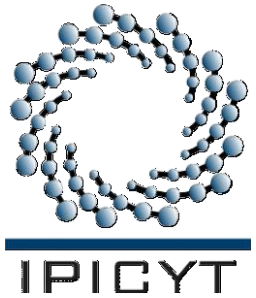


INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN

CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Análisis estructural y funcional de la proteína Bl-ARC perteneciente a la familia de ATPasas AAA de *Bifidobacterium longum*

Tesis que presenta
MABEL GUZMÁN RODRÍGUEZ

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARTHA LETICIA SANTOS MARTÍNEZ

San Luis Potosí, S.L.P., Julio del 2011

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **"ANÁLISIS ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE PROTEÍNAS DE LA FAMILIA DE ATPASAS AAA EN *BIFIDOBACTERIUM LONGUM"***

presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Mabel Guzmán Rodríguez** y aprobada el **dd de Julio de 2011** 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.

_____

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

(Director de la tesis)

_____

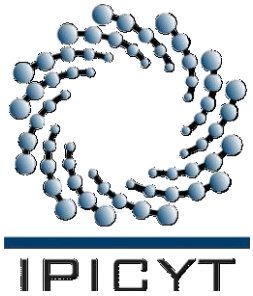
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

(Asesor de la tesis)

_____

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Martha Leticia Santos Martínez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (263350) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo de tesis de Maestría se realizó con el apoyo del Proyecto por Convocatoria-Fondos Sectoriales-SEP-101568 del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

IPICYT

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 080 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 7 días del mes de julio del año 2011, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Martha Leticia Santos Martínez	**Presidenta**	**IPICYT**
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	**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.

Mabel Guzmán Rodríguez

sobre la Tesis intitulada:

Análisis estructural y funcional de la proteína Bl-ARC perteneciente a la familia de ATPasas AAA de Bifidobacterium longum

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Martha Leticia Santos Martínez

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:00 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 7 días del mes de julio de 2011.

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.
IPICYT
SECRETARIA ACADEMICA

Contenido

Página

Constancia de aprobación de la tesis ii

Créditos institucionales iii

Acta de exámen iv

Dedicatorias v

Agradecimientos vi

Contenido vii

Lista de figuras ix

Lista de tablas x

Resumen xi

Abstract xii

Introducción 1

Resultados

1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

1.1 Alineamiento de secuencias de proteínas pertenecientes a la superfamilia de proteínas AAA. Dominio ATPásico. 3

1.2 Modelo tridimensional *in silico* de la estructura de la proteína IPR003593. 3

1.3 Árbol filogenético de la superfamilia AAA y nueva nomenclatura. 6

2. ANÁLISIS EXPERIMENTAL

2.1 Cultivo de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis.* 8

2.2 Extracción del ADN genómico de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. 8

2.3 Amplificación del gen (NCBI *IPR003593*) por la Reacción en Cadena de la Polimerasa. 8

8

2.4 Clonación en Sistema TOPO4. 8
2.5 Subclonación en el vector de expresión pET28a+. 8
2.6 Expresión heteróloga de la proteína Bl-ARC en *E. coli* BL21pLysS. 8
2.7 Purificación de la proteína Bl-ARC por cromatografía de afinidad (Ni^{2+}). 11
2.8 Detección de la proteína Bl-ARC por Western blot. 11
2.9 Actividad ATpásica. 14
3.0 Parámetros cinéticos. 14
Discusión 17
Materiales y Métodos
1. Análisis Bioinformático. 21
2. Cultivo de *Bifidobacterium longum subsp*. infantis. 21
3. Extracción del ADN genómico de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis.* 21
4. Amplificación del gen (NCBI *IPR003593*) por la Reacción en Cadena de la Polimerasa. 21
5. Clonación en Sistema TOPO4. 22
6. Subclonación en el vector de expresión pET28a+. 22
7. Expresión heteróloga de la proteína Bl-ARC en *E. coli* BL21pLysS. 22
8. Purificación de la proteína Bl-ARC por cromaotgrafía de afinidad (Ni^{2+}). 22
9. Detección de la proteína Bl-ARC por Western blot. 22
10. Actividad ATPásica. 23
11. Parámetros cinéticos 23
Números de acceso 23
Referencias 24
Material suplementario 26

Lista de figuras

Página

Figura 1. Análisis en secuencia de aminoácidos de Bl-ARC. 4

Figura 2. Representación en listones del modelo de una subunidad de la proteína Bl-ARC, reconstrucción tridimensional *in silico* obtenida con el servidor I-TASSER. 5

Figura 3. Árbol filogenético de la familia de proteínas AAA. 7

Figura 4. PCR del gen *IPR003593* (NCBI). 9

Figura 5. Digestiones de clonas positivas en pET28a+. 9

Figura 6. Expresión de la proteína Bl-ARC en *E. coli* BL21pLysS. 10

Figura 7. Purificación de la proteína Bl-ARC por cromatografía de afinidad (Ni-NTA). 12

Figura 8. Western blot de la proteína en condiciones desnaturalizantes. 12

Figura 9. Western blot de la proteína Bl-ARC en condiciones nativas. 13

Figura 10. Ensayos de actividad ATPásica. 15

Lista de tablas

Página

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la proteína Bl-ARC. 15

Tabla 2. Comparación de velocidad máxima de actividad ATPásica de varias proteínas AAA+ incluyendo a Bl-ARC (adaptado de Wolf et al., 1998). 20

Resumen

Análisis estructural y funcional de la proteína Bl-ARC perteneciente a la familia de ATPasas AAA de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis.*

La familia de proteínas AAA (***A***TPasas ***A***sociadas a diversas ***A***ctividades celulares) se encuentran involucradas en importantes procesos celulares como la proteólisis y el desdoblamiento-plegamiento de las proteínas. Las proteínas AAA+ se encuentran presentes en todos los reinos de vida y contienen un domino ATPásico altamente conservado, denominado módulo AAA. Este dominio posee 200 a 250 residuos de aminoácidos y lo conforman tres motivos: Walker A (reconoce el sustrato ATP), Walker B (unión al cofactor Mg^{+2}) y una segunda región de homología (SRH) la cual distingue a estas ATPasas AAA+ de otras familias.

En este proyecto nosotros utilizamos a *Bifidobacterium longum* como modelo de estudio para caracterizar proteínas presentes en eucariontes superiores*. B. longum* es una bacteria Gram positiva anaerobia obligada; ésta bacteria habita el tracto gastrointestinal en mamíferos. Los estudios de esta bacteria se han enfocado a sus efectos benéficos en la mejora del entorno intestinal, el mantenimiento del sistema inmune, en la homeostásis, el combate contra infecciones, y el favorecimiento de la fuerza ósea e inhibición de la carcinogénesis.

En el genoma de *Bifidobacterium longum* se han localizado 30 ATPasas AAA+ hipotéticas, dentro de las cuales seleccionamos al gen hipotético *IPR003593 AAA+*, cuya secuencia de amino ácidos contiene 72% de identidad de los dominios AAA antes descritos.

Debido a que se desconoce la función de esta proteína, se realizó la clonación y expresión del gen antes mencionado en *E. coli* para dilucidar su actividad enzimática, así como el análisis de su estructura tridimensional, con el objetivo de descubrir su función y participación en procesos celulares.

PALABRAS CLAVE.
Probióticos
Bacterias Gram Positivas
Metaloproteasas
Dominios Walker A y B
Segunda Región de Homología

Adaptado al Journal of Molecular Biology

Abstract

Structural and functional analysis of the Bl-ARC protein that belongs to the AAA ATPase family of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis.*

The AAA+ protein family (**A**TPases **A**ssociated with diverse cellular **A**ctivities) is involved in important cellular processes as proteolysis and protein folding/unfolding. The AAA+ proteins are found in all kingdoms of life and have a highly conserved domain called AAA+ module. This domain has 200 to 250 amino acid residues and comprises three motifs: Walker A (recognizes the substrate ATP), Walker B (binding to the cofactor Mg^{+2}) and a Second Region of Homology (SRH) which distinguishes these ATPases from other families.

In this study we used *Bifidobacterium longum* as a model microorganism to dilucidate key mechanisms of the proteins present in higher eucaryotes. It is an obligated anaerobic Gram positive bacteria, that belongs to the flora of the gastrointestinal tract in mammals. Studies of this bacteria have been focused on the fact that provides beneficial effects; especially those describing his involvement in improving the intestinal environment, the maintenance of a healthy immunological system, fighting infections, the bone strength and inhibition of carcinogenesis.

Bifidobacterium longum genome contains 30 hypothetical AAA+ ATPases, from these, we have selected the hypothetical gene *IPR003593 AAA+*, and its amino acid sequence shows 72% identity to the AAA domains above described.
Due to the unknown function of this protein, the purpose of this project was to elucidate the structure and enzymatic activity by cloning and expressing the gene in *E. coli* to establish its function and participation in cellular processes.

KEY WORDS.
Probiotics
Gram positive bacteria
Metalloproteases
Domains Walker A and B
Second Region of Homology

Adapted to the Journal of Molecular Biology

INTRODUCCIÓN

Las ATPasas AAA (***A***TPases ***A***ssociadas a diversas ***A***ctividades celulares) (Frohlich *et al*., 1995) conforman una gran familia de proteínas, las cuales tienen numerosas funciones celulares, por ejemplo, participan en la regulación del ciclo celular, la proteólisis (Dougan *et al*., 2002), el desdoblamiento, la biogénesis de organelos y en el transporte celular (Ogura, 2001).

Algunas de las ATPasas participan como chaperonas moleculares, como subunidades de complejos proteolíticos o como proteasas independientes, que pueden actuar como helicasas de ADN y como factores transcripcionales (Neuwald *et al*., 1999).

Las proteínas AAA+ se localizan en todos los organismos y presentan un domino AAA altamente conservado, denominado, módulo AAA (Swaffield *et al*., 2008). Este dominio está formado por 200 a 250 aminoácidos, entre los cuales podemos encontrar tres motivos, 1) Walker A (Reconoce el sustrato ATP), 2) Walker B (Unión al cofactor Mg^{+2}), 3) una segunda región de homología responsable de la unión de ATP e hidrólisis (Walker *et al*., 1982).

Esta familia de proteínas pertenece a la superfamilia de proteínas AAA+, que es además subclasificada en seis divisiones principales: Metaloproteasas, Meiosis/ Mitocondria, Secreción/Neurotransmisión, Subunidades del 26S de Proteosoma, Ciclo de división celular y peroxisomas. Muchas de las proteínas de la familia de las proteínas AAA están asociadas a las membranas de organelos, proteínas como Afg2p se han localizado únicamente en citosol, mientras que las metaloproteasas las encontramos en las mitocondrias y cloroplastos en las células eucariotas (Ogura & Wilkinson, 2001).

Estas proteínas se ensamblan formando oligómeros que pueden formar estructuras anilladas con un poro central. También, son motores moleculares que se asocian a ATP, produciendo hidrólisis y pudiendo llegar a modificar sus estados conformacionales, lo que les permitirá actuar sobre la remodelación del sustrato blanco (Vale, 2000. Martin *et al*., 2005).

Es importante mencionar que existen enfermedades que están relacionadas a las mutaciones localizadas en los dominios conservados que caracterizan a estas proteínas, como lo pueden ser: la alteración del mediador de la transformación oncogénica y leiotomioma uterino por modificación en el complejo c-Myc, trastornos del movimiento, distonía temprana (contracciones del músculo), mutaciones en tirosina A y la paraplejia espástica recesiva hereditaria autosómica (HSP) causada por alteraciones en la proteína mitocondrial m-AAA (Ozelius, 1997).

