

# Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

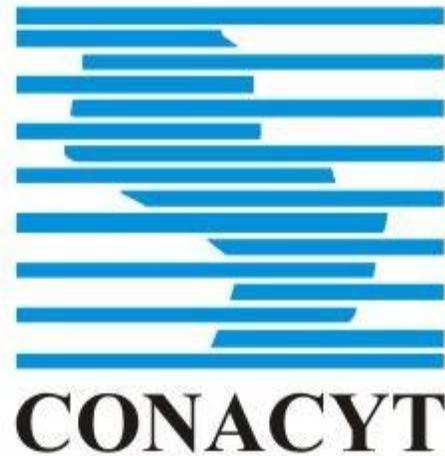
Universidad Nacional de Asunción

**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

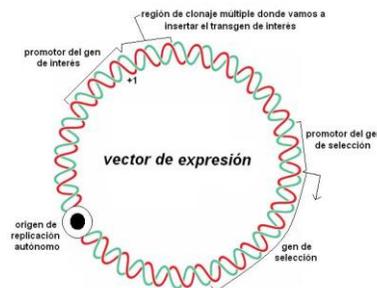


**Dra. Adriana Valdez**  
Departamento de Biología Molecular y  
Biotecnología

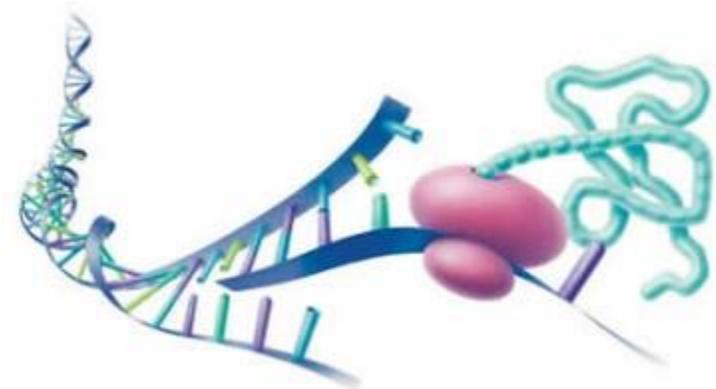


# Proteínas recombinantes

- 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<sup>a</sup>, Sathyamangalam Swaminathan<sup>a</sup>, Sirimali Fernando<sup>b</sup>, Asha M. Jana<sup>c</sup>, Navin Khanna<sup>a</sup> ·  · 

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

D Sblattero PhD<sup>1</sup>, I Berti MD<sup>1,2</sup>, C Trevisiol MD<sup>1</sup>, R Marzari PhD<sup>3</sup>, A Tommasini MD<sup>1</sup>, A Bradbury MD, PhD<sup>4</sup>, A Fasano MD<sup>2</sup>, A Ventura MD<sup>1</sup> and T Not MD<sup>1</sup>

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

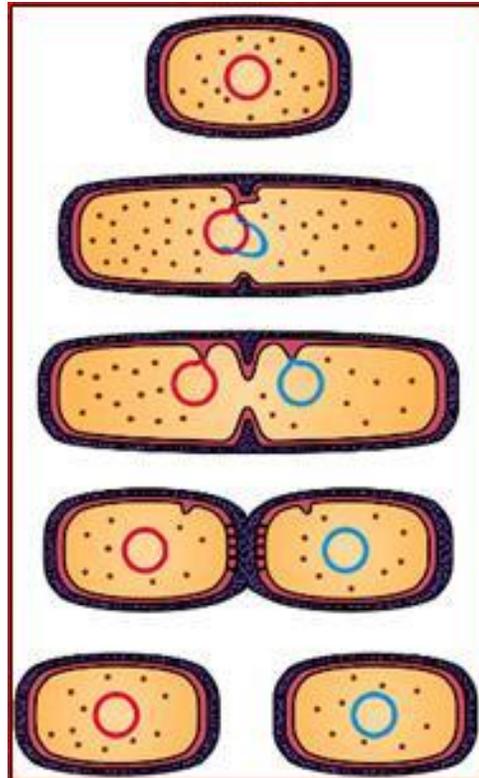
- Altos niveles de producción
- Buen desempeño en el proceso
- Modificada para facilitar la producción

