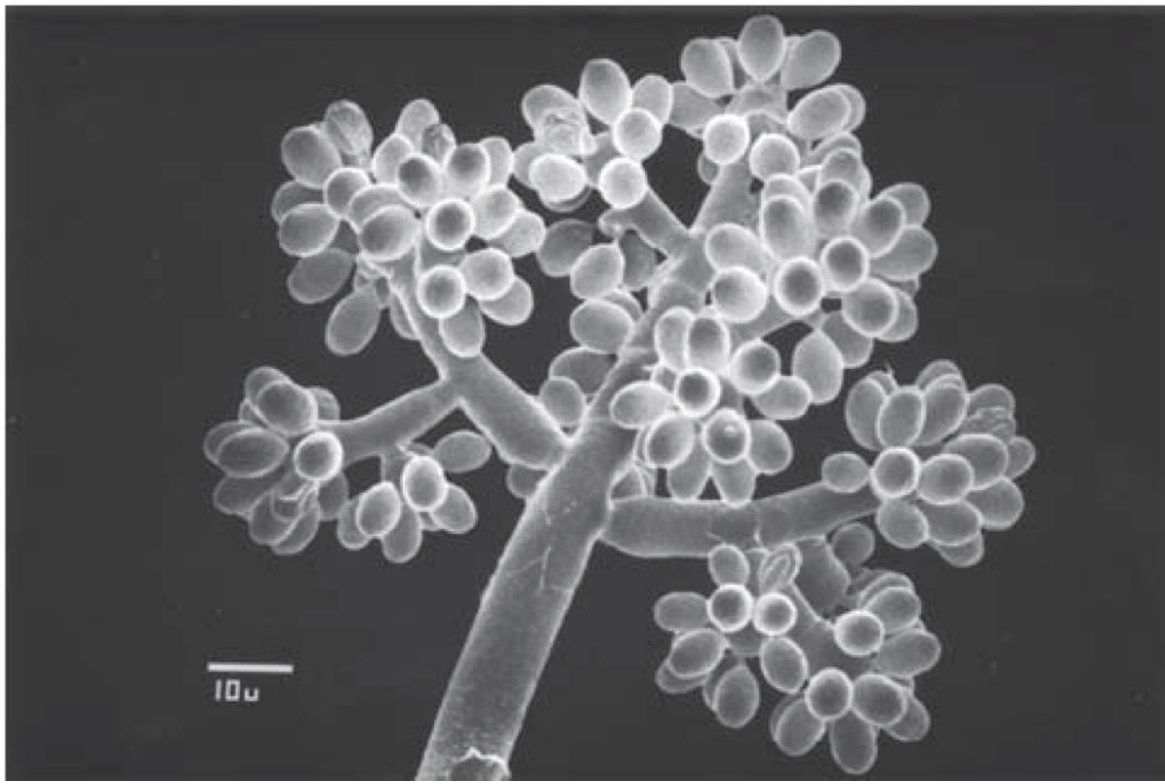


Optimización de los sistemas de expresión de *Botrytis cinerea* para la proteína BcSUN1 y su purificación.

Optimization of *Botrytis cinerea's* expression systems for BcSUN1 and its purification.



Conidias de *B. cinerea* (Jackson, 2014)

Trabajo de Fin de Grado por **Marco David Peña Prunell**

Tutorizado por **Nélida Emilia Brito Alayón** y **Alicia Pérez Hernández**

# Tabla de Contenidos

<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>7</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>8</b>
ELECTROFORESIS .....	8
PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON TRICLOROACÉTICO 6% .....	9
PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON TRICLOROACÉTICO 20% .....	10
PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON METANOL-CLOROFORMO .....	10
PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON SULFATO AMÓNICO AL 80% .....	11
“STRIPPING” DE MEMBRANAS DE NITROCELULOSA .....	11
EXTRACTOS CELULARES DE <i>SACCHAROMYCES</i> .....	12
DOT BLOT .....	12
WESTERN BLOT .....	13
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>15</b>
EXTRACTOS CELULARES .....	19
PRECIPITACIÓN CON SULFATO AMÓNICO .....	21
PURIFICACIÓN MEDIANTE MATRIZ DE SEPHADEX .....	23
PURIFICACIÓN MEDIANTE COLUMNA DE AFINIDAD HISTRAP .....	24
PRECIPITACIÓN CON TCA-METANOL-CLOROFORMO .....	26
ÚLTIMA PRECIPITACIÓN A PARTIR DE <i>SACCHAROMYCES</i> .....	27
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONS</b> .....	<b>31</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>32</b>

---

## Resumen

*Botrytis cinerea* o "moho gris" es un hongo patógeno de la familia Sclerotiniaceae, algunos de sus huéspedes más importantes son la vid (*Vitis vinífera*) o el tomate *Solanum lycopersicum*, los cuales quedan inservibles tras ser infectados. Una de las proteínas producidas por este hongo es BcSUN1, una glicoproteína de la familia SUN que forma parte de la superficie celular de *B. cinerea* y participando en su virulencia. En este trabajo se ha tratado de encontrar un método que permita la producción de esta proteína para su posterior purificación de manera sencilla y consistente a través de una cepa modificada de *Saccharomyces cerevisiae* capaz de producir la proteína en cuestión.

## Abstract

*Botrytis cinerea* or "gray mold" is a pathogenic fungus of the Sclerotiniaceae family, some of its most important hosts are the vine (*Vitis vinifera*) or the tomato *Solanum lycopersicum*, which are rendered useless after being infected. One of the proteins produced by this fungus is BcSUN1, a glycoprotein of the SUN family that is part of the cell surface of *B. cinerea* and participates in its virulence. In this assignment, we tried to find a process that allows the production of this protein for its subsequent purification in a simple and reliable way through a modified strain of *Saccharomyces cerevisiae* capable of producing the protein in question.

# INTRODUCCIÓN

## Introducción

*Botrytis cinerea* es un hongo de gran notoriedad en los ámbitos científico y económico debido a su rol como organismo patógeno en una gran variedad de especies vegetales, principalmente dicotiledóneas, entre ellas, algunas de gran importancia agrícola como *Vitis vinífera* (Ait Barka, Eullaffroy, Clément, & Vernet, 2004) o *Solanum lycopersicum* (Harel, 2015).

Sus esporas se propagan por el aire y son capaces de sobrevivir a condiciones extremas en períodos de tiempo extendido como el invierno, aunque tiene preferencia por tejidos maduros o en estado de senescencia puede introducirse en cualquiera de los estadios de crecimiento del vegetal, incluyendo la semilla, una vez infectado el huésped puede permanecer en estado de quiescencia durante largos periodos. Tras encontrarse con las condiciones ambientales y fisiológicas del vegetal idóneas el hongo se activará y dará comienzo la necrosis de los tejidos lo que permite al patógeno actuar como saprófito (Williamson, Tudzynski, Tudzynski, & Van Kan, 2007).

Actualmente, el genoma de *Botrytis cinerea* ha sido secuenciado y se estima que el 10% de los polipéptidos que codifica son secretadas (Amselem et al., 2011) estas presentan una gran variedad de funciones como la inducción a la senescencia de las células vegetales o la degradación de estructuras vegetales.(Fernández-Acero et al., 2010)

Entre las proteínas secretadas por *Botrytis cinerea* durante la infección se encuentra BcSUN1, perteneciente a la familia de proteínas  $\beta$ -glucosidasa SUN y se sospecha que puede ser detectada por el sistema inmune del organismo infectado. (González, Brito, & González, 2014)

BcSUN1 está codificada por el gen *Bcsun1* y la componen 471 aminoácidos con una elevada cantidad de zonas ricas en serinas y treonina, además de estar altamente O-Glicosilada (Pérez-Hernández, González, González, van Kan, & Brito, 2017)

Para la producción y purificación de BcSUN1 en este trabajo se recurrió a la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* ScYedisSUN1 que nos permite sintetizar la proteína de manera aislada, con alto grado de pureza y en una cantidad relativamente elevada.

## OBJETIVOS

## Objetivos

El objetivo de este proyecto es alcanzar el método más eficiente para producir la proteína BcSUN1 usando como organismo productor una cepa del hongo *Saccharomyces cerevisiae* capaz de producir BcSUN1 en cantidades relativamente altas y con un elevado grado de pureza para su posterior purificación, lo que permitirá el estudio de la proteína en posteriores trabajos. Para ello se realizaron pruebas en las que las variables estudiadas eran: los medios de cultivo, el tiempo de incubación, el método de precipitación y finalmente el método de purificación de las proteínas. Con la ayuda de técnicas analíticas como western-blot o Dot-blot para validar la presencia e identificar las proteínas deseadas.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## Material y métodos

### Electroforesis:

#### Material

Sistema de electroforesis miniprotean – Bio Raid, Acrilamida/Bisacrilamida 30% Trisaminometano clorhídrico 1,5 molar pH 8,8 (Tris HCl 1,5M pH8,8), trisaminometano clorhídrico 0,5 molar pH 6,8 (Tris HCl 0,5M pH6,8), Dodecilsulfato sódico al 10% (SDS 10%), Persulfato amónico al 10%, Tetrametiletilendiamina (TEMED)

#### Método

1. Preparar el molde para el gel de acrilamida uniendo las dos placas de vidrios limpias y secas, después fijándolos con el soporte.
2. Preparar el gel inferior mezclando los componentes en un matraz kitasato, las concentraciones varían en base a la reticulación deseada para el gel, 10% de reticulación en el caso de estos ensayos.

