

**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**Sobreexpresión y purificación del producto
del gen *chrB* del plásmido pUM505 de
*Pseudomonas aeruginosa***

TESIS

Para obtener el título de: Químico-Farmacobiólogo

Presenta:

p.Q.F.B. René Martínez Valencia

Asesor:

DC. Carlos Cervantes Vega

Coasesora:

DC. Martha Isela Ramírez Díaz

junio 2008

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORIA DEL DC. CARLOS CERVANTES VEGA Y LA DC. MARTHA I SELA RAMÍREZ DÍAZ

RESUMEN

El plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* posee el gen *chrA* que codifica la proteína de membrana ChrA de 416 aminoácidos (aa) la cual confiere resistencia a cromato a través de un sistema de expulsión, mediado por el potencial de membrana. De igual manera, la resistencia a cromato en *Cupriavidus metallidurans* CH34 es codificada por el gen *chrA* del plásmido pMOL28. El operón *chr* de *C. metallidurans* además del gen *chrA* posee los genes *chrB*, *chrC*, *chrE* y *chrF* también involucrados en la resistencia a cromato. Se ha propuesto que el gen *chrB* de *C. metallidurans* codifica la proteína ChrB que funciona como un regulador transcripcional de la resistencia a cromato y cuya ausencia ocasiona un aumento en la acumulación e hipersensibilidad al ión. El plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* posee además al gen *chrA* un gen *chrB*, el cual codifica una proteína hipotética denominada ChrB de 296 aa. ChrB presenta 44% de aa idénticos con la proteína ChrB de *C. metallidurans*. La presencia de un homólogo al gen *chrB* de *C. metallidurans* en el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* sugiere que el gen *chrB* de pUM505 puede codificar una proteína reguladora involucrada en la resistencia a cromato en *P. aeruginosa*. El objetivo de este trabajo fue sobreexpresar y purificar a la proteína ChrB codificada en el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. Para lograr la purificación de la proteína ChrB, el gen *chrB* fue clonado en el vector de expresión pQE31 que añade una etiqueta de seis histidinas (6xHis) en el extremo amino de ChrB obteniendo la proteína recombinante ChrB-His y se transfirió a cepas de *Escherichia coli*. Se llevó a cabo la expresión de la proteína recombinante ChrB-His empleando diferentes concentraciones del inductor IPTG (isopropil β -D tiogalactopiranosido), variando el tiempo y la temperatura de inducción. La obtención de ChrB-His se realizó utilizando Triton X-100 al 1% y posteriormente se observó la proteína mediante el corrimiento electroforético en SDS-PAGE al 12%. La purificación de ChrB-His a partir de extractos celulares se llevó a cabo en una columna de afinidad con Ni-NTA. Durante la elaboración de este trabajo se encontraron las condiciones óptimas para sobreexpresar a la proteína recombinante ChrB-His empleando 1 mM de IPTG e incubando por 4 horas a 30°C después de la inducción. Se comprobó por Western blot que la banda mayoritaria de ~32 kDa observada corresponde a ChrB-His. Finalmente, se logró una purificación de aproximadamente 80% de la proteína recombinante ChrB-His.

ÍNDICE

A) RESUMEN.....	I
B) ÍNDICE.....	II
C) ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. El cromo.....	1
a) Generalidades del cromo.....	1
b) Transporte y acumulación del cromo.....	1
c) Mecanismos de toxicidad del cromo en bacterias.....	2
2. Mecanismos de resistencia a cromato en bacterias.....	2
a) Resistencia cromosómica.....	4
b) Resistencia plasmídica.....	4
3. Características de la proteína ChrA.....	4
4. Genes adicionales de resistencia a cromato.....	5
5. Análisis de proteínas.....	5
a) Expresión de proteínas recombinantes.....	6
b) Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	6
c) Inmunodetección de proteínas inmovilizadas (Western blot).....	7
6. Purificación de proteínas.....	8
a) Purificación de proteínas bajo condiciones desnaturalizantes.....	8
b) Purificación en columnas de afinidad.....	9
II. ANTECEDENTES.....	10
a) Clonación del gen <i>chrB</i> del plásmido pUM505 en un vector de expresión.....	10
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	14
a) Hipótesis.....	14
b) Objetivo general.....	14
c) Objetivos particulares.....	14

