



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

2014

“Expresión y purificación de la proteína antigénica recombinante Tpp17 de *Treponema pallidum* para su utilización en el diagnóstico de Sífilis.”

VALERIA ECHENIQUE.

Orientadores: Dr. Mario
Señorale y Dra. Mónica Marín
Sección Bioquímica y Biología
Molecular
Facultad de Ciencias
UdelaR



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR fcien.edu.uy

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE	2
ABREVIACIONES	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1- Sífilis- Generalidades	6
1.2- Manifestaciones clínicas.....	6
1.3- Aspectos epidemiológicos	8
1.4- Agente etiológico	8
1.5- Virulencia.....	9
1.6- Genoma del <i>Treponema pallidum</i>	10
1.7- Componentes antigénicos	11
1.8- Proteína antigénica TPP17 (Tp0435)	12
1.9- Respuesta en anticuerpos	13
1.10- Diagnóstico de Sífilis en el laboratorio	13
1.11- Antígenos recombinantes de <i>T. pallidum</i>	17
2. OBJETIVOS	18
2.1- Objetivo general	18
2.2- Objetivos específicos	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1- Bacterias y plásmidos utilizados	19
3.2- Preparación de placas de cultivo Agar-LB	20
3.3- Cultivo de bacterias	20
3.4- Extracción de ADN plasmídico.....	20
3.5- Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	21
3.6- Digestión con enzimas de restricción	21
3.7- Fraccionamiento celular	21
3.8- Electroforesis de proteínas	22
3.10- Purificación de muestras solubles	22
3.11- Cuantificación de proteínas	23
3.12- Detección de Tpp17 por Western blot	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25

4.1- Análisis de los plásmidos pET17_Tpp17-6His y pGEX_Tpp17-6His	25
4.2- Extracción de Tpp17 recombinante utilizando distintos detergentes	26
4.3- Purificación de muestras solubles	27
4.4- Expresión de Tpp17 a 30 y 37° C	27
4.5- Cuantificación de proteínas por BCA	28
4.6- Evaluación de IMAC como método de purificación para Tpp17.....	30
4.7- Western Blot de muestras solubles purificadas por IMAC	30
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33
AGRADECIMIENTOS.....	35
ANEXO 1- Medios de cultivo.....	36
ANEXO 2- Soluciones	37
ANEXO 3- Marcadores de Peso Molecular	39
ANEXO 4- SDS- PAGE	40

Abreviaciones utilizadas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ORF (Open Reading Frame): Marco abierto de lectura.

ATP: Adenosín trifosfato.

LPS: Lipopolisacárido.

TROMPs (treponemal rare outer membrane proteins): Proteínas presentes en bajas concentraciones en la membrana de treponemas.

N-terminal: Extremo amino terminal.

IgG: Inmunoglobulina de tipo G.

IgM: Inmunoglobulina de tipo M.

IgA: Inmunoglobulina de tipo A.

RIT (Rabbit Infectivity test): Método de inoculación de treponemas en conejos.

DFA-TP (Direct Fluorescent Antibody Test for *Treponema Pallidum*): Test directo para el diagnóstico de *Treponema pallidum* utilizando anticuerpos fluorescentes.

PCR (Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la Polimerasa.

FTA (Fluorescent Treponemal Antibody): Test diagnóstico de Sífilis mediante el uso de anticuerpos fluorescentes.

TPHA (*Treponema pallidum* particle agglutination assay): Ensayo de hemoaglutinación para la detección del *Treponema pallidum*.

ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay): Test que utiliza anticuerpos conjugados para la detección de un antígeno.

LCR: Líquido Céfal Raquídeo.

ARN: Ácido ribonucleico.

O.N: Overnight, toda la noche.

PCR: Polymerase Chain Reaction; Reacción en cadena de la Polimerasa.

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis): Electroforesis en gel de poliacrilamida, con dodecil sulfato de sodio.

BSA: Seroalbúmina bovina.

DTT: Dithiothreitol.

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud estima que la infección por *Treponema pallidum* causa unos doce millones de casos nuevos de Sífilis cada año y se estima que gran cantidad de casos no han sido diagnosticados aún. Pese a ser una enfermedad curable, sus consecuencias resultan en cuadros graves para el infectado.

La enfermedad es de curso lento, hecho que se asocia a las características morfológicas de la espiroqueta causante, dado que en su membrana externa no abundan antígenos blanco del sistema inmune, sin embargo se han identificado una serie de lipoproteínas altamente antigénicas que serían responsables de la respuesta de anticuerpos frente a la bacteria, son ejemplos de estas proteínas la Tpp15, Tpp17, Tpp47.

Esta tesina de grado se enfocó en la expresión de la Tpp17 para su posterior uso en tests rápidos para el diagnóstico de Sífilis. Se logró en primera instancia la expresión de la proteína antigénica recombinante Tpp17 en *E. coli* utilizando diferentes condiciones. En una etapa posterior se llegó a su purificación utilizando diferentes métodos cromatográficos, y se cuantificó la cantidad de proteína generada mediante el método del BCA (Método del Ácido Bicinconínico) para estudiar el rendimiento.

1- INTRODUCCIÓN

1.1- GENERALIDADES

SÍFILIS

La Sífilis es una enfermedad de transmisión sexual exclusiva del ser humano, y causada por una espiroqueta flagelada móvil (*Treponema pallidum*) que penetra las mucosas. La enfermedad afecta distintos sistemas incluyendo piel y mucosas, es de curso crónico y de no ser tratada correctamente da lugar a diferentes estadios (primario, secundario, tardío) cada uno de ellos con signos y síntomas propios como por ejemplo gomas, neurosífilis, cardiovascular y congénita (ver pág. 8). Comienza por una lesión genital o por vía transplacentaria y continúa hasta diseminarse por los distintos sistemas [1].

1.2- MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Sífilis primaria. Ente los 10 y 90 días de ingresada la espiroqueta al organismo, se manifiesta el primer signo de infección como un chancro (puede no ser aparente en algunos pacientes en los que se manifestó en sitios poco notorios como por ejemplo el cuello del útero), una ulceración de aspecto redondeado que raramente causa dolor y segrega un líquido seroso que contiene una gran cantidad treponemas. El chancro se cura sin dejar señales entre la tercer y sexta semana de iniciado pero continúa la diseminación sistémica en el huésped [1].

Sífilis secundaria. Una vez que la infección se haya diseminado tanto a nivel circulatorio como en tejidos, alrededor de unos cuatro meses luego del ingreso de los treponemas al organismo, se empiezan a observar signos sobre toda la superficie corporal que van desde lesiones papulosas hasta puntos necróticos en tronco y extremidades.

Esta etapa está caracterizada también por la aparición de fiebre baja, pérdida de peso, malestar general y en un porcentaje importante de pacientes el sistema nervioso se encuentra comprometido con posibilidad de desarrollar un cuadro de meningitis aséptica aguda [1].

Sífilis latente. Durante esta fase de la enfermedad el paciente no presenta síntomas, sin embargo continúa infectado y su diagnóstico es detectable únicamente a través de test serológicos [1].

Sífilis tardía. Aparece luego de varios años de latencia (por lo menos cuatro), en pacientes que no han recibido tratamiento adecuado y se manifiesta de formas benignas y malignas [1].

Sífilis tardía benigna (gomas)- Se trata de tumoraciones indoloras que aparecen en respuesta a reacciones de hipersensibilidad contra la espiroqueta, dichas gomas pasan por cuatro estados: de formación, de reblandecimiento, de ulceración y de reparación. Estas lesiones no cuentan con gran cantidad de espiroquetas y los sitios en donde se pueden localizar son piel, hueso, tracto respiratorio superior, hígado y estómago. Sus consecuencias van a depender del sistema en el que se encuentren [2].

Neurosífilis- Las consecuencias de la Sífilis no tratada sobre el sistema nervioso van a depender del tiempo que hace que el paciente está enfermo así como también de su estado inmune y presentan varias formas clínicas: *Neurosífilis asintomática*, *Neurosífilis menígea*, *Neurosífilis meningovascular*, *Parálisis general progresiva*, *Tabes dorzal*, *Gomas del SNC*, etc. El estudio del LCR es el método elegido para el diagnóstico ya que es lo primero que se altera en casos de Neurosífilis [3].

Sífilis cardiovascular- Se presenta sólo en un 10% de los pacientes sifilíticos con más de diez años de enfermedad latente. Las lesiones se localizan en los grandes vasos y su localización principal es en el segmento ascendente del arco aórtico, causando aortitis con destrucción de tejido elástico, tiene consecuencias letales para el paciente [4].

Sífilis congénita. Se refiere a la infección por *Treponema pallidum* transmitida al feto por vía transplacentaria y va a depender de la etapa de la enfermedad que esté cursando la madre ya que en las primeras la transmisión al feto puede llegar al 100% de los casos, bajando el riesgo de infección en etapas más avanzadas. La infección del feto puede llevar a prematuridad del parto, muerte neonatal o fetal, entre otras [5].

La sífilis congénita se manifiesta en el niño básicamente en dos formas:

Sífilis precoz o temprana- Los niños nacidos con Sífilis congénita no presentan síntomas al nacer pero estos se manifiestan en los primeros meses de vida y están asociados a adenopatías generalizadas, síndrome nefrótico, neumonitis, coriza sifilítica, hepatoesplenomegalia, manifestaciones cutáneas, osteítis, nefritis, hepatitis sifilítica. Cambios hematológicos: anemia, trombocitopenia, glaucoma y chancro en los párpados, entre otros [6].

Sífilis tardía- Se asocia más que nada a lesiones óseas y se da en consecuencia a la cicatrización de lesiones primarias como son los “dientes de Hutchinson”, molares “en mora” o de Moon, destrucción maxilar y de paladar, nariz en silla de montar, prominencia frontal, engrosamiento en la parte proximal de las clavículas, “tibia en sable”, así como también retardo mental, hidrocefalia, convulsiones, paresia juvenil, sordera y ceguera por afectación de pares craneales [6].

1.3- ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

La Sífilis es una enfermedad de distribución mundial y tiene consecuencias no solo para la salud pública registrándose altos niveles de morbilidad, sino también a nivel social y psicológico. La OMS estima que por año se infectan en el mundo unas doce millones de personas de las cuales, dos millones corresponden a mujeres embarazadas, esto a pesar de ser una infección fácilmente tratable (con penicilina) y prevenible [7].

La región latinoamericana no es ajena a esta situación mundial, ya que se estima que tres millones de adultos se infectan cada año y que en al menos diez países de Latinoamérica y el Caribe la tasa de nacidos vivos con sífilis congénita está por encima del objetivo planteado por la OPS (de 0.5 X 1000 nacidos vivos) en 2004 [8-9].

La OMS estima que gran parte de las muertes de niños en sus primeras semanas de vida (cifra que asciende a 3.3 millones en el mundo) estarían relacionadas a la enfermedad por *Treponema pallidum* generalmente en países que se encuentran en desarrollo [10].

A pesar de que en gran parte de América Latina y Caribe la atención médica prenatal es en promedio aceptable ya que están controlados más del 50% de los embarazos, se observa en aumento la prevalencia de sífilis congénita (con excepción de Cuba que ha logrado disminuir dicha prevalencia). Este hecho podría estar relacionado a la falta de concientización de sus consecuencias y a la importancia de tratar tanto a la mujer embarazada como a su pareja sexual. También la dificultad de algunas poblaciones de acceder a controles médicos regulares así como al miedo de estigma y discriminación social que se generan en torno a las enfermedades de transmisión sexual presentan un reto a vencer para el control de la enfermedad congénita

Ante tal escenario, resulta de primordial importancia el diagnóstico a tiempo como forma de prevenir de forma exitosa la sífilis congénita [8-11].

1.4- AGENTE ETIOLÓGICO



Figura 1. Microfotografía del *Treponema pallidum* [12]

Treponema pallidum pertenece a la familia *Spirochetaceae*. Su tamaño va de 6 a 15 micras de longitud, posee forma helicoidal y un flagelo móvil que lo dota de un movimiento característico [Figura 1]. De división lenta (aprox. 30 horas) por fisión, es un microorganismo anaerobio y que experimentalmente solo

se logra conservar con virulencia en células de testículo de conejo. Existen casos como la cepa Nichols que se logra cultivar en otros tejidos pero pierden la virulencia [1].