## Cultivo bacteriano

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

# Crecimiento bacteriano

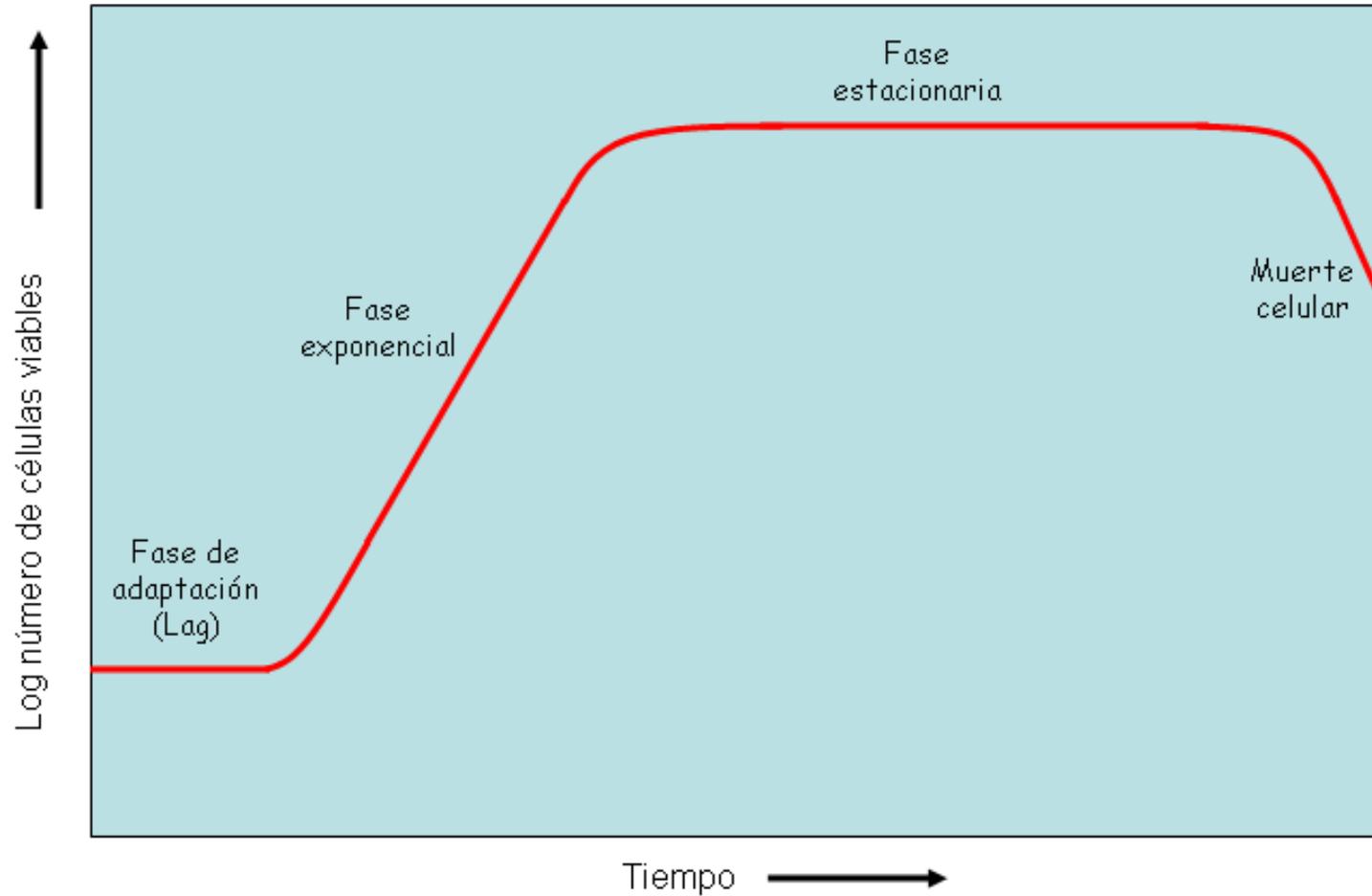
- Incremento en el número de células o aumento de la masa microbiana (biomasa).