Para 5ml de solución al 10% de reticulación se mezclaron los siguientes volúmenes:

2.03ml agua, 1.67ml Acrilamida 30%, 1.25ml 1.5M tris PH 8.8, 0.05ml SDS 10%

3. Desgasificar la solución con una bomba de vacío
4. Añadir 25ul de persulfato amónico y 2.5ul de TEMED por gel
5. Verter entre los vidrios hasta un 80% de su capacidad aproximadamente y sobrecapar con agua y esperar 1 hora hasta que polimerice
7. Preparar el gel superior de la misma manera que el anterior, cambiando la concentración de los productos:

1.82ml agua, 0.40ml acrilamida 30, 0.75 ml 0.5M tris pH 6.8, 0.03ml SDS 10%

8. Desgasificar el gel superior y añadir 15ul de persulfato + 3ul de TEMED
9. Retirar el agua entre los vidrios y verter el gel superior



10. Introducir el peine entre los vidrios y esperar 1 hora hasta que polimerice
11. Retirar el peine verticalmente para no dañar los pocillos
12. Introducir el gel en el soporte y llenar este con tampón de cámara 1X, lavar los pocillos pipeteando tampón de cámara dentro de ellos
13. Mezclar las muestras con LSB y hervirlas, pipetear volúmenes entre 15-20ul por pocillo lentamente
14. Colocar el soporte en la cubeta de electroforesis y conectar a la fuente para correr a 200V durante 45 minutos aproximadamente

## Precipitación de proteínas con tricloroacético 6%

### Material

Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) al 96%

Ácido tricloroacético(C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) con concentración mayor al 6% (TCA)

Tubos eppendorf de 1,5 ml

### Método

1. Añadir TCA a la muestra que deseamos precipitar de manera que la concentración final de TCA en la disolución sea del 6%
2. Incubar durante una hora en hielo
3. Centrifugar durante 10 minutos a 15.000 x g y 4°C
4. Sacar las muestras de la centrifuga y retirar el sobrenadante sin perturbar el pellet
5. Resuspender el pellet pipeteando 0,5 ml de etanol 96% repetidas veces sobre las paredes del tubo. Al finalizar, pasar a un tubo eppendorf. Centrifugar el eppendorf con los mismos parámetros que en el paso 3
6. Repetir el paso anterior dos veces más
7. Retirar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente (No demasiado o dificultará la próxima suspensión de este).

## Precipitación de proteínas con tricloroacético 20%

### Material

Acetona ( $C_3H_6O$ )

Ácido tricloroacético con concentración mayor al 20% (TCA).

Tubos eppendorf 1,5 ml.

### Método

1. Añadir TCA a la muestra que deseamos precipitar de manera que la concentración final de TCA en la disolución sea del 20%.
2. Agitar con vórtex e incubar durante media hora en hielo, después centrifugar durante 10 minutos a 15.000 x g y 4°C.
4. Sacar las muestras de la centrífuga y retirar el sobrenadante sin perturbar el pellet.
5. Resuspender el pellet añadiendo 0,5 ml de acetona y agitando con el vórtex. Al finalizar, pasar a un tubo eppendorf. Centrifugar el eppendorf con los mismos parámetros que en el paso 2.
6. Retirar acetona y dejar que se evapore a temperatura ambiente el resto con cuidado de no secar la muestra en exceso.

## Precipitación de proteínas con metanol-cloroformo

### Material

Cloroformo ( $CHCl_3$ ) +99% estabilizado con etanol

Metanol ( $CH_3OH$ )

### Método

1. Introducir entre 1,5 y 3 ml de muestra a precipitar en un tubo de centrifuga y añadir 4 volúmenes de metanol, 1 volumen de cloroformo y 3 volúmenes de agua, siendo 1 volumen igual a los ml de muestra utilizados. Antes de añadir cada solvente agitar unos 5 segundos.

2. Centrifugar a 15.000 x g y 4°C durante 10 minutos y retirar la fase superior sin perturbar la interfase.
3. Añadir 3 volúmenes metanol, agitar y volver a centrifugar en las mismas condiciones. Al finalizar retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en 3 volúmenes de metanol para volver a centrifugar.
4. Retirar el sobrenadante y dejar secar a temperatura ambiente.

## Precipitación de proteínas con sulfato amónico al 80%

### Material

Tampón fosfato salino o PBS (*phosphate buffered saline*)

Sulfato amónico (sólido)

### Método

Equilibrar la muestra con tampón PBS, la concentración de tampón debe ser 1X en la disolución final.

Añadir la sal de sulfato amónico previamente pulverizada, el proceso debe ser lento, aproximadamente 30 minutos mientras se agita a 4°C. 55.94g sulfato amónico por cada 100 ml de disolución. Agitar 1 hora y dejar reposar otra hora más

Centrifugar a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C y resuspender el pellet en PBS

## “Stripping” de membranas de nitrocelulosa

### Material

Stripping buffer 0.1 L: 10 ml SDS10% + 12,5ml Tris HCL pH6,8 0,5M + 67,5 ml agua + 0.8ml 2-mercaptoetanol

TBST 1X: 0,05M Tris pH7,5 + 0,15M NaCl + 0,05% Tween-20

### Método

1. Añadir el stripping buffer (previamente calentado a 50°C) junto con la membrana de nitrocelulosa a un tubo falcón de manera que el tampón cubra la membrana

2. Incubar a 50°C durante 50 minutos
3. Lavar la membrana con agua destilada durante 2 minutos y con TBST entre 3-5 veces con TBST durante 5 minutos cada vez

## Extractos celulares de *Saccharomyces*

### Material

Breaking buffer: Tampón PBS1X + 1mM PMFS + 1mM EDTA + 5% glicerol

Laemmli Sample Buffer (LSB)

### Método

1. Resuspender las células a romper en 150 µl de breaking buffer y añadir 300 mg de esferas de vidrio estériles dentro de un tubo eppendorf.
2. Introducir los tubos eppendorf en el agitador “Fast prep” a una velocidad de 6 m/s durante 30” y dejar reposar 2 minutos en hielo. Repetir este paso dos veces más.
3. Perforar los tubos eppendorf por debajo para transferir la disolución a un nuevo tubo eppendorf y manteniendo las esferas de vidrio en el antiguo.
4. Centrifugar los tubos nuevos a 15.000 x g durante 10 minutos y 4°C. Retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en LSB.

## Dot blot

### Material

Tampón fosfato salino o PBS (*phosphate buffered saline*)

Thermo Scientific Sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Dura

Disolución de bloqueo: 5% Leche desnatada en polvo + Tampón PBS

Membrana de nitrocelulosa

Anticuerpo primario: c-Myc Anticuerpo (9E10) de ratón IgG1

Anticuerpo secundario: Anti-Mouse IgG

## Método

1. Cortar un trozo de membrana de nitrocelulosa del tamaño adecuado al número de muestras que se van a cargar, humedecerla con agua destilada durante 1 minuto.
2. Montar y conectar el sistema de Dot-blot a la bomba de vacío y colocar la membrana húmeda en su interior, apretar bien el sistema para asegurar el vacío en su interior. En caso de que la membrana no cubra todos los pocillos usar parafilm.
3. Pipetear lentamente entre 0.5 y 3ml de muestra por pocillo, una vez secos todos los pocillos que se han cargado desmontar el sistema y lavar la membrana con 20 ml de PBS 1X durante 20 minutos en agitación.
4. Incubar con 20ml de disolución de bloqueo durante 1 hora en agitación, retirar la disolución e incubar con 10ml de anticuerpo primario en una concentración de 1/5000 en disolución de bloqueo. Guardar el anticuerpo primario al finalizar (reutilizable 3-4 veces) y lavar con 20ml de PBS durante 10 minutos, repetir el lavado dos veces más. Incubar con 10 ml de anticuerpo secundario en una concentración 1/3000 en disolución de bloqueo durante 30 minutos. Retirar el anticuerpo secundario y lavar con 20 ml de PBS1X durante 10 minutos, repetir el lavado 2 veces.
5. Colocar la membrana sobre una placa de vidrio, pipetear sobre ella el sustrato quimioluminiscente (25µl de cada componente por cm<sup>2</sup> de membrana) y cubrir con un trozo de film plástico.
6. Colocar la membrana dentro del Chemidoc configurado durante el último lavado del anticuerpo secundario (Modo High sensitivity chemiluminescence, filtro en posición 0 e iris abierto al máximo). Seleccionar la opción “Live acquire” e introducir los siguientes parámetros: Inicio 10”, Total 3600”, N°60

## Western Blot

### Material

Tampón de transferencia 1 L: Tris 3.03g + Glicina 14.51g + 200ml metanol + agua.