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
1. Medios de cultivo.....	15
2. Plásmidos.....	15
3. Cepas.....	15
4. Aislamiento de plásmidos.....	15
5. Electroforesis en geles de agarosa.....	17
6. Tratamientos enzimáticos de ácidos nucleicos.....	17
7. Inducción de la expresión de ChrB-His.....	17
8. Extracción de proteínas.....	18
9. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	18
a) Preparación del gel de poliacrilamida al 12 %.....	18
Gel separador.....	18
Gel concentrador.....	19
b) Preparación de las muestras.....	19
c) Corrimiento electroforético.....	10. 19
Tinción del gel.....	19
11. Ensayo de inmunodetección.....	19
a) Detección de la proteína recombinante ChrB-His por Western blot.....	20
12. Purificación de proteínas.....	20
V. RESULTADOS.....	21
1. Caracterización del plásmido recombinante pQE31- <i>chrB</i>	21
2. Sobreexpresión de la proteína ChrB-His.....	21
3. Detección de ChrB-His por western blot.....	27
4. Purificación de ChrB-His.....	27
VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	31
VII. PERSPECTIVAS.....	35
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transporte y toxicidad del cromato en la célula bacteriana.....	3
Figura 2. Secuencia de aminoácidos deducida del gen <i>chrB</i> del plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i>	11
Figura 3. Arreglo estructural de los genes de resistencia a cromato de los plásmidos pB4 de <i>Pseudomonas sp</i> , pUM505 de <i>P. aeruginosa</i> y pMOL28 de <i>C. metallidurans</i>	12
Figura 4. Clonación del gen <i>chrB</i> del plásmido pUM505 de <i>P. aeruginosa</i>	13
Figura 5. Esquema del plásmido recombinante pQE31- <i>chrB</i>	16
Figura 6. Caracterización del plásmido recombinante pQE31- <i>chrB</i> por medio de restricción enzimática.....	22
Figura 7. Alineamiento del DNA de pQE31- <i>chrB</i> con el gen <i>chrB</i> del plásmido pUM505.....	23
Figura 8. Inducción de la sobreexpresión de ChrB-His.....	25
Figura 9. Inducción de la sobreexpresión de ChrB-His.....	25
Figura 10. Inducción de la sobreexpresión de ChrB-His.....	26
Figura 11. Inmunodetección de ChrB-His por western blot.....	28
Figura 12. Purificación de la proteína recombinante ChrB-His.....	29
Figura 13. Purificación de la proteína recombinante ChrB-His con resina de cobalto.....	30

I. INTRODUCCIÓN

1. El cromo

a) Generalidades del cromo

El cromo (Cr) es un metal de transición el cual se encuentra agrupado dentro de los elementos químicos denominados metales pesados, término utilizado para referirse al grupo de metales y metaloides asociados con la toxicidad en los seres vivos, incluyéndose también en este grupo elementos esenciales para el funcionamiento de algunos organismos a bajas concentraciones (Alloway, 1990). El Cr se encuentra ubicado en el grupo VIB de la tabla periódica, tiene un número atómico de 24 y un peso atómico de 51.996 g/mol. Este elemento ocupa el séptimo lugar en orden de abundancia sobre la corteza terrestre y el vigésimo primero en rocas minerales (McGrath y Smith, 1990). En su forma de mineral el Cr es un metal gris y quebradizo que puede ser altamente pulido y resistir el ataque por oxidación.

Los estados de oxidación del Cr van desde -2 hasta +6, encontrándose en el ambiente como las formas más comunes la +3 y +6 (McGrath y Smith, 1990). La forma más estable es el estado trivalente Cr(III). Los derivados del Cr(III) (óxidos, hidróxidos y sulfatos) son poco solubles en agua a pH neutro, mientras que a pH de 5.5 ocurre la precipitación completa del compuesto (Losi y col., 1994). El Cr(III) se encuentra generalmente asociado a la materia orgánica, por lo que su movilidad es menor, en comparación con la del Cr(VI) (Bartlett, 1991). Por su parte, el Cr(VI) es considerado la forma más tóxica del Cr en bacterias, usualmente se encuentra asociado con el oxígeno formando iones de cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (McGrath y Smith, 1990). El Cr(VI) es un fuerte agente oxidante y en presencia de materia orgánica es reducido a Cr(III); este proceso de reducción se lleva a cabo con mayor rapidez en ambientes como los suelos ácidos (McGrath y Smith, 1990). Sin embargo, altas concentraciones de Cr(VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y así persistir como un contaminante (Vajpayee y col., 1999).