Se trata de un microorganismo de pared Gram-negativa y su forma de vida es de parásito obligado, resulta muy sensible al medio ambiente y muere al poco tiempo de encontrarse fuera del cuerpo humano por factores diversos como desecación, pH, radiación UV y distintas temperaturas [1].

Su membrana externa es una bicapa constituida mayormente por fosfolípidos y con pocas proteínas ancladas [Figura 2]. Esta baja cantidad de proteínas en su cubierta externa se traduce en una membrana poco inmunogénica lo que se plantea como uno de los factores virulentos con los que cuenta el treponema para persistir en su huésped.

Al igual que el resto de las Gram-Negativas, la capa de peptidoglicano es relativamente fina, sin embargo, es el objetivo de agentes beta-lactámicos como la Penicilina.

La respuesta inmune del huésped es generada mayormente por lipoproteínas ya que el *Treponema*

pallidum carece de

lipopolisacáridos en su estructura

y se cree que la fagocitosis con

posterior destrucción de

la bacteria generan las

citoquinas necesarias para

activar eficazmente a

células del sistema

inmune como son los monocitos, macrófagos y linfocitos entre otras [12].

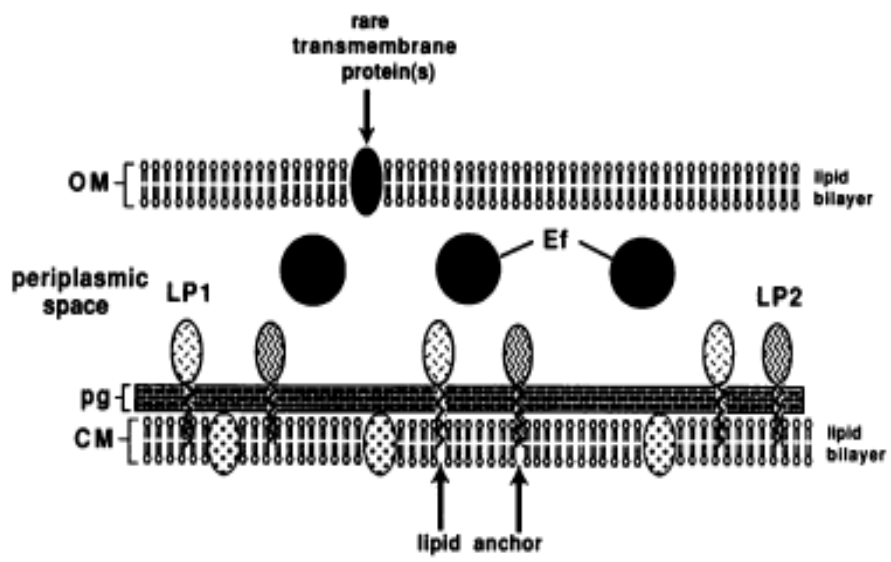


Figura 2. Modelo propuesto de membrana del *Treponema pallidum*. OM: Membrana externa, pg: peptidoglicano, CM: Membrana interna, LP: Mayores inmunógenos Ef: Endoflagelos [12]

1.5- VIRULENCIA

Los principales factores de virulencia del treponema están dados principalmente por su forma y movimiento, que facilitan penetrar en los diferentes tejidos y mucosas. La membrana externa también cumple un rol importante en la virulencia. No solo permite el anclaje efectivo a los tejidos, sino que su baja cantidad de proteínas antigénicas (que generalmente

son blanco preferencial de anticuerpos en infecciones bacterianas), le permite a la bacteria permanecer gran tiempo dentro de su hospedador [13].

1.6- GENOMA DEL *TREPONEMA PALLIDUM*

En 1998 se secuenció el genoma de *T. pallidum* subs. *pallidum* cepa Nichols. Se determinó que es un genoma circular y consta de 1.138.006 pares de bases, con 1041 marcos abiertos de lectura (ORF's) y sin elementos extracromosomales.

El 55% de los ORF corresponde a proteínas con funciones conocidas, el 17% coincide con genes

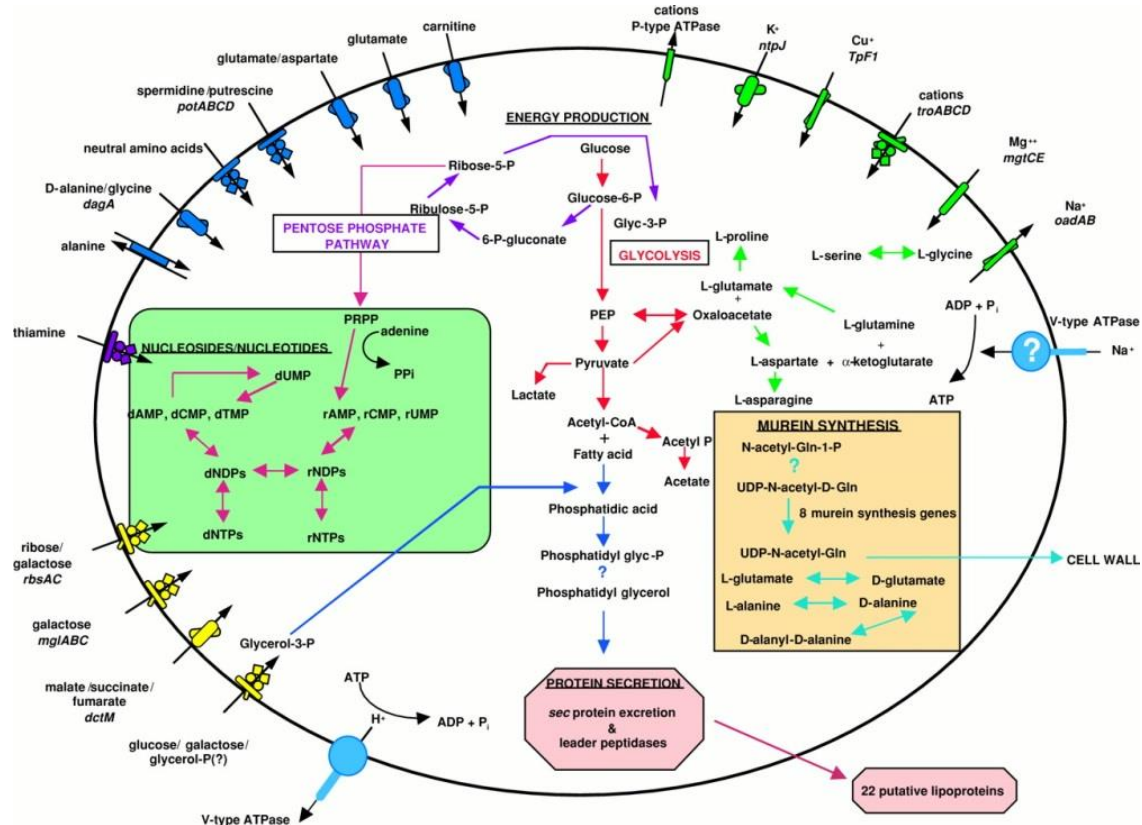


Figura 3. Diagrama que explica los mecanismos y componentes del *Treponema* que fueron elucidados por análisis genómico. [13]

que codifican proteínas en otras especies y el 28% corresponderían a genes presentes sólo en *T. pallidum*.

La segregación cromosómica se da mediante un mecanismo que implica el anclaje de ADN hemimetilado a la membrana citoplasmática (presente *dam- adenina metil transferasa*). El sistema de reparación de ADN que utiliza es mediante *uvr*, *mutL/mutH*, *mutY* y *dat*.

A partir del análisis de su genoma, se llega a la conclusión de que *T. pallidum* sólo crece bajo condiciones limitadas de oxígeno molecular ya que carece de genes que codifiquen para proteínas protectoras contra la toxicidad de éste como son la superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. Sin embargo, se encuentran presentes genes codificantes para la NADH oxidasa.

A su vez la sensibilidad hacia los cambios de temperatura que presenta el treponema se debe a que si bien el microorganismo consta de un juego básico de proteínas protectoras contra shock térmico, no se encuentran presentes genes para σ^{32} .

A nivel metabólico *Treponema pallidum* es capaz de realizar glucólisis pero no están presentes genes que le permitan realizar el ciclo de los ácidos tricarbónicos o fosforilación oxidativa. La producción de ATP se da acompañada de fosforilación a nivel de sustrato [Figura 3].

Tampoco dispone de genes que le permitan utilizar fuentes alternativas de carbono y no puede sintetizar aminoácidos ni ácidos grasos, lo que lo lleva a depender de su huésped si precisa sintetizar macromoléculas.

Presenta gran cantidad de proteínas de transporte específicas para cationes, aminoácidos y carbohidratos.

El análisis genómico indica la presencia de 22 lipoproteínas en la membrana externa.

T. pallidum presenta genes parálogos que codifican proteínas implicadas en interacciones adhesina- ligando e integrinas (familia *tpr* A-L) y la presencia de éstas resulta importante para identificar blancos de una posible vacuna [14]. En lo que refiere a la movilidad, los genes se encuentran conservados y comparten gran homología con respecto a otras espiroquetas. Para la quimiotaxis, que le resulta primordial al treponema para su amplia diseminación en los tejidos, son identificados cuatro genes: *mcp1* (TP0040), *mcp2-1* (TP0488), *mcp2-2* (TP0639), y *mcp2-3* (TP0640) [15].

La respuesta inflamatoria generada por *T. pallidum* va a favorecer la penetración dentro de los tejidos así como la expresión de moléculas de adhesión. También la presencia de proteínas como la Tpp47 van a activar una cascada de diferentes proteínas y factores de inflamación como son la E- selectina, TNF- α , IL- β , IL-6, IL-8 e IL-12 [15].

1.7- COMPONENTES ANTIGÉNICOS

Una característica notable del *T. pallidum* es su capacidad para evadir la respuesta tanto celular como humoral de su huésped utilizando mecanismos como localización intracelular o cubriendo su superficie con glucosaminoglicanos del hospedero. A su vez, en su cubierta externa están ausentes LPS (lipopolisacáridos) o endotoxinas que en otras bacterias Gram-negativas provocan reacciones inmunes exacerbadas [16-17].

Otro factor importante en la latencia del treponema es que su membrana externa contiene pocas proteínas. Esto es importante porque minimiza las moléculas que pueden ser reconocidas por el sistema inmune. De todas formas, se han identificado determinadas lipoproteínas altamente antigénicas que la bacteria utiliza para interactuar con su ambiente así como para facilitar la invasión y adhesión a tejidos y son responsables de la respuesta de anticuerpos y células endoteliales. Son ejemplos de estas proteínas: Tpp47, Tpp17, y Tpp15 [18]. Utilizando un algoritmo computacional (SpLip), se identificaron 46 proteínas que podrían ser blancos para una posible vacuna contra la sífilis [Tabla1] [15].

Tabla1. Proteínas antigénicas de membrana de *T. pallidum* (Norris, 1993).

LOCUS	GEN	FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA	LOCUS	GEN	FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA
TP0 009	<i>tprA</i>	Proteína A tpr (Frame shift)	TP0897	<i>tprK</i>	Proteína K tpr
TP0011	<i>tprB</i>	Proteína B tpr	TP1031	<i>tprL</i>	Proteína L tpr
TP0017	<i>tprC</i>	Proteína C tpr	TP0155	-	Proteína hipotética conservada
TP0131	<i>tprD</i>	Proteína D tpr	TP0163	<i>troA</i>	Transportador ABC periplásmico
TP0313	<i>tprE</i>	Proteína E tpr	TP0257	<i>glpQ</i>	Glicerolfosforiléster, fosfodiesterasa
TP0316	<i>tprF</i>	Proteína F tpr (Frame shift)	TP0326	-	Proteína de membrana externa
TP0317	<i>tprG</i>	Proteína G tpr	TP0153	-	Proteína hipotética
TP0610	<i>tprH</i>	Proteína H tpr	TP0483	-	Proteína hipotética
TP0620	<i>tprI</i>	Proteína I tpr	TP0663	-	Proteína putativa de memb. externa
TP0621	<i>tprJ</i>	Proteína J tpr	TP0751	-	Proteína hipotética

1.8- PROTEÍNA ANTIGÉNICA TPP17 (Tp0435)

La proteína Tpp17 fue identificada primariamente como una molécula lipoproteica de 17-kDa que era reconocida fuertemente con sueros positivos para la enfermedad. Su presencia en la membrana externa del treponema es mínima ya que se descubrió que de las proteínas de membrana presentes, representa solo el 2%.