Sistema de transferencia western blot.

Membrana de nitrocelulosa y papeles de filtro recortados (tamaño ligeramente superior a membrana)

Tampón fosfato salino o PBS (*phosphate buffered saline*)

## Método

1. Antes de que termine la electroforesis, tener preparado el tampón de transferencia y el sistema a mano, equilibrar las esponjas, los papeles de filtro y la membrana de nitrocelulosa.
2. Retirar el gel de acrilamida de la electroforesis y lavar en una placa de Petri 1 minuto con agua y 15 con tampón de transferencia.
3. Montar el casete para la transferencia: Sumergir el casete del western con la parte negra hacia abajo, colocar una esponja equilibrada y húmeda encima, a continuación colocar uno de los papeles de filtro húmedos y encima el gel de acrilamida sin crear burbujas y lo más cercano al centro del papel posible, con cuidado colocar la membrana de nitrocelulosa sobre el gel sin dejar burbujas y evitando que se seque, de nuevo colocamos un papel de filtro húmedo y una esponja para finalizar, se cierra el casete y se introduce en el tanque de transferencia junto a un imán de agitación y un bloque de refrigeración. Llenar el tanque con tampón de transferencia y cerrar.
4. Poner el tanque sobre un agitador, a una temperatura ambiente de 4°C y con una corriente de 30 V durante toda la noche.
5. Al día siguiente retirar la membrana del casete, lavar con agua 1 minuto y con PBS 1X durante 20 minutos.
6. Seguir los pasos 4-6 del protocolo de Dot-blot.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Resultados y discusión

ScYedisSUN1 tiene una mayor eficiencia en medio YPGal respecto al medio mínimo SD Leu + Gal

La cepa ScYedisSun1 presento un crecimiento al menos 50 veces mayor en los dos cultivos independientes de medio YPGal respecto a los otros dos cultivos hechos con medio mínimo SD Leu + Gal calculado en base a la absorbancia de los cultivos (Figura 1) en consecuencia, la producción de la proteína también fue mucho mayor en los cultivos de medio YPGal como se observa en el Dot Blot realizado (Figura 2). En base a estos resultados, todos los cultivos posteriores de ScYedisSUN1 se realizaron en medio YPGal para una mayor eficiencia.

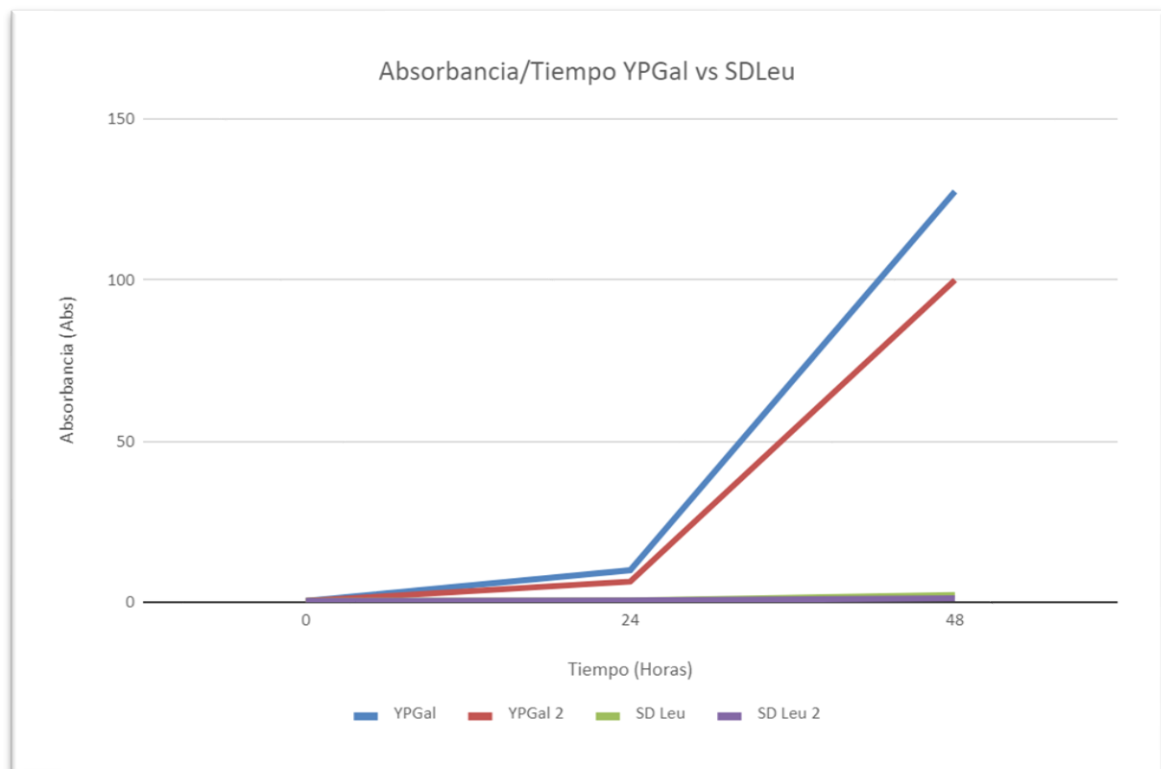
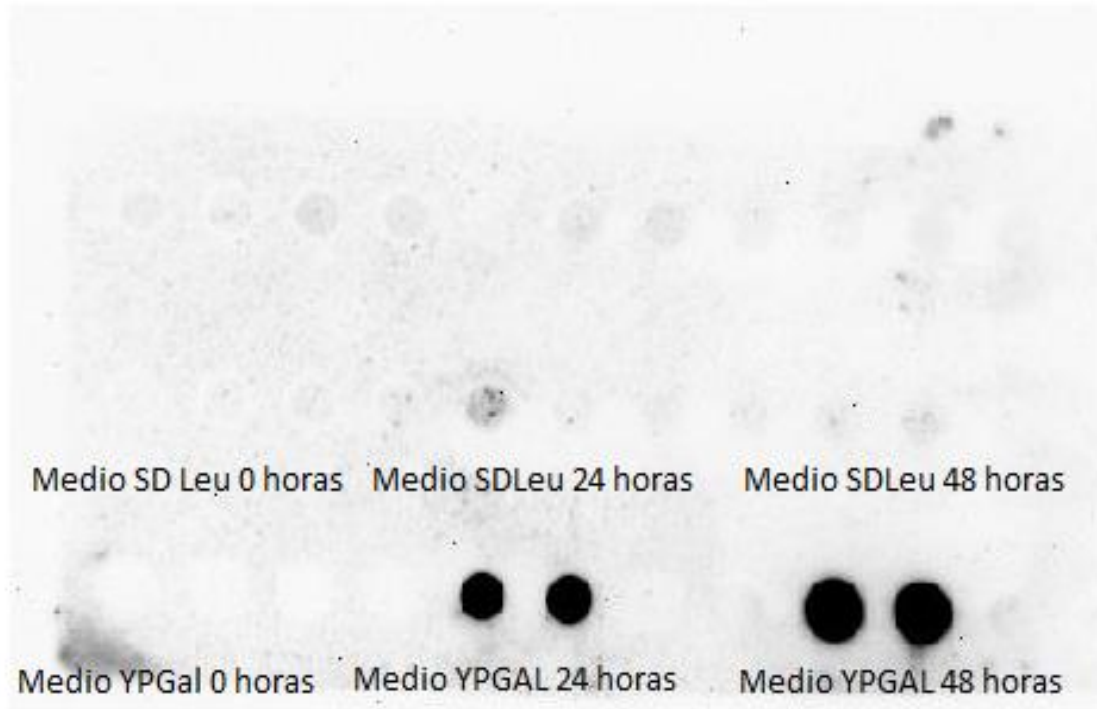


Figura 1. Relación de absorbancia frente al tiempo para los 4 cultivos de ScYedisSUN1



en medios YPGal y SD Leu + Gal. Medidas realizadas al inicio, tras 24 horas y tras 48 horas.



