

Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

Universidad Nacional de Asunción

Bq. Liz López

Tutora: MCs. Belen Infanzón **Co-tutora:** MCs. Alejandra Rojas

2016

Programa de Vinculación de Científicos y Tecnólogos



PROGRAMA PARAGUAYO PARA EL DESARROLLO DE LA CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Universidad Nacional Autónoma de México



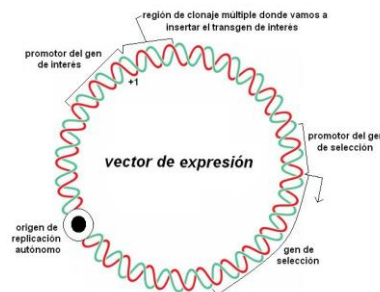
Dra. Adriana Valdez
Departamento de Biología Molecular y
Biotecnología



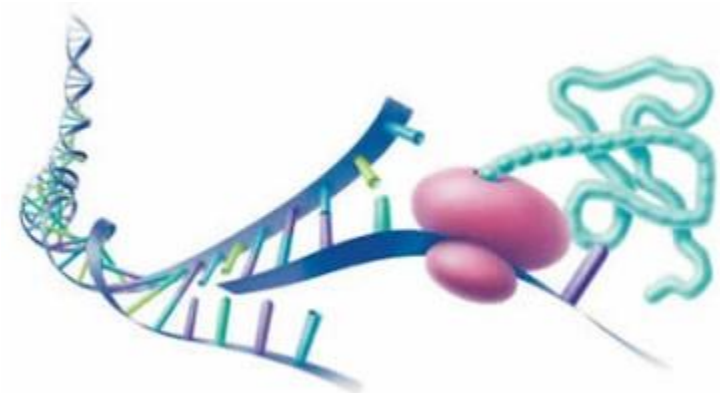
UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

Proteínas recombinantes

- Son obtenidas a partir de una especie o una línea celular distinta a la célula original.
- La capacidad de manipular las secuencias de ADN permite alterar los genes y expresarlos de manera a obtener proteínas con propiedades funcionales mejoradas.



→
Huésped heterólogo





Proteínas recombinantes terapéuticas

Producto	Proteína recombinante	Organismo	Aplicación
Humulin	Insulina	<i>E. coli</i>	Diabetes
Protropin	Protropina	<i>E. coli</i>	Deficiencia hGH
Roferon A	Interferón alfa-2a	<i>E. coli</i>	Leucemia linfóide crónica
Intron A	Interferón alfa-2b	<i>E. coli</i>	Cáncer, verrugas genitales, hepatitis
Recombivax	Vacuna Hepatitis B	<i>S. cerevisiae</i>	Hepatitis B
Humatrope	Somatropina	<i>E. coli</i>	Deficiencia hGH
Activase	TPA	CHO	Infarto agudo del miocardio
Epogen	Epoetina alfa	CHO	Anemia

Proteínas recombinantes en diagnóstico

A custom-designed recombinant multiepitope protein as a dengue diagnostic reagent

Ravulapalli AnandaRao^a, Sathyamangalam Swaminathan^a, Sirimali Fernando^b, Asha M. Jana^c, Navin Khanna^a ·  · 

Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease

D Sblattero PhD¹, I Berti MD^{1,2}, C Trevisiol MD¹, R Marzari PhD³, A Tommasini MD¹, A Bradbury MD, PhD⁴, A Fasano MD², A Ventura MD¹ and T Not MD¹

Serological detection of Grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPa V) by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein

A. Minafra, P. Casati, V. Elicio, A. Rowhani, P. Saldarelli, V. Savino, G. P. Martelli

Producción de proteínas recombinantes en bacterias

Vector de expresión

- Número de copias
- Promotor
- Presión de selección

Purificación

- Ruptura celular
- Separación de proteínas bacterianas
- Eliminación de endotoxinas

Selección de la cepa productora

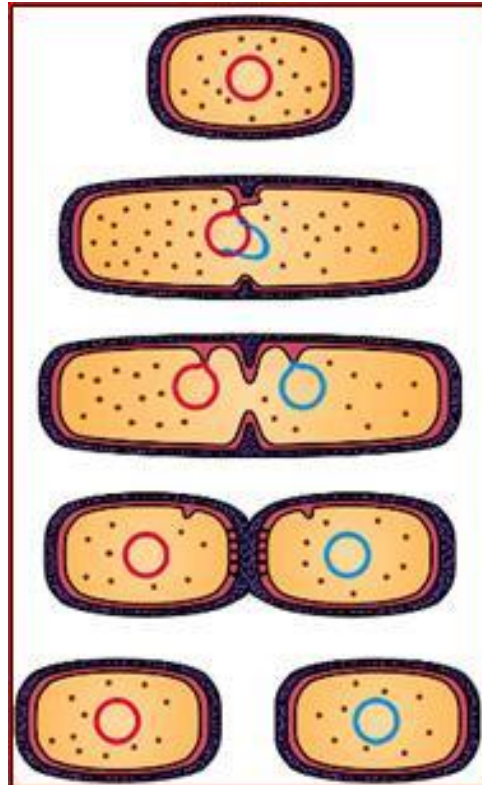
- Altos niveles de producción
- Buen desempeño en el proceso
- Modificada para facilitar la producción