El microorganismo modelo para el estudio es *Bifidobacterium longum*; bacteria anaerobia obligada, Gram positiva. Posee un cromosoma circular y su genoma está constituido por 2, 832,748 pares de bases de longitud con un 60% de contenido de GC (Sela *et al*., 2008).
Se conocen 32 especies de bifidobacterias, de las cuales algunas se han aislado de la cavidad intestinal y vaginal humana, pero la gran mayoría pertenecen a la flora del

tracto gastrointestinal de mamíferos (Ventura *et al*., 2004). Las bifidobacterias tienen un metabolismo hexosa único que ocurre a través de una vía fosfoquetolasa, la cual utiliza una enzima fructosa-6-fosfato fosfoquetolasa, por lo tanto oxidan la glucosa 6 fosfato a 6 gluconolactona que luego, descarboxilan para producir pentosa fosfato, ésta a su vez, se rompe en triosa y acetil fosfato mediante la enzima fosfoquetolasa. Pertenecen al grupo de las bacterias heterofermentativas (productoras de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono), en particular este género de bacterias posee como característica la producción de ácido láctico y ácido acético como principales productos derivados de la fermentación de la glucosa (De Vries & Stouthamer, 1968).

Bifidobacterium longum se localiza en el tracto gastrointestinal humano, colaborando a que exista un equilibrio en la salud intestinal (Ishibashi *et al*., 2001).
El intestino puede verse afectado debido por perturbaciones de su microflora nativa causada por diversos factores como los cambios en alimentación, la toma de antibióticos y otros medicamentes, el estrés, el envejecimiento o el consumo de alcohol (Turroni *et al*., 2008). Las bifidobacterias son microorganismos comensales que se localizan en regiones específicas a lo largo del tracto gastrointestinal y son considerados como probióticos porque ayudan a mejorar la salud del huésped.
Trabajos científicos han demostrado especialmente que el *Bifidobacterium longum*:

- Contribuye en el mantenimiento del sistema gastrointestinal, mejora la microflora de adultos proporcionando resistencia a las infecciones (el número de bifidobacterias disminuye con el envejecimiento) (Dunne *et al*., 1999).
- Tienen acción inmunoestimulante (induce la producción de anticuerpos específicos y no específicos) y antiinfecciosa (las bifidobacterias producen el ácido acético cuya acción bactericida es responsable de la destrucción de bacterias perjudiciales como *Escherichia coli*) (Hoarau *et al*., 2008).
- Evitan la diarrea provocada por la administración de antibióticos.
- Mejoran el entorno intestinal, al disminuir el contenido en amoníaco de las deposiciones, la actividad de ciertas enzimas fecales y aumenta la frecuencia de las deposiciones.
- Inhiben el desarrollo del cáncer (Yazawa, 2000-2001. Reddy, 1999. Fujimori, 2006).
- Juegan un papel en el refuerzo de los huesos, probablemente al mejorar la absorción de calcio.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

1.1 Alineamiento de secuencias de proteínas pertenecientes a la superfamilia de proteínas AAA. Dominio ATPásico.

El gen *IPR003593 de B. longum* subsp*. infantis* codifica para una proteína de 521 aminoácidos, a la que denominamos Bl-ARC (Ver sección 1.3). El alineamiento de algunas secuencias pertenecientes a esta familia de proteínas y la proteína Bl-ARC revela que la proteína en estudio posee los 3 dominios altamente conservados y característicos de las proteínas AAA+ que son de vital importancia por su función catalítica (Figura 1).

La conservación en secuencia de los motivos Walker A y B, nos indica que la proteína posee los sitios conocidos como los responsables de la unión a los mononucleótidos (conocido como el dominio P-loop NTPase) (Beyer-Andreas, 1997). El plegamiento de estas cadenas está conformado por cinco láminas β (Database SCOP en http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop). Por otro lado la presencia de la segunda región de homología nos indica que la proteína es capaz de hidrolizar el ATP. Lo que nos sugiere que la proteína puede tener funciones catalíticas y puede participar en los eventos celulares como motor generador de energía.

1.2 Modelo tridimensional *in silico* de la estructura de la proteína IPR003593.

El modelado de proteínas facilita la visión espacial y permite superar la dificultad de ubicar los aspectos tridimensionales de la estructura molecular, para comprender el aspecto espacial de estas biomoléculas debido a que no son simples imágenes estáticas, son virtuales o activas, logrando quizá enfocar su implicación en distintos procesos biológicos y biotecnológicos (Sali *et al*., 1993).

Nuestro modelado se basó en la predicción por comparación, en la que se recurre a una biblioteca de estructuras conocidas, utilizando estructuras resueltas como puntos de partida o plantillas. Esta metodología es efectiva puesto que a pesar de la enorme cantidad de proteínas existente, hay un conjunto limitado de motivos estructurales que hacen distintivas a algunas de las familias de proteínas. Con base en esta evidencia se ha sugerido que sólo existen alrededor de 2,000 plegados proteínicos diferentes en la naturaleza, mientras que existen varios millones de proteínas diferentes.

El método se basa en la suposición razonable de que dos proteínas homólogas compartirán estructuras muy similares. Puesto que un plegado proteínico está evolutivamente más conservado que su secuencia de aminoácidos, una secuencia problema puede modelarse con una precisión razonable sobre una plantilla relacionada muy distante, siempre que la relación entre el problema y la plantilla sea perceptible en el alineamiento de sus secuencias. Se ha sugerido que el principal cuello de botella en el modelado comparativo proviene más de las dificultades en el alineamiento que de los errores en la predicción de la estructura. Concluyendo que el modelado por homología es más preciso cuando el problema y la plantilla tienen secuencias similares.

Este análisis nos permitió visualizar el plegamiento de esta proteína, indicándonos que el sitio catalítico (A, T, N, R, P, D, G), está expuesto en la parte hidrofílica de la subunidad para que se facilite la unión al sustrato, por otro lado fue posible identificar

las láminas β y las hélices α que conforman el dominio N-terminal, así como el dominio C-terminal de la proteína (Figura 2).

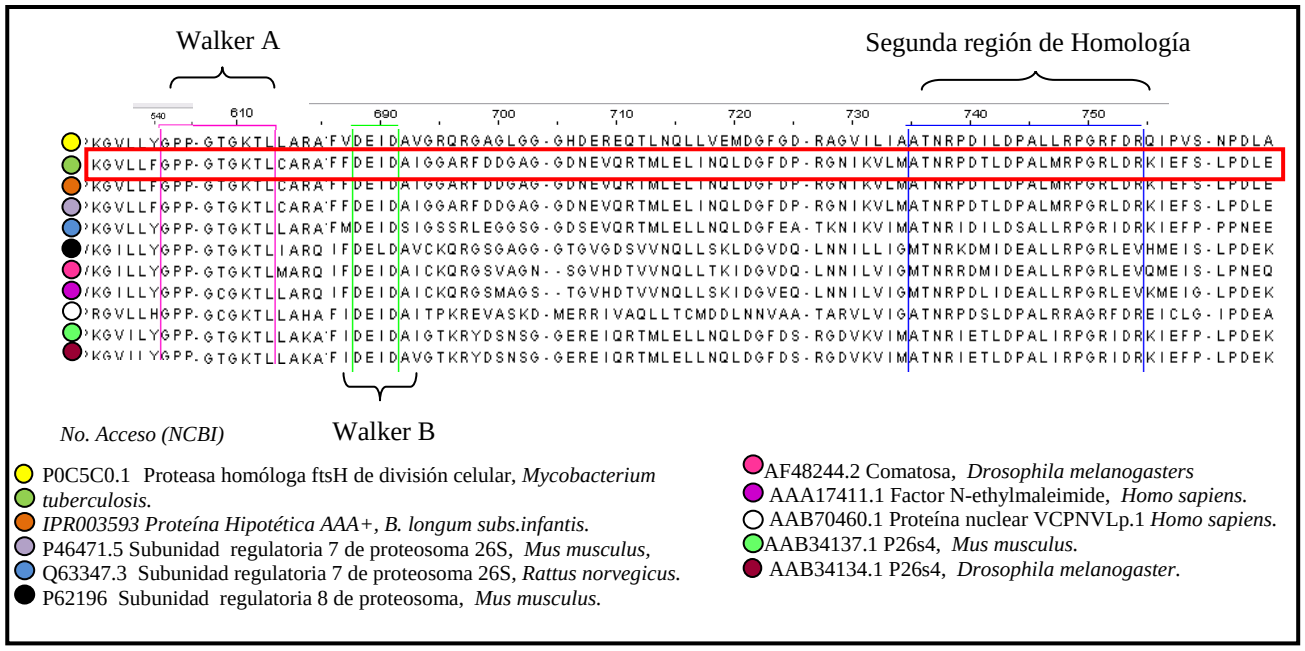
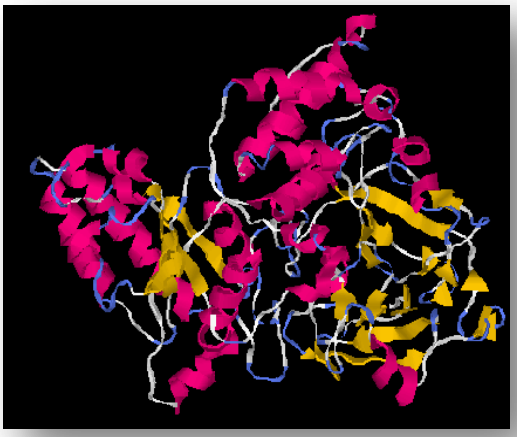


Figura 1. Análisis en secuencia de aminiácidos de la proteína IPR003593. Comparación de alineamientos de secuencias de aminoácidos del dominio ATPásico entre IPR003593 (recuadro rojo) de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* y 150 secuencias de aminoácidos elegidas del árbol filogenético de la familia de proteínas AAA (solo se muestran 10 secuencias representativas). El recuadro rosa denota el dominio conservado Walker A (participa en el reconocimiento del ATP), en verde Walker B (participa en la unión al cofactor Mg^{2+}), así como la segunda región de homología SRH (participa en la hidrólisis de ATP).

A)



B)

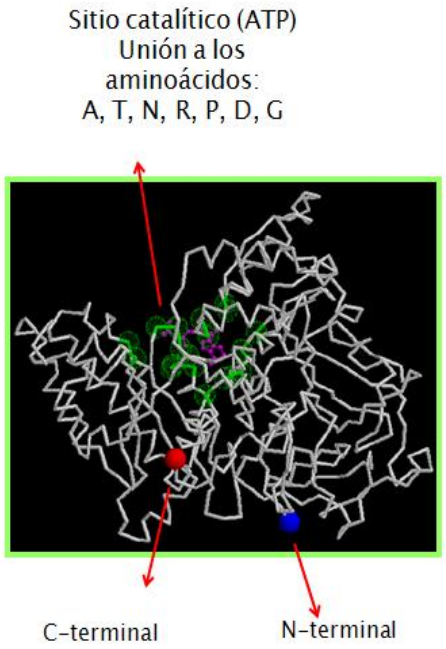


Figura 2. Representación en listones del modelo de una subunidad de la proteína Bl-ARC, reconstrucción tridimensional *in silico* obtenida por medio del servidor I-TASSER. A) Imagen generada tomando como modelo la proteína de transporte 3CF; las regiones en rosa indican hélices α, mientras que las amarillas están conformadas por láminas β. B) Muestra el domino ATNRPDG expuesto formando una invaginación que facilita la unión al sustrato (ATP) al formarse el poro interno conformado por el ensamblaje de las seis subunidades. El círculo rojo denota el carboxilo terminal de la proteína y el azul la parte amino terminal.