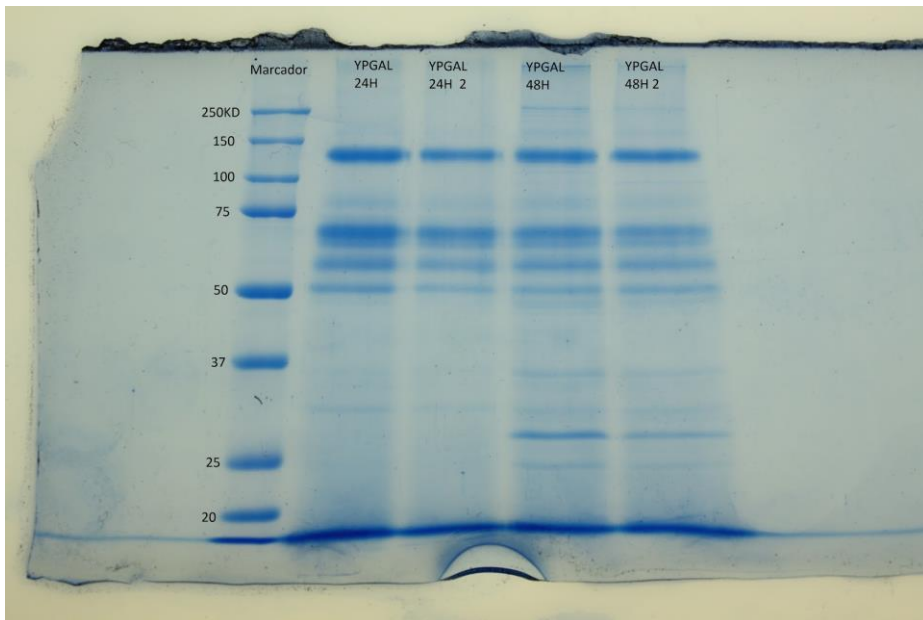
**IMAGEN 0. DOT BLOT REALIZADO CON LOS MEDIOS DE CULTIVO EN EL QUE SE OBSERVA COMO EN MEDIO YPGAL, ScYEDISSUN1 PRODUCE UNA MAYOR CANTIDAD DE LA PROTEÍNA.**

### Precipitación de proteínas con TCA

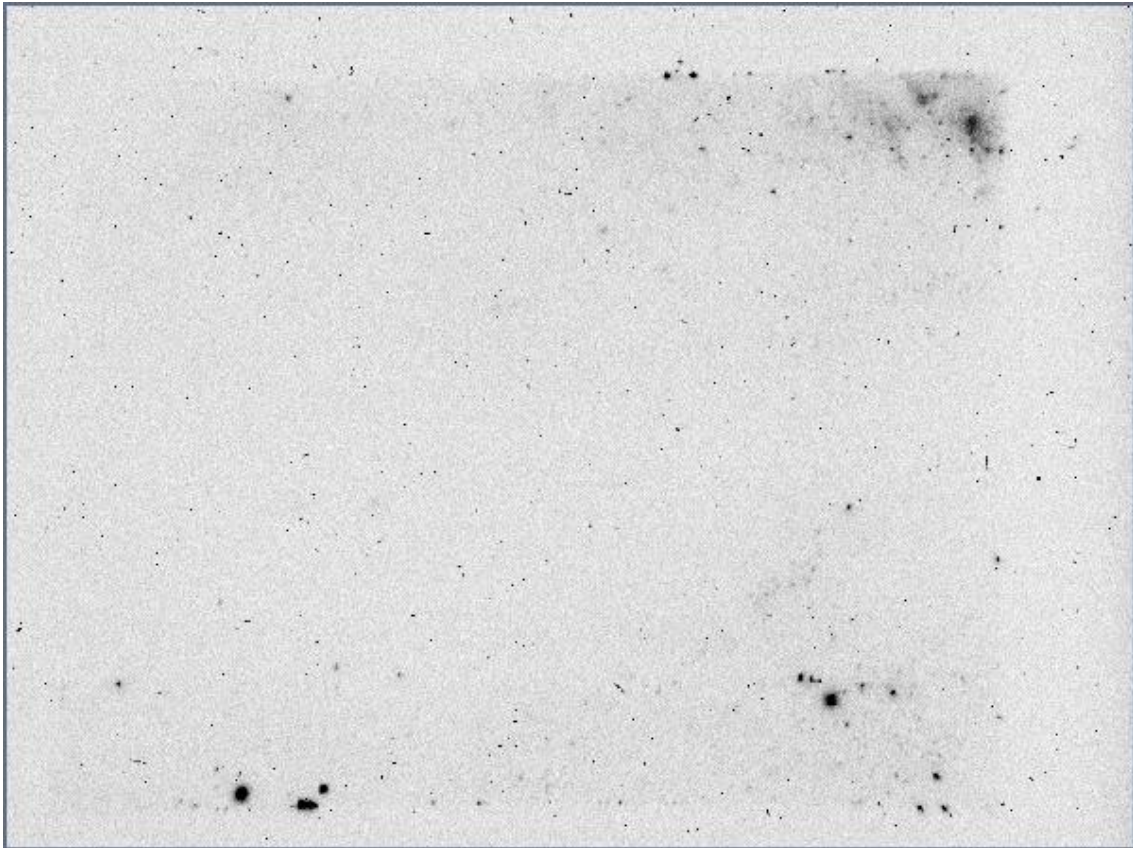
A partir de los cultivos de YPGal de 24 horas y 48 horas, con presencia de BcSUN1 comprobada mediante Dot Blot (Imagen 0), se realizó una precipitación mediante TCA al 6%, un método comúnmente usado (Koontz, 2014). Para comprobar el éxito de las precipitaciones se realizaron dos electroforesis en geles de acrilamida, el primero de ellos fue teñido mediante “Coomassie Brilliant Blue”, una técnica que permite una rápida visualización de las proteínas presentes en el gel de acrilamida (Chrambach, Reisfeld,

Wyckoff, & Zaccari, 1967), la prueba indicaba que en la precipitación con TCA 6% podemos encontrar una gran variedad de proteínas bandeadas a diferentes alturas, incluía una banda presente entre los 100KD y los 150KD (Imagen 1) debería encontrarse BcSUN1, sin embargo, el Western Blot (Mahmood & Yang, 2012) realizado a partir del segundo gel de acrilamida indica la ausencia de BcSUN1 en las muestras (Imagen 2).

Esto puede deberse a varios factores los dos primeros son un fallo durante la electroforesis/transferencia/revelado de las muestras o una concentración muy baja de BcSUN1 en las muestras, ambas podrían haber sido descartadas si se hubiera añadido un control positivo en el western blot. Otra posible causa que explicaría el por qué el Dot-blot y el western blot se contradicen es la degradación de BcSUN1, posiblemente debido a proteasas producidas por ScYedisSUN1, de ser así las proteínas degradadas no podrían ser transferidas durante el western blot dejando así la membrana sin señal mientras que en el Dot Blot las cadenas de 6 Histinas presentes en la cola de BcSUN1 son las causantes de esta señal. Para evitar este problema podrían usarse inhibidores de proteasas para levaduras (Bera, Ho, Khan, & Sedlak, 2011)



**IMAGEN 1. PRECIPITACIÓN DE CULTIVOS DE YPGAL A 24 HORAS Y 48 HORAS MEDIANTE TCA AL 6%.**

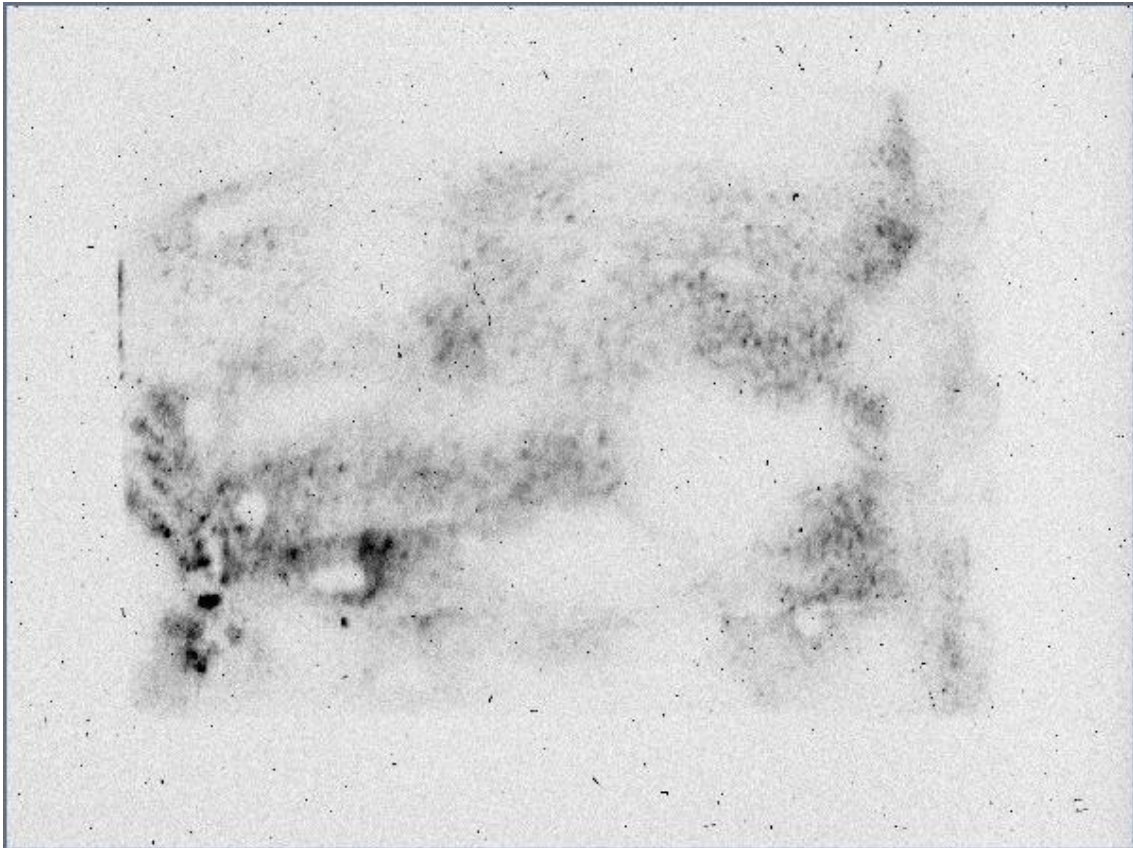


**IMAGEN 2. WESTERN BLOT REALIZADO DE MUESTRAS DE YPGAL 24 Y 48 HORAS PRECIPITADAS MEDIANTE TCA 6%, LA AUSENCIA DE BANDAS DE COLOR NEGRO INDICA QUE EN LA MEMBRANA NO SE ENCUENTRAN PROTEÍNAS A LAS QUE LOS ANTICUERPOS PUEDAN ADHERIRSE.**