# 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)

$\mu$ : 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  $\mu$  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	$\mu_m$ (hr <sup>-1</sup> )	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

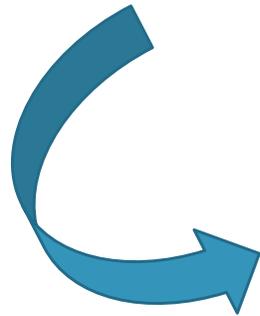
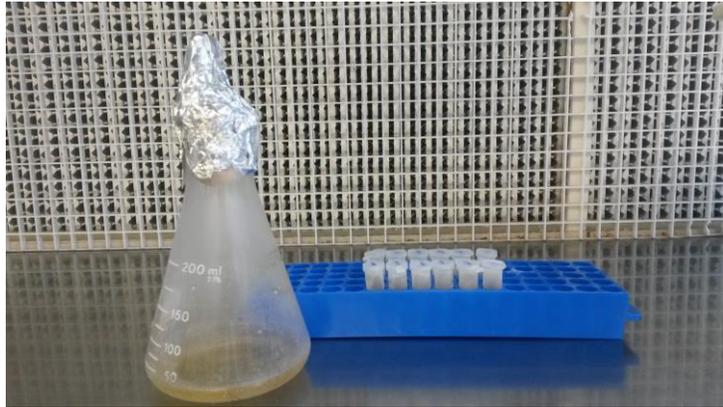
## Métodos directos