1.3 Árbol filogenético de la Superfamilia AAA y nueva nomenclatura.

Para establecer las relaciones filogenéticas de la proteína se generó el árbol filogenético con las secuencias conocidas de las familias de las proteínas AAA. Con este fin y buscando la mejora de los métodos computacionales para el tratamiento de la información, se han introducido un número interesante de algoritmos para la clasificación mediante árboles filogenéticos. Dentro de estos métodos se encuentra el programa CLANS (Cluster Analysis of Sequences), (Frickey, 2004-B), el cual fue elegido para lograr obtener información más cercana sobre el posicionamiento de la proteína hipotética dentro de las subclasificaciones de esta gran familia de proteínas. CLANS posiciona en tercera dimensión a familias de proteínas basadas en la comparación de similitud en parejas de secuencias, satisfaciendo ciertas propiedades razonables con algoritmos que pueden construir árboles filogenéticos para un conjunto de secuencias de aminoácidos y extraer de entre ellos los que sean óptimos en la comparación para generar un nuevo árbol y lograr la ubicación más adecuada para la proteína.

Gracias al alineamiento y construcción del árbol filogenético con la proteína hipotética de interés (IPR003593) contra miles de proteínas pertenecientes a esta gran familia de proteínas, fué posible dilucidar que la proteína Bl-ARC se ubica dentro del subgrupo de las proteínas ARC (AAA ATPase forming Ring-shaped Complexes), cuya característica es la formación de complejos hexaméricos, así como su actividad ATPásica AAA (Figura 3). Con esta clasificación fue posible asignar a la proteína una nueva nomenclatura: Bl-ARC (*Bifidobacterium longum* ARC).

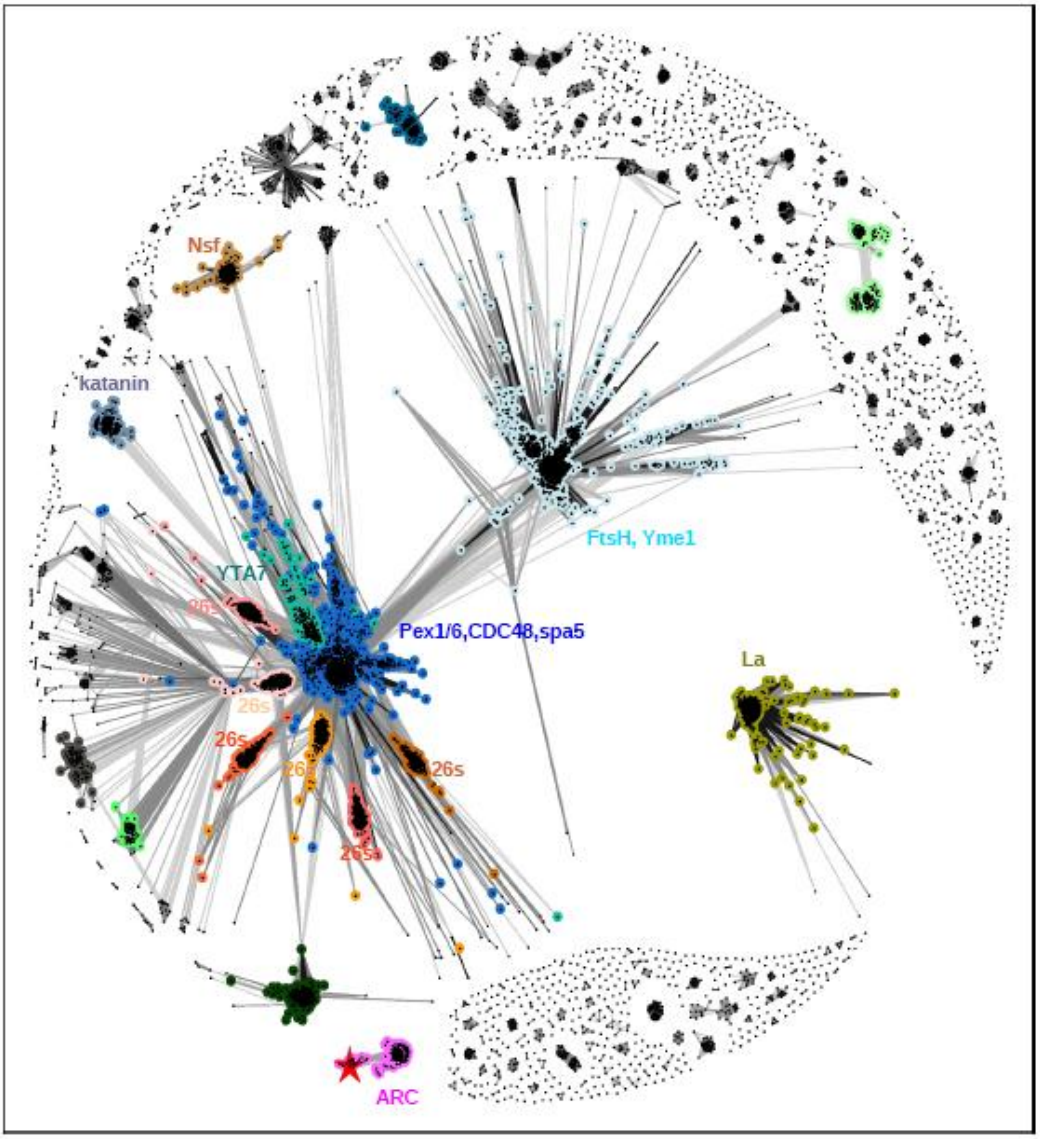


Figura 3. Árbol filogenético de la familia de proteínas AAA. La proteína Bl-ARC pertenece a la subfamilia AAA-ARC. Cada uno de los puntos representa una proteína, mientras que las líneas rectas agrupan a una subfamilia de proteínas que pertenecen a la superfamilia de proteínas AAA. La proteína se agrupó dentro del subgrupo denominado ARC (estrella roja en la parte inferior de la Figura). Esta secuencia de aminoácidos pertenece a proteínas que forman complejos de anillos hexaméricos (ARC-AAA ATPase forming Ring-shaped Complexes); según datos reportados (Wolf et al., 1998) esta proteína puede tener una función potencial de chaperona en la vía de degradación vía proteosoma.

2. ANÁLISIS EXPERIMENTAL

2.1 Cultivo de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

Bifidobacterium longum se creció en un medio rico en proteínas y sales (MRS), en cajas de anaerobiosis. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación (12,000 xg, 10 minutos).

2.2 Extracción del ADN genómico de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*.

Se extrajo el ADN genómico de *Bifidobacterium longum* de la pastilla de células recuperada del cultivo utilizando la técnica de lisis alcalina (material suplementario), logrando obtener 200 ng/µl de ADN.

2.3 Amplificación del gen (NCBI *IPR003593*) por la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Con el fin de obtener un gran número de copias del gen *IPR003593*, utilizando a secuencia del gen de la base de datos (NCBI) con el juego de oligonucleótidos que incluye los sitios de corte reconocidos por las enzimas de restricción *NdeI* (Extremo 5') y *XhoI* (extremo 3'), fusionados a 6 histidinas en el C-terminal para su amplificación en base a los fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figura 4).

2.4 Clonación en Sistema TOPO4.

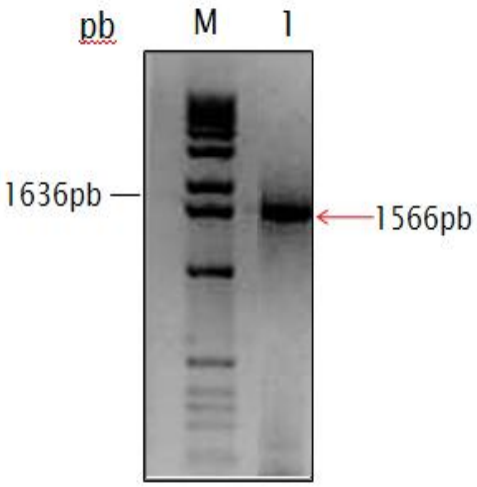
El amplicón de 1,566 pb se clonó en el vector TOPO 4, este sistema permite la inserción directa de productos de PCR con inserciones de adeninas en cada uno de los extremos al final de la amplificación, ligándose con los extremos de timina que posee el vector, el vector a su vez contiene una topoisomerasa que forma el enlace covalente para la unión de los extremos. Para confirmar la inserción del gen clonado en el vector se realizó una digestión del plásmido (TOPO 4) con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* cuyos sitios de corte estaban previamente diseñados en la construcción de los oligonucleótidos. Adicionalmente se enviaron a secuenciar las clonas positivas (Bl-ARC + pET28+) para confirmar su identidad.

2.5 Subclonación en el vector de expresión pET28a+.

El gen clonado en el vector TOPO4 se subclonó en el plásmido de expresión pET28a+, el cual es regulado por el promotor T7 (Invitrogen), el cual se aisló por digestión del vector topo 4 y se ligó en el mismo sitio enzimático de pET28a+. La digestión doble del gen y del vector fué realizada con las enzimas *NdeI* y *XhoI* . La ligación se realizó con una relación 1:3 (vector: inserto) (Figura 5).

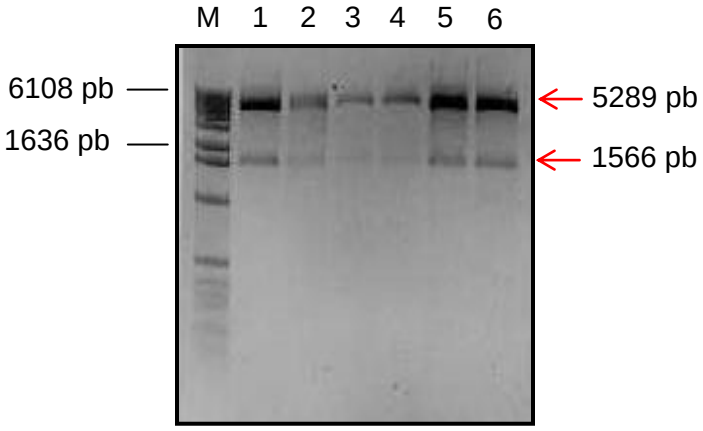
2.6 Expresión heteróloga de la proteína Bl-ARC en *E. coli* BL21pLysS.

La inducción de expresión de la proteína se realizó con el crecimiento de las células a 37°C y se adicionó 1mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido). Esto con el objetivo de lograr la expresión a altos niveles del gen clonado gracias a que se induce la producción de polimerasa T7. El nivel de expresión que se obtuvo se visualizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10% (Figura 6).