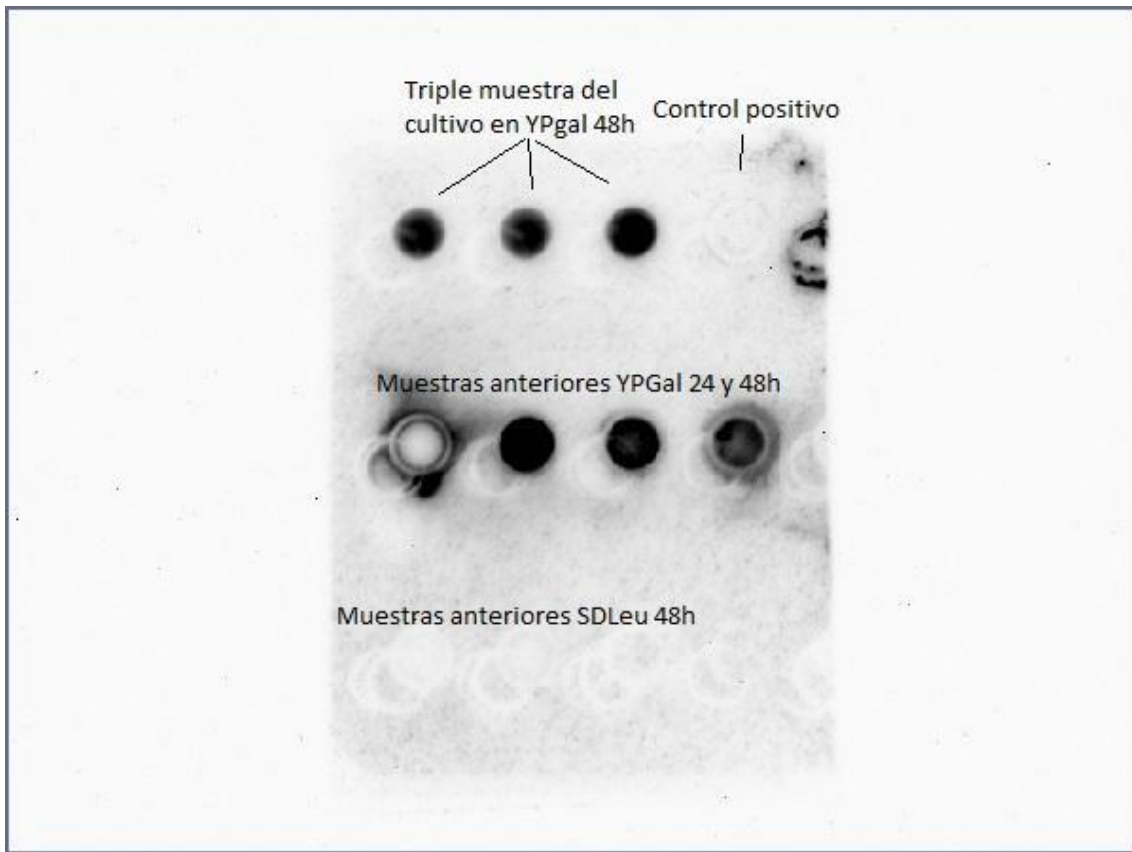
## Extractos celulares

Las muestras con las que se ha trabajado hasta ahora proceden del sobrenadante obtenido al retirar las células de los cultivos de ScYedisSun1 en YPGal, la otra fracción de los cultivos, las células, existe la posibilidad de que éstas no secreten BcSUN1 al medio y la mantengan en el citoplasma, para comprobarlo se rompieron éstas células y se realizó un western blot con los extractos. (Imagen 3) Dado el resultado de este western y para evitar un posible segundo western blot fallido, se optó por realizar un Dot-blot (Imagen 4), que

en este caso no solo incluiría un control positivo, sino que muestras de sobrenadante de un nuevo cultivo de ScYedisSUN1 en YPGal con 48 horas de incubación (mismas condiciones que el anterior).



**IMAGEN 3. DE NUEVO, NO SE PUEDEN APRECIAR BANDAS DE PROTEÍNAS EN ESTA MEMBRANA, EN ESTA OCASIÓN SE APRECIÓ UNA POBRE TRANSFERENCIA DE LAS PROTEÍNAS CORRESPONDIENTES A LOS MARCADORES MOLECULARES, POR LO TANTO, ES DE ESPERAR QUE EL RESTO DE PROTEÍNAS SUFRIERAN EL MISMO PROBLEMA.**

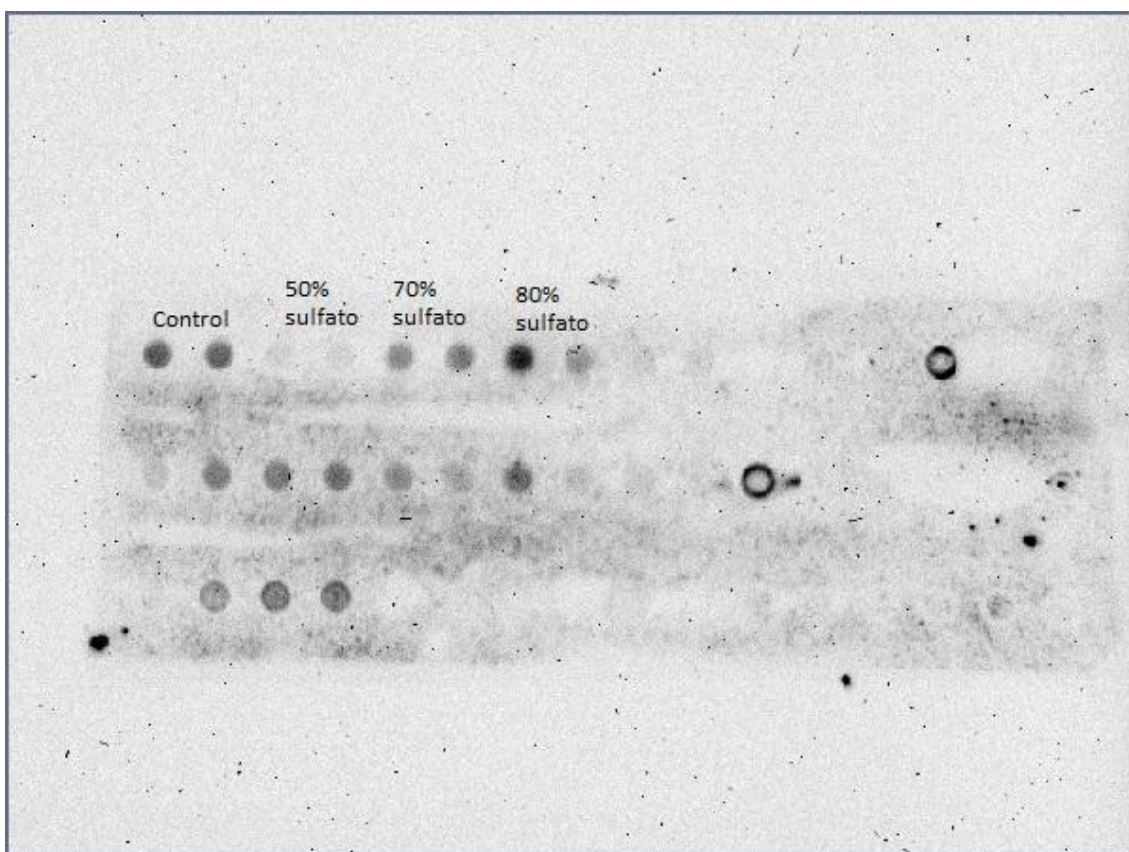


**IMAGEN 4. 3 MUESTRAS DEL NUEVO SOBRENADANTE DE 48 HORAS EN COMPARACIÓN AL SOBRENADANTE DEL ANTERIOR CULTIVO A 24 Y 48 HORAS, MUESTRAS RESULTADOS SIMILARES COMO SE ESPERABA.**