Cultivo bacteriano

- Diseño óptimo del medio
- Alta densidad celular
- Estrategias de operación

Crecimiento bacteriano

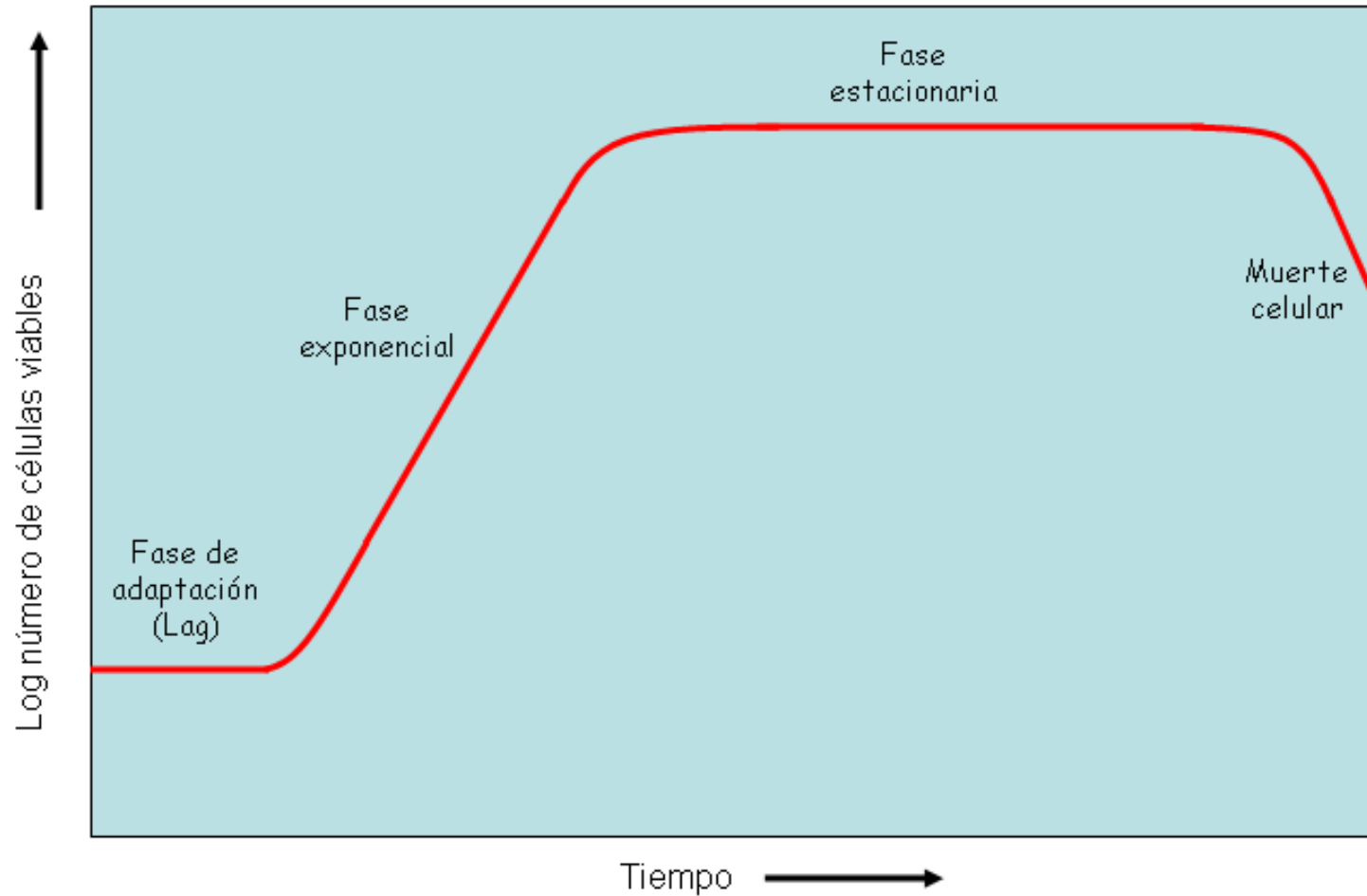
- Incremento en el número de células o aumento de la masa microbiana (biomasa).