b) Transporte y acumulación del cromo

El Cr(VI) en forma de cromato es transportado activamente a través de las membranas biológicas tanto en procariontes (Dreyfuss, 1964) (**Figura 1**), como en eucariontes (Wiegand, 1985; Alexander y Aashet, 1995). Su permeabilidad radica en la similitud química que tiene con el sulfato, ya que ambos oxianiones son moléculas tetraédricas con radios atómicos y de

hidratación semejantes (Pardee y col., 1966). El cromato es transportado al interior de las células con tal facilidad que actúa como un inhibidor competitivo del transporte de sulfato en bacterias (Ohtake y col., 1987).

c) Mecanismos de toxicidad del cromo en bacterias

Los efectos tóxicos del Cr dependen de su estado de oxidación. En el exterior de la célula el Cr(III) es relativamente inócuo debido a la baja solubilidad de sus compuestos en medio acuoso (Pardee y col., 1966). Por otro lado, la toxicidad del Cr(VI) se relaciona con el proceso de reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III) (**Figura 1**) causando un daño importante al DNA, además del daño oxidativo generado a través de intermediarios reactivos (Voitkun y col., 1998). La reducción del Cr(VI) a Cr(III) ha sido reportada en varios sistemas biológicos y la formación transitoria de Cr(V) es el mecanismo probablemente implicado en la toxicidad del Cr (Kawanishi y col., 1986). Durante la reducción del Cr(VI) puede ocurrir la formación de radicales libres $\cdot\text{OH}$, O_2^- , y productos intermediarios como el Cr(V) (Kawanishi y col., 1986); este último puede reaccionar con el H_2O_2 dando origen al radical $\cdot\text{OH}$ que interactúa con el DNA (Shi y col., 1990). El Cr(III) también puede interactuar con el DNA (Nishio y Uyeky, 1985) o con las proteínas alterando su estructura y actividad (Levis y col., 1982) (**Figura 1**).

2. Mecanismos de resistencia a cromato en bacterias

Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005). Entre ellos se encuentran principalmente los que involucran: a) componentes celulares que capturan a los iones, neutralizando su toxicidad; b) enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides, convirtiéndolos en formas menos tóxicas; y c) transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Cervantes y col., 2006). La presencia de altas concentraciones de cromato en el ambiente ejerce un efecto inhibitorio sobre los microorganismos, promoviendo la selección de variantes resistentes al ión (Cervantes y Silver, 1992). Esta resistencia puede estar conferida en el cromosoma bacteriano o en plásmidos (Cervantes y col., 1990).