### Precipitación con sulfato amónico

Con el objetivo de comprobar si existen métodos de precipitación más efectivos con BcSUN1 se optó por la precipitación de proteínas con sulfato amónico (Wingfield, 1998). En primer lugar, se buscó el método optimo con sulfato amónico, para ello se realizaron pruebas con diferentes porcentajes de saturación de sulfato amónico (50%, 70% y 80% de sulfato amónico), elegir entre añadir el sulfato amónico como sal triturada o como una disolución saturada y, por último, elegir entre precipitar en lotes de 3ml (tubos falcon) o en lotes de 0,5ml (tubos eppendorf). Se realizó una precipitación para cada combinación

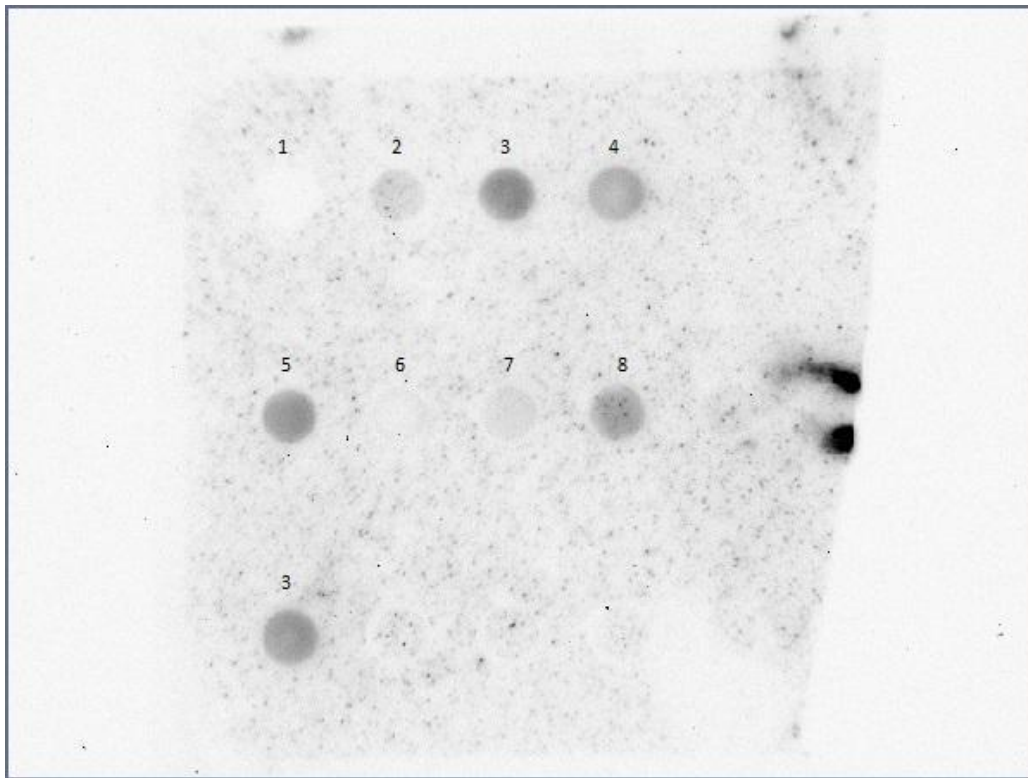
de factores y mediante un Dot-blot (Imagen 5) se determinó que el método más efectivo es precipitar con sulfato amónico es el siguiente: En lotes de 3ml ( (tubos eppendorf) con un 80% de saturación y añadiendo el sulfato amónico como una sal triturada y por tanto es el método a usar en las siguientes precipitaciones con sulfato amónico.



**IMAGEN 5. REVELADO DEL DOT BLOT PARA LAS MUESTRAS PRECIPITADAS CON SULFATO AMÓNICO CON DIFERENTES VARIABLES, LAS MUESTRAS CON UNA MAYOR INTENSIDAD INDICAN UNA MAYOR CONCENTRACIÓN DE BCSUN1 Y SE CORRESPONDEN CON LAS PRUEBAS DE 80%SULFATO AMÓNICO, 3ML POR TUBO Y ADICIÓN DE SULFATO AMÓNICO EN FORMA DE SAL TRITURADA.**

## Purificación mediante matriz de Sephadex

El primer intento de purificación empleado fue la cromatografía en columna de Sephadex. Una muestra de sobrenadante de 48 horas fue precipitada con sulfato amónico y dializada para filtrarse pasando a través de una columna de Sephadex. De esta prueba se recogieron dos muestras, la primera es el sobrenadante que paso por la columna y la segunda un lavado de la columna con tampón PBS. Se realizo un Dot-blot ambas muestras además de muestras correspondientes los pasos intermedios de este proceso (Imagen 6) y según nos indica, parece que existe una pérdida de la proteína en la columna. Las muestras previas al paso por la columna muestran una señal relativamente intensa, sin embargo, en las dos muestras posteriores a la columna esta señal ya no existe o es prácticamente nula. Podría deberse a que la matriz de Sephadex está atrapando a BcSUN1 ya que se trata de una proteína altamente glicosilada.



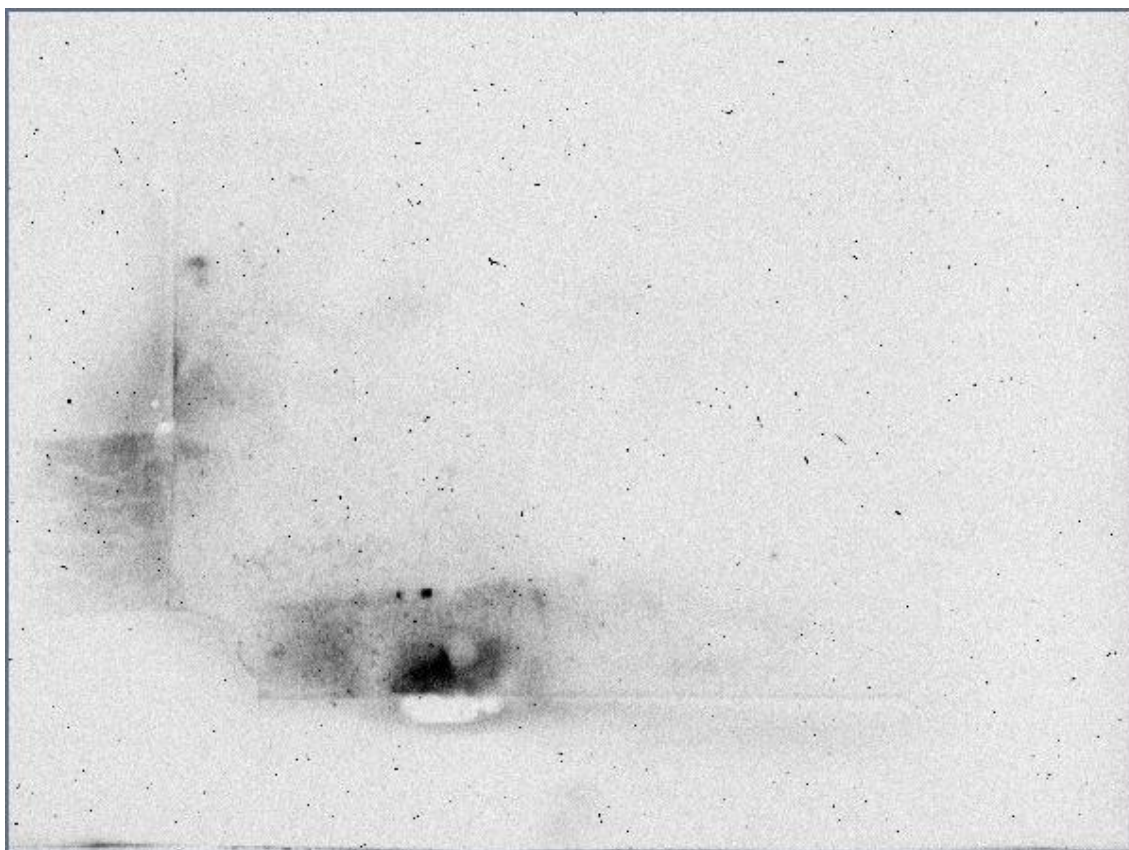
**IMAGEN 6. DOT BLOT CON LAS SIGUIENTES MUESTRAS: 1.CONTROL NEGATIVO 2.CONTROL POSITIVO 3.SOBRENADANTE PRECIPITADO CON SULFATO AMÓNICO 5. MUESTRA PRECIPITADA Y DIALIZADA 6. MUESTRA TRAS PASAR LA COLUMNA 7.LAVADO DE LA COLUMNA CON TAMPÓN PBS.**