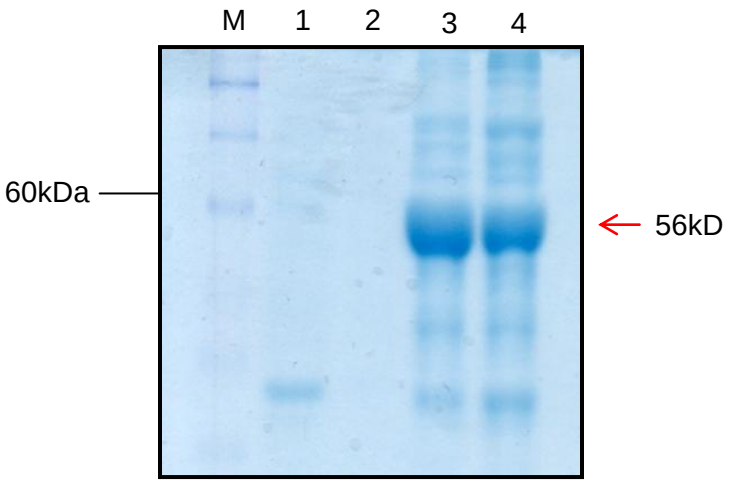
Gel agarosa

Figura 4. PCR del gen *IPR003593* (NCBI).
Se utilizó ADN extraído de un cultivo anaerobio de *Bifidobacterium longum*.
M=Marcador de peso molecular de 1 Kpb.
Carril 1 = Gen *IPR003593* (NCBI).



Gel agarosa 1%

Figura 5. Digestiones de clonas positivas en pET28a+.
Se utilizaron las enzimas de restricción *Nde*I y *Xho*I.
M=Marcador de peso molecular de 1 Kpb.
Carriles 1a 6 = Clonas positivas del gen *IPR003593* (NCBI).



Gel SDS-PAGE 10 %

Figura 6. Expresión de la proteína Bl-ARC en *E. coli* BL21pLysS.
Tinción con azul de Coomassie.
M=Marcador de peso molecular de 190 kDa.
Carril1 = Control negativo Bl-ARC_pET28a+ sin IPTG.
Carril 2 = Control negativo, sin pET28a+.
Carril 3 y 4 = Bl-ARC+pET28a+ con IPTG.

2.7 Purificación de la proteína Bl-ARC por cromatografía de afinidad (Ni^{2+}).

La proteína se purificó en columnas de afinidad con resina de Níquel (Ni-NTA), la resina se caracteriza por contener un soporte de agarosa derivada con ácido nitrilotriacético que actúa como quelante de los iones de níquel divalente (Ni^{2+}). De esta forma los iones de Ni^{2+} quedan unidos por 4 enlaces a la columna, haciendo muy difícil su desprendimiento. A través de los dos enlaces restantes, se unen las proteínas con las colas de histidina que se quieren purificar. Mediante este método se logró obtener 20 mg/ml de proteína pura, con un 85% de pureza (Figura 7).

2.8 Detección de la proteína Bl-ARC por Western blot.

También se detectó la proteína recombinante pura Bl-ARC por Western blot empleando un anticuerpo policlonal anti- etiqueta His, tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes. La proteína recombinante se observó en geles de poliacrilamida. En el gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% observamos el peso molecular de cada una de las subunidades que lo conforman (56 kDa) (Figura 8). En el gel de poliacrilamida al 8% bajo condiciones nativas se logró detectar la formación de un complejo de alto peso molecular, posiblemente hexamérico (Figura 9), lo que nos hace suponer es que gel de poliacrilamida desnaturalizante observamos el peso molecular de cada una de las subunidades que lo conforman.

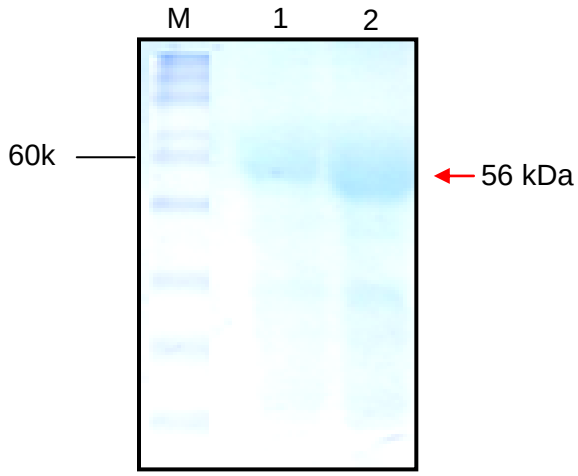


Figura7. Purificación de la proteína Bl-ARC (Ni-NTA).
Tinción con azul de Coomassie.
M=Marcador de peso molecular.
Carril 1 = 15 mg/ml.
Carril 2 = 30 mg/ml.

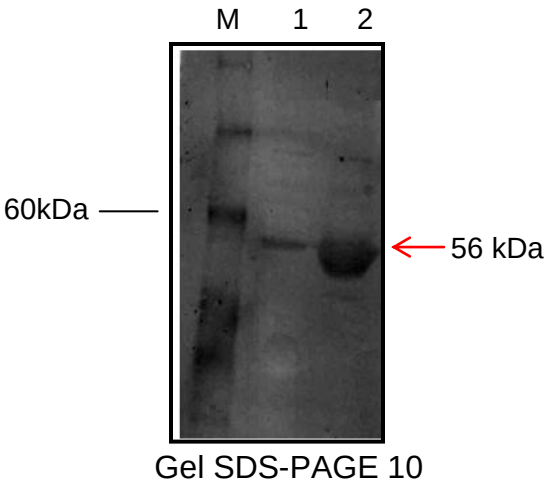


Figura 8. Western blot de la proteína Bl-ARC en condiciones desnaturalizantes, utilizando anticuerpo anti-etiqueta His.
M=Marcador de peso molecular 190 kDa.
Carril 1 = Proteína Bl-ARC del extracto total.
Carril 2 = Proteína pura Bl-ARC.

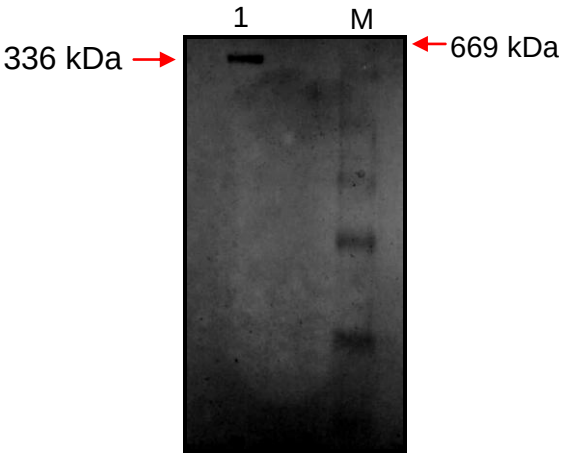


Figura 9. Western blot de la proteína Bl-ARC en condiciones nativas, Utilizando un anticuerpo anti-etiqueta His.
M=Marcador nativo de peso molecular de 669 kDa.
Carril 1 = Proteína Bl-ARC nativa purificada.

2.9 Actividad ATPásica.

La actividad ATPásica se midió por hidrólisis enzimática de ATP implementando el ensayo verde malaquita (Lanzetta *et al*., 1979).

Reacción: ATP → ADP + Pi

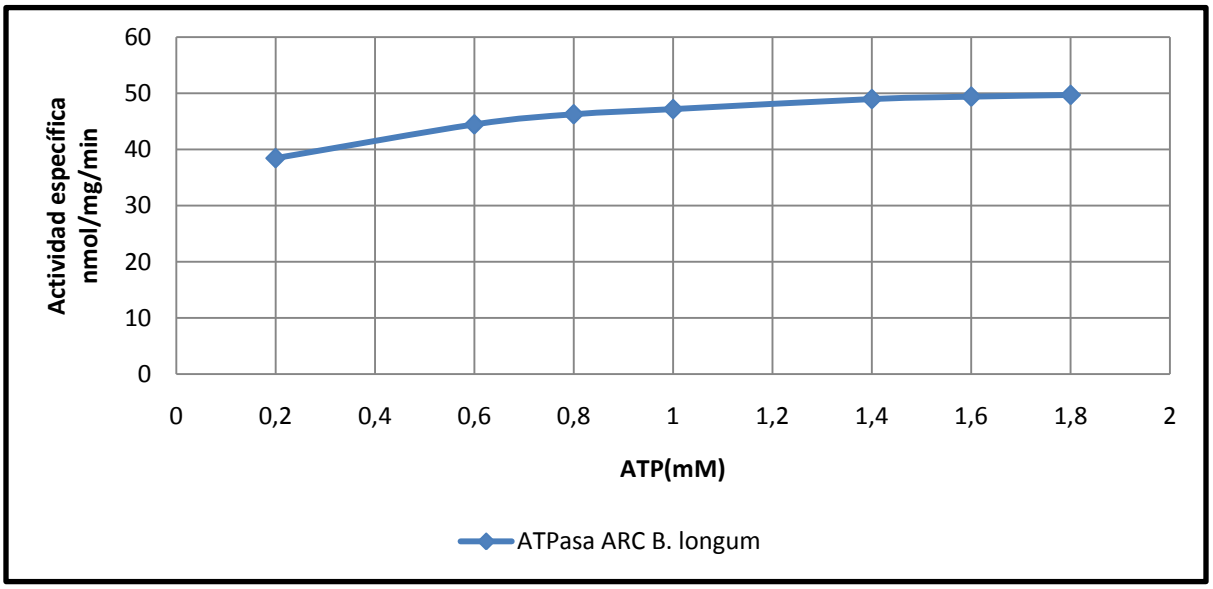
El verde de malaquita es un colorante que captura las moléculas de fosfato inorgánico (Pi) liberadas durante la reacción de degradación del ATP y son detectadas por espectrofotometría a 640 nm.
La proteína Bl-ARC purificada se utilizó para realizar los análisis de actividad ATPasa. Se graficó una curva estándar de 1 a 8 nmol de KH_2PO_4 que relaciona la absorbancia detectada con la cantidad de fosfato inorgánico liberado en la reacción.
En un primer análisis se obtuvo que la actividad específica de la proteína Bl-ARC, es de 47 nmol/mg/min (Figura 10-A).
El ensayo con la proteína Bl-ARC se realizó con 10 µg de proteína, en buffer con pH 7.0 a 37°C con 1 mM de ATP y se monitoreó durante 15 minutos.
Para determinar el pH óptimo de la actividad ATPasa de la proteína Bl-ARC, se efectuó un análisis de actividad a 37°C con 10 µg de proteína y 1 mM de ATP en un rango de pH de 3.0 a 6.0. Los valores a los cuales la actividad de la proteína se favoreció oscilaron entre 3.0 a 4.5 (Figura 10-B).
De la misma forma se monitoreó la actividad ATPasa para la proteína bajo las mismas condiciones de reacción, pero manejando un rango de temperaturas entre 25°C a 60°C. Observando su evidente funcionalidad a una temperatura de 37°C (Figura 10-C).
Estos resultados muestran que las condiciones en las que se favorece su actividad corresponden a las condiciones en la que habitan en el tracto gastrointestinal humano.