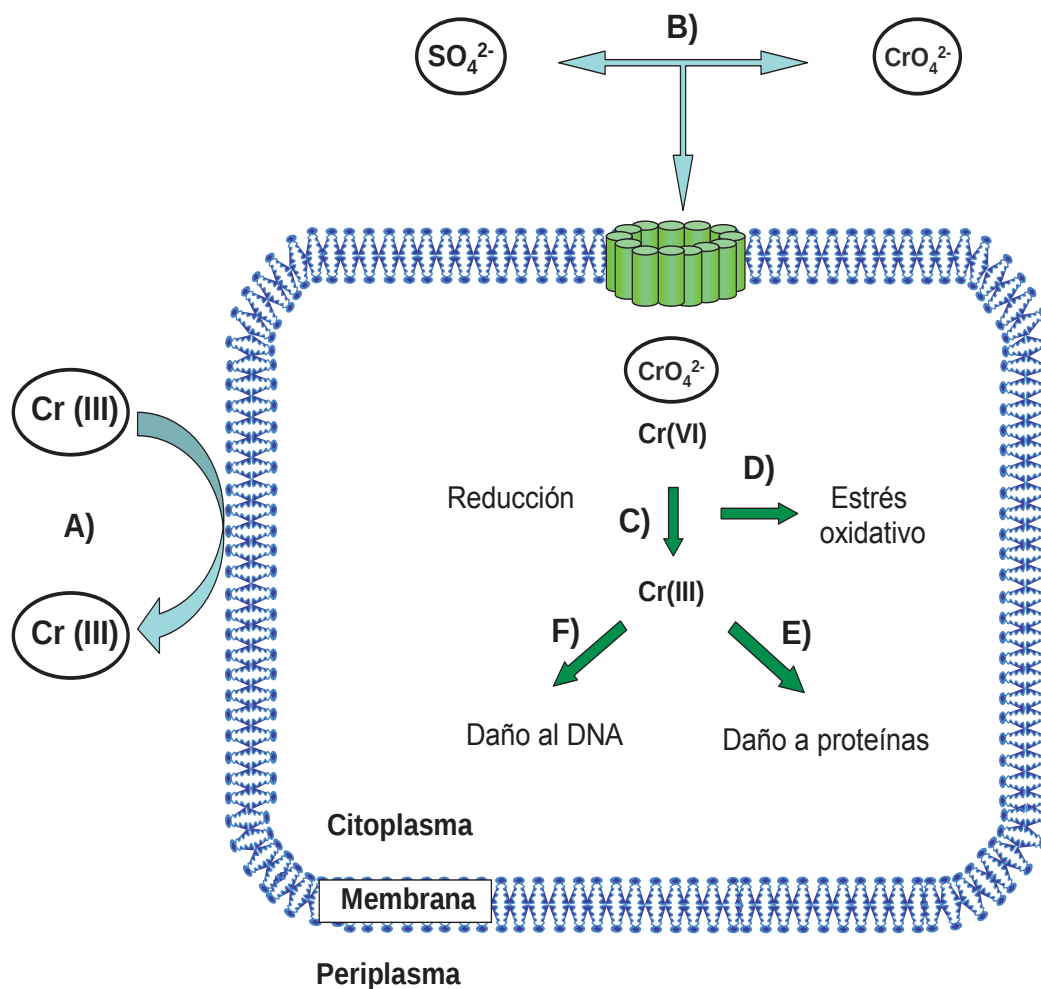


Figura 1. Mecanismos de transporte y toxicidad del cromato en la célula bacteriana. A) Las membranas biológicas son impermeables al Cr(III) por lo que éste resulta inócuo extracelularmente. B) El cromato (CrO_4^{2-}) ingresa a la célula a través del sistema de transporte del sulfato. C) Intracelularmente el Cr(VI) puede reducirse a Cr(III). D) En este proceso se puede generar estrés oxidativo [radicales libres y productos intermediarios como Cr(V)] (Kawanishi y col., 1986). E) El Cr(III) también puede interaccionar con las proteínas (Levis y col., 1982) o F) con el DNA (Nishio y col., 1985).

a) Resistencia cromosómica

La reducción del Cr(VI) a Cr(III) puede ser considerada como un mecanismo cromosómico alternativo (o secundario) de resistencia con bajos niveles de tolerancia a cromato en adición a la tolerancia codificada por plásmidos (Bopp y Ehrlich, 1988; Cervantes y Silver, 1996). La reducción puede ocurrir en el citoplasma, en la membrana o en el espacio periplasmico (Campos y col., 1995). La reducción periplasmica, transforma a nivel de la cubierta celular por acción de enzimas inespecíficas, el Cr(VI) a Cr(III) que es impermeable y por lo tanto no toxico (Cervantes y Vaca, 1991). Adicionalmente, se sabe que la resistencia a cromato puede ser consecuencia de mutaciones cromosómicas que afectan el transporte del sulfato disminuyendo su entrada y consecuentemente la entrada del ión cromato generando poblaciones resistentes a cromato (Marzluf, 1970).

b) Resistencia plasmídica

La resistencia conferida por plásmidos radica en la acumulación disminuida del ión tóxico cromato (Ohtake y col., 1987). De las cepas bacterianas resistentes a cromato estudiadas, sólo se han analizado a nivel molecular, los determinantes de resistencia presentes en los plásmidos pUM505 de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1990) y pMOL28 de *C. metallidurans* (antes *Alcaligenes eutrophus*) (Nies y col., 1990).

3. Características de la proteína ChrA

ChrA es una proteína de membrana de 416 aminoácidos (aa) codificada por el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* la cual confiere resistencia al ión tóxico cromato expulsándolo del citoplasma a través de un sistema dependiente de la energía generada por el potencial de membrana (Álvarez y col., 1999). ChrA es un miembro de los transportadores del ión cromato pertenecientes a la superfamilia CHR, compuesta de al menos varias docenas de miembros distribuidas en los tres dominios de la vida (Díaz-Pérez y col., 2007). En la actualidad se han identificado 135 secuencias de proteínas homologas a ChrA pertenecientes a la superfamilia CHR [77 secuencias de cadena larga o bidominio (LCHR) y 58 secuencias de cadena corta o monodominio (SCHR)] (Díaz-Pérez y col., 2007). La proteína ChrA de *C. metallidurans* (perteneciente a la subfamilia LCHR2) posee 10 segmentos transmembranales, con los dominios amino y carboxilo terminal orientados de manera similar con respecto al eje de la

