLOT

Buffer de transferencia Towbin 10X

Reactivo	Cantidad (g)
25 mM Tris	15.1425
192 mM Glicina	72.0672
Ajustar a un volumen de 500 mL con agua desionizada	

Buffer de transferencia Towbin 1X

Reactivo	Cantidad (mL)
Buffer de transferencia 10X	100
20% Metanol	200 mL
Ajustar a un volumen de 1L con agua desionizada	

TBS 10X

Reactivo	Cantidad (g)
200 mM Tris	292.25
5 M NaCl	24.22
Ajustar a un volumen de 1L con agua desionizada	

TBS-T

Reactivo	Cantidad (mL)
TBS 10X	100 mL
0.5 % Tween 20	5
Ajustar a un volumen de 1L con agua desionizada	

Solución AP

Reactivo	Cantidad (g)
0.1 M Tris base	0.121
0.1 M NaCl	0.58
50 mM MgCl ₂	1
Se disuelve en un volumen de 100 mL y se ajusta el pH a 9.5 antes de agregar el MgCl ₂	

REACTIVOS PURIFICACION DE PROTEINA**Buffer stock 10X****Solución A (10X)**

Reactivo	Cantidad (g)
200 mM Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	27.6
5 M NaCl	292.9
Disolver en 800 mL de agua desionizada mezclar y ajustar a un volumen de 1L. Almacenar a temperatura ambiente.	

Solución B

Reactivo	Cantidad (g)
200 mM Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	28.4
5 M NaCl	292.9
Disolver en 800 mL de agua desionizada mezclar y ajustar a un volumen de 1L. Almacenar a temperatura ambiente.	

5X Buffer de purificación nativa

Reactivo	Cantidad (g)
250 mM Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	7
2.5 M NaCl	29.2
Disolver en 180 mL de agua desionizada mezclar y ajustar pH 8.0. Aforar a un volumen final de 200 mL con	

agua desionizada.

3M Imidazol pH 6.0

Reactivo	Cantidad
3 M Imidazol	20.6 g
Stock sol. A (10X)	8.77 mL
Stock sol B (10X)	1.23 mL
Agua desionizada	90 mL
Ajustar pH 6.0 y aforar a un volumen de 100 mL con agua desionizada, si la solución forma un precipitado calentar hasta disolver.	

Buffer de unión nativo

Reactivo	Cantidad (mL)
Agua destilada estéril	80
Native Purification buffer 5X	20
Mezclar y ajustar pH 8.0.	

Buffer de lavado nativo

Reactivo	Cantidad
Native purification buffer 1X	50 mL
3 M Imidazol pH 6.0 (20 mM)	335 μ L
Mezclar y ajustar el pH a 8.0	

Buffer de elusión nativo

Reactivo	Cantidad (mL)
Native purification buffer 1X	13.75
3 M Imidazol pH 6.0 (20 mM)	1.25
Mezclar y ajustar el pH a 8.0	