Crecimiento bacteriano

- El conocimiento de como se expande la población celular es útil para el diseño de métodos de control para el crecimiento microbiano.
- Adquiere relevancia en el aumento de la biomasa y en los productos que se pueden llegar a obtener.

Curva de crecimiento bacteriano



Curva de crecimiento bacteriano

- **Fase lag**

Representa el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular después de un periodo de ayuno nutrimental.

- **Fase exponencial**

O de crecimiento balanceado, representa el periodo en el que hay suficientes nutrimentos; las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número exponencialmente.

- **Fase estacionaria**

Representa el periodo de crecimiento nulo. Se define operacionalmente como el momento en el que el número de células en el cultivo no varía.

- **Fase de muerte**

Cinética de crecimiento

- Los microorganismos presentan un crecimiento que se puede describir mediante la siguiente función:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Donde:

x : concentración celular (biomasa)

μ : velocidad específica de crecimiento

t : tiempo de crecimiento

Cinética de crecimiento

- El crecimiento celular es considerado una *reacción autocatalítica de primer orden*, en donde en un sistema cerrado el crecimiento es el único proceso que afecta la concentración celular.
- Considerando μ constante:

$$x = x_0 e^{\mu t}$$

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t.$$

- **Velocidad específica de crecimiento**

Relación del crecimiento de la célula en función de los nutrientes del medio.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{k_S + S}$$

- **Tiempo de duplicación celular**

O tiempo de generación. Es el tiempo requerido para que una célula se divida (o para que la población de un organismo se duplique en número).

$$t = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Microorganismo	μ_m (hr ⁻¹)	td (hr)
<i>Escherichia coli</i>	2.1	0.33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.45	1.5
<i>Candida utilis</i>	0.40	1.7
<i>Geotrichum lactis</i>	0.35	2.0

Métodos de cuantificación del crecimiento bacteriano

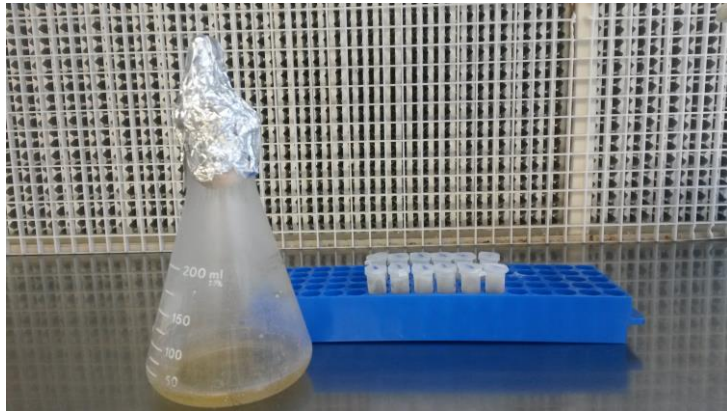
Métodos directos

- Métodos gravimétricos
- Métodos espectrofotométricos
- Métodos microscópicos de recuento celular en cámaras
- Métodos de siembra