Su presencia está relacionada a la respuesta inmune del paciente ya que estimula la producción TNF- α por parte de los macrófagos del tejido y genera un aumento en la respuesta de linfocitos a partir de los diez días de infección aproximadamente [19].

Pertenece al grupo de las TROMPs (treponemal rare outer membrane proteins) que son un grupo de proteínas de membrana que se encuentran en bajas concentraciones. Debido a esto podrían participar en la evasión de la respuesta inmune del huésped [16].

Si bien su ubicación pareciera ser mayormente en el periplasma y no en la superficie externa como se planteó en un momento, la proteína se encuentra anclada a la membrana mediante una cola hidrofóbica N-terminal.

A partir de su secuencia aminoacídica se descubrió que contiene un tetrapeptido consenso presente en proteínas de carácter lipídico de procariotas y se confirmó luego que su extremo hidrofóbico es producto de una modificación lipídica (palmitoilación) [20].

También en su secuencia se distinguen gran cantidad de cisteínas que generan enlaces disulfuro. Sin embargo, las formas de mayor tamaño de Tpp17 están afectadas mas que nada por interacciones hidrofóbicas.

Mediante secuenciación de Tpp17 se llegó a la conclusión de que tiene un 20% de homología con NLP_E que es una proteína de anclaje a membrana de *E.coli* que está relacionada a la respuesta al stress pero Tpp17 no parece tener esta función en el treponema [19].

1.9- RESPUESTA EN ANTICUERPOS

La respuesta de anticuerpos al patógeno *T. pallidum* en suero ha sido estudiada tanto en animales como en humanos infectados.

Los primeros anticuerpos en ser detectados en suero son de tipo IgM y se producen alrededor de dos semanas luego de la exposición a la espiroqueta, a éstos los siguen los IgG unas dos semanas luego de la producción de IgM.

Los anticuerpos de tipo IgG ven aumentado su título en pacientes con sintomatología persistente en el tiempo y al igual que en pacientes con sífilis latente no tratada, baja el título de IgMs pero aumenta la variabilidad de antígenos reactivos para los IgGs. Luego del tratamiento en estadios primarios o secundarios el título de anticuerpos de clase IgM es casi indetectable pero la presencia de anticuerpos de clases IgG puede persistir por años independientemente si se trató o no la enfermedad.

A su vez, en un tercio de los pacientes, se encuentran elevados los niveles de anticuerpos de clase IgA [18].

1.10- DIAGNÓSTICO DE SÍFILIS EN EL LABORATORIO

Los métodos de diagnóstico de laboratorio pueden ser de dos tipos básicamente, los que van a detectar directamente al agente infeccioso o a los anticuerpos generados específicamente contra éste patógeno [21].

Métodos de detección directa

Dentro de este tipo de métodos, uno de los primeros fue el llamado **RIT (Rabbit Infectivity Test)**; éste consistía en la inoculación de animales, o sea, en transferir espiroquetas provenientes de chancros humanos a testículos de conejos. Si bien resulta ser un método extremadamente sensible, no es práctico para laboratorios diagnósticos ya que no sólo tiene un alto costo sino que los resultados se obtienen luego de noventa días, sin embargo es muy útil en laboratorios de investigación [22].

Otra forma de detección directa es por medio de microscopía, estudiando el exudado de la lesión primaria se puede realizar mediante microscopía de campo oscuro y/o fluorescencia directa (DFA-TP). Ambos métodos tienen la ventaja de ser inmediatos, de bajo costo y de diagnóstico definitivo. Se pueden realizar antes que la pruebas serológicas, son indicados en las fases primarias y secundarias. Sin embargo, un resultado negativo en el examen directo de la lesión no descarta la enfermedad, ya que la cantidad de treponemas en el área de muestra puede variar. Otras desventajas de la observación por microscopía de campo oscuro son que requiere de personal entrenado, las muestras no pueden tener más de veinte minutos de tomadas, ya que la movilidad del treponema se vería afectada (característica importante para su identificación) y no es útil en heridas bucales, porque se corre el riesgo de

confundirlo con otros treponemas no patógenos como *T. denticola*, pudiendo generar falsos positivos. En el caso de la detección directa con anticuerpos conjugados con fluorocromos no se tiene en cuenta la motilidad del treponema lo que resulta de utilidad cuando se trata de muestras no recientes [22].

Existen numerosos métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para el diagnóstico de sífilis que resultan altamente efectivos en lo que refiere tanto a especificidad como a sensibilidad ya que basta una única espiroqueta en la muestra para que se logre un resultado positivo. Desafortunadamente, dado que no siempre las muestras contienen espiroquetas, para el diagnóstico clínico no resulta del todo útil pudiendo generar falsos negativos [22].

Métodos de detección indirecta

Dado que a nivel clínico generalmente no resulta posible contar con muestras que cumplan las características necesarias para utilizar un método de detección directo, los métodos indirectos o serológicos son los que se emplean más frecuentemente.

La respuesta humoral contra el treponema se comienza a detectar a las dos semanas y continúa en aumento durante las primeras fases de la enfermedad. Las pruebas se dividen en treponémicas y no treponémicas de acuerdo a si los anticuerpos que se detectan son contra antígenos específicos de treponema, o si son antígenos de especificidad más amplia [22].

Pruebas treponémicas:

La existencia de anticuerpos anti treponema significa que el paciente está cursando la enfermedad o que en algún momento de su vida tuvo contacto con ésta incluso si fue tratado exitosamente, por este motivo, este tipo de pruebas no es aconsejable para seguir tratamientos pero son indicadas para confirmar resultados positivos [23].

Son ejemplos de pruebas treponémicas:

- FTA-ABS 200. Inmunofluorescencia indirecta con absorción del suero
- FTA-ABS 200 DS. Inmunofluorescencia indirecta con absorción y doble tinción.
- TPHA. Microhemaglutinación.
- Captia Syphilis M. ELISA de captura anti cadena pesada.
- ELISA IgG.
- FTA-ABS 19S IgM.
- FTA-ABS LCR.
- Western blot.

Pruebas no treponémicas:

Estas pruebas se basan en la detección de anticuerpos dirigidos contra un fosfolípido de membrana (cardiolipina).

Se corre el riesgo con este tipo de pruebas de generar tanto falsos negativos (ya que los anticuerpos no treponémicos pueden no detectarse en sífilis tardía o en un estadio muy precoz) como falsos positivos (porque existe un porcentaje importante de reacciones con enfermedades como Hepatitis, Malaria, Mononucleosis, entre otras) [22].

Son ejemplos de pruebas no treponémicas:

- **V.D.R.L.** Venereal Research Disease Laboratory. Consiste en una preparación de cardiopina pura, lecitina y colesterol cuya reacción positiva es la de floculación de la muestra.
- **R.P.R.** Rapid Plasma Reagin. Similar al anterior, con el agregado de partículas de carbón para hacer visible la floculación.
- **TRUST.** Tolidine Red Unheated Serum Test. Utiliza partículas coloreadas con rojo de toluidina para poner en evidencia la floculación.
- **U.S.R.** Unheated Serum Reagin. Variante similar al VDRL, con agregado de cloruro de colina como aditivo que sirve para bloquear sustancias interferentes y eliminar la necesidad de calentar el suero.
- **E.L.I.S.A.**

Tabla 2. Sensibilidad de los métodos diagnósticos durante la etapa de infección [18]).

TEST	FASE1	FASE2	LATENTE	TARDIA
VDRL	78	100	96	71
TRUST	85	100	98	ND
RPR	86	100	98	73
MHA-TP	76	100	97	94
TPPA	88	100	100	ND
TPHA	86	100	100	99
FTA-ABS	84	100	100	96
IgG-ELISA	100	100	100	ND
IgM-EIA	93	100	64	ND
ICE	77	85	100	100
CLIA	98	100	100	100

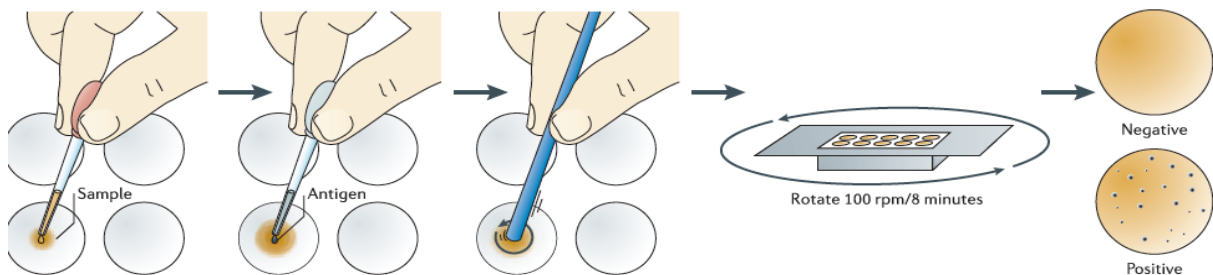


Figura 5. Ejemplo de test de floculación, en este caso, se muestra el RPR [24].

* De los métodos discutidos, sólo la VDRL es útil en el diagnóstico de neurosífilis ya que es la única validada para utilizarse en LCR (Líquido Céfal Raquídeo) [25].

Pruebas rápidas para sífilis

Antes de la existencia de éste tipo de pruebas, se requería no solo de personal capacitado

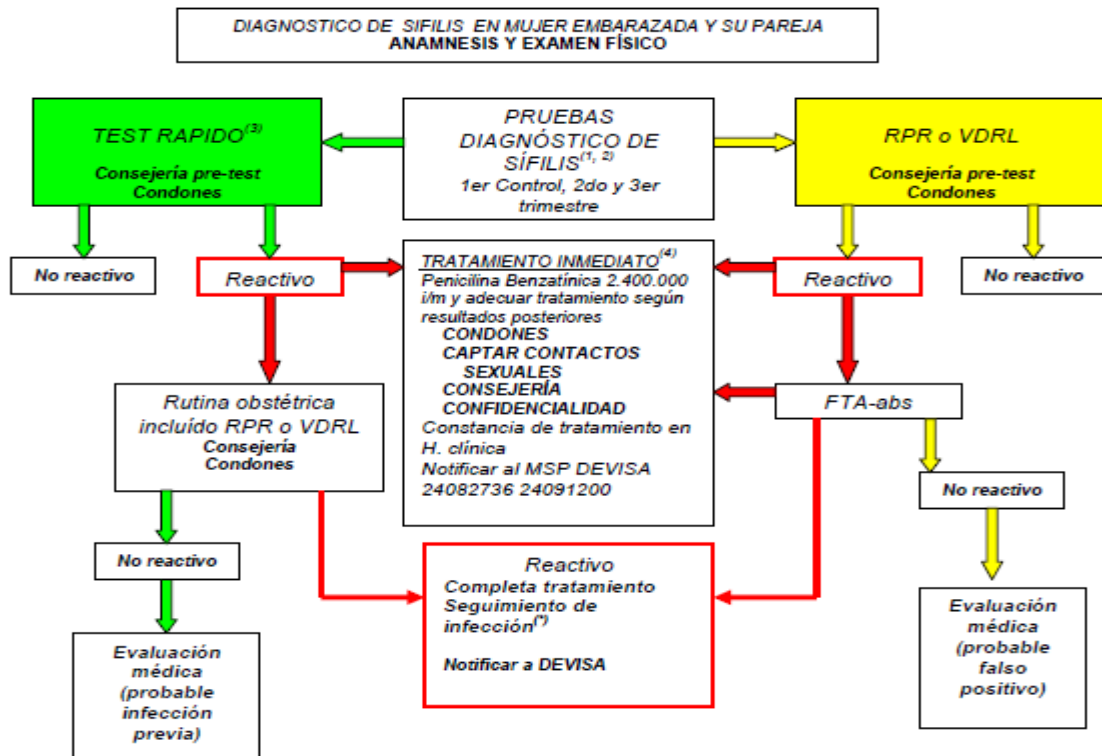


Figura 6. Algoritmo propuesto por el MSP para el diagnóstico de sífilis en la mujer embarazada [26].

para el transporte y manipulación de las muestras, de equipamiento específico de laboratorio y de días para la obtención de un resultado antes de poder brindar tratamiento, esto conducía en algunos casos a que el paciente no volviera a retirar su resultado (cuyo caso significaba un riesgo para la salud pública ya que potencialmente estos pacientes estarían diseminando la enfermedad). Por ésta razón, son indicados principalmente en poblaciones aisladas, con difícil acceso a centros de salud o bien como primer estudio anti-sifilítico en embarazadas [Figura 6] [22].