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

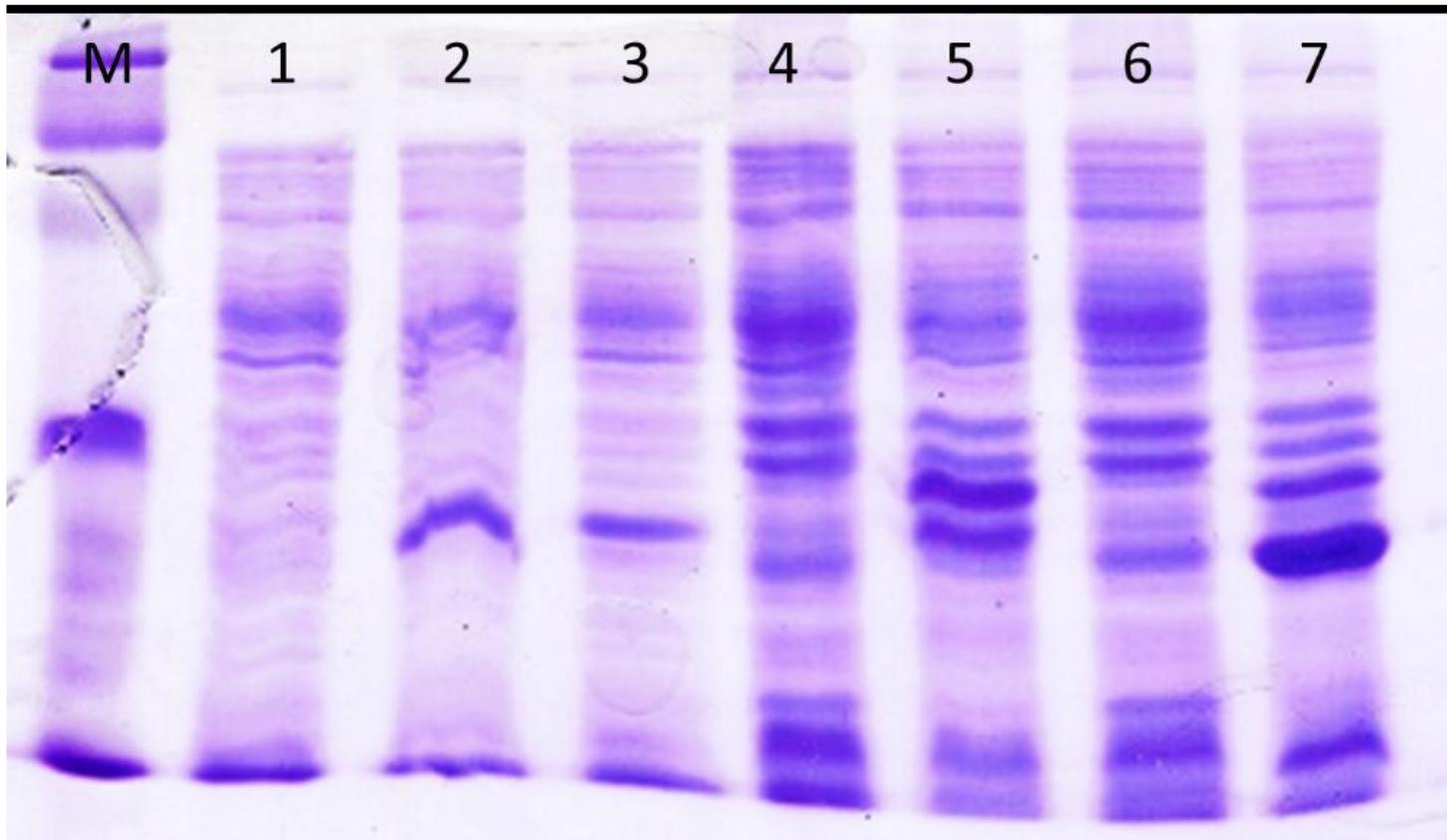
## Métodos indirectos

- Bradford

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



# *E. coli* BL21(DE3) clon pGEX-mNS1