3.0 Parámetros cinéticos.

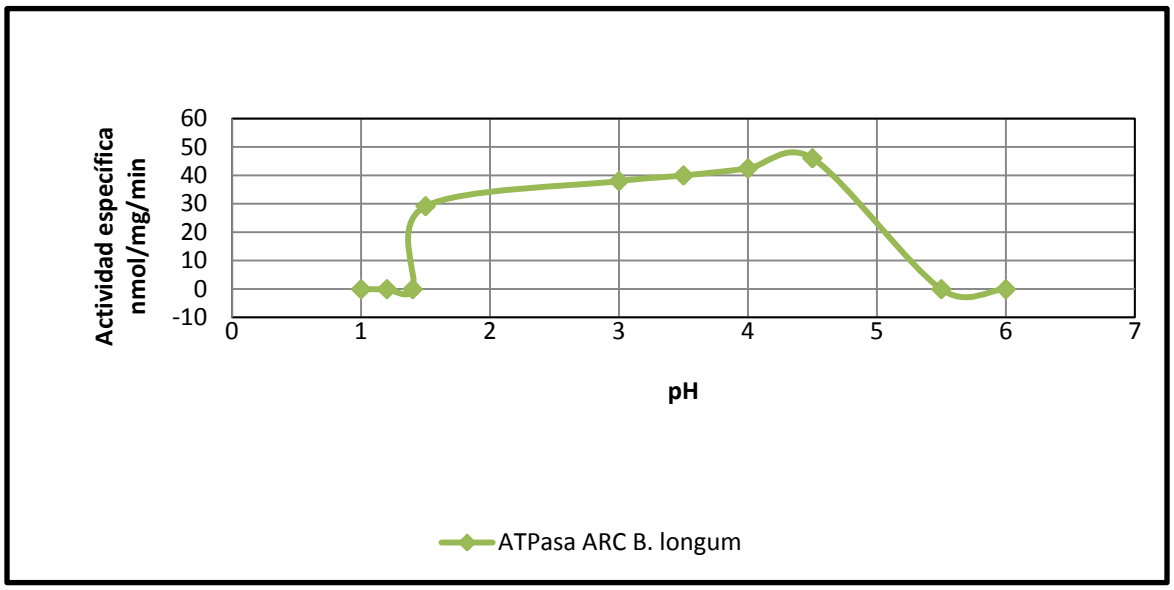
El análisis de la interacción de la proteína con su sustrato, así como la velocidad máxima a la cual la enzima alcanza la concentración saturante de sustrato, fueron calculadas con la ecuación de Michaelis-Menten (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la proteína Bl-ARC.

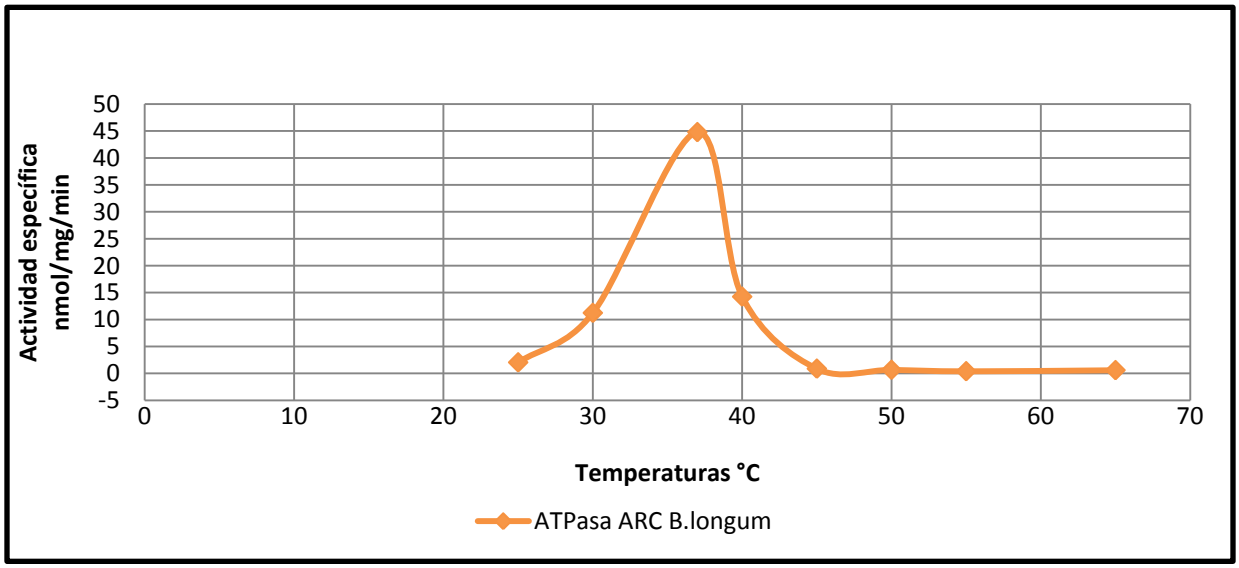
Proteína Bl-ARC	
Km	0.21 mM
V_{max}	51.28 nmol/mg/minuto



A) La actividad específica de la proteína Bl-ARC es de 47 nmol/mg/min.



B) La proteína Bl-ARC tiene tendencia por los pH ácidos, alcanzando su punto máximo de actividad a pH 3.0.



C) La proteína Bl-ARC tiene su actividad máxima a una temperatura de 37°C.

Figura 10. Ensayos de actividad ATPásica. A) Actividad específica de la proteína Bl-ARC, B) Actividad ATpasa de la proteína Bl-ARC a diferentes pH y C) Actividad de la proteína Bl-ARC a diferentes temperaturas.

DISCUSIÓN

La proteína Bl-ARC pertenece sin duda a la familia de proteínas AAA+, las cuales probablemente forman un poro central debido a la presencia de arreglos característicos denominados P-loop NTPasa en su conformación estructural (Beyer- Andreas, 1997).

La formación de estos plegamientos está dada precisamente en los segmentos de la proteína que corresponden a las secuencias altamente conservadas conocidas como motivos Walker A y B (Walker et al., 1982), los cuales contienen residuos esenciales que coordinan los grupos fosfato y los iones magnesio. En muchas NTPasas los motivos Walker A y B se localizan de manera adyacente como lo es en el caso de la proteína Bl-ARC, sin embargo también es posible localizarlos de manera aislada debido a la inserción de una lámina β entre ellos, como ejemplo de estas proteínas encontramos a Rec A, helicasas y F1 ATPasa; dando como resultado una topología diferente del poro central característico de estas proteínas. A pesar de estas modificaciones los sitios activos ocupan posiciones equivalentes en la estructura proteica (Ogura, 2001).

En el esquema tridimensional (I-TASSER) se muestra el dominio N-terminal el cual se caracteriza por que está conformado por 5 láminas β paralelas flanqueadas por 2 α hélices por un lado y 3 α hélices por el otro. El sitio catalítico corresponde efectivamente al consenso de algunos aminoácidos conservados dentro en la secuencia del motivo Walker A (GxxxxGKT, x= cualquier residuo), es en este sitio en el cual se lleva a cabo la formación del P-loop, considerando a su vez el motivo Walker B (hhhhDEx, h=residuo hidrofóbico).

El domino C-terminal de esta familia de proteínas es mucho mas variable en tamaño y su estructura es menos conservado que el domino N-terminal.

La posición de estos dominios en las estructuras de las proteínas no es constante debido a la unión que deben tener con los grupos fosfato del nucleótido blanco y los residuos cargados positivamente del domino N-terminal, lo que ocasiona algunas modificaciones estructurales (Kraulis, 1991).

La unión del nucleótido se realiza en la interfase entre cada una de las subunidades que conforman el hexámero (Oruga, 2001).

Los sitios de actividad usualmente contienen uno o más sensores que facilitan la reacción de ATPasa, la primera función es percibir la presencia o ausencia del grupo fosfato y desplegar esta información a sitios distantes a través de algunos cambios conformacionales (Song, 2000).

Los residuos en los motivos Walker A forman interacciones con moléculas de Mg^{2+} y los grupos fosfato de los nucleótidos, estas son reacciones típicas de las P-loop ATPasas. Estas interacciones se desencadenan gracias a la presencia en su secuencia de una lisina conservada, la cual forma interacciones iónicas con los oxígenos de los fosfatos β y γ, mientras que la treonina conservada provee la unión al metal (Oruga, 2001).

Por otro lado también se conocen algunos residuos de aminoácidos (Asn, Ser, Thr o His) que actúan como sensor formando un enlace polar con el fosfato γ del ATP (sensor 1). Un residuo conservado de Arg funciona como un sensor 2 (descrito en las proteínas AAA+) su actividad es la de mediar el movimiento del domino C-terminal, así como el del dominio N-terminal durante el ciclo de la hidrólisis de ATP (Liu, 2000).

El primer paso para la unión del sustrato no requiere del uso de hidrólisis de ATP, aunque para muchas de las proteínas AAA+ la unión del ATP es requerida para generar la conformación oligomérica de la enzima.

Al correlacionar la evidencia obtenida del resultado en la construcción del árbol filogenético donde se muestra que la proteína Bl-ARC forma parte del subgrupo de las proteínas ARC (ARC-AAA ATPase forming Ring-shaped Complexes), además la información en el análisis del gel de poliacrilamida nativo donde se puede visualizar la sumatoria de cada una de las subunidades (56 kDa) nos sugiere que existe la posible formación de una proteína hexamérica (336 kDa). Se ha establecido que el grupo de estas proteínas se encuentra relacionado con actividades en colaboración con el proteosoma (Wolf *et al*., 1998) lo que nos hace concluir que la proteína Bl-ARC pudiera estar asociada a las actividades del proteosoma, participando en el desdoblamiento de proteínas antes de entrar a su sitio catalítico (Gottesman *et al*., 1997).
Se conoce que en los proteosomas de células eucariotas las proteínas ATPasas forman parte de la tapa 19S que está asociada al centro 20S para dar lugar al proteosoma 26S (Ciechanover, 2009).
En arqueas se ha identificado a la proteína VAT como un homólogo a este grupo de proteínas (Bult *et al*., 1996).
La evidencia de que el gen *arc* se encuentra cercano a los operones del proteosoma en *Rhodococcus* y *Mycobacterium*, y su ausencia en otras eubacterias cuyo genoma no ha sido completamente secuenciado y las cuales no contienen proteosoma, incrementa la posibilidad de que la proteína Bl-ARC posea funciones en el contexto de proteosoma (Wolf *et al*., 1998). Además se sabe que las arqueas y eucariotas únicamente pueden degradar los polipéptidos desdoblados en el proteosome 20S, de manera que necesitan la cooperación de un sistema que les provea energía para unir la proteína blanco y presentarla desdoblada hacia el centro del complejo 20S del proteosoma.
Por otro lado se tienen evidencias en las cuales se reporta que la parte regulatoria del proteosoma 26S se encuentra rodeada de seis proteínas AAA+. Estas seis proteínas AAA+, se encuentran posicionadas en la base del proteosoma, donde quedan en contacto directo con el poro central del proteosoma (Glickman *et al*.1998), formando un complejo hexamérico justo alrededor de su base, teniendo como función concreta el desdoblar las proteínas de manera dependiente a ATP antes de la entrada al poro proteolítico que conforma el proteosoma (Rubin *et al*., 1998).
La formación de este complejo no necesariamente necesita ser estable, de manera que la interacción puede ocurrir transitoriamente.
Evidentemente es necesario realizar ensayos más detallados para afirmar la formación del complejo hexamérico, por lo que haremos uso de la microscopía electrónica que es una de las herramientas de gran ayuda para resolver este tipo de incógnitas, la cual provee imágenes de las proteínas, brindando datos importantes sobre la estructura oligométrica y su simetría, así como la yuxtaposición de las subunidades y dominios en

complejo con las proteínas blanco. Además, estos datos proveen un marco de trabajo para ordenar cada una de las piezas que conforman los ensambles para llegar a la resolución de las estructuras cristalográficas que forman los complejos activos. También es necesario diseñar ensayos para determinar su funcionalidad en las células y poder determinar con que proteínas se encuentra participando.
La actividad ATPasa determinada para la proteína BL-ARC se encuentra dentro de los valores reportados para otras proteínas (Santos *et al*., 2002) (Tabla1).