Los tests rápidos son pruebas diagnósticas que consisten en tiras inmunocromatográficas que utilizan gotas de suero o sangre y

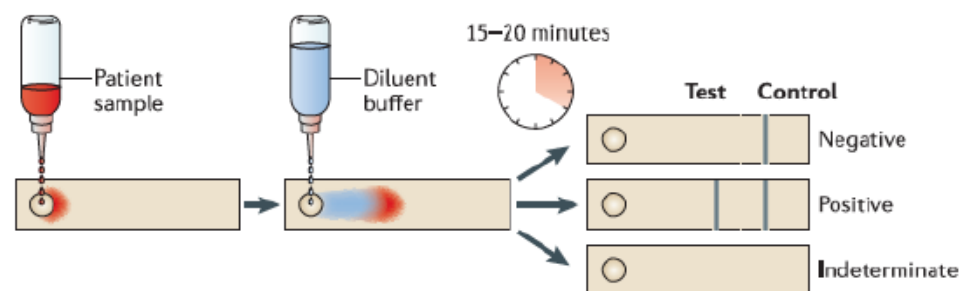


Figura 7. Modelo general de un test rápido [24].

con las cuales se obtienen resultados a los pocos minutos. Utilizan como antígenos a proteínas recombinantes de *T. pallidum* para captar anticuerpos de tipo IgM, IgG e IgA.

Si bien presentan ventajas múltiples relacionadas a su rapidez y bajos costos por kit, no distinguen entre sífilis activa o pasada no permitiendo hacer seguimiento de la enfermedad.

Cabe aclarar que todos los negativos deben ser confirmados con otro tipo de pruebas [18].

1.11- ANTIGENOS RECOMBINANTES DE *T. PALLIDUM*

La purificación directa de antígenos de treponema no resulta práctica cuando se requieren grandes cantidades. Esto es porque el organismo no puede ser cultivado y necesita la propagación en animales. También la utilización del extracto crudo ha arrojado un gran porcentaje de falsos positivos. Por estos motivos, la utilización de antígenos recombinantes plantea ventajas ya que mediante técnicas de ADN recombinante se logra acceder a grandes cantidades de antígenos cuando se los produce en organismos como *Escherichia coli* que tienen bajo costo, alta densidad de cultivo y fácil manipulación genética.

Algunos de los antígenos recombinantes utilizados para el diagnóstico de sífilis son lipoproteínas como TpN44.5, TpN15, TpN17, y TpN47 [18].

En este contexto sería interesante desarrollar un sistema de diagnóstico de Sífilis utilizando antígenos recombinantes claves.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo principal

El objetivo principal de este trabajo de tesina es la optimización de la expresión y purificación de la proteína antigénica Tpp17 recombinante en *E. coli* para su utilización posterior en el diagnóstico de Sífilis.

2.2- Objetivos específicos

- Análisis de los plásmidos recombinantes **pET_Tpp17-6His** y **pGEX_Tpp17-6His** extraídas de bacterias *E. coli* BL 21 previamente transformadas.
- Expresión de la proteína recombinante Tpp17 en bacterias *E. coli* BL 21.
- Purificación y cuantificación de Tpp17 recombinante.

3- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Bacterias y plásmidos utilizados.

Para la expresión de proteínas, se utilizó la cepa de *E. coli* BL 21 Star (DE3) transformada previamente de forma química con los plásmidos:

pET_Tpp17-6His y pGEX_Tpp17-6His.

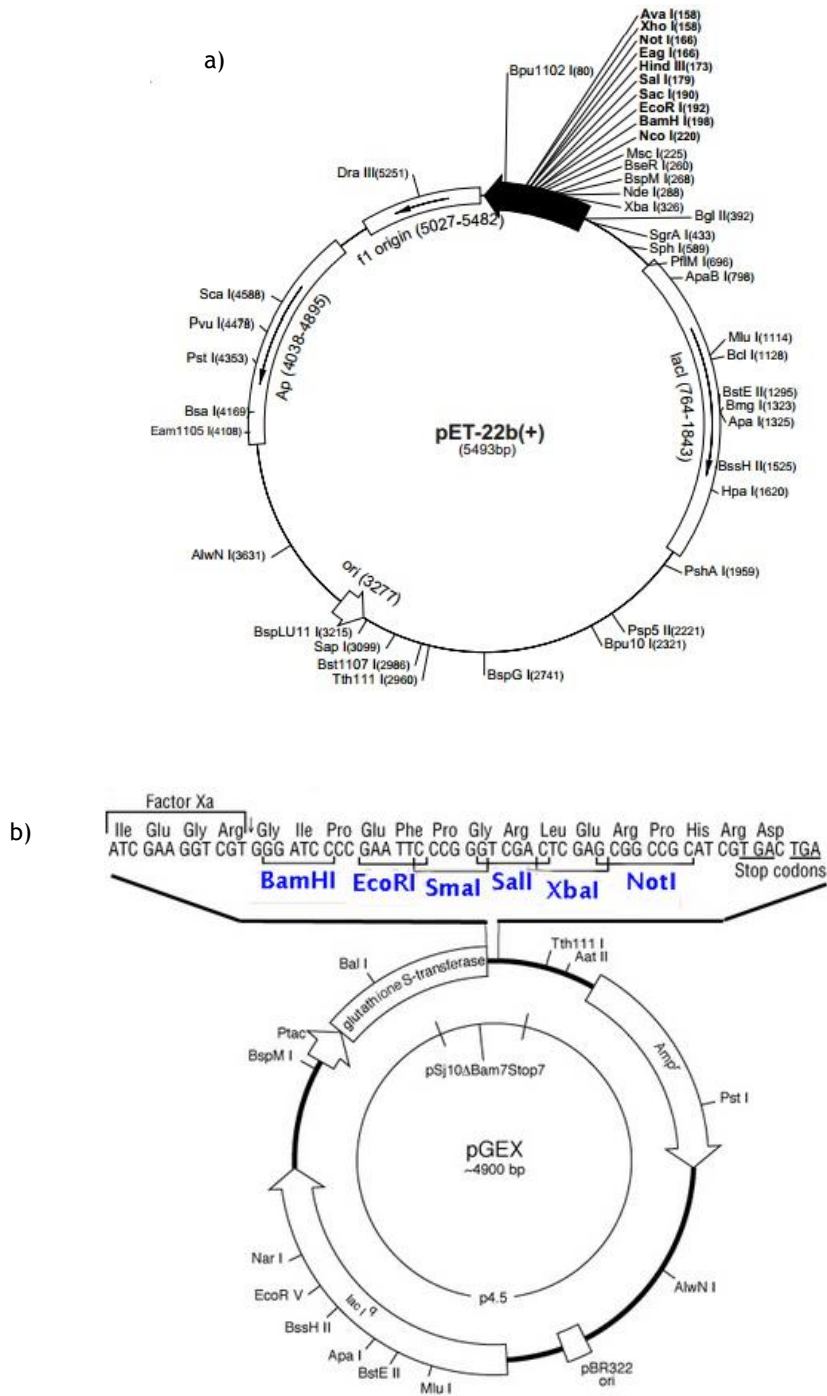


Figura 8. Plásmidos – Se observan los mapas de los plásmidos utilizados. a) pET22(+), b) pGEX.

3.2- Preparación de placas de cultivo LB-Agar.

Se disolvieron 4,75 g de medio LB y 4,50 g de agar en 300 ml de H₂O destilada dentro de un frasco Schott que se esterilizó en autoclave durante veinte minutos a 121°C, luego se le agregaron 300 µl de Ampicilina 100 mg/ml, se distribuyó en placas y se dejó solidificar el medio.

3.3- Cultivo de las bacterias.

A. En medio sólido:

La cepa de *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con los plásmidos pET_Tpp17-6His o pGEX_Tpp17-6His fue inoculada por siembra en estrías sobre las placas de agar-LB que luego fueron incubadas en estufa a 37°C durante toda la noche.

B. En medio líquido LB:

Con ansa de metal esterilizada se inocularon 4 tubos previamente autoclavados conteniendo 3 ml de medio LB con las colonias aisladas de *E. coli* BL 21 obtenidas del cultivo sólido y se incubaron durante toda la noche en estufa a 37°C con agitación continua.

C. En medio autoinductor ZYM- 5052:

A partir de una placa con colonias *E. coli* BL 21 Star (DE3) transformada previamente con el plásmido pET_Tpp17-6His, se inoculó con ansa de metal 200 ml de medio autoinductor ZYM-5052 y se dejó en estufa a 37 y a 30°C O.N. (toda la noche) con agitación constante de 200 rpm.

3.4- Extracción de ADN plasmídico de bacterias *E. coli* BL 21 transformadas con los plásmidos pET_Tpp17-6His o pGEX_Tpp17-6His.

Los tubos con 3 ml de cultivo bacteriano fueron centrifugados y el sedimento bacteriano se resuspendió en 150 µl de SOLUCIÓN 1 (ver anexo 2) con ayuda de vortex con el fin de que las bacterias se encuentren totalmente en solución, se le agregaron 150 µl de SOLUCIÓN 2 (ver anexo 2) y se agitó suavemente hasta observar una solución transparente debida a la lisis bacteriana. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante cinco minutos, y luego, se le agregaron 150 µl de SOLUCIÓN 3 (ver anexo 2), con el agregado de ésta, se formó un precipitado blanco, el contenido del tubo se centrifugó cinco minutos a máxima velocidad y se pasó el sobrenadante a otro tubo al que se le agregaron 900 µl de etanol 95% y se volvió a centrifugar a máxima velocidad para luego descartar el sobrenadante.

El precipitado de ácidos nucleicos fue enjuagado con 1000 µl de etanol 70% y resuspendido en 100µl de H₂O MilliQ para ser colocado en freezer.

Luego de descongelado el ADN plasmídico, se le agregó 1 µl de ARNasa y se dejó en estufa durante 15 minutos.

3.5- Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La separación de los plásmidos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, disolviendo 0,5 gr de ésta en 50 ml de buffer TAE 0.5X, a ésta mezcla se la calentó hasta obtener la fundición total de la agarosa y se la dejó solidificar en un soporte con peines. Se sembraron diferentes muestras así como un **Marcador de Peso Molecular (MPM)** (ver Anexo3). La migración fue a 100 V durante 20 minutos. El gel fue preteñido con 1 µl de “**Good View**” y posteriormente visualizados bajo luz ultravioleta.

3.6- Digestión con enzimas de restricción

El plásmido pET_Tpp17-6His fue digerido con las enzimas *XbaI* y *XhoI*, mientras que el pGEX_Tpp17-6His fue digerido con la enzima de restricción *EcoRI*. En ambos casos la mezcla tuvo un volumen total de 20 µl; para el pET_Tpp17-6His, ésta contenía: 17 µl de ADN plasmídico pET_Tpp17-6His, 2 µl de Buffer NEB2 10X, 0,5 µl de *XbaI* y 0,5 µl de *XhoI*, para digerir el pGEX_Tpp17-6His, la mezcla contenía: 17 µl de ADN plasmídico pGEX_Tpp17-6His, 2 µl de Buffer NEB 10X y 1,0 µl de *EcoRI*. Las mezclas fueron colocadas en estufa a 37°C durante toda la noche.

3.7- Lisis celular

Con el fin de extraer las proteínas, se pasaron las células crecidas en el medio ZYM 5052 a un baño hielo-agua y se agitó manualmente hasta enfriar.

La lisis celular se realizó en botellas para rotor JA-14 de centrífuga Beckman previamente pesadas y a 4°C. La primer centrifugación fue durante 15 minutos a 6500 rpm y los sobrenadantes se descartaron para calcular el peso húmedo de las células, luego se completó con PBS hasta llegar a un volumen final de 20 ml en 4 tubos falcon que se centrifugaron durante 15 min a 6000 g y 4°C, los sobrenadantes obtenidos fueron descartados y a los sedimentos se les agregaron 10 ml de PBS por gramo de peso húmedo y 1/10 de volumen de un detergente diferente para cada botella (**TRITÓN, TWEEN, DESOXICOLATO y un control sin detergente**).