membrana (Nies y col., 1998). Por otro lado, se encontró por medio de fusiones traduccionales con proteínas reporteras (fosfatasa alcalina y β -galactosidasa), que la proteína ChrA de *P. aeruginosa* (perteneciente a la subfamilia LCHR5) contiene 13 segmentos transmembranales conectados por 6 asas periplásmicas y 6 citoplásmicas, con su extremo amino localizado en el citoplasma y su extremo carboxilo terminal localizado en el periplasma (Jiménez-Mejía y col., 2006).

4. Genes adicionales de resistencia a cromato

El operón *chr* presente en el plásmido pMOL28 de *C. metallidurans* posee los genes *chrI*, *chrB*, *chrA*, *chrC*, *chrE* y *chrF* (Juhnke y col., 2002). En base a la similitud que poseen con proteínas predichas, se ha propuesto una función para cada uno de los genes. El gen *chrC* codifica un producto con similitud a superóxido dismutasas (SOD). La delección de *chrC* en *C. metallidurans* ocasiona la pérdida de 1/7 o 1/8 en la resistencia a cromato. Debido a que la proteína ChrC presentó actividad de SOD, se postuló que éste es un sistema adicional de detoxificación de cromato para la célula (Juhnke y col., 2002). El gen *chrE* codifica un producto que posee similitud con una rodanasa; *chrF*, se propuso forma parte de un grupo de genes que regulan el sistema de resistencia a cromato; y finalmente, para *chrI* no se ha identificado ninguna función (Juhnke y col., 2002). Se ha propuesto que el gen *chrB* de pMOL28 codifica una proteína predicha de 297 aa probablemente con función reguladora (Nies y col., 1990). Interesantemente, la construcción de un plásmido con los genes *chrA* y *chrC* en ausencia de *chrB* en *C. metallidurans* tuvo como consecuencia la acumulación de cromato y la hipersensibilidad al ión, lo que indica que el producto del gen *chrB* es necesario para la expresión de la resistencia a cromato (Nies y col., 1990). Recientemente se encontró que el plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* posee aledaño a *chrA* el gen *chrB*, el cual codifica una proteína predicha de 296 aa denominada ChrB. La proteína ChrB de pUM505 presentó un 44% de aa idénticos y un 72 % de aminoácidos similares cuando se hizo un alineamiento con la proteína ChrB de *C. metallidurans* (Díaz Magaña, 2006).

5. Análisis de proteínas

La electroforesis es la migración de moléculas cargadas en solución en respuesta a un campo eléctrico. El rango de migración depende de la fuerza del campo, de la carga neta, del tamaño y

la forma de las moléculas, así como de la fuerza iónica, la viscosidad y la temperatura del medio en el cual las moléculas se mueven. Como una herramienta analítica, la electroforesis es simple, rápida y altamente sensible; es usada analíticamente para estudiar las propiedades de especies cargadas y principalmente como una técnica de separación (Coney y col., 2003). Generalmente la muestra se corre en un soporte ó matriz como papel, acetato de celulosa, gel de almidón, geles de agarosa o poliacrilamida. Al final del corrimiento, la matriz puede almacenarse o usarse para ser escaneada o revelada. Además, los soportes matrices más usados, agarosa y poliacrilamida, proveen el medio de separar las moléculas por tamaño debido a que forman geles porosos. Un gel poroso actúa como una malla, retardando o, en algunos casos, obstruyendo completamente el movimiento de moléculas grandes mientras permite a las moléculas pequeñas migrar libremente (Coney y col., 2003).

a) Expresión de proteínas recombinantes

La expresión óptima de proteínas recombinantes en distintos sistemas de expresión incluyendo *Escherichia coli* se puede lograr cuando los vectores y las células receptoras son cuidadosamente elegidos y si se controlan adecuadamente las condiciones de crecimiento del cultivo y la inducción de la expresión se pueden tener resultados favorables y en este contexto, influir directamente en las estrategias empleadas para la purificación de proteínas. Las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se pueden producir en forma soluble. La formación de cuerpos de inclusión (agregados proteicos depositados en el citoplasma bacteriano), está influenciada por la naturaleza de la proteína, de la célula huésped, por el nivel de expresión resultante de la elección del vector, las condiciones de crecimiento y de inducción. Los cuerpos de inclusión invariablemente limitan la utilidad de los estándares de purificación de los procedimientos que dependen de la forma soluble de las proteínas nativas.

b) Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

La electroforesis analítica de proteínas es llevada a cabo en geles de poliacrilamida (PAGE) bajo condiciones que aseguran la disociación de las proteínas en sus subunidades polipeptídicas individuales y que minimice la agregación. Comúnmente, el detergente fuertemente aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) es usado en combinación con un agente reductor y calor para disociar las proteínas antes de cargarlas en el gel. El polipéptido desnaturizado se une al SDS

y adquiere carga negativa. Debido a que la cantidad de SDS unido es casi siempre proporcional al peso molecular del polipéptido y es independiente de su secuencia, los complejos SDS-polipéptido migran a través de geles de poliacrilamida de acuerdo con el tamaño del polipéptido. En saturación, aproximadamente 1.4 g de detergente es unido por gramo de polipéptido. Usando marcadores de peso molecular conocido, es por lo tanto posible estimar el peso molecular de cadenas polipeptídicas separadas en SDS-PAGE (Sambrook y col., 1989).

Los geles de poliacrilamida se forman por la copolimerización de acrilamida y bisacrilamida (N,N'-metilen-bisacrilamida) iniciada por un sistema generador de radicales libres como persulfato de amonio y TEMED (tetrametiletilendiamina): el TEMED acelera la formación de radicales libres del persulfato y cataliza de esta forma la polimerización (Sambrook y col., 1989). El rango efectivo de separación de geles de SDS-PAGE depende de la concentración de poliacrilamida usada para preparar el gel y de la cantidad de enlaces cruzados. Los enlaces cruzados por la bisacrilamida dan rigidez y tensión al gel, formando los poros a través de los cuales los complejos SDS-polipéptido deben pasar (Sambrook y col., 1989). Las propiedades de un gel como tamiz son determinadas por el tamaño de sus poros, lo cual está en función de las concentraciones absolutas de acrilamida y bisacrilamida usadas para preparar el gel (Sambrook y col., 1989). Los polipéptidos separados por SDS-PAGE pueden ser finalmente teñidos con colorantes como el azul brillante de Coomassie R250 (Sambrook y col., 1989).

c) Inmunodetección de proteínas inmovilizadas (Western blot)

La técnica Western blot, inmunoblot o inmunoelectroblot es un método en el que pueden ser caracterizadas simultáneamente las propiedades electroforéticas y antigénicas de una proteína. Es usado para detectar, en una mezcla de proteínas o fragmentos de proteínas, aquellas que reaccionan con un anticuerpo específico (Mathews y van Holde, 1983; Gerhardt y col., 1994). La técnica puede ser aplicada en el estudio de cualquier proteína que retiene su estructura antigénica funcional después de su corrimiento en SDS-PAGE (Gerhardt y col., 1994).

El paso inicial es la separación de la mezcla mediante SDS-PAGE, en base a su tamaño. Después de la electroforesis, el gel es puesto en contacto con un soporte sólido, generalmente una membrana de nitrocelulosa, y las proteínas son transferidas (blotted) a la membrana por una corriente eléctrica. Las proteínas se unen irreversiblemente a la membrana y puede ser visualizada la reacción antígeno-anticuerpo después del tratamiento de la membrana con el

anticuerpo específico (Mathews y van Holde, 1983; Gerhardt y col., 1994). La visualización requiere el uso de un segundo anticuerpo el cual puede ser radiomarcado con yodo ¹²⁵ y detectado por autorradiografía, o bien, unido covalentemente a una enzima, como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano que, en presencia de su sustrato, dan origen a un compuesto colorido. Cantidades tan pequeñas como 1 a 5 ng de una proteína de tamaño promedio pueden ser detectadas por un Western blot (Mathews y van Holde, 1983; Sambrook y col., 1989; Gerhardt y col., 1994).