Además la actividad de la proteína Bl-ARC frente al monitoreo a diferentes concentraciones de pH, mostró que a valores de pH ácidos alcanza su actividad óptima, debido a que en el intestino encontramos pH alrededor de 3 a 4, además en el monitoreo a diferentes temperaturas se evidenció que su temperatura óptima es de 37°C, concluyendo que su actividades óptimas enzimáticas las realiza dentro de las condiciones ambientales que encontramos en el tracto intestinal en el humano.

Perspectivas de trabajo.

- Cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel) para confirmar el estado de oligomerización de la proteína Bl-ARC.
- Microscopía electrónica de transmisión de la proteína Bl-ARC para conocer su estructura.
- Determinación de unión a extractos naturales: Inmunoprecipitación y espectrometría de masas.
- Determinar la función de la proteína:
  - Chaperonina: Doblamiento – Desdoblamiento de proteínas.
  - Participación en la vía del proteosoma: Degradación de sustratos.

Tabla 2. Comparación de velocidad máxima de actividad ATPásica de varias proteínas AAA incluyendo a Bl-ARC (adaptado de Wolf *et al*., 1998).

Proteína	Organismo	Km (μM)	V_{max} (pmol/min/μg)	Referencia
Bl-ARC	*Bifidobacterium longum*	210	470	Este trabajo
ARC	*Rhodococcus erythropolis*	200	268	Wolf *et al*. (1998)
VAT	*Thermoplasma acidophilum*	n.d.	90	Pammani *et al*. (1997)
VPS4p	*Saccharomyces cerevisiae*	n.d	450	Babst *et al*. (1997)
SUG1	*Saccharomyces cerevisiae*	35	7	Makino *et al*. (1997)
26S proteosoma	Reticulocitos de conejo	15	19	Hoffman (1996)

Pi = Fosfato inorgánico
Bl-ARC. Proteína AAA+ hexamérica posiblemente chaperona.
ARC. Proteína hexamérica chaperona.
VAT. Proteína asociada a proteosoma.
VPS4p. Proteína requerida para el transporte de endosomas.
SUG1. Proteína asociada al proteosoma.
26S proteosoma. Degradación de proteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Análisis Bioinformático

Los análisis para la identificación de los dominios conservados en la proteína fueron realizados utilizado el programa Bioedit Sequence Alignment Editor (1997-2005) para la generación de alineamientos y análisis de secuencias que funciona únicamente sobre software de MS/Windows.

El modelamiento de la estructura tridimensional de la proteína se realizó utilizando el programa de I-TASSER.

La construcción del árbol filogenético se generó mediante el uso del Programa CLANS (Clustal analysis of sequences) (Frickey, 2004-A).

Las secuencias en aminoácidos de las proteínas AAA+, se obtuvieron de la base de datos de la Superfamilia de proteínas AAA (Sitio: http://yeamob.pci.chemie.uni-tuebingen.de/AAA/Tree.html).

2. Cultivo de *Bifidobacterium longum subs. infantis*

La cepa de *Bifidobacterium longum ATCC15697* fué adquirida del banco de cepas DSMZ de Alemania, la cepa liofilizada se rehidrató para ser cultivada en caldo y agar de MRS (Tabla No.1, material suplementario) a 37^{o}C bajo condiciones de anaerobiosis. Al tercer día de crecimiento celular se continuó con la lisis de las células para obtener el material genético.

La generación de la atmósfera de CO_2 se logró colocando una pastilla de bicarbonato sódico y ácido cítrico en 10 ml de H_2O Milli Q en un tubo Falcon, el cual se colocó en un frasco junto con el medio inoculado con la *Bifidobacterium longum*, se selló con papel parafilm e incubó 48 horas a 37 °C.

3. Extracción del ADN genómico de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis.*

Se llevó a cabo una lisis celular, usando proteinasa K y lisozima. Las moléculas no deseadas se removieron con lavados de una solución cloroformo - alcohol isoamílico. La adición de etanol frío al 100% permitió precipitar el ADN, que fué lavado con etanol al 70% y al final sé reconstituyó en agua.

4. Amplificación del gen *IPR003593* por la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Se buscó la secuencia del gen en la base de datos (NCBI) para el diseño de un par de oligonucleótidos específicos para lograr la amplificación del gen *IPR003593* (FW5' GGGGAATTCCATATGAGCGACACCGAAGATCTCGCCGCGCTG3'-
RV5' GCTCTCGAGTTCGGCGGTGCGGATGCGGCGGATCGGGT 3'), este diseño incluye sitios de corte reconocidos por las enzimas de restricción *NdeI* (Extremo 5') y *XhoI* (Extremo 3').

La mezcla de reacción para la PCR utilizó como molde ADN genómico (100 ng) de *Bifidobacterium longum ATCC15707*, 0.3 µM de cada dNTP, 0.2 µM de $MgSO_4$, 1U de Pfx platinum Taq polimerasa y buffer PCR 1X en un volumen total de reacción de 50µl. Para la amplificación se programó el termociclador (BioRad), se manejó una

temperatura de alineamiento de 60°C con una programación de 30 ciclos en el proceso de amplificación.

5. Clonación en el Sistema TOPO4.

El contenido de la reacción total fué de 6 µl, la cual contenía 2 µl del producto de PCR, 1 µl de solución salina, 2 µl de agua estéril y 1 µl del vector; la reacción se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y una incubación de 20 minutos en hielo, para proceder a dar el choque térmico a 42°C 2 minutos y dejar reposar las células en medio LB durante 1 hora a 37°C. Se plaqueó en cajas con medio LB sólido y Kanamicina (50 mg/ml).

6. Subclonación en el vector de expresión pET28a+.

La subclonación se realizó por digestión del vector TOPO 4 y el vector pET28a+ con las enzimas *NdeI* y *XhoI* y una ligación posterior con una relación molar 1:3 (vector: inserto).

- Transformación en *E.coli* BL21pLysS

Se prepararon células competentes de *E. coli* BL21pLysS por el método de cloruro de calcio. La transformación con el vector BL-ARC + pET28a+, se obtuvo por choque térmico (42 °C / 2 min). Las células se plaquearon en cajas con agar LB y Kanamicina (50 mg/ml) como antibiótico de selección, incubándose por una noche a 37^{o}C.

- Extracción de ADN por lisis alcalina

Se realizó la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina y se confirmó el tamaño y la identidad de la construcción Bl-ARC pET28a+ por digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI*, y por su secuenciación.

7. Expresión heteróloga de la proteína Bl-ARC

Se indujo la expresión con 1 mM de IPTG por 4h a 37°C. Su expresión se analizó en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10%.

8. Purificación de la proteína Bl-ARC por cromatografía de afinidad (Ni^{2+}).

La purificación de la proteína Bl-ARC se realizó por medio de columnas de afinidad con resina de Ni^{2+} (QIA Ni-NTA) que permite la unión al 6x de la etiqueta de His de la proteína con el Ni^{2+}. La proteína unida a la resina se recuperó en buffer con imidazol (500 mM). Las fracciones colectadas se analizaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 10%, así como en geles nativos al 7%.

9. Detección de la proteína Bl-ARC por Western blot.

Los geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 15% se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham), en una cámara horizontal Semy-Dry Trans-blot (BioRad). Se utilizó un anticuerpo primario monoclonal anti-etiqueta de His producido en conejo (mouse anti-etiqueta de His, Serotec) y un anticuerpo secundario anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa-alcalina (goat anti-rabbit IgG, Sigma). La detección de la proteína se realizó colorimétricamente al incubar con *p*-nitro azul tetrazolium y sodio-5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato (NBT y BCIP, Amersham Biosciences). El análisis de las membranas y de los geles se llevó a cabo en un foto-documentador Gel-Doc 2000 (BioRad) y el software Quantity OneTM versión 4.5 (BioRad).

10. Actividad ATPásica.

La actividad ATPásica se midió por hidrólisis enzimática de ATP implementando el ensayo verde malaquita (Lanzettaet al., 1979). Se procesaron 10µg de proteína, ATP 1 mM, y $MgCl_2$ 10 mM en una reacción total de 50 µl. La reacción se realizó por 15 minutos a 37^{o}C, se detuvo con la adición de 800µl de reactivo de color (Verde de malaquita 0.045% y 4.2% de molibdato de amonio, mezcla 3:1 en 4 N de HCl, adicionando 0.1% de Tritón X-100 y 100 µl de una solución de citrato de sodio al 34%). La medición de la actividad ATPásica se determinó a 640 nm con una curva estándar de fosfato inorgánico.

11. Parámetros cinéticos.

Los parámetro de Km y V_{max} se generaron con la ecuación de Michaelis-Menten.

Números de acceso.

NCBI Acceso No. YP_002323567.1 (Proteína Bl-ARC).

REFERENCIAS

1. Beyer-Andreas. (1997). Sequence analysis of the AAA protein family. Protein Sci. 6:2043-2058.
2. De Vries, W. & Stouthamer, A. H. (1967). Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of Bifidobacteria. J Biotechnol. 93:574-576.
3. Doleyres, Y., Paquin, C. & LeRoy, M. (2002). *Bifidobacterium longum* ATCC15707 cell production during free-and immobilized-cell cultures in MRS-whey permeate medium. Appl Microbiol Biotechnol. 60:168-173.
4. Dougan, D.A. & Mogk, A. (2002). Protein folding and degradation in bacteria: To degrade or not to degrade? That is the question. CMLS. 59:1607-1616.
5. Dunne, C., Murphy, L. & Flynn, S. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionally in animal models of disease and in human clinical trials. A Van Leeuw J Microb.76: 279-292.
6. Erzberger, J. P. & Berger, J. M. (2006). Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 35:93-114.
7. Frickey, T. & Lupas, A.N. (2004). Phylogenetic analysis of AAA proteins. Journal of Structural Biology. 146:2-10.
8. Frickey, T. & Lupas, A. (2004). CLANS: a Java application for visualizing protein families based on pairwaise similarity. Bioinformatics. 20:3702-3704.
9. Fujimori, M. (2006). Genetically Engineered *Bifidobacterium* as a drug delivery system for systemic therapy of metastatic breast cancer patients. Breast Cancer 13:27-31.
10. Glickman, M.H., Rubin, D.M. & Coux, O., et al. (1998). A subcomplex of the proteasome regularoty particle required for ubiquitin.conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. Cell 94, 615-623.
11. Gottesman, S., Wickner, S. & Maurizi, M.R. (1997). Protein quality control: Triage by chaperones and proteases. Genes and Dev. 11:815-823.
12. Hay, J.C. & Scheller, R.H. (1997). SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. Cell Biol. 9: 505-512.
13. Hoarau, C., et al. (2008). Supernatant from *Bifidobacterium* differentially modulates Transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. PLoS ONE 3(7) e2753:1-10.
14. Ishibashi, N. & Yamazaki, S. (2001). Probiotics and safety. Clin Nutr. 73: 465S-70S.
15. Lanzetta, P.A., Alvarez, L. J., Reinach, P.S. & Candia O.A. (1979). An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. Anal. Biochem. 100(1):95-7.
16. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W. & Moss, D.S. (1993). Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structure. J. Appl. Crystallogr. 26:283-291.
17. Liu, j., Smith, C.l., DeRyckere, D., DeAngelis, K., Martin, G.S. & Berger, J. M. (2000). Strucutre and function of Cdc6/Cdc18: implication for origin recognition and checkpoint control. Mol. Cell 6, 637-648.
18. Martin, A., Baker, T. A. & Sauer, R. (2005). Rebuilt AAA+ motors reveal operating principles for ATP-fulled machines. Nature. 43710:1115-1120.