### Purificación mediante columna de afinidad HisTrap

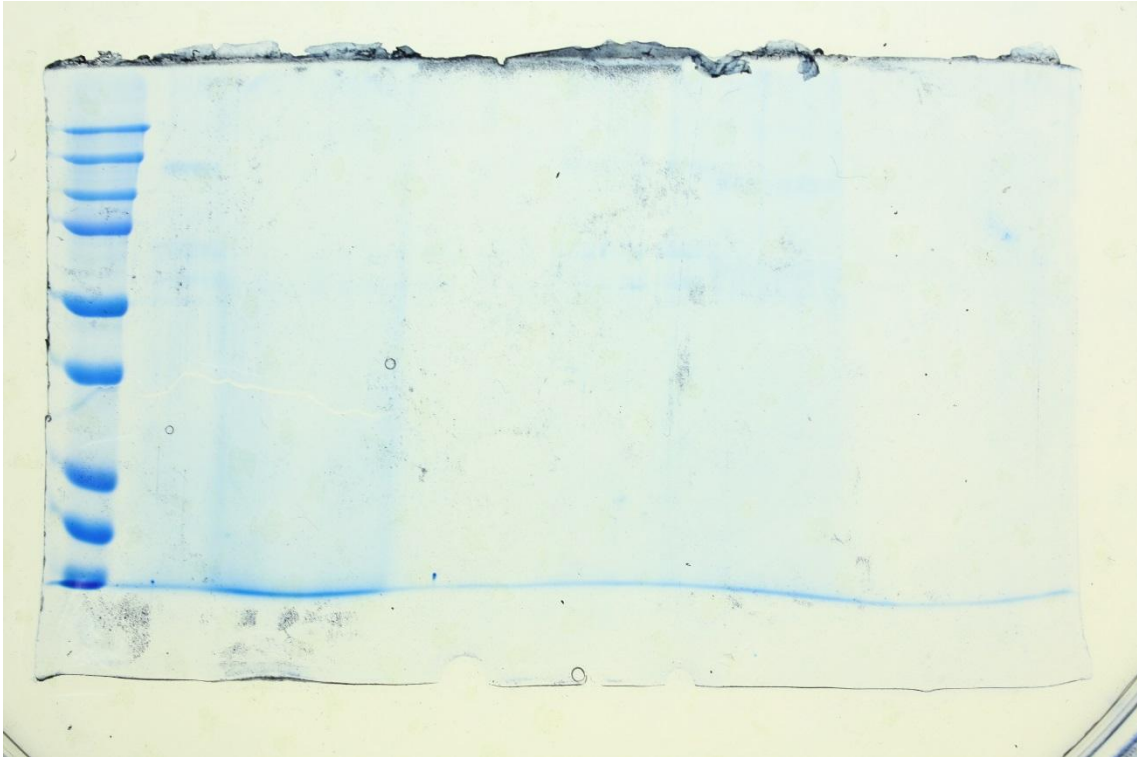
Con la posibilidad de que BcSUN1 este ligándose a la matriz de Sephadex, se optó por usar otro método para purificar la proteína, columnas de afinidad HisTrap FF con níquel (Cuatrecasas & Anfinsen, 1971). De nuevo ser utilizado sobrenadante de 48 horas dializado previamente y se recogieron como muestras tanto el sobrenadante que paso por la columna como las 2 eluciones y el lavado de la columna. Estas muestras fueron precipitadas con TCA 6% para realizar un western blot (Imagen 7) que de nuevo no muestra señal. Para descartar un error en el western el gel de acrilamida usado para este western se tiñe usando Coomassie Brilliant Blue (Imagen 8) y la membrana sufre un



“Striping”(Kaufmann, Ewing, & Shaper, 1987) para volver a ser incubada con anticuerpos, ninguno de los dos procesos mostro la presencia de proteínas por lo que se deduce que el problema sucedió durante/previo a la electroforesis (columna HisTrap o precipitación con TCA) o la cantidad de proteína extraída era muy baja desde el primer momento.



**IMAGEN 7. WESTERN BLOT DE LAS MUESTRAS UTILIZADAS DURANTE LA CROMATOGRAFÍA POR AFINIDAD USANDO COLUMNA HISTRAP FF. NO HAY SEÑAL VISIBLE.**



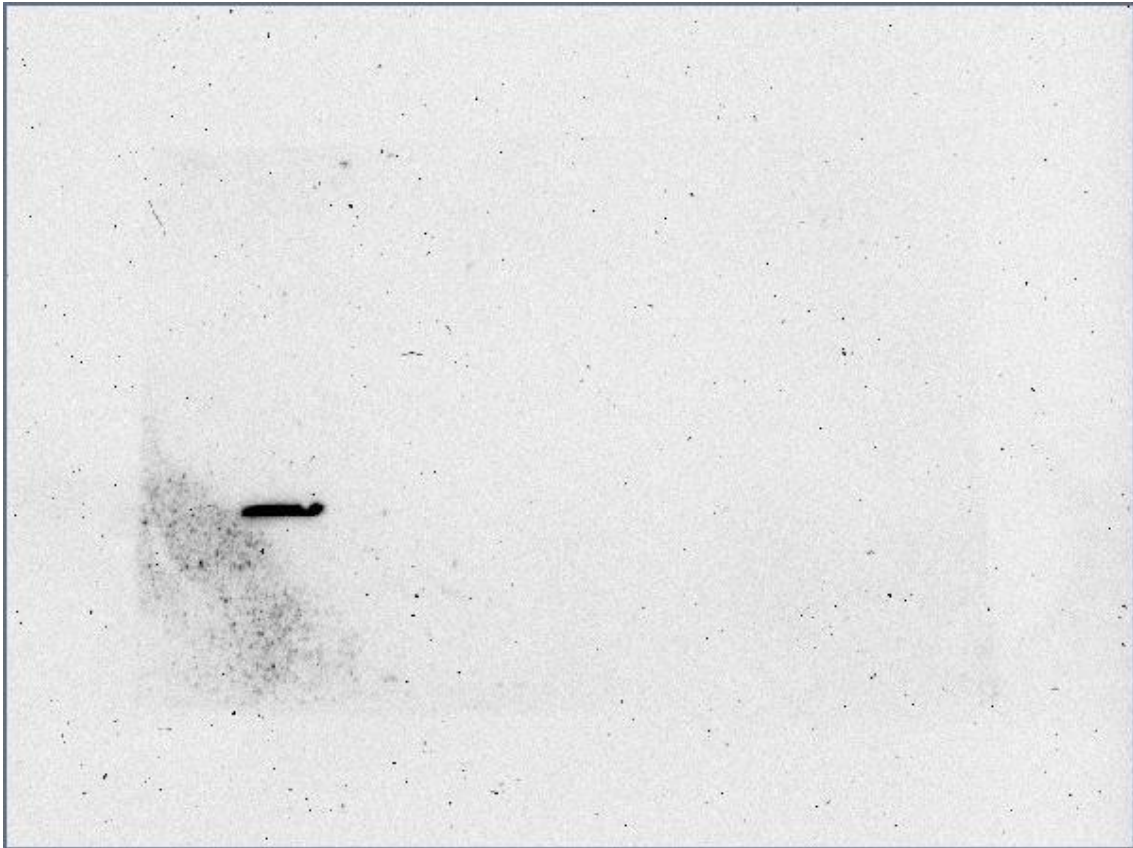
**IMAGEN 8 TINCIÓN CON COOMASSIE BRILLIANT BLUE SIN RESULTADOS VISIBLES**

## Precipitación con TCA-metanol-cloroformo

Teniendo en cuenta que los anteriores métodos de precipitación de proteínas no fueron del todo efectivos se decidió probar uno diferente que combina el anterior método del TCA al 6% + una precipitación con metanol-cloroformo (Wessel & Flugge, 1984).

El ensayo se realizó con sobrenadante de 48 horas en diferentes volúmenes al igual que las otras precipitaciones y con las muestras se realizaron tanto un western blot (Imagen 9) como una tinción de Commassie

De nuevo no se encontró una banda que indicara la presencia de BcSUN1 ni en el western blot ni en la tinción de commassie, sin embargo, el control positivo sí que es visible, por lo tanto, o se cometió un error durante la precipitación TCA metanol-cloroformo o la cantidad de proteína presente en las muestras es demasiado baja.

