

## Producción recombinante de la enteroquinasa de cadena ligera bovina en el periplasma de *Escherichia coli*

Susana Anahí Carreón Piña<sup>1\*</sup>, Víctor Fabián García Cerda<sup>1</sup>, Bryan Daniel Santos Rodríguez<sup>1</sup>, Xristo Zárate Kalfópulos<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Laboratorio de Biotecnología 2, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, México.  
\*Email: sanahicp@gmail.com

### Introducción

La enteroquinasa es una peptidasa que se produce en la mucosa duodenal bovina, la cual consiste de dos cadenas: una pesada (115 kDa) y una ligera (35 kDa) la cual posee la actividad catalítica. Esta enzima activa el tripsinógeno reconociendo la secuencia (Asp)<sub>4</sub>-Lis y cortando en el extremo C-terminal de esta secuencia<sup>1</sup>. Esto la convierte en un reactivo esencial en la producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* ya que colocando esta secuencia entre una proteína de fusión y la proteína de interés permitiría la separación de ambas. Para producir la enteroquinasa se utilizará la secuencia de aminoácidos del péptido señal de la enzima PelB, una peptidasa de la bacteria *Erwinia carotovora*<sup>2</sup>, la cual se encargará de dirigir la expresión al periplasma de *Escherichia coli*. Se produce aquí ya que es rara la formación de cuerpos de inclusión, favorece la formación de puentes disulfuro para el correcto plegamiento, además hay menos proteínas y esto hace que la fracción sea más pura. Esta proteína se usará en el Laboratorio de Biotecnología de la FCQ para separar proteínas de fusión de las proteínas recombinantes de interés.

### Parte experimental

Para la digestión de la enteroquinasa y del vector pET30a se utilizaron las enzimas de restricción NdeI (NEB) y XhoI (NEB) siguiendo las instrucciones del fabricante. En la purificación en gel del gen de la enteroquinasa se utilizó el QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen). Se realizó la ligación de pET30a con el inserto de la enteroquinasa previamente digerida y se transformó en *Escherichia coli DH5α* utilizando el método de choque térmico. Para la extracción del DNA plasmídico se realizó un miniprep con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Para verificar que el inserto de la enteroquinasa fue clonado en pET30a se realizó una PCR confirmatoria utilizando los primers o cebadores T7.

*Escherichia coli* BL21 (DE3) fue transformada con el plásmido pET30a-Ent. Para la expresión de proteínas se tomaron varias colonias y se cultivaron en caldo LB con Kanamicina (30μL) a una densidad óptica a 600 nm de 0.6. La expresión fue inducida con IPTG a concentración final de 0.1 mM incubada a 25 °C durante 16h. La extracción de la enteroquinasa del periplasma se realizó utilizando el método de lisozima/choque osmótico<sup>3</sup>. Posteriormente se realizó el análisis de las fracciones por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% para confirmar que la enteroquinasa fue expresada.

### Resultados y discusión

Se realizó la clonación del gen de la enteroquinasa en el vector pET30a designándolo como pET30a-Ent y mediante PCR pudo confirmarse que el gen fue

insertado de manera satisfactoria (ver Figura 1). Posterior a la transformación en *E. coli* BL21(DE3) se realizó la expresión de la enteroquinasa utilizando IPTG como inductor. En la figura 2 se puede observar el análisis de la expresión por SDS-PAGE en gel de poliacrilamida al 12% observando la presencia de las bandas de expresión de la enteroquinasa aproximadamente a 35 kDa.

### PET30a-EK VS pET41a-GST-EK

En GST-EK, la proteína se expresó el 10% en forma soluble y 90% como cuerpos de inclusión. Sin embargo, en nuestro plásmido como ya se vio anteriormente, no se muestra presencia alguna de cuerpos de inclusión en las fracciones solubles ni tampoco alguna banda visible de la proteína de interés en la fracción insoluble<sup>4</sup>.

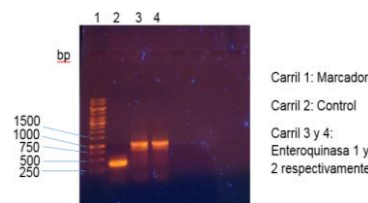


Figura 1. PCR confirmatoria de la clonación del gen de la enteroquinasa en pET30a

El gen de la enteroquinasa es de 801 bp, y el vector contiene 200 bp aproximadamente. Por esta razón, en el análisis en gel de agarosa aparece una banda en 1000 pb.

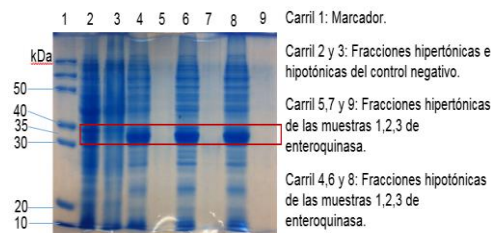


Figura 2. Análisis de la expresión por SDS-PAGE

### Conclusión

Se obtuvo y se purificó el inserto de la enteroquinasa. Se clonó el inserto de la enteroquinasa con el vector pET30a. Se demostró que la enteroquinasa recombinante se produce de forma soluble en *Escherichia coli*. Se esperaría que la enteroquinasa producida sea activa por lo que se ha revisado en la literatura. Se necesitan optimizar las condiciones del choque osmótico para confirmar la presencia de enteroquinasa en el periplasma de *Escherichia coli*

**Referencias:**

1. Chun H.; Joo K.; Lee J. *Biotechnol Lett.* **2011**, 33, 1227-1232.
2. Heikinheimo R.; Flego D.; Pirhonen M.; Karlsson MB.; Eriksson A.; Mae A.; Koiv V. *Mol Plant Microbe In.* **1995**, 8,207-17.
3. French C.; Keshavarz-Moore E.; Ward J. M. *Enzyme Microb. Tech.* **1996**, 19, 332-338.
4. Tan H.; Wang J.; Zhao Z. *Protein Expr Purif.* **2007**, 56, 40-7