19. Neuwald, A.F., Aravind, L., Spougue, J.L. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPase Associated with the assembly, operation and disassembly of protein complexes. Genome Res. 9:27-43.
20. Ogura, T. & Wilkinson, A. J. (2001). AAA^+ Superfamily ATPases: common structure-diverse function. Genes Cells. 6:575-597.
21. Ozelius, J.L., et al. (1997). The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein. Nat. Genet.17(1):40-8.
22. Reddy, B. (1999). Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence colon carcinogenesis and tumor growth. Am. Soc. Nut. Sci. 12:1478S-1482S.
23. Rubin, D.M., Glickman, M.H., Larsen, C.N., Dhruvakumar, S. & Finley, D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles in proteasome. EMBO J. 17, 4909-4919.
24. Sali, A. & Blundell, T.L. (1993). Comparative protein modeling by satisfaction on spatial restrains. J. Mol. Biol. 234:779-815.
25. Santos, L., Frickey, T., Peters, J., Baumeister, W., Lupas, A. & Zwickl, P. (2004). *Thermoplasma acidophilum* TAA43 is an archaeal member of the eukaryotic meiotic branch of AAA ATPases. *Biol Chem.* 385:1105-1111.
26. Sela, A., et al. (2008). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. Proc Natl Acad Sci. 105(48): 18964 –18969.
27. Song, H.K., Hartmann, C., Ramachandran, R., et al. (2000). Mutational studies on HslU and its docking mode with HslV. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 14103-14108.
28. Swaffield-Jonathan, C., & Purugganan-Michael, D. (1997). The Evolution of the conserved ATPase Domain (CAD): Reconstructing the history of an ancient protein module. Mol. Evol. 45:549-563.
29. Turroni, F., Ribbera, A., Foroni, E. & Ventura, M. (2008). Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. A Van Leeuw. 94:35–50.
30. Vale, R. AAA Proteins: Lords of the ring. (2000). J Cell Biol. 150:F13-F19.
31. Ventura, M., Van Sinderen, D., Fitzgerald Gerald, F. & Zink, R. (2004). Insights into the taxonomy, genetics and physiology of bifidobacteria. A Van Leeuw J Micro. 86: 205-223.
32. Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the alpha- and 0-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1:945-951.
33. Wolf, S., Nagy I. & Lupas, A. (1998). Characterization of ARC a divergent member of the AAA ATPase family from *Rhodococcus erytropolis*. J. Mol. Biol. 277:13-25.
34. Yazawa, K., Fujimori, M., Amano, J., Kano, Y. & Taniguchi, S. (2000). *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: Selective localization and growth in hypoxic tumors. Cancer Gene Therapy 7: 269–274.
Yazawa, K., Fujimori, M., Nakamura, T., Sasaki, T., Amano, J. & Taniguchi, S. (2001). *Bifidobacterium longum* as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. Breast Cancer Res Tr. 66: 165–170, 2001.

Material suplementario

Cultivo de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis.*

Tabla 1. Medio MRS Líquido

Agua destilada	100 ml
Peptona	1 g
Extracto de res	1 g
Extracto de levadura	0.5 g
TWEEN 80	0.1 g
Citrato de amonio	0.2 g
Acetato de sodio	0.5 g
$MgSO_4$	0.01 g
$MnSO_4$	0.005 g
K_2HPO_4	0.2 g
Glucosa	2 g
Cisteína	0.05 g

*Adicionar Bacto Agar 1.5 g para la preparación de medio sólido.

Extracción ADN genómico

Reactivos	
Lisozima	10 µg/µl
Proteinasa K	20 mg/ml
RNAsa	0.5 mg/ml
SDS	25%
Fenol: cloroformo: alcohol isoamílico	25:24:1
Acetato de sodio	5 M
Isopropanol	10 ml
Etanol	70%
Agua desionizada estéril	50 µl

Protocolo para un cultivo celular de 2 gramos.

1. Centrifugar el cultivo celular líquido a 5,000 rpm durante 10-15 minutos a 4^{o}C. Decantar el sobrenadante.
2. Resuspender las células en el buffer de lisis (300 µl).
3. Adicionar 100 µl de lisozima 10 µg/µl. Incubar la muestra 15 minutos a 37^{o}C. Se adiciona gota a gota agitando en el vórtex.
4. Adicionar 25 µl de proteinasa K 20 mg/µl. Incubar 15 minutos a 37^{o}C.
5. Adicionar 30 µl de SDS 25, mezclar la solución e incubar a 60^{o}C. por un lapso de 2 horas.

6. Extraer la mezcla celular con un volumen igual de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, centrifugar 10,000 rpm durante 5 minutos, hasta que la interfase desaparezca, o este clara.
7. Adicionar 50 µl de acetato de sodio 5M y 2 volúmenes de isopropanol frío.
8. Invertir el tubo suavemente hasta que el ADN genómico sea visible; decantar el sobrenadante.
9. Lavar la pastilla con etanol al 70% y centrifugar durante 5 minutos a 10,000 rpm. Descartar el etanol.
10. Dejar secar a temperatura ambiente el ADN para eliminar el etanol.
11. Resuspender en 50 µl de agua desionizada estéril.
12. Incubar el ADN 15 minutos a 37^{o}C con RNAsa 0.5 mg/ml.
13. Almacenar a 4^{o}C.

Gel de agarosa al 1%

Agarosa	0.4%
Buffer TAE 1X	40 ml

Células competentes

1. Inocular un tubo que contiene 2 ml de LB con una colonia de *E. coli*. Incubar toda la noche a 37^{o}C con agitación.
2. Transferir 200 µl del cultivo inoculado en un inicio a un matraz e 250 ml que contenga 15 ml de medio LB. Se incuba a 37 ^{o}C durante 2 horas para alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.4 a 0.6 que representan aproximadamente 5x10^{7} células/ml.
3. Enfriar el cultivo por 10 minutos en hielo, así como el tubo para la centrifugación del cultivo celular.
4. Centrifugar 5 minutos a máxima velocidad a 4 ^{o}C, descartar el sobrenadante.
5. Resuspender las células suavemente (No usar vórtex) en la mitad del volumen original con una solución de $CaCl_2$- 100 mM/Tris - HCl 10mM, pH 8.0.
6. Incubar la suspensión celular en hielo durante 15 minutos.
7. Centrifugar 5 minutos a 4^{o}C (7,500 rpm).
8. Resuspender en 1/15 del volumen original de la solución $CaCl_2$ – 100 mM/Tris.HCl 10 mM, pH 8.0.
9. Las células competentes pueden ser almacenadas en lotes de 200 µl con un volumen igual de glicerol estéril (25% en la solución final).
10. Almacenar a -80 ^{o}C.

Protocolo transformación

1. Descongelar el vial de las células competentes.
2. Anadir el ADN plasmídico y dejar reposar 30 minutos.
3. Dar un choque térmico a 42 ^{o}C por dos minutos.
4. Anadir 1 ml de medio LB estéril e incubar a 37 ^{o}C por un lapso de 1 hora con agitación.

5. Plaquear la suspensión celular en medio LB con el antibiótico de selección.

Protocolo purificación banda del gel de agarosa (Kit QIAgen)

1. Cortar el fragmento de ADN del gel de agarosa. (Minimizar el tamaño del gel removiendo la agarosa extra).
2. Pesar el fragmento de agarosa en un tubo Eppendorf. Anadir 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen de gel.
3. Incubar a 50 ^{o}C por 10 minutos hasta que el gel se haya disuelto.
4. Adicionar un volumen de isopropanol a la mezcla.
5. Colocar la columna QIAgen con su tubo colector.
6. Adicionar la mezcla a la columna QIAgen, centrifugar 1 minuto a 13,000 rpm.
7. Desechar el sobrenadante y coloque la columna de nuevo en el tubo colector.
8. Adicionar 0.5 ml de buffer QG a la columna QIAgen y centrifugar 1 minuto.
9. Adicionar 0.75 ml de buffer PE a la columna QIAgen, centrifugar 1 minuto y desechar el sobrenadante del tubo colector. Repetir una vez este paso.
10. Realizar una centrifugada adicional de 1 minuto para eliminar los restos de etanol.
11. Colocar la columna QIAquick en un tubo limpio de 1.5 ml para eluir el ADN añadiendo 50 µl de buffer EB.

Protocolo limpieza de producto de PCR (Kit-QIAgen)

1. Adicionar un volumen igual al volumen del producto de PCR de ¨membrane binding solution¨.
2. Colocar la columna en un tubo colector de 2 ml, utilizar una columna para cada reacción de PCR.
3. Transferir el producto preparado de producto de PCR a la columna, e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Centrifugar por un minuto a 13,000 rpm. Remover la columna y descartar el líquido filtrado, regresar la columna al tubo colector.
5. Lavar la columna adicionando 700 µl de la ¨membrane wash solution¨, previamente diluida con etanol al 95%. Centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm, descartar el líquido filtrado. Repetir el lavado con 500 µl de la solución y centrifugar durante 5 minutos a 13,000 rpm.
6. Remover la columna del tubo colector, con cuidado de que no toque el líquido filtrado, descartar el líquido y volver a ensamblar, centrifugar durante 1 minuto a 13,000 rpm, para eliminar el resto de etanol.
7. Con cuidado transferir la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml limpio.
8. Adicionar 50 µl de agua libre de nucleasas directamente al centro de la membrana sin que la punta de la pipeta toque la membrana, Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar por 1 minuto a 13000 rpm.
9. Descartar la columna y utilizar el ADN o almacenar a -20°C.

Extracción de ADN plasmídico (Kit QIAgen)

1. Crecer un preinóculo de las colonias seleccionadas en 4 ml de medio LB a 37°C durante toda la noche.
2. Recuperar las células por centrifugación.
3. Resuspender la pastilla en 250 µl de buffer P1.
4. Adicionar 200 µl de buffer P2 y mezclar por inversión.
5. Adicionar 350 µl de buffer N3 y mezclar por inversión.
6. Centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm a 4°C
7. Poner el sobrenadante en una columna.
8. Centrifugar por 1 minutos a 13,000 rpm.
9. Unir el DNA a la membrana con 500 µl de buffer PB y centrifugar por 1 minuto a 13,000 rpm.
10. Lavar la columna con 750 µl de buffer PE y centrifugar por 1 min.
11. Descartar el líquido filtrado y centrifugar por 1 minuto adicional para desechar el etanol residual.
12. Eluir en un tubo limpio con 50 µl de buffer EB o agua destilada estéril.