A. Lisis enzimática:

La lisis enzimática se llevó a cabo mediante el agregado de Lisozima en una concentración de 200 µg/ml en cada tubo, se siguió con el agregado de DNAsa 1U/ml y se dejó con agitación constante durante veinte minutos.

B. Lisis mecánica por ultrasonido:

La lisis mecánica de las células fue mediante rondas de sonicación con microtip y pulsos de 40%, durante 5 minutos en baño de hielo-agua

*Luego de cada lisis, el contenido resultante fue centrifugado 2 veces a 4°C durante 15 min y 13000 rpm, de cada extracto se guardó una alícuota de 1 ml para los análisis posteriores y a los sedimentos de cada tubo (Fracción insoluble) se los resuspendió en 10 ml de UREA 8M por gramo de peso húmedo de células.

3.8- Electroforesis de proteínas

A las muestras se les agregó en todos los casos buffer de carga se las colocó en Termoblock a 80°C junto con el MPM durante cinco minutos antes de ser sembradas en los pocillos de cada gel.

A. Geles de 10 ml, 15% de Poliacrilamida

El análisis de proteínas se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15%, de 1.0 mm de espesor que migraron en cubas BioRad a 50 V durante unos veinte minutos hasta la salida de las proteínas del gel concentrador (stacking), y luego a 200 V por el gel separador.

B. Geles de 35 ml, 15% de Poliacrilamida

Para visualizar las proteínas en todas las fases (soluble, insoluble, lavados, etc) se realizó la electroforesis de proteínas en geles de 35 ml de volumen en cuba Pharmacia Biotech. Las muestras migraron junto con un MPM y un control de Lisozima, a 90 V por el gel stacking y a 250 V a través del gel separador.

* Para ambos casos el buffer de corrida fue Tris-glicina y la tinción de proteínas se realizó con agitación suave en azul de Coomassie durante toda la noche y para decolorar los geles se utilizó solución decolorante con agitación suave.

3.9- Purificación de proteínas solubles

Con el fin de tener la proteína pura, se pasó por varios pasos de purificación utilizando distintas técnicas cromatográficas.

A. Cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado (IMAC).

Como principal método de purificación, se utilizó la IMAC, ya que se basa en la interacción de proteínas que contienen residuos de Histidina (como la His-Tag presente en la construcción de la TPP17) con iones metálicos divalentes (Ni^{2+} en este caso) que se encuentran inmovilizados por un quelante (Ni-NTA Agarose, Qiagen).

Para llevar a cabo la purificación IMAC, se comenzó por lavar 2 veces el lecho de la columna con PBS 1X y a continuación se lavó con PBS 1X hasta llegar a los 12 ml de volumen.

Las fracciones solubles obtenidas por Lisis celular, se filtraron con una membrana de 0,2 μm y fueron colocadas en cuatro tubos a los cuales se les agregaron 3 ml de resina y se dejaron con agitación suave durante quince minutos con el fin de fomentar el intercambio entre las muestras y la matriz.

Luego de pasadas las muestras por sus respectivas columnas, se tomaron los percolados y se lavaron las columnas con 27 ml de PBS 1X cada una (los lavados fueron descartados) y para finalmente eluir la proteína de la matriz se utilizaron cinco mililitros de Buffer de Elución (ver anexo 2) para cada tubo.

B. Cromatografía de gel filtración

En este caso se necesitó desalar las muestras y cambiar su buffer a Tris-HCl 1M, pH 8.3. Para esto, 2.5 ml de volumen de cada muestra fueron sembrados en PD-10 y se eluyeron con buffer Tris-HCl obteniéndose 3.5 ml de cada ensayo.

3.10- Cuantificación de proteínas

A. Reactivo de Bradford

Se tomaron 5 µl de muestra y se hicieron reaccionar con 200 µl de reactivo de Bradford con el fin obtener un producto coloreado dado por la presencia de proteínas.

B. Método del Ácido Bicinconínico (BCA)

La concentración de proteínas en la muestras fue determinada por el método de cuantificación por BCA de Kit Pierce y como estándar se hizo una curva de concentraciones de BSA.

El ensayo se realizó por triplicado [Figura 9]. Para la reacción se colocaron 25 µl de cada muestra con 200 µl de solución de trabajo (del Kit Pierce) y se dejó la placa 30 segundos a temperatura ambiente seguidos de treinta minutos en estufa a 37°C para luego ser leídos con Varioskan a 562 nm.

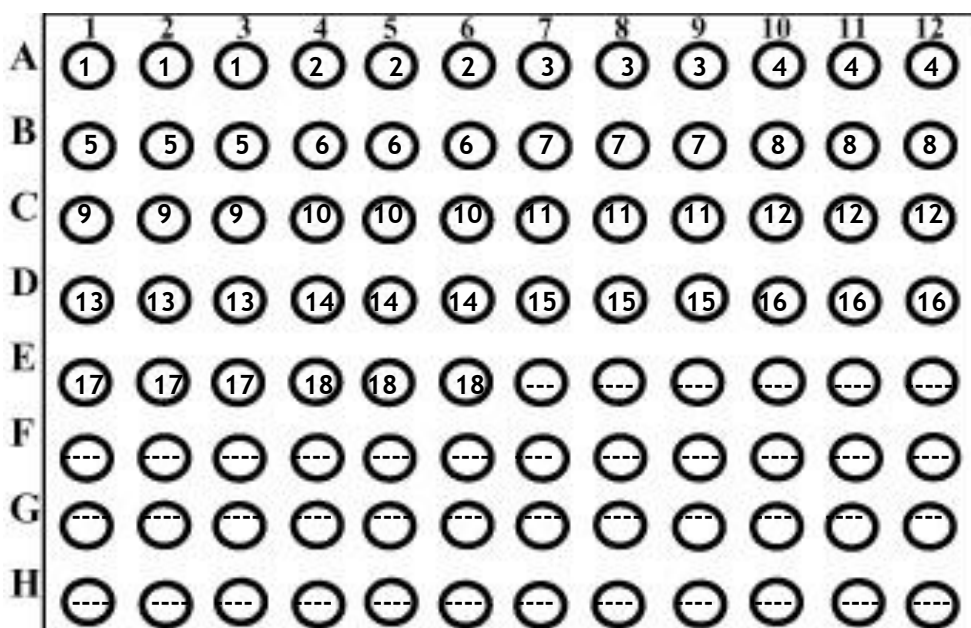


Figura 9. Esquema en el que se muestra el orden de sembrado en la placa de microtitulación. Contenido de los pocillos: (1) Curva estándar de BSA [1500 µg/ml], (2) Curva estándar de BSA [1000 µg/ml], (3) Curva estándar de BSA [750 µg/ml], (4) Curva estándar de BSA [500 µg/ml], (5) Curva estándar de BSA [250 µg/ml], (6) Curva estándar de BSA [125 µg/ml], (7) Curva estándar de BSA [25 µg/ml], (8) Curva estándar de BSA [0 µg/ml], (9) Eluato 1 de IMAC a 30°C, (10) Eluato 2 de IMAC a 30°C, (11) Eluato 3 de IMAC a 30°C, (12) Eluato 4 de IMAC a 30°C, (13) Eluato 5 de IMAC a 30°C, (14) Eluato 1 de IMAC a 37°C, (15) Eluato 2 de IMAC a 37°C, (16) Eluato 3 de IMAC a 37°C, (17) Eluato 4 de IMAC a 37°C, (18) Eluato 5 de IMAC a 37°C.

3.11- Detección de Tpp17 por Western Blot

Con el fin de confirmar la presencia de la Tpp17 en las muestras solubles obtenidas mediante fraccionamiento, se realizaron en paralelo dos gels de poliacrilamida al 15% y de 1.0 mm de grosor, uno para la separación electroforética y otro para realizar un *Western Blot* de la

siguiente manera: Luego de la migración de las muestras solubles y el control negativo (CN) el cual consistía en la fracción soluble de un cultivo de la cepa BL21 de *E.Coli* que contenía el plásmido pET22 sin inserto, el gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa mediante transferencia húmeda que se dio durante una hora a 400 mA en buffer de transferencia.

Luego de lograda la transferencia de las muestras y el MPM desde el gel a la membrana, ésta fue bloqueada con solución de leche descremada en polvo 5%, glicina 2% en buffer TBST 1X toda la noche a 4°C. Una vez que la membrana se encontraba bloqueada, se procedió a incubarla con 0.5 µl de anticuerpo primario anti-his tag (Tetra his antibody- **Qiagen**) producido en ratón durante una hora a temperatura ambiente. Mas adelante, se hicieron 5 lavados con TBST de cinco minutos cada uno y agitación constante con el fin de remover el anticuerpo primario.

A continuación se colocó sobre la membrana 1 µl de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón elaborado en cabra y conjugado a Alexa 680 en 2 ml de solución de bloqueo (ver anexo 2) y se dejó una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron diez lavados de cinco minutos con TBST y se procedió a la visualización mediante **GBOX Chemi de Syngene**.

4- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1- Análisis de los plásmidos pET17_Tpp17-6His y pGEX_Tpp17-6His

Se disponía de colonias bacterianas de la cepa BL 21 Star (DE3) que habían sido transformadas con pET17_Tpp17-6His o pGEX_Tpp17-6His.

En una primera instancia, fue necesario obtener colonias aisladas de dichas cepas.

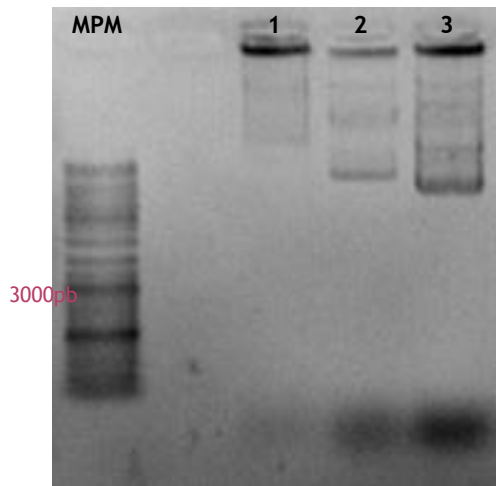


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, preteñido con GoodView y revelado bajo luz U.V.

- 1) 10 µl de pET.
- 2) 10 µl de pET17_Tpp17-6His
- 3) 10 µl de pGEX_Tpp17-6His

Mediante método de estría con ansa, se inocularon las colonias de interés sobre placas agar-LB-ampicilina. Con las colonias obtenidas se hizo un cultivo en medio LB.

A partir del cultivo líquido se procedió a hacer la extracción de ADN plasmídico para confirmar los clones recombinantes.

Las muestras de ADN que se obtuvieron fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa y visualizadas mediante iluminación ultravioleta.

En la figura 10 se muestra el resultado de esta electroforesis en la que se observan los plásmidos pET17_Tpp17-6His o pGEX_Tpp17-6His de las colonias bacterianas previamente transformadas.

Resulta llamativa la presencia en los tres carriles de una banda superior que podría deberse a contaminación con ADN genómico. Para evitar dicha contaminación en experiencias posteriores se tendrá mayor cuidado al extraer el precipitado blanco de ácidos nucleicos luego del agregado del Acetato de potasio o bien, se podrá considerar el uso de kits comerciales para la extracción de ADN plasmídico.