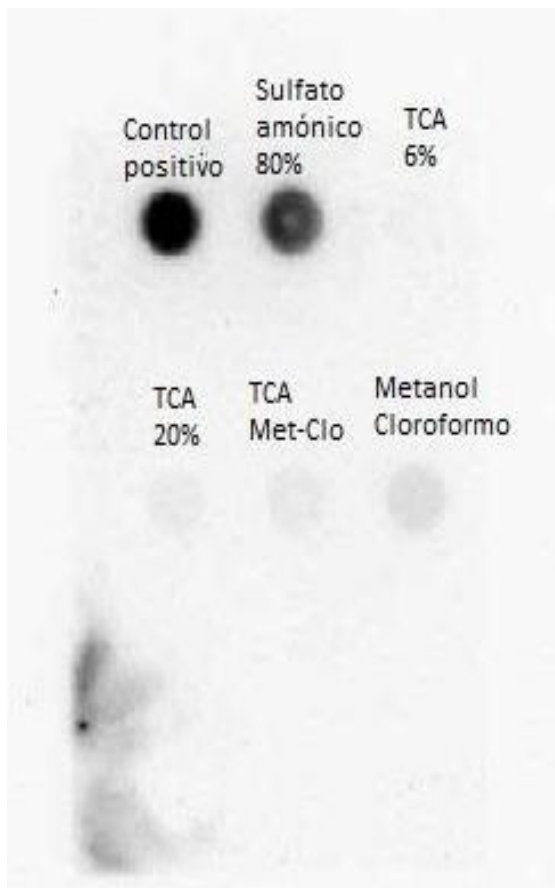


**IMAGEN 9. WESTERN BLOT EN EL QUE FUERON CARGADOS LOS MARCADORES MOLECULARES, UN CONTROL POSITIVO (ÚNICA BANDA VISIBLE), Y 7 PRECIPITACIONES QUE PARTÍAN DE DIFERENTES VOLÚMENES DE SOBRENADANTE (NO VISIBLES).**

### Ultima precipitación a partir de Saccharomyces

Se realizó una precipitación del sobrenadante de 48h usando los 5 métodos previamente usados (sulfato amónico, TCA 6%, TCA 20%, TCA-metanol-cloroformo y metanol cloroformo) con el fin de realizar una comparación a nivel cualitativo de los 5 métodos, en todos los casos se partió de 2.5ml de sobrenadante y los resultados se midieron en un Dot-blot (Imagen 10) el cual muestra que la mayor efectividad la presenta el sulfato amónico con una diferencia notable teniendo como segundo puesto al metanol-cloroformo y con resultados casi imperceptibles los métodos que utilizan TCA. Por

último, en base a los resultados se intentará una última precipitación utilizando como método el sulfato amónico al 80 % en las muestras de elución de la columna de afinidad HisTrap ff y se realizará un western-blot con ella en el cual se puede encontrar finalmente una leve banda correspondiente a la proteína BcSun1 para la muestra de la primera elución.



**IMAGEN 10. DOT BLOT DE 2.5ML DE SOBRENADANTE 48H EN YPGAL PRECIPITADO MEDIANTE 5 MÉTODOS DIFERENTES ADEMÁS DE UN CONTROL POSITIVO.**

# CONCLUSIONES

## Conclusiones

Con la primera prueba se pudo descartar rápidamente el medio mínimo SD Leu y por tanto utilizar para el resto de experimentos el medio YPGal el cual presento un crecimiento al menos 50 veces mayor a su competidor, a partir de un cultivo en YPGal se realizó la primera purificación la cual resulto en la ausencia de BcSUN1 durante el western-blot ya sea por error humano durante los análisis, por degradación de proteínas durante el proceso o porque las células no excretaban la proteína al medio, esta tercera opción fue la primera en ser comprobada realizando un análisis de los extractos celulares de ScYedisSun1 que resulto en un mal transporte de proteínas durante el western blot. Para comprobar si la precipitación de proteínas podía mejorar, se optó por realizar dicha prueba probando diferentes concentraciones de sulfato amónico, añadiendo el sulfato tanto como sal triturada como una disolución saturada y por último decidir si la purificación daba mejores resultados en un tubo de 0,5ml o en un tubo de 3ml. Todo esto dio como resultado el método que se usaría en las siguientes pruebas, usando una concentración dl 80% de sulfato amónico en tubos de 3ml y añadiendo la sal como polvo triturado. Una vez decidido el medio de cultivo y el método de precipitación de proteínas se realizaron dos pruebas de purificación, una mediante una matriz de Sephadex y la otra con una columna de afinidad HisTrap ff, esta última acabo siendo la que presento un mayor rendimiento y por ende la utilizada más adelante. La última prueba que se realizó durante este trabajo consistió en una precipitación de proteínas a partir del sobrenadante del cultivo en YPGal incubado durante 48h y usando todos los métodos de precipitación previos resultando como ganador nuevamente el sulfato amónico al 80%, esta precipitación fue purificada con una columna HisTrap ff y se realizó un western-blot que obtuvo al fin presencia de la proteína deseada, esto indica que, aunque probablemente se realizaron errores humanos durante las pruebas y por tanto deben ser revisadas, el rumbo general era el correcto y los métodos empleados se acercaban cada vez más a la forma eficiente de producir BcSUN1 a partir de esta cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Por tanto, aunque no puedo decir que se hayan cumplido los objetivos de este trabajo durante su duración, considero que seguir con esta línea de experimentos llevara eventualmente a un proceso de producción óptimo.

## Conclusions

With the first test, the medium “minimum SD Leu” could be quickly discarded and therefore the YPGal medium was preferable for the rest of the experiments, due to a growth at least 50 times higher than its competitor, from a YPGal culture the first purification was made which resulted in the absence of BcSUN1 during the western-blot either by human error during the analysis, by protein degradation during the previous process or because the cells did not excrete the protein to the medium, this third option was the first to be tested. performing an analysis of the cell extracts of ScYedisSun1 that resulted in poor protein transmission during the western blot. To check if the protein precipitation method could be improved, it was decided to carry out this test by trying different concentrations of ammonium sulfate, adding the sulfate both as salt powder or as a saturated solution and finally deciding if the purification gave better results either in a tube of 0, 5ml or in a 3ml tube. All this resulted in the method that would be used in the following tests, using an 80% concentration of ammonium sulfate in 3 ml tubes and adding the salt as powder. Once the culture medium and the protein precipitation method had been decided, two purification tests were carried out, one with a Sephadex matrix and the other with a HisTrap ff affinity column, the latter being the one that presented the highest yield and the one used later. The last test that was carried out during this work consisted of a protein precipitation from the culture supernatant in YPGal incubated for 48 h and using all the previous precipitation methods, yet again the winner was the ammonium sulphite, this precipitation was purified with the HisTrap ff column and a western-blot was performed finally obtaining the desired protein, this indicates that, although human errors were probably made during the tests and therefore should be reviewed, the general direction was correct and the methods employed were getting closer and closer to the most efficient way to produce BcSUN1 from this strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, although I cannot say that the objectives of this work have been fulfilled during its duration, I believe that continuing with this line of experiments will eventually lead to an optimal production process.

## Referencias

- Ait Barka, E., Eullaffroy, P., Clément, C., & Vernet, G. (2004). Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*, 22(8), 608–614. <https://doi.org/10.1007/s00299-003-0733-3>
- Amselem, J., Cuomo, C. A., van Kan, J. A. L., Viaud, M., Benito, E. P., Couloux, A., ... Dickman, M. (2011). Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>
- Bera, A. K., Ho, N. W. Y., Khan, A., & Sedlak, M. (2011). A genetic overhaul of *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST) to improve xylose fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(5), 617–626. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0806-6>
- Chrambach, A., Reisfeld, R. A., Wyckoff, M., & Zaccari, J. (1967). A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 20(1), 150–154. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90272-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(67)90272-2)
- Cuatrecasas, P., & Anfinsen, C. B. B. T.-M. in E. (1971). [31] Affinity chromatography. In *Enzyme purification and related techniques* (Vol. 22, pp. 345–378). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(71\)22033-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(71)22033-4)
- Fernández-Acero, F. J., Colby, T., Harzen, A., Carbú, M., Wieneke, U., Cantoral, J. M., & Schmidt, J. (2010). 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. *PROTEOMICS*, 10(12), 2270–2280. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900408>



- González, M., Brito, N., & González, C. (2014). Identification of glycoproteins secreted by wild-type *Botrytis cinerea* and by protein O-mannosyltransferase mutants. *BMC Microbiology*, *14*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0254-y>
- Harel, Z. H. M. E. author Dalia R.-D. R. G. M. (2015). Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling. *Plant and Soil*, *395*(1–2), 31–44. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2445-1>
- Kaufmann, S. H., Ewing, C. M., & Shaper, J. H. (1987). The erasable Western blot. *Analytical Biochemistry*, *161*(1), 89–95.
- Koontz, L. (2014). Chapter One - TCA Precipitation. In J. B. T.-M. in E. Lorsch (Ed.), *Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C* (Vol. 541, pp. 3–10). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00001-X>
- Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, *4*(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Pérez-Hernández, A., González, M., González, C., van Kan, J. A. L., & Brito, N. (2017). BcSUN1, a *B. cinerea* SUN-family protein, is involved in virulence. *Frontiers in Microbiology*, *8*(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00035>
- Wessel, D., & Flugge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, *138*(1), 141–143.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, *8*(5), 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>

Wingfield, P. (1998). Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. *Current Protocols*  
*in Protein Science*, 13(1), A.3F.1-A.3F.8.  
<https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs13>