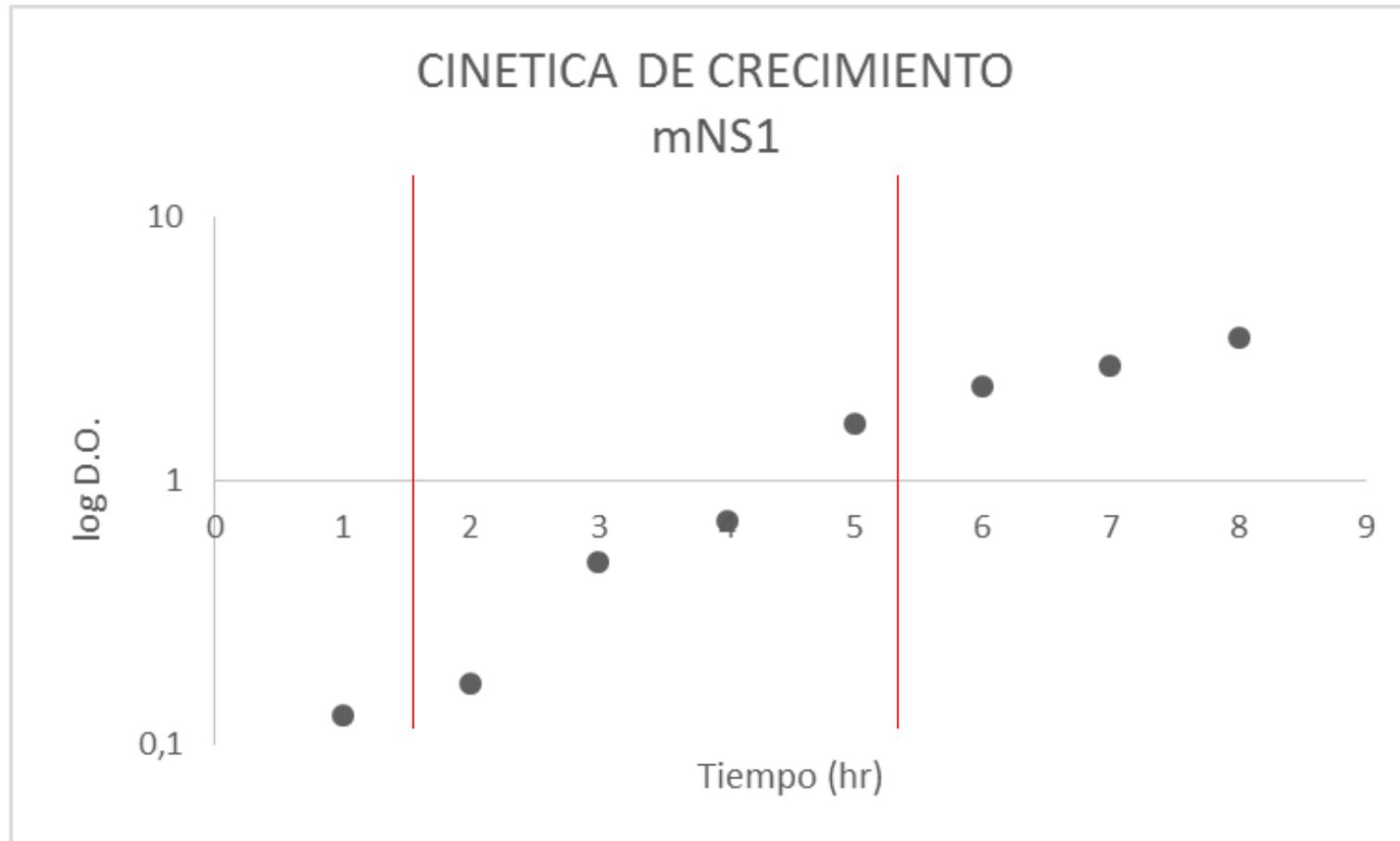
- M: Marcador de PM
- 1: Extracto D1 sin inducir
- 2: Extracto D1+IPTG
- 3: Extracto D5+IPTG
- 4: Pellet D1 sin inducir
- 5: Pellet D1+IPTG
- 6: Pellet D5 sin inducir
- 7: Pellet D5+IPTG