6. Purificación de proteínas

Los sistemas que emplean proteínas de fusión son una alternativa para expresar proteínas recombinantes con alto rendimiento, siendo apropiados además por poseer esquemas de purificación simples. En estos sistemas, la purificación, detección y seguimiento en el proceso productivo son relativamente sencillos debido a la expresión de péptidos, polipéptidos o proteínas fusionados a la proteína recombinante de interés en el extremo amino o carboxilo terminal. Además, el uso de estos sistemas disminuye o evita la formación de cuerpos de inclusión, mejora el plegamiento molecular y limita la degradación proteolítica. Respecto a la recuperación y purificación del producto final, el mismo varía de acuerdo al sistema empleado, dependiendo de que la proteína recombinante sea secretada, intracelular, soluble o se encuentre en cuerpos de inclusión. En el caso particular del sistema pQE31 (QIAGEN), donde el producto recombinante es expresado como proteína de fusión con una etiqueta de seis histidinas (6xHis), la purificación es efectuada por cromatografía de afinidad con una resina de níquel-nitriloacético-agarosa (Ni-NTA). La especificidad del sistema y las condiciones poco desnaturizantes en la que se produce la elusión, pueden arrojar un producto aplicable.

a) Purificación de proteínas bajo condiciones desnaturizantes

Los altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en una variedad de sistemas de expresión pueden llevar a la formación de agregados insolubles. Algunos desnaturizantes fuertes como el hidroxiclورو de guanidina (GuHCl) 6 M ó urea 8 M, pueden solubilizar completamente los cuerpos de inclusión y las proteínas con etiquetas 6xHis. Pueden utilizarse otros desnaturizantes o detergentes, pero la elección de estos reactivos y las concentraciones específicas necesarias deben establecerse de manera empírica. En virtud de las condiciones de

desnaturalización, las etiquetas de 6xHis en una proteína estarán totalmente expuestas a fin de mejorar la unión a la matriz de Ni-NTA y la eficiencia del procedimiento de purificación será maximizada por el potencial de reducción de las uniones inespecíficas. Las proteínas con etiquetas 6xHis purificadas bajo condiciones de desnaturalización se pueden utilizar directamente o pueden ser renaturalizadas y replegadas. La renaturalización y el replegado de proteínas puede llevarse a cabo en una columna de Ni-NTA antes del proceso de elución (Holzinger y col., 1996).

b) Purificación en columnas de afinidad

Las proteínas que poseen 6xHis pueden ser purificadas por medio de cromatografía en columna con resinas de Ni-NTA. Se utilizan columnas de vidrio o plástico con una fase estacionaria constituida por un sólido poroso y una fase móvil formada por la solución en la cual se encuentra resuspendida la proteína que lentamente va atravesando la fase estacionaria. La fase estacionaria constituida de Ni-NTA se compone de un átomo de níquel unido a un complejo de ácido nitriloacético-agarosa. El complejo ocupa cuatro de los seis sitios de unión en la esfera de coordinación del ión de níquel, dejando dos lugares libres para interactuar con la etiqueta 6xHis unida a la proteína recombinante. De esta manera, las proteínas recombinantes con 6xHis se quedan unidas a la resina Ni-NTA, mientras que el resto de las proteínas fluyen a través de la resina sin interaccionar. Posteriormente las proteínas recombinantes se eluyen de la columna al adicionar un buffer con altas concentraciones de imidazol, el cual compite con las histidinas de las proteínas por unirse al níquel de la resina, desplazando las proteínas con 6xHis, las cuales se recuperan en el eluido.

II. ANTECEDENTES

La resistencia a cromato conferida por el plásmido pMOL28 de *C. metallidurans* CH34 se sugiere está dada por la expulsión de cromato a través de la proteína ChrA. El determinante *chr* de pMOL28 posee los genes *chrB*, *chrA* y *chrC* (Nies y col., 1990). Adicionalmente, con el mismo arreglo estructural que el determinante *chr* de *C. metallidurans*, dentro del transposón Tn5719 el plásmido pB4 de *Pseudomonas sp.* posee los genes *chrB*, *chrA* y *chrC*. Sin embargo, estos genes no han sido caracterizados a nivel molecular (Tauch y col., 2003).