Con el fin de confirmar la presencia del inserto contenido en cada plásmido, se realizaron las digestiones con enzimas *Xba*I, *Xho*I y *Eco*RI para digerir los plásmidos pET17_Tpp17-6His y pGEX_Tpp17-6His respectivamente. Luego los productos migraron en gel de agarosa 1% preteñido con GoodView [Figura 11] y se observó que se obtuvo plásmido digerido solo en las pGEX_Tpp17-6His presentando una banda de 0.4 kb, lo cual es compatible con el tamaño del inserto [Figura 11, carril 2]. En lo que respecta al plásmido pET17_Tpp17-6His, no se observan bandas nítidas en el carril correspondiente a su migración lo que podría indicar

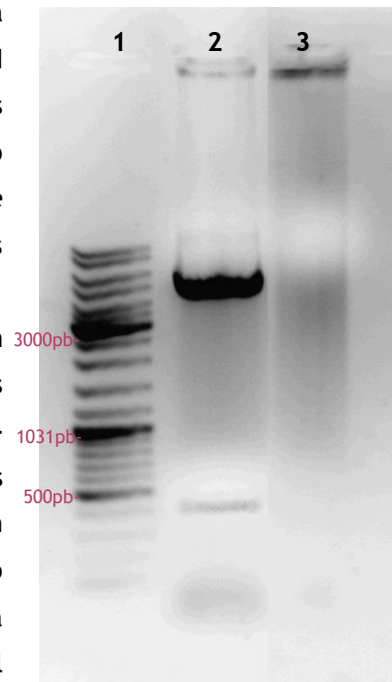


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, preteñido con GoodView y revelado bajo luz U.V.

- 1) 2 µl de MPM.
- 2) 10 µl de pGEX_Tpp17-6His digerido con *Eco*RI.
- 3) 10 µl de pET17_Tpp17-6His digerido con *Xba*I y *Xho*I.

por un lado que el plásmido hubiera sido degradado durante la digestión enzimática, que el plásmido se encontrara originalmente en una concentración demasiado baja como para ser detectado por el equipo o visualizada a la vista o bien que el inserto no estuviera presente. A pesar de no ver la banda correspondiente al inserto en el carril 3, decidimos continuar con la inducción de la expresión de la Tpp17 en esta etapa del trabajo.

4.2- Extracción de proteína recombinante Tpp17 de células *E. coli* utilizando distintos buffers.

A partir de que se aislaran las colonias según lo descrito en 4.1, se hicieron cultivos en 200 ml de caldo autoinductor ZYM-5052 con ampicilina (Studier, 2005). Luego de una noche a 37°C con agitación, se centrifugaron los cultivos divididos en 4 botellas y se descartó el sobrenadante. El peso húmedo del sedimento bacteriano presente en cada botella de cultivo fue 0.632 g, 0.825 g, 0.804 g, 0.898 g.

Es decir, el rendimiento fue de aproximadamente 15.8 g de bacterias (peso húmedo) por litro de cultivo.

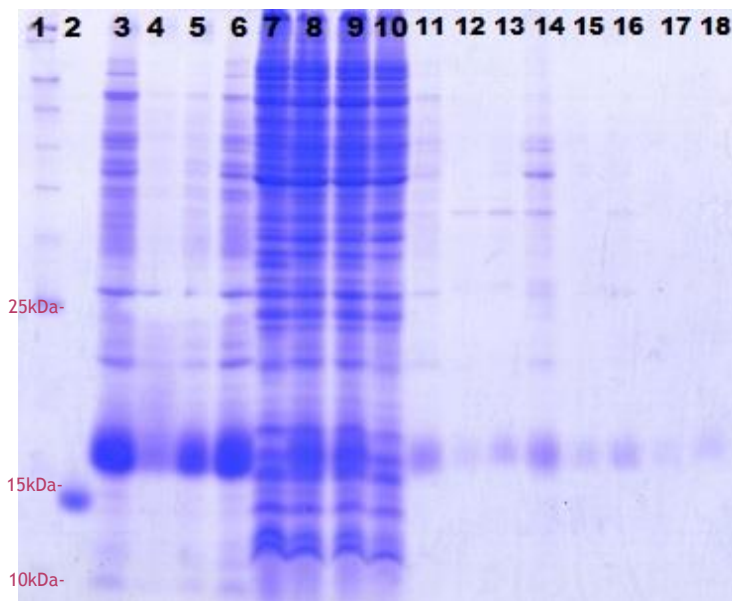


Figura 12. Análisis de fracciones solubles e insolubles. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie. Orden de siembra: (1) MPM, (2) 2 µg de Lisozima, (3) Muestra soluble c/ TRITÓN, (4) Muestra soluble c/TWEEN, (5) Muestra soluble SIN DETERGENTE (6) Muestra soluble c/DESOXICOLATO, (7) Sedimento 1 c/TRITÓN, (8) Sedimento 1 c/TWEEN, (9) Sedimento 1 SIN DETERGENTE, (10) Sedimento 1 c/DESOXICOLATO, (11) Sedimento 2 c/TRITÓN, (12) Sedimento 2 c/TWEEN, (13) Sedimento 2 SIN DETERGENTE, (14) Sedimento 2 c/DESOXICOLATO, (15) Lavado de sedimento c/ TRITÓN, (16) Lavado de sedimento c/ TWEEN,

Luego de resuspendidos los sedimentos en sus respectivos detergentes, se procedió a hacer la lisis bacteriana obteniéndose las fracciones solubles y las fracciones insolubles.

A las fracciones solubles se las volvió a centrifugar con el fin de que quedaran lo más puras posibles y al pellet obtenido se lo rotuló como Sedimento2. Por otro lado, a las fracciones insolubles obtenidas primariamente se las resuspendió en PBS 1X y centrifugó, de esa manera, a los sobrenadantes obtenidos en cada centrifugación se los denominó como “lavados”.

El procedimiento se realizó tres

veces y a los sedimentos resultantes luego de los 3 lavados se los resuspendió en Urea 8 M (Sedimento1).

Todas las fracciones obtenidas (fracciones solubles, sedimentos y lavados) fueron evaluados mediante migración en un gel de poliacrilamida 15% junto con un MPM y 2 µg de Lisozima 1 µg/µl [Figura 12, carril 2]. La misma se utilizó para descartar que las bandas observadas se

trataran de dicha enzima ya que su peso molecular es cercano (14 kDa) al de la TPP17. De esta forma se corroboró que si bien la fracción soluble (carriles 3-6) está enriquecida de Tpp17 recombinante, la proteína se encuentra presente en todas las fracciones analizadas. Con respecto a la utilización de los distintos buffers utilizados se observa que a excepción de la extracción realizada con TWEEN en la que se ve disminuida la intensidad de banda (carriles 4, 8, 12 y 16), no se ven diferencias importantes [figura12].

4.3- Purificación de muestras solubles

A los productos solubles obtenidos luego de la ruptura celular, se les realizó una IMAC (Cromatografía de afinidad de ion metálico inmovilizado) ya que la construcción de la TPP17 presenta una His-Tag (etiqueta de poli histidinas) y mediante ésta se logra la interacción con iones Ni^{2+} .

Las eluciones obtenidas de la IMAC migraron junto a un MPM en un gel de poliacrilamida al 15% en el que se observa que la mayor cantidad de proteína se obtiene en todos los casos en las eluciones 2,3 y 4 [Figura 13]. También a partir de la figura 13 se puede ver que la purificación de la proteína no fue total ya que se observan otras bandas a alturas mayores de las correspondientes a los 17 kDa que es lo esperado para la Tpp17.

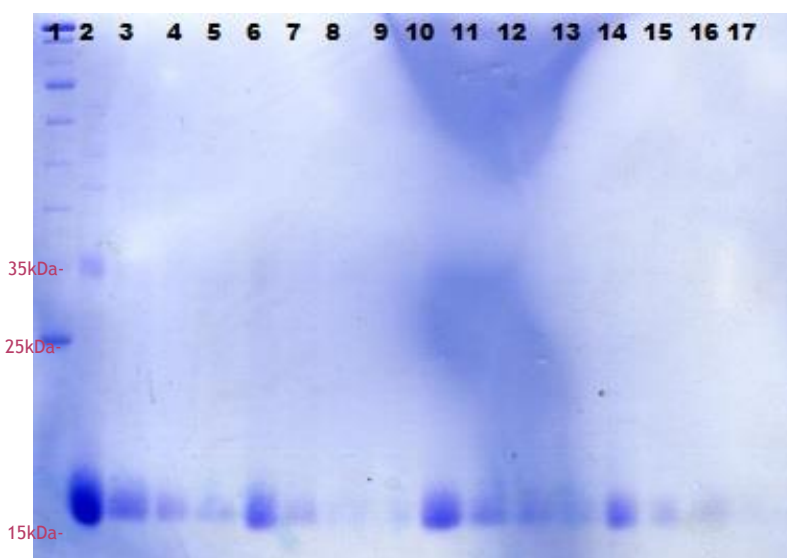


Figura 13. Purificación de muestras solubles mediante IMAC. Se muestra un gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie. Orden de siembra: (1) MPM, (2) Elución 2 de muestra c/ TRITÓN, (3) Elución 3 de muestra c/ TRITÓN, (4) Elución 4 de muestra c/ TRITÓN, (5) Elución 5 de muestra c/ TRITÓN, (6) Elución 2 de muestra c/ TWEEN, (7) Elución 3 de muestra c/ TWEEN, (8) Elución 4 de muestra c/ TWEEN, (9) Elución 5 de muestra c/ TWEEN, (10) Elución 2 de muestra s/detergente, (11) Elución 3 de muestra s/detergente, (12) Elución 4 de muestra s/detergente, (13) Elución 5 de muestra s/detergente, (14) Elución 2 de muestra c/ DESOXICOLATO, (15) Elución 3 de muestra c/ DESOXICOLATO, (16) Elución 4 de muestra c/ DESOXICOLATO, (17) Elución 5 de muestra c/ DESOXICOLATO.

De esta forma se puede concluir que si bien la IMAC resulta un buen método de purificación primario para proteínas con una His-Tag, si el objetivo es lograr una purificación total de la muestra es necesario complementarla con otro método de purificación [figura13].

4.4- Expresión de proteína recombinante Tpp17 de células *E. coli* a 30 y 37° C.

Con el fin de analizar si hay diferencias en la expresión de proteína recombinante Tpp17 a diferentes temperaturas, se realizaron cultivos de células *E. Coli* BL21 Star (DE3) en 20 ml de medio autoinductor ZYM-5052 a 30° C y 37° C.

Cada matraz conteniendo 20 ml de caldo de cultivo fue inoculado y se dejó en agitador durante la noche con agitación constante. Luego se centrifugaron los cultivos y con el sedimento obtenido se calculó el peso húmedo de las células crecidas a 30° C y 37° C siendo

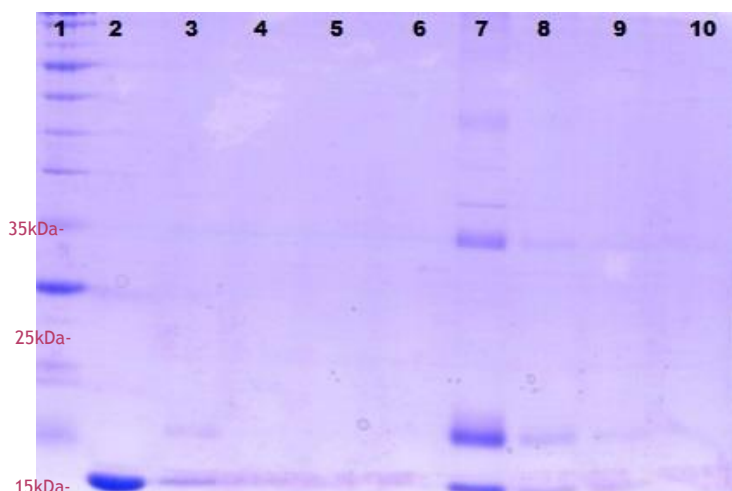


Figura 14. Expresión de Tpp17 a distintas temperaturas. Se muestra un gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie, Orden de siembra: (1) MPM, (2) 2 µg de Lisozima, (3) 10 µl de eluato 1 de IMAC a 30° C, (4) 10 µl de eluato 2 de IMAC a 30° C, (5) 10 µl de eluato 3 de IMAC a 30° C, (6) 10 µl de eluato 4 de IMAC a 30° C, (7) 10 µl de eluato 1 de IMAC a 37° C, (8) 10 µl de eluato 2 de IMAC a 37° C, (9) 10 µl de eluato 3 de IMAC a 37° C, (10) 10 µl de eluato 4 de IMAC a 37° C.

estos de 0.376 g y 0.382 g respectivamente. Con estos datos obtenemos que el rendimiento fue de 18.8 g de bacterias por litro para el cultivo a 30° C y 19,1 g de bacterias por litro para el cultivo a 37° C.