# 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

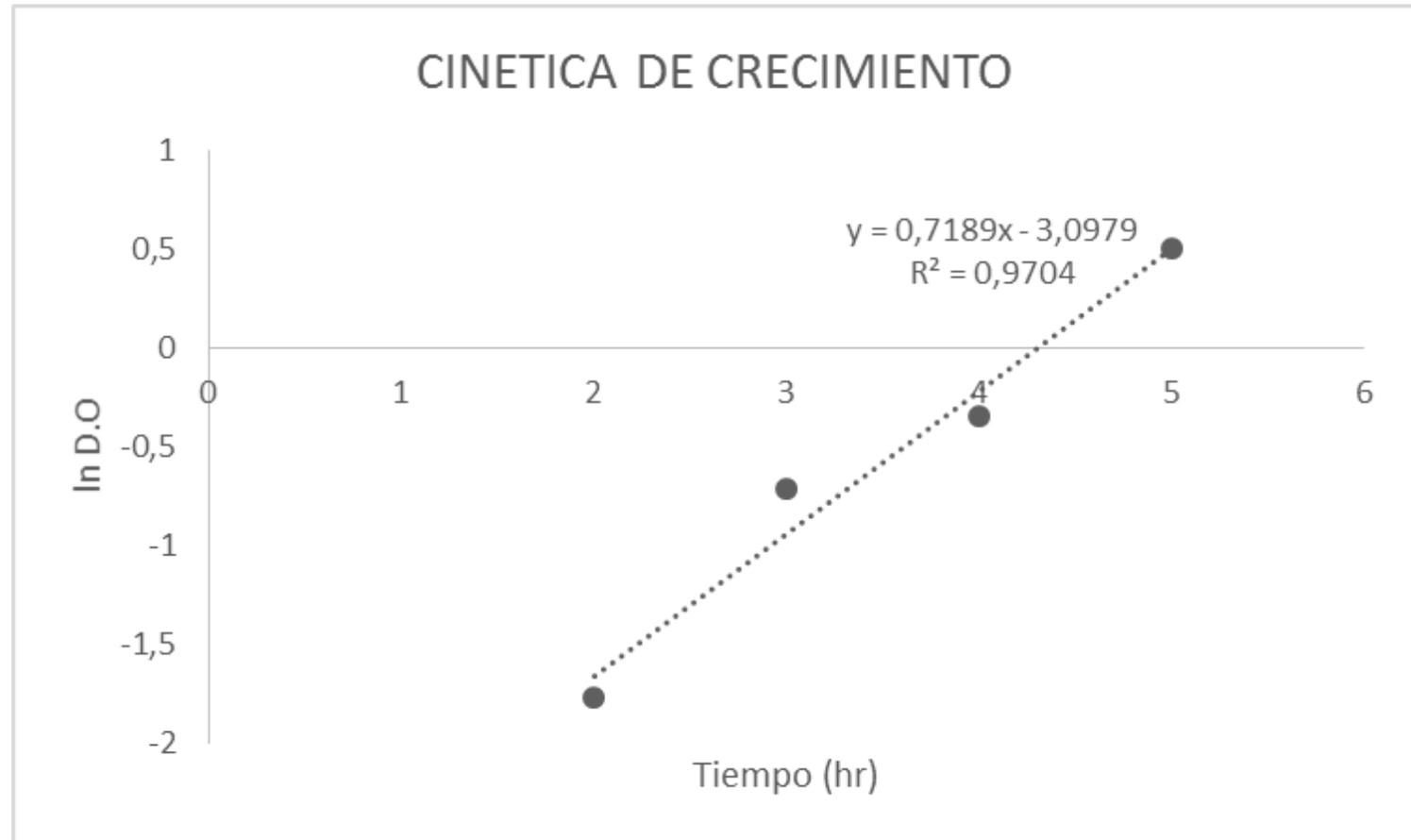
# Cinética de crecimiento de bacterias *E. coli* BL21(DE3) clon pGEX-mNS1