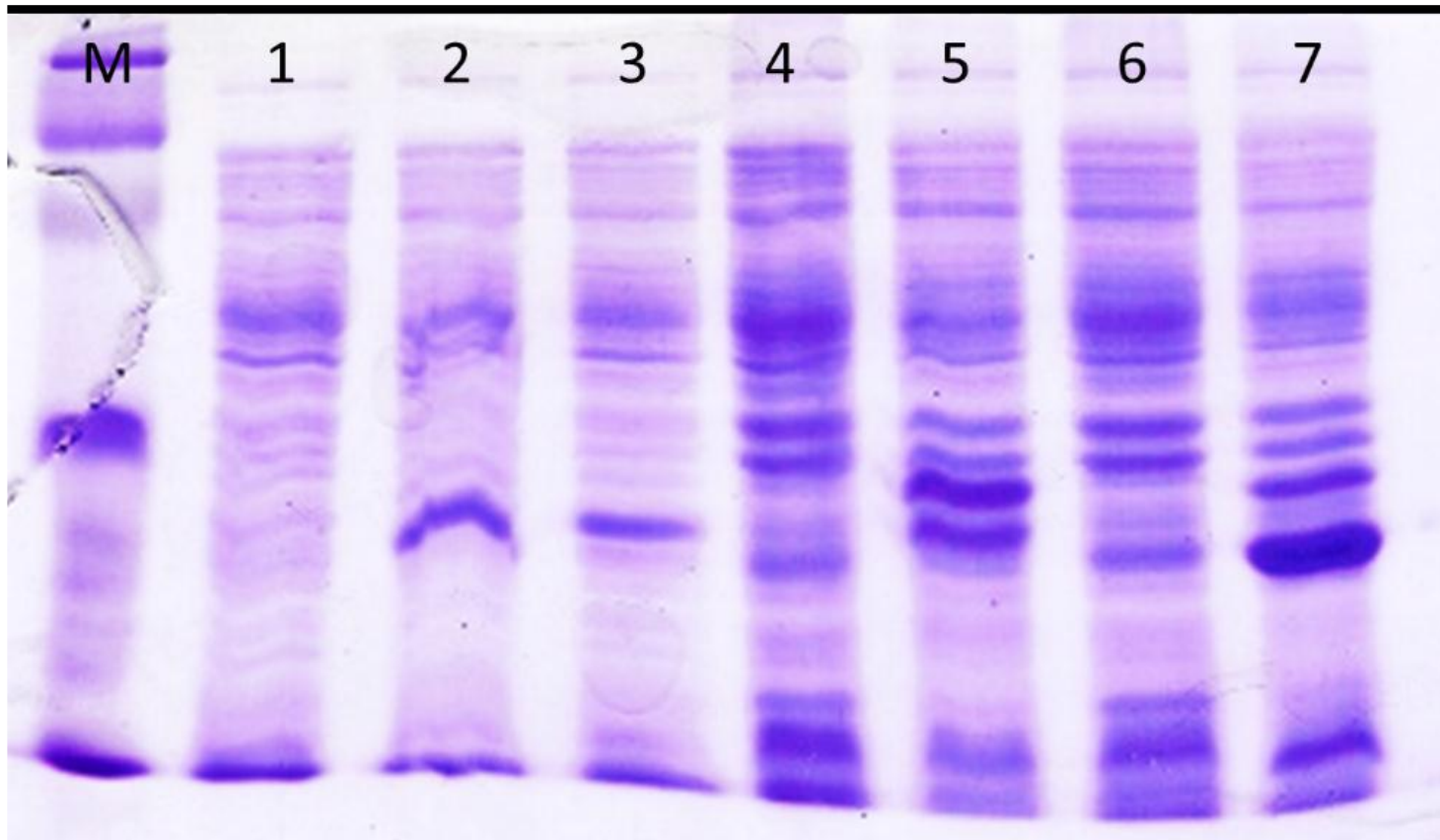
Métodos indirectos

- Bradford

Cinética de crecimiento de bacterias *E. coli* BL21(DE3) clon pGEX-mNS1



E. coli BL21(DE3) clon pGEX-mNS1



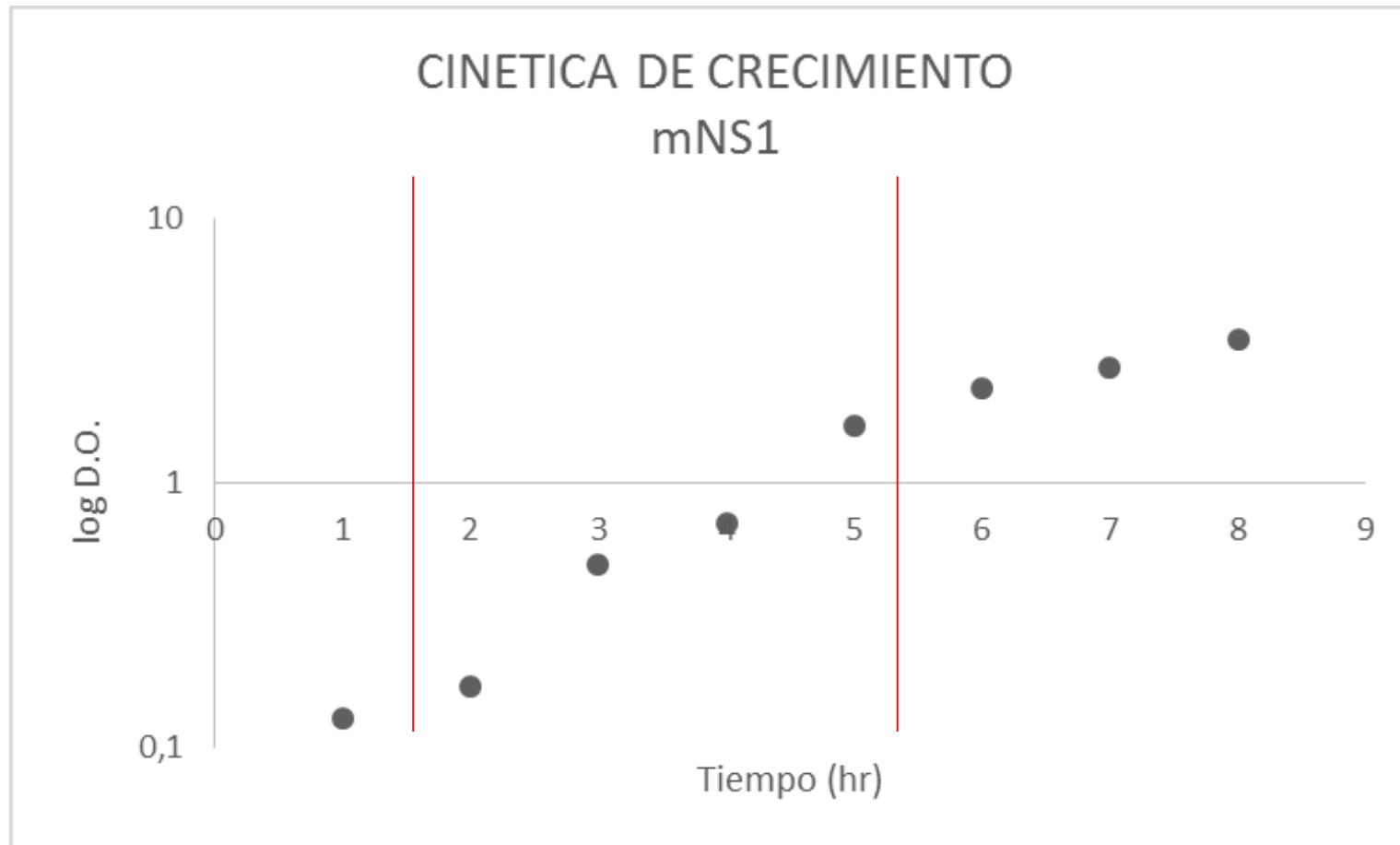
- M: Marcador de PM
- 1: Extracto D1 sin inducir
- 2: Extracto D1+IPTG
- 3: Extracto D5+IPTG
- 4: Pellet D1 sin inducir
- 5: Pellet D1+IPTG
- 6: Pellet D5 sin inducir
- 7: Pellet D5+IPTG

Cinética de crecimiento de bacterias *E. coli* BL21(DE3) clon pGEX-mNS1

- Medio: Luria Bertani
- Temperatura: 37°C
- Antibiótico: Ampicilina 100 µg/mL

<i>E. coli</i> BL21 pGEX-mNS1					
Tiempo (hr)	D.O.	D.O	D.O	x	D.E
1	0,17	0,08	0,15	0,13	0,04725816
2	0,2	0,13	0,18	0,17	0,03605551
3	0,46	0,5	0,52	0,49	0,0305505
4	0,68	0,7	0,76	0,71	0,04163332
5	1,54	1,56	1,86	1,65	0,17925773
6	2,19	2,11	2,6	2,3	0,26286879
7	2,53	2,36	3,32	2,74	0,51228247
8	3,13	3,38	3,92	3,48	0,40377386