A los sedimentos se los resuspendió en 2 ml de PBS 1X y se procedió a realizar la lisis celular con Lisozima en una concentración de 200 µg/ml. A esto se lo centrifugó y así se obtuvieron las fracciones solubles que fueron purificadas por IMAC

(Sección 3.10) y luego analizadas mediante SDS-PAGE [Figura 14].

En la Figura 14 se muestra el resultado de la SDS-PAGE realizada con las muestras solubles a 30° C y 37° C, allí se distingue una ligera diferencia entre la expresión de proteína recombinante a cada temperatura que luego es confirmada mediante cuantificación por BCA. A partir de estos datos se puede concluir que a 37° C la expresión de Tpp17 recombinante es mayor que a 30° C en las condiciones presentadas en la sección 3.3. También se observa en la figura que la IMAC no logró purificar completamente a Tpp17, hecho que concuerda con los resultados presentados en la sección 4.3. En lo que respecta a bandas observadas diferentes a las de la Tpp17, las que resultan más llamativas corresponden a la presencia de Lisozima en las muestras y se observan a los 14 kDa en todos los pocillos del gel. Esto podría deberse a que la concentración de enzima presente en cada muestra es demasiado alta (200 µg/ml) para su eliminación total. Una alternativa al uso de Lisozima si lo que se desea es obtener una mayor pureza en la expresión de Tpp17 podría ser para volúmenes pequeños utilizar sonicado para la lisis celular [Figura 14].

4.5- Cuantificación de proteínas por BCA.

Para comparar la expresión de proteína recombinante expresada a 30° C y 37° C, se dosifica a las muestras solubles previamente purificadas mediante IMAC con BCA (Ácido Bicinonónico) en placa de microtitulación junto con un estándar de BSA y se leyeron con Varioskan a 562 nm.

A partir del estándar de BSA se obtuvo la ecuación de recta [Figura 15]: $Abs = -124,38 + 714 * C$ y con ésta se calcularon las concentraciones de proteína presentes en cada pocillo de placa [Tabla 3].

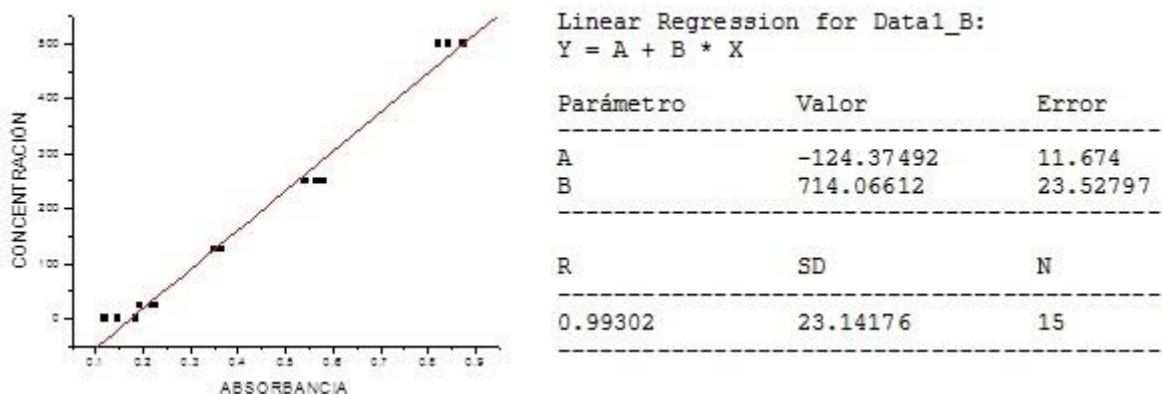


Figura 15. Gráfico de Concentración vs. Absorbancia obtenido a partir del estándar de BSA.

Tabla 3. Cuantificación de Tpp17 purificada a partir de cultivos crecidos a 30° y 37°C. En los primeros 24 pocillos se encuentra por triplicado la curva estándar de BSA en concentraciones decrecientes: [1500µg/ml], [1000µg/ml], [750µg/ml], [500µg/ml], [250µg/ml], [125µg/ml], [25µg/ml] y [0µg/ml]. A continuación se ven las concentraciones en µg/ml de proteínas presentes en cada pocillo de placa a las distintas temperaturas. La fila C y los pocillos 1, 2 y 3 de la fila D corresponden a las eluciones de IMAC de cultivos a 30°C. Mientras que la fila E y los pocillos desde el 4 al 12 de la fila D corresponden a eluciones de IMAC de los cultivos a 37°C. Orden de siembra: Ver Figura 9.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA
B	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA	BSA
C	83.48	68.53	77.3	46.1	47.09	48.35	48.02	39.73	44.79	58.08	58.51	73.79
D	44.17	42.32	46.39	262	266.63	257.72	68.91	74.35	78.8	64	53.94	69.73
E	82.44	66.56	47.87	45.7	39.41	41.87						
F												

Con los valores obtenidos por el método de cuantificación de BCA utilizando como estándar BSA, se logró obtener los valores de concentración para las muestras crecidas a las diferentes temperaturas [Tabla 3]; 55.1 µg/ml para el cultivo crecido a 30°C y 101.3 µg/ml para el cultivo crecido a 37°C. Teniendo en cuenta que las muestras estaban conservadas en un volumen final de 4 ml en PBS 1X, el rendimiento a partir de 20 ml de ZYM-5052, fue de aproximadamente 221 µg para el cultivo crecido a 30°C y 405 µg para el cultivo crecido a 37°C. Por lo tanto se puede estimar que en estas condiciones de cultivo y purificación, la producción de Tpp17 fue de 11.1 mg/l y 20.3 mg/l para los cultivos crecidos a 30°C y 37°C respectivamente. Éstos valores de expresión son relativamente bajos si se los compara con experiencias anteriores de la sección Bioquímica en la que se lograron obtener concentraciones que ascendían a los 104 mg/l para cultivos crecidos a 37°C. Sin embargo, la forma de lisis celular en estos casos fue mediante sonicado y no mediante el agregado de

Lisozima como se hizo en este trabajo y podría resultar un factor clave en la cantidad de proteína obtenida [27].

4.6- Evaluación de IMAC como método de purificación para Tpp17.

Para evaluar el comportamiento de la proteína recombinante Tpp17 durante la IMAC y controlar que no se pierdan grandes cantidades de proteína previo al agregado de Imidazol, se observó el seguimiento de los percolados obtenidos mediante SDS-PAGE.

En esta etapa se utilizó el medio ZYM-5052 y se realizó la lisis bacteriana mediante Sonicación.

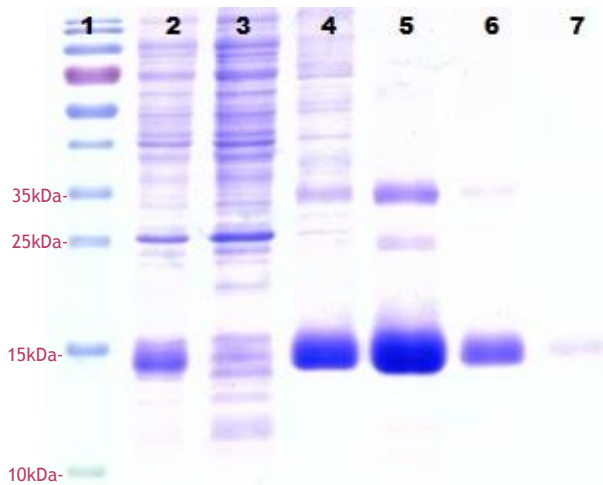


Figura 16. Purificación por IMAC. Se muestra un gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie, Orden de siembra: (1) MPM, (2) Filtrado Fracción soluble, (3) Lavado de columna con PBS, (4) Eluato 1 de IMAC con Imidazol, (5) Eluato 2 de IMAC con Imidazol, (6) Eluato 3 de IMAC con Imidazol, (7) Eluato 4 de IMAC con Imidazol.

Las muestras migraron en un gel de poliacrilamida al 15% junto con un filtrado sin purificar de la fracción soluble. Como se observa en la foto [Figura 16] la proteína quedó correctamente adherida a la matriz, ya que en el carril 3 no se observan bandas de proporciones importantes a la altura de los 17 KDa. Como era de esperarse la proteína comenzó a eluir luego del agregado de Imidazol (carriles 4, 5 y 6).

A su vez, también se puede ver una banda más pesada de alrededor de 35 KDa que podrían tratarse de dímeros de Tpp17. Éstos resultados deberán ser confirmados mediante Western Blot.

4.7- Western Blot de muestras solubles purificadas por IMAC.

A la fracción soluble de un cultivo bacteriano crecido en medio ZYM-5052 a 37°C y purificada mediante IMAC, se la pasó por una columna PD10 de desalado y luego se sometió a electroforesis y *Western Blot*.

Con las muestras separadas en el gel de poliacrilamida, se procedió a hacer la transferencia húmeda a la membrana de nitrocelulosa con el fin de realizar la detección por Western Blot y así confirmar que las bandas presentes en el gel (17 kDa, ~35 kDa, ~55 kDa) correspondían a la proteína recombinante Tpp17 [Figura 17].

Las tres bandas fueron visibles sobre la membrana del Western, lo que indicaría en el caso de la banda de 17 kDa que es la proteína Tpp17 desnaturalizada y en cuanto a las bandas presentes alrededor de los ~35 y ~55 kDa, podrían tratarse de diferentes conformaciones cuaternarias de la Tpp17 cuya estructura rica en cisteínas le permitiría estar formando múltiples puentes disulfuro. Este hecho resulta llamativo, ya que las muestras fueron hervidas en presencia de β -mercaptoetanol y sometidas a electroforesis desnaturalizante (ver anexo 4) y luego de este tratamiento se esperaba que las proteínas se desnaturalizaran y perdieran su estructura nativa.

Para contrarrestar este comportamiento proteico en experiencias futuras, sería útil considerar la utilización de otros agentes reductores de puentes disulfuro como son el DTT (Dithiothreitol) [Figura 17].

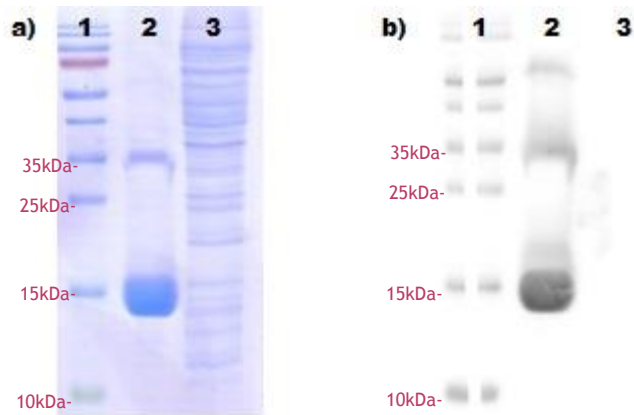


Figura 17. (a) SDS-PAGE. Se muestra un gel de poliacrilamida al 15% teñido con azul de Coomassie, Orden de siembra: (1) MPM, (2) Filtrado Fracción soluble desalada (3) Control Negativo (CN), **(b) Western Blot.** Se utilizó el anticuerpo primario anti his-tag y como anticuerpo secundario anti-Ig conjugado a Alexa 680 y visualizado en GBOX Chemi de Syngene, Orden de siembra: (1) MPM, (2) Filtrado Fracción soluble desalada (3) Control Negativo (CN).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se lograron cumplir con todos los objetivos planteados, tanto principal como específicos.

Se realizaron cultivos bacterianos en distintas condiciones determinando que si bien la proteína está presente en todas las fracciones, la mayor cantidad de proteína se obtiene de las fracciones solubles.

También se generaron distintas condiciones de cultivo para la obtención de la proteína Tpp17. A partir de estas, se puede concluir que:

- El detergente de extracción no influye en la cantidad de proteína obtenida.
- La expresión de Tpp17 recombinante aumenta a casi el doble cuando el cultivo celular crece a 37°C con respecto al cultivo crecido a 30°C (20.3 mg/l y 11.1 mg/l respectivamente). Cabe aclarar que estos representan valores bajos de expresión de proteína recombinante por lo que para instancias posteriores se plantea variar la forma de lisis celular pudiendo utilizar por ejemplo sonicado en lugar de Lisozima [27].
- Sugerimos en base a los ensayos de *Western Blot*, que la proteína podría formar puentes disulfuro intermoleculares por lo que se deben utilizar agentes reductores en mayor concentración si se quiere evitar la formación de multímeros.