# 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

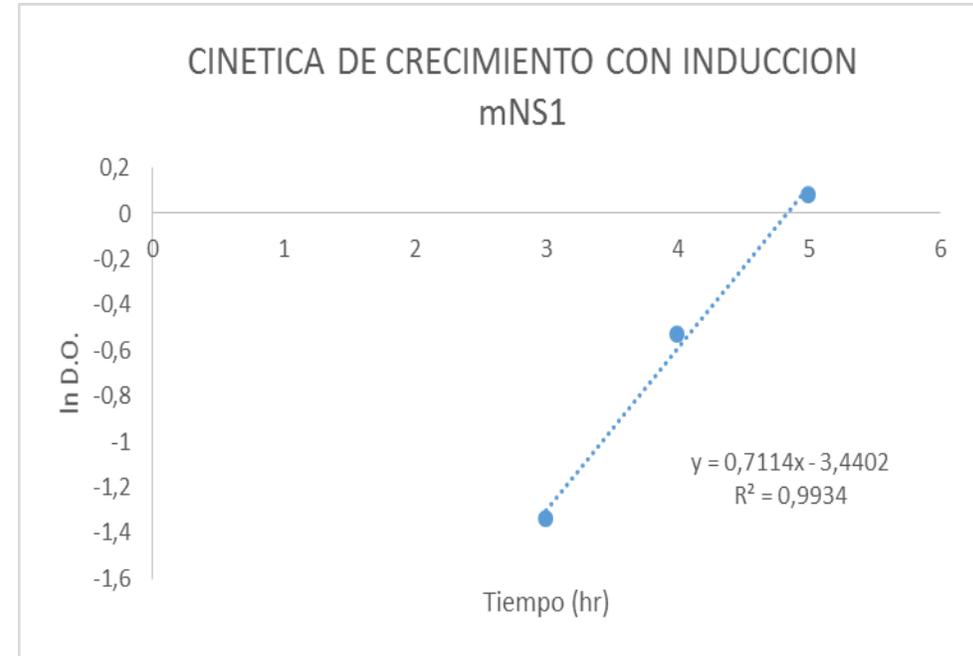
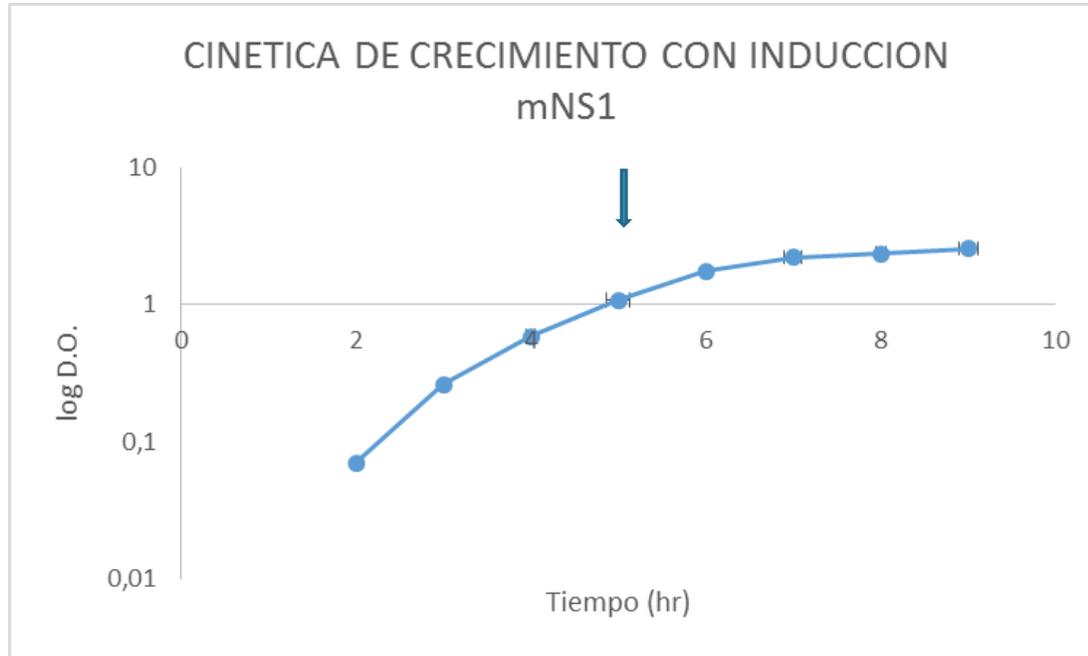
$\mu = 0,719 \text{ hr}^{-1}$   
 $t_d = 0,96 \text{ hr}$



# 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  IIRYIADKHHPLGGCPYERAEIHSLEGAVLDIRYGVSRAYSXDFETLVDFLSKLPFHLKPFEEORLCHK 140
Helix 71  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 140
Sheet 71  EEEE EEEE EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE 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  EEEEEHTHHHEEECHHHHEHHHEEEEEEEEEHHHHHHHEHEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEE 140

Query 141  TYLNGDHVTHPDFHLYDALDVLVYNDPYCLDAFPKLVCFKXRIEAIPIQIDKYLKSSKVIANPLQWQATF 210
Helix 141  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 210
Sheet 141  EE EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE 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  EECCTCCHEHTHEHHHEEEEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEHEHEHHTTHEEEEEHEEE 210

Query 211  GGGDHPKSDLVPRGSPFFGRLERPHRDDSGCVINMGRELKCGGGGSGCVSUKNELKCGGGDNG 280
Helix 211  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 280
Sheet 211  EEEE EEEE EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE 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  CVINMGKELKCGGGGSGCVSUSGRELKCGGGGRSHHHHH 323
Helix 281  HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH 323
Sheet 281  EEEE EEEE EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE 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  EEEEEHHHHCCCTTCHEEEEECCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCTCCCT 323
    