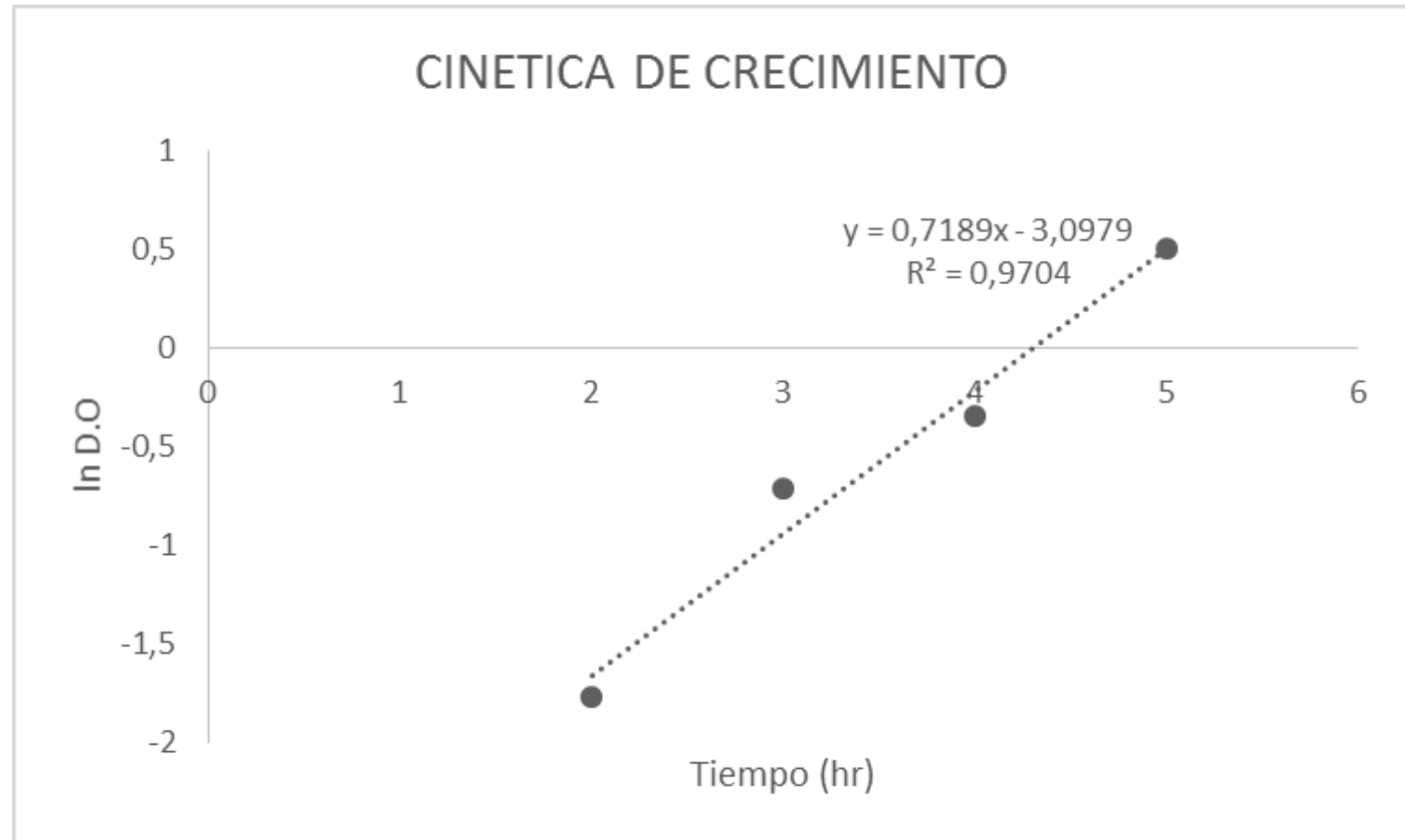
Cinética de crecimiento de bacterias *E. coli* BL21(DE3) clon pGEX-mNS1