El plásmido pUM505 posee el gen *chrA* que confiere resistencia a cromato en *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1990). Mediante la secuenciación por PCR inverso de las regiones aledañas al gen *chrA* del plásmido pUM505, Díaz Magaña (2006), identificó un gen homólogo a *chrB* de *C. metallidurans*, esta secuencia nombrada *chrB* codifica una proteína predicha de 296 aa (**Figura 2**). Sin embargo, el papel del gen *chrB* en la regulación y/o resistencia a cromato se desconoce (Díaz Magaña, 2006). Un análisis de comparación de secuencias de aminoácidos mostró que la proteína predicha ChrB de pUM505 de *P. aeruginosa* posee un 44% y 88% de identidad con las ChrB homólogas de los plásmidos pMOL28 de *C. metallidurans* y pB4 de *Pseudomonas sp.*, respectivamente (**Figura 3**). Dado que se propone que la proteína ChrB de pMOL28 está implicada en la regulación de la resistencia a cromato, la presencia de un gen homólogo en el plásmido pUM505 sugiere que dicho gen puede codificar también una proteína implicada en la regulación de la resistencia a cromato conferida por el gen *chrA* de pUM505.

a) Clonación del gen *chrB* del plásmido pUM505 en un vector de expresión.

En un trabajo previo el gen *chrB* se clonó en el vector pGEMT y posteriormente se subclonó en el vector de expresión pQE31 (**Figura 4**). Los plásmidos recombinantes fueron transferidos a células competentes de *E. coli* JM101. Una de las transformantes obtenidas se empleó en este trabajo para determinar las condiciones de sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante ChrB-His.

-35
-10
RBS

tttttgacgaaggagcccgtgcttgagcttttcttgccctattcgtcagcctgcccaccaaggcatc
 gaccggccgc

248 atgcgcgtctggcgttctgtcaaagcgcagggctgcgcaacgctg
 M R V W R S V K A Q G C A T L
 293 cgcgacggggctctatctgctgcccgactcggcggacagtgcggcg
 R D G V Y L L P D S A D S A A
 338 acgctggggcgaagtggcggcgcaggcgggtggaagtcgggggcagc
 T L G E V A A Q A V E V G G S
 383 ggccaggtctatcgactgtcgggggtgtgacgaagctcagaaggcc
 G Q V Y R L S G C D E A Q K A
 428 gcgctacgcgccctgttcgaccggggcgaggagtacgccagcatc
 A L R A L F D R G E E Y A S I
 473 gccgaggagatcaaagcgcctcggggcgtaacctggcatccccggac
 A E E I K A L G R N L A S P D
 518 ggcgccgatgccatgcgcaagctccagccgctcgtgcgccgcttc
 G A D A M R K L Q P L V R R F
 563 gagcaggtgaaccgcacatcgacttcttccccggcgaggcgcagcgg
 E Q V N R I D F F P G E A Q R
 608 cagaccttgagcctgctggacgacctgcgcgacgcgatcaccgcg
 Q T L S L L D D L R D A I T R
 653 cgtatgtctccccgacgagccgaccgcccggcagacggatattccg
 R M S P D E P T A R Q T D I P
 698 cggctgaaccgcgcccactatcagggctcggacctgggccacgcgg
 R L N R A D Y Q G R T W A T R
 743 gcgcgcccgtgggtggaccgactcgccttcggcctggctgatccgg
 A R P W V D R L A S A W L I R
 788 cggttcatcgacccgagcgcgcgcacatcgtctggctggcgagtccc
 R F I D P S A R I V W L A S P
 833 tccgactgccgcaatggctggctcggcttcgatttcgacggcgcc
 S D C R N G W L G F D F D G A
 878 gccttcagtcattgtgggcaccaaggtcaccttcgagacgctgctg
 A F S H V G T K V T F E T L L
 923 gcgagtttcggacttgattccgcccctgcactggtacgcctgggc
 A S F G L D S A P A L V R L G
 968 aagctcgtgcattgcctggatttgggcgggctgccggtagcagaa
 K L V H C L D L G G L P V A E
 1013 gcgctgggcatcgaatcgctgctcgccggcttgccgcgcatcggaa
 A L G I E S L L A G L R A S E
 1058 cccgatgacgacgcgctgcttgcccgcgcgtgcgaaatttttgat
 P D D D A L L A R A C E I F D
 1103 tggctattgaagagttacgaggacaaaacaacgtga 1138
 W L L K S Y E D K T T * **296 aa**

acgccccgaccagtctcagaccgcgcgcaaccacgcccggcccgtccgtctttctgggacatca
 cccaagacgacctgc

Figura 2. Secuencia de aminoácidos deducida del gen *chrB* del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. Se muestra una posible región promotora (-10 y -35), y un posible sitio de unión a ribosomas (RBS). Subrayados se indican el codón de inicio (atg) y el codón de paro (*) (Díaz Magaña, 2006).