Cuantificación de Proteína por el método de Bradford

Curva estándar

Tubos (Duplicado)	ddH_2O - µl	BSA 2 µg/ µl
0	1000	0
1	999.5	0.5
4	998	2
8	996	4
12	994	6
16	992	8
20	990	10
24	988	12
28	986	14
32	984	16
40	980	20

1. Medición a 595 nm.
2. Etiquetar los tubos.
3. Adicionar el agua destilada a cada uno de los tubos.
4. Adicionar el BSA.
5. Adicionar 300 µl del colorante concentrado (Bio-Rad Protein) a cada uno de los tubos en el orden en que serán leídos, agitar.
6. Colocar las cubetas en el espectro para realizar las lecturas. (Recomendable iniciar las lecturas con los tubos de menor concentración).
7. Lavar las cubetas con etanol y agua.
8. Calcular los promedios de las absorbancias.

9. Construir una curva que nos indique la concentración de proteína por el eje de las X y la absorbancia por el eje de las Y.

Electroforesis de proteínas

SDS-PAGE

Buffer 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 (100 ml)

Tris base	18.15 g
Agua destilada	c.b.p.

*Ajustar el pH con HCl

Buffer 0.5M Tris-HCl pH 6.8 (100 ml)

Tris base	6.0 g
Agua destilada	c.b.p.

*Ajustar pH con HCl

SDS 10% (10 ml)

SDS	1 g
Agua destilada	c.b.p.

PSA 10% (1 ml)

Persulfato de amonio	0.1 g
Agua destilada	c.b.p.

Buffer de corrida 40X (400 ml)

Tris base	48.0 g
Glicina	30.0 g
SDS 10%	160.0 ml
Agua destilada	c.b.p.

Azul de Comassie (50 ml)

Azul de Comassie	0.125 g
Metanol	22.50 ml
Acido acético	22.50 ml
Agua destilada	c.b.p.

Solución de desteñido (500 ml)

Acido acético	25 ml
Metanol	250 ml
Agua destilada	c.b.p.

Buffer de carga (Laemmli 10 ml)

Tris 1M pH 8.8	2.5 ml
Glicerol	2.8 ml

Azul de bromofenol	25.0 mg
SDS 2%	2.0 ml
Agua destilada	c.b.p.

Gel de acrilamida gradiente 5.5 al 4%

Agua destilada	1.65 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	690 µl
Acrilamida bis-acrilamida	365 µl
SDS 10%	27.5 µl
PSA	9.2 µl
TEMED	0.91 µl

Gel de acrilamida gradiente 5.5 al 20%

Agua destilada	205 µl
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	690 µl
Acrilamida bis-acrilamida	1.815 µl
SDS 10%	27.5 µl
PSA	9.2 µl
TEMED	1.83 µl

Gel de acrilamida separador al 10 %

Agua destilada	4.8 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	3.0 ml
Acrilamida bis-acrilamida	4.0 ml
SDS 10%	120.0 µl
APS	60.0 µl
TEMED	12.0 µl

Gel de acrilamida concentrador al 4%

Agua destilada	1.9 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.5ml
Acrilamida bis-acrilamida	300 µl
SDS 10%	30.0 µl
APS	15.0 µl
TEMED	1.5 µl

Gel de acrilamida Nativo separador al 10%

Agua destilada	1.89 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.0 ml
Acrilamida bis-acrilamida	1.28 ml
SDS 10%	40.0 µl
PSA	40.0 µl
TEMED	2.40 µl

Gel de acrilamida Nativo concentrador al 4%

Agua destilada	600 µl
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	252 µl
Acrilamida bis-acrilamida	132 µl
SDS 10%	10.0 µl
PSA	10.0 µl
TEMED	1.0 µl

Western Blot

Buffer Transferencia Towbin (1L)

Tris-base 48 mM	5.8 g
Glicina 39 mM	2.9 g
Metanol 20%	200 ml
SDS 0.037% (SDS 10%)	3.7 ml

Rojo de Ponceau (10 ml)

Ponceau xilidina	0.05 g
Ácido acético glacial	500 µl
Agua grado MQ	c.b.p.

PBS 20X pH 7.5 (500 ml)

NaCl	81.81 g
NaH2 PO4 · H2O	3.86 g
Na2H PO4	10.22 g
Água Milli Q	c.b.p.

Solución de bloqueo (30 ml)

Leche Svelty 5%	1.25 g
PBS 1X	30 ml

Solución de lavado (30 ml)

PBS 1X	30 ml

Solución anticuerpo primario 1:1000 (10 ml)

PBS 1X	10 ml
Leche Svelty 1%	0.1 g
Anticuerpo (Anti-ADH)	10 µl

Solución Anticuerpo secundario 1:10,000 (10 ml)

PBS 1X	10 ml
Leche Svelty 1%	0.2 g
Anticuerpo	1 µl

Buffer AP (100 ml)

Tris-base	1.21 g
NaCl	0.58 g
MgCl2 · 6 H2O	1.51 g
Agua MQ	c.b.p.

Solución de revelado (15 ml)

Buffer AP	15 ml
NBT 50 mg/mL	66 µl
BCIP 50 mg/ml	33 µl

Protocolo

1. Cargar 50 µg de proteína en un gel de 10% de poliacrilamida desnaturalizante, por duplicado. Realizar la electroforesis a 90 volts por un periodo de 2 a 3 horas. Uno teñirlo con Comassie.

Transferencia.

- Humedecer la membrana de nitrocelulosa y papel filtro con buffer Towbin.
- Equilibrar el gel por 15 minutos en buffer Towbin.
- Clocar el papel filtro humedecido en la placa (ánodo) de la cámara de transferencia, evitando la formación de burbujas.
- Colocar la membrana sobre el papel filtro.
- Encima colocar el gel, eliminando todas las burbujas que se formen.
- Colocar encima papel filtro humedecido.
- Colocar la tapa del cátodo, cerrar y conectar.
- Correr por 30 minutos a 10 volts.

2. Teñir con rojo de Ponceau, para visualizar la transferencia de las proteínas y el marcador de peso molecular (marcar y cortar).
3. Lavar la membrana hasta eliminar todo el colorante.
4. Lavar la membrana con PBS 1X.
5. Incubar la membrana con solución de bloqueo por toda la noche a temperatura ambiente en agitación constante.
6. Lavar la membrana con PBS 1X, por 4 veces durante 5 minutos cada vez.
7. Incubar la membrana con la solución del anticuerpo primario a 4°C en agitación constante, toda la noche.
8. Lavar la membrana por 4-5 veces durante 5 minutos cada vez con solución de lavado.
9. Incubar la membrana con la solución del anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación constante.
10. Lavar la membrana con solución de lavado por 4-5 veces durante 5 minutos por vez.
11. Revelar la reacción con la solución de revelado. El desarrollo de la reacción puede llevar de 5-20 minutos.
12. Detener la reacción con agua destilada y dejar secar la membrana.

Purificación de proteína por columnas de afinidad (Ni-NTA)

Crecimiento de cultivos celulares.

1. Inocular 10 ml de LB con kanamicina (50 mg/ml) con un stock de bacterias de un cultivo fresco. Incubar a 3°C una noche.
2. Inocular 30 ml de LB con 500 µl de cultivo de una noche e incubarlo a 37 °C en agitación hasta alcanzar una OD de 0.6.
3. Adicionar IPTG 1mM y poner el inóculo a incubar 37°C con agitación durante 4 horas.
4. Recuperar las células por centrifugación 15 minutos, almacenarlas a -20°C o procesarlas inmediatamente para purificación de proteínas por el método de condiciones nativas o desnaturalizantes.

Condiciones nativas

1. Cosechar las células del cultivo de la expresión por centrifugación.
2. Resuspender 5 ml de cultivo celular en 630 µl de buffer de lisis.
3. Adicionar 20 mg/ml de lisozima e incubar en hielo por 30 minutos.
4. Sonicar la muestra sobre hielo. Dar impulsos de alta densidad en periodos de 10 segundos con pausas de 10 segundos entre cada pulso.
5. Centrifugar el lisado a 7,000 rpm por 15 minutos. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
6. Guardar 20 µl de lisado para análisis en SDS-PAGE.
7. Equilibrar la columna Ni-NTA con 600 µl de Buffer de lisis. Centrifugar 2 minutos a 2,900 rpm.
8. Cargar 600 µl del lisado con la proteína marcada con la etiqueta de 6 - His en la columna pre-equilibrada. Centrifugar 5 minutos a 1,600 rpm.
9. Lavar la columna Ni-NTA 2 veces con 300 µl de Buffer de lavado. Centrifugar 2 minutos a 2,900 rpm.
10. Eluir la proteína 2 veces con 300µl de Buffer de Elución. Centrifugar 2 minutos a 2900 rpm y colectar el eluido.

Soluciones

Buffer de lisis.

$Na_2H_2PO_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM; pH 8.0.

Buffer de lavado.

$Na_2H_2PO_4$ 50 mM , NaCl 300 mM, imidazol 20 mM; pH 8.0.

Buffer de elución.

$Na_2H_2PO_4$ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM; pH 8.0.

Condiciones desnaturalizantes.

1. Descongelar las células y resuspender en 700 µl de Buffer B-7M urea.
2. Incubar las células con agitación por 15 minutos a temperatura ambiente.

3. Centrifugar el lisado 12000 xg durante 15-30 minutos a temperatura ambiente para que se sedimente la parte celular. Colectar el sobrenadante.
4. Guardar 20 µl de este lisado para observarlo en geles SDS-PAGE.
5. Cargar 600 µl del lisado (sobrenadante) que contiene la proteína marcada con la etiqueta 6x de His en la columna pre-equilibrada Ni-NTA. Centrifugar 5 minutos a 1,600 rpm y recolectar el sobrenadante de desecho.
6. Lavar la columna Ni-NTA con 600 µl de Buffer C. Centrifugar 2 minutos a 2,900 rpm (repetir 2 veces).
7. Eluir la proteína 2 veces con 200 µl de Buffer E. Centrifugar 2 minutos a 2,900 rpm y colectar la elución.

Soluciones

Buffer A*: Gu HCl 6 M; NaH_2PO_4 0.1 M; Tris.Cl 0.01 M; pH 8.0.
Buffer B-M urea: Urea 7 M; NaH_2PO_4 0.1 M; Tris,Cl 0.01 M; pH 8.0.
Buffer C: Urea 8 M; NaH_2PO_4 0.1 M; Tris.Cl 0.01 M; pH 6.3.
Buffer D*: Urea 8 M; NaH_2PO_4 0.1 M; Tris.Cl 0.01 M; pH 5.9.
Buffer E: Urea 8 M; NaH_2PO_4 0.1 M; Tris.Cl 0.01 M; pH 4.5.
*Bufer A y D no son necesarios en todas las proteínas.

Soluciones para medir actividad ATPásica

Buffer de reacción (5 ml)

MES 50 mM pH 5.5	250 µl
$MgCl_2$ 10 mM	50 µl
L-Cisteína 2 mM	10 µl
ATP 1 mM	5 µl

Reactivo de color (5 ml)

Tritón 1-X 2%	2 µl
Molibdato de amonio 4.2 % en HCl 4N	10 ml
Verde de malaquita 0.045 %	30 ml

Protocolo

1. Mezclar 3 volúmenes de la solución verde malaquita 0.045 % con un volumen de molibdato de amonio 4.2 % y mezclar con la barra magnética durante 30 minutos.
2. Filtrar la solución por Watman 0.45 µm. Colocar la solución en una botella de vidrio pre-tratada con HCl 1N y protegerla de la luz.
3. Adicionar 2 µl de Tritón 1-X 2 %
4. Guardar a 4^{o}C (Estable por una semana).