Cinética de crecimiento de bacterias *E. coli* BL21(DE3) clon pGEX-mNS1

Tiempo (hr)	ln D.O.
2	-1,77195684
3	-0,71334989
4	-0,34249031
5	0,50077529

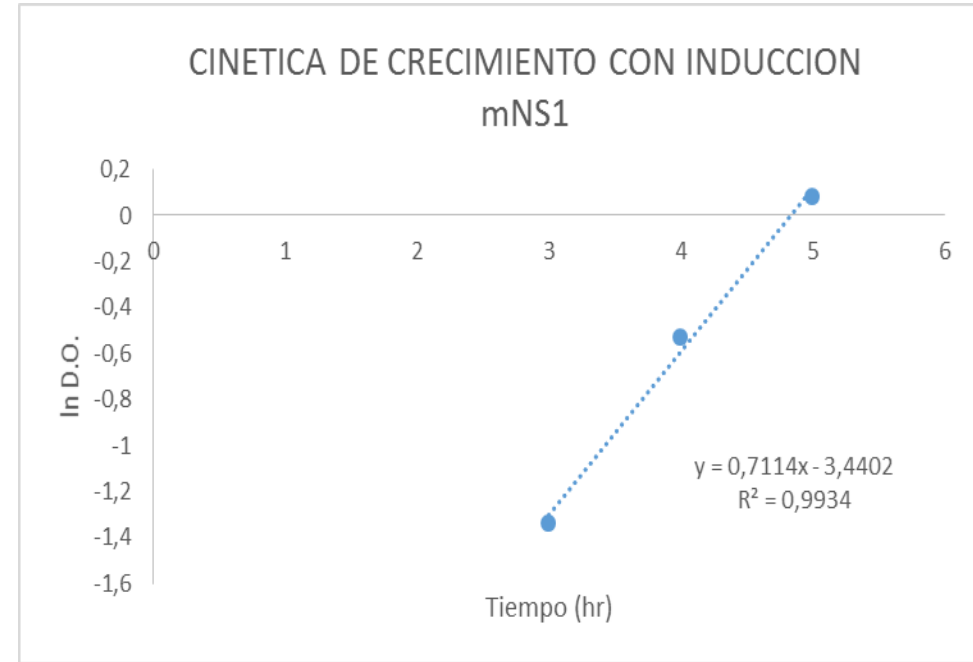
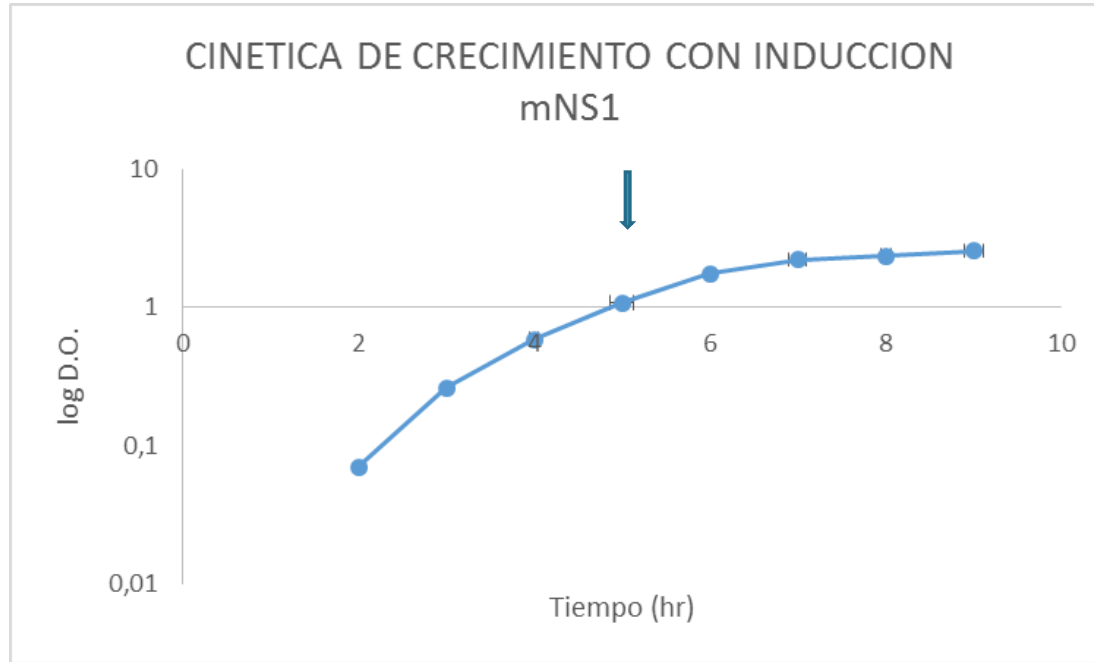
$\mu = 0,719 \text{ hr}^{-1}$
 $t_d = 0,96 \text{ hr}$



Cinética de crecimiento de bacterias *E. coli* BL21(DE3) clon pGEX-mNS1 con inducción

- Medio: Luria Bertani
- Temperatura: 37°C
- Antibiótico: Ampicilina 100 µg/mL
- Inductor: IPTG 0,05 mM

Cinética de crecimiento de bacterias *E. coli* BL21(DE3) clon pGEX-mNS1 con inducción



$$\mu = 0,7114 \text{ hr}^{-1}$$
$$td = 0,974 \text{ hr}$$

Perspectivas

- Obtener rendimientos favorables de la proteína recombinante mNS1 mediante la optimización de las condiciones de cultivo y expresión.

Otras actividades realizadas



```
Secondary Structure:
*
*
*
Query 1  NSPTLGYWKIKGLVQPTALLLEYLEEKYEEHLVERDEGDKWRNKKFELGLEFPHPYIDGDVVKLTQSHA 70
Helix 1  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 70
Sheet 1  EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE 70
Turns 1  T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T 70
Struc 1  EEEEEHHHEEEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEE 70
*
*
*
Query 71  IIRYIADKHHPLGGCPYERAEISHLGSAVDIRYGVSRAYSXDFETLVDFLSKLPFHLKPFQORLCHK 140
Helix 71  HHHHHHHHHH HHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 140
Sheet 71  EEEE EEEE EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE 140
Turns 71  T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T 140
Struc 71  EEEEEHTHHHEEECHHHHEHHHEEEEEEEEEEEHHHHHHHEHEHHHHHHHHHHHHHHHHHEEE 140
*
*
*
Query 141  TYLNGDHVTHPDFHLYDALDVLVYNDPYCLDAFPKLVCFKRIEAIPIQIDKYLKSSKVIANPLQWQATF 210
Helix 141  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 210
Sheet 141  EE EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE 210
Turns 141  T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T 210
Struc 141  EECCTCCCEHTHEHHHEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEHEHEHHTTHEEEEEEE 210
*
*
*
Query 211  GGGDHPKSDLVPRGSPFFGRLERPHRDDSGCVINMGRLEKCGGGGSGCVSUKNELKCGGGDNG 280
Helix 211  HHHHHHHH HHHHHHHH 280
Sheet 211  EEEE EEEE 280
Turns 211  TT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T 280
Struc 211  CTTCCCTTCGCCCTCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT 280
*
*
*
Query 281  CVINMKGKELKCGGGGSGCVSUSGRELKCGGGGRSHHHHH 323
Helix 281  HHHHHHHH 323
Sheet 281  EEEE 323
Turns 281  TT T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T 323
Struc 281  EEEEEHHHCCCTTC:EEEEEECTTCCCCCTCCCTCCCCC 323
```