En lo que refiere a la purificación, se constata que si bien la IMAC resulta ser un método primario eficiente, éste debe ser complementado con otro método de purificación ya que no se logran purificaciones totales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Velez Hernán, A., Rojas William, M., Borrero Jaime, R., Restrepo Jorge, M., (2003) Enfermedades infecciosas, 6ta. Edición. *Editado por Corporación para Investigaciones Biológicas*, Colombia.
2. Conde Sendín, M.A., Hernández Fleta, M.A., Cárdenes Santana, C.R., Amela Peris, R. (2002) “Neurosífilis: formas de presentación y manejo clínico”. *Revista de Neurología* 35, 380-386.
3. Carrada Bravo, T., (2006) Sífilis cardiovascular: Diagnóstico y tratamiento. *Archivos de Cardiología de México*, 76,189-196.
4. Moraes, M., Estevan, M. (2011) Actualización en sífilis congénita temprana. *Archivos de Pediatría Uruguay* 83, 35-39.
5. Tulio Rodriguez, J., Prato Cohrs, D., (2006) Microbiología: lo esencial y lo práctico. *Editado por Organización Panamericana de la Salud*, Washington
6. Meredith, S., Hawkes, S., Schmid, G., Broutet, N. (2008) Eliminación mundial de la sífilis congénita: fundamentos y estrategia para la acción. OMS.
7. Galban, E., Benzaken, A. (2007) Situación de la Sífilis en 20 Países de Latinoamérica y El Caribe. *Jornal brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis*, 19, 166-169.
8. Resolución 116ª. Reunión comité ejecutivo de la OPS y XXXVIII reunión del comité regional de la OMS para las Américas, Washington, OPS; 1995.
9. Álvarez Hernández, G., Salazar Arriola, S., Bocanegra Luna, C. (2012) Guía: Diagnóstico y manejo de la sífilis en el embarazo y prevención de la sífilis congénita. Editado por CENSA, México.
10. Valderrama, J., Zacarías, F., Mazin, R., (2004) “Sífilis materna y sífilis congénita en América Latina: un problema grave de solución sencilla”. *Revista Panamericana de la Salud Pública*, 16, 211-217.
11. Burgos, P., Emma, L., (2010) *Treponema Pallidum*: Estructura y antigenicidad. *Universidad Ciencia y Sociedad*, 1, 42-44.
12. Cox, D., Chang, P., McDowall, A., Radolf, J. (1992) The Outer Membrane, Not a Coat of Host Proteins, Limits Antigenicity of Virulent *Treponema pallidum*. *Infection and Immunity*, 60, 1076-1083.
13. Fraser, C., Norris, S., Weinstock G., White, O., Sutton, G., Dodson, R. (1998) Complete Genome Sequence of *Treponema pallidum*, the Syphilis Spirochete. *Science*, 281, 281-375.
14. Meléndez Herrada, E., Ramirez, M., Sanchez, G., Cravioto, A. (2008) Estrategias de investigación para el desarrollo de una vacuna contra la sífilis. *Rev. Fac. Med. UNAM*, 51, 18-23.
15. Norris, J., *Treponema Pallidum* Polypeptide Research Group. (1993) Polypeptides of *Treponema pallidum*: Progress toward Understanding Their Structural, Functional, and Immunologic Roles. *Microbiol Rev*, 57, 750-779.

16. Radolf, J., (1995) *Treponema pallidum* and the quest for outer membrane Proteins. *Molecular Microbiology*, 16, 1067-1073.
17. Sen, A., White, B., Sparring, F. (2010) Novel *Treponema pallidum* Serologic Tests: A Paradigm Shift in Syphilis Screening for the 21st Century. *Clin Infect Dis*, 51, 700-708.
18. Akins, B., Bret, P., Monalisa, M., Norgard, M., Radolf, J., (1993) Lipid Modification of the 17-Kilodalton Membrane Immunogen of *Treponema pallidum* Determines Macrophage Activation as well as Amphiphilicity. *Infection and Immunity*, 61, 1202-1210.
19. Brautigam, C., Ranjit, K., Norgard D., Norgard, M. (2013) Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of TP0435 (Tp17) from the syphilis spirochete *Treponema pallidum*. *Acta Crystallogr, Struct Biol Cryst Commun*, 69, 453-455.
20. Radolf, J., Robinson, E., Bourell, K., Norgard, M. (1995) Characterization of Outer Membranes Isolated from *Treponema pallidum*, the Syphilis Spirochete. *Infection and Immunity*, 63, 4244-4252.
21. Larsen, S., Johnson, R. (1998) Manual of tests for syphilis.
22. Fuertes, A. (2013) Diagnóstico Serológico de la Sífilis. Servicio de Microbiología, Madrid.
23. Peeling, R., Mabey, D., Herring, A., Hook, E. (2006) Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections?. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 901-921.
24. Nature Publishing Group (2006) Evaluation of rapid diagnostic tests: syphilis. *Nature Reviews Microbiology*, S33-S40.
25. Cabrera, S., Aguirre, R., Giacchetto, G., Ramirez, Y., Moraes, M., Ballesté, R. (2012) Guía clínica de diagnóstico, monitorización y tratamiento de Sífilis en la mujer embarazada y Sífilis congénita. Ministerio de Salud Pública, Uruguay.
26. Studier, W. (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41, 207-234.
27. Castro, R., Díaz, J., Pulido, D., Acosta, O., Guerrero, C. (2006) Producción de la Proteína de Choque Térmico HSC70 recombinante en *Escherichia Coli* BL21 (DE3) para generar anticuerpos policlonales. *Rev. Fac. Med. Univ. Nac. Colomb*, 54, 156-168.
28. Pharmacia Biotech, (2004) Spandex ® ion exchange media. Sweden.

AGRADECIMIENTOS

A Mario Señorale y Mónica Marín, por permitirme realizar mi pasantía de fin de carrera en su laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio 305 de la Sección Bioquímica y Biología Molecular por la ayuda, el apoyo y sobre todo por la buena onda que me motivaba a ir día a día.

A mi mamá y mi abuela por darme aliento, creer en mi y estar presentes todo el tiempo.

A mi familia natural y política, por el constante apoyo y por estar siempre pendientes de mis avances.

A Ernesto, por acompañarme, comprenderme y tenerme paciencia durante estos años de facultad.

A mis amigas, muy especialmente a las de facultad por todos los momentos compartidos, por hacerme sentir contenida y comprendida en todas las instancias de la carrera.

A Viviana K., por mostrarme que podía.

ANEXO 1- Medios.

1. Medio LB (*Luria broth base, Miller*).

Se utilizó el medio L1900 de Sigma Aldrich que contiene: triptona (10 g/L), extracto de levadura (5 g/L) y cloruro de sodio (0,5 g/L).

2. Medio ZYM-5052

El medio para 200 ml consiste en 2 g de Triptona y 1 g de extracto de levadura, 400 µl de MgSO₄ 1M y 40 µl de Oligoelementos 1000X, la mezcla se autoclava a 121 °C durante 20 minutos, luego se le agrega a la mezcla 8 ml de Solución 5052 25X (ver Anexo2), 8 ml de Solución M 25X y 200 µl de Ampicilina (100 µg/ml).

ANEXO 2- Soluciones.

1. SOLUCIÓN 1.

Tris.HCl 50 mM (pH8.0); EDTA 10 mM

2. SOLUCIÓN 2.

NaOH 0,2 M; SDS 1%

3. SOLUCIÓN 3.

Acetato de potasio 3 M (pH 4.5)

4. Buffer TAE

Tris-acetato/EDTA

5. Buffer NEB 2

NaCl 50 mM, Tris.HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, (pH 7.9)

6. Buffer NEB.

Bis Tris Propano.HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, (pH 7.0)

7. Solución 5052 50X

Glicerol/ Glucosa /Lactosa

8. Solución M 25X

Na₂HPO₄, Kh₂PO₄, Nh₄Cl, Na₂SO₄

9. PBS

Nacl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄

10. Buffer de carga

TCEP 0.5 M, Buffer PAGE 6X

11. Azul de Coomassie

Ácido acético 7%, EtOH 30%, Coomassie 0.2%

12. Solución decolorante

H₂O: EtOH: Ácido acético (40:50:10)

13. Buffer de elución

TRIS HCL 20mM+ 200mM de Imidazol

14. Solución de trabajo (Kit Pierce)

12.5 ml de Reactivo A (Kit Pierce) + 240 µl de Reactivo B (Kit Pierce)

15. Reactivo A (Kit Pierce)

Carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, ácido Bicinconínico y tartrato de sodio en hidróxido de sodio 0.1 M

16. Reactivo B (Kit Pierce)

4% de sulfato cúprico

17. Estándar de BSA (Kit Pierce) (2mg/mL)

Seroalbúmina bovina 2mg/mL en solución salina 0.9% y 0.05% de azida de sodio

18. Buffer de transferencia (Western Blot)

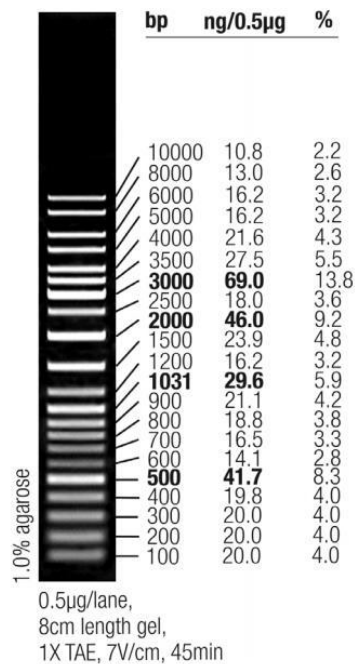
Tris-glicina 1x, EtOH 20%

19. TBST (Western Blot)

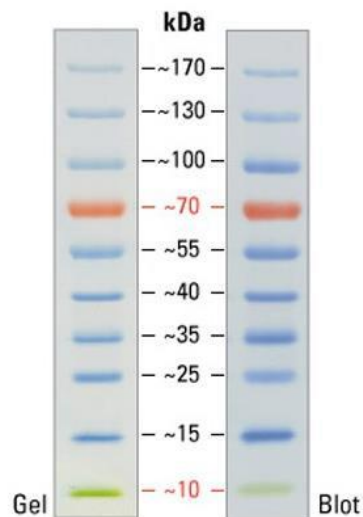
Tris-Cl 0.01 M pH 7.5, NaCl 0.05 M, Tween 20 0.2%

ANEXO 3- Marcadores de peso Molecular (MPM).

1. **Para geles de Agarosa.** Se utilizó el marcador de Peso Molecular #SM0331 de *Thermo Scientific*:



2. **Para geles de Poliacrilamida:** Se utilizó el MPM #26616 de *Thermo Scientific*:



Images are from a 4-20% Tris-glycine gel (SDS-PAGE) and subsequent transfer to membrane.

ANEXO 4- Contenido de geles de poliacrilamida.

"Mix" gel 15%, 10 ml.

Gel concentrador 5%

H ₂ O mQ	2.1 ml
30% mix de acrilamida	0.5 ml
1.0 M TRIS (PH 6.8)	0.38 ml
10% SDS	0.03 ml
10% APS	0.03 ml
TEMED	0.003 ml

Gel separador

H ₂ O mQ	2.3 ml
30% mix de acrilamida	5.0 ml
1.5 M TRIS (PH 8.8)	2.5 ml
10% SDS	0.1 ml
10% APS	0.1 ml
TEMED	0.004 ml

"Mix" gel 15%, 35 ml.

Gel concentrador 5%

H ₂ O Mq	6.3 ml
30% mix de acrilamida	1.5 ml
1.0 M TRIS (PH 6.8)	1.14 ml
10% SDS	0.09 ml
10% APS	0.09 ml
TEMED	0.009 ml

Gel separador

H ₂ O mQ	8.05 ml
30% mix de acrilamida	17.5 ml
1.5 M TRIS (PH 8.8)	8.75 ml
10% SDS	0.35 ml
10% APS	0.33 ml
TEMED	0.0132 ml

*Para el gel de 35 ml, se tuvo que generar un “sócalo” para evitar que pierda, esto se logró agregándole a 2 ml del “MIX” del gel de separador, 2 µl de TEMED + 20 µl de APS (Persulfato de Amonio).