```

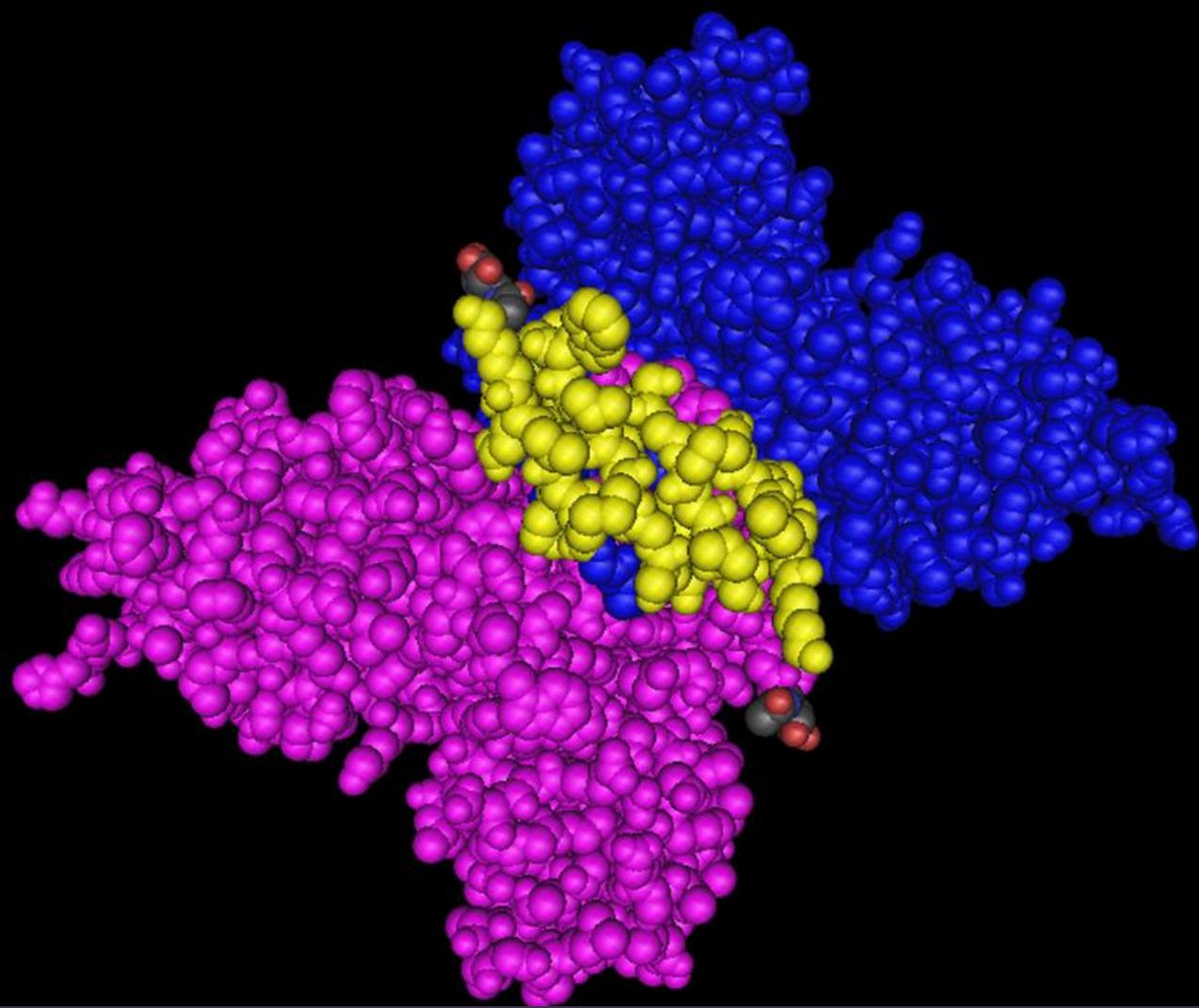
CSSFP: [Chou & Fasman Secondary Structure Prediction Server](#)



# Agradecimientos

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





NS1 DENV  
Cn3D 4.3.1

# Gracias