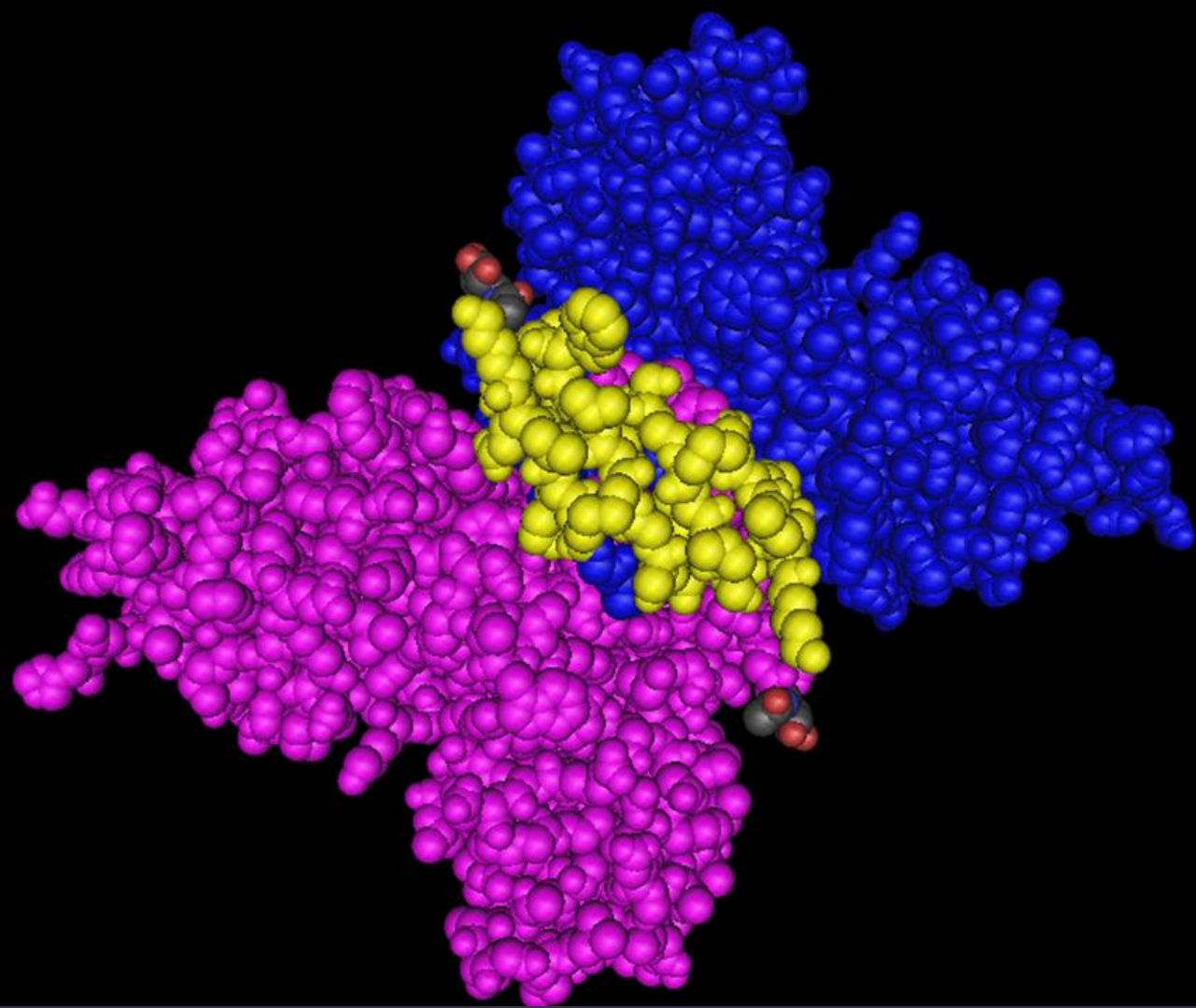
CSSFP: [Chou & Fasman Secondary Structure Prediction Server](#)



Agradecimientos

- CONACYT
- Dra. Adriana Valdez y equipo de trabajo IIB-UNAM
- IICS-UNA





NS1 DENV
Cn3D 4.3.1

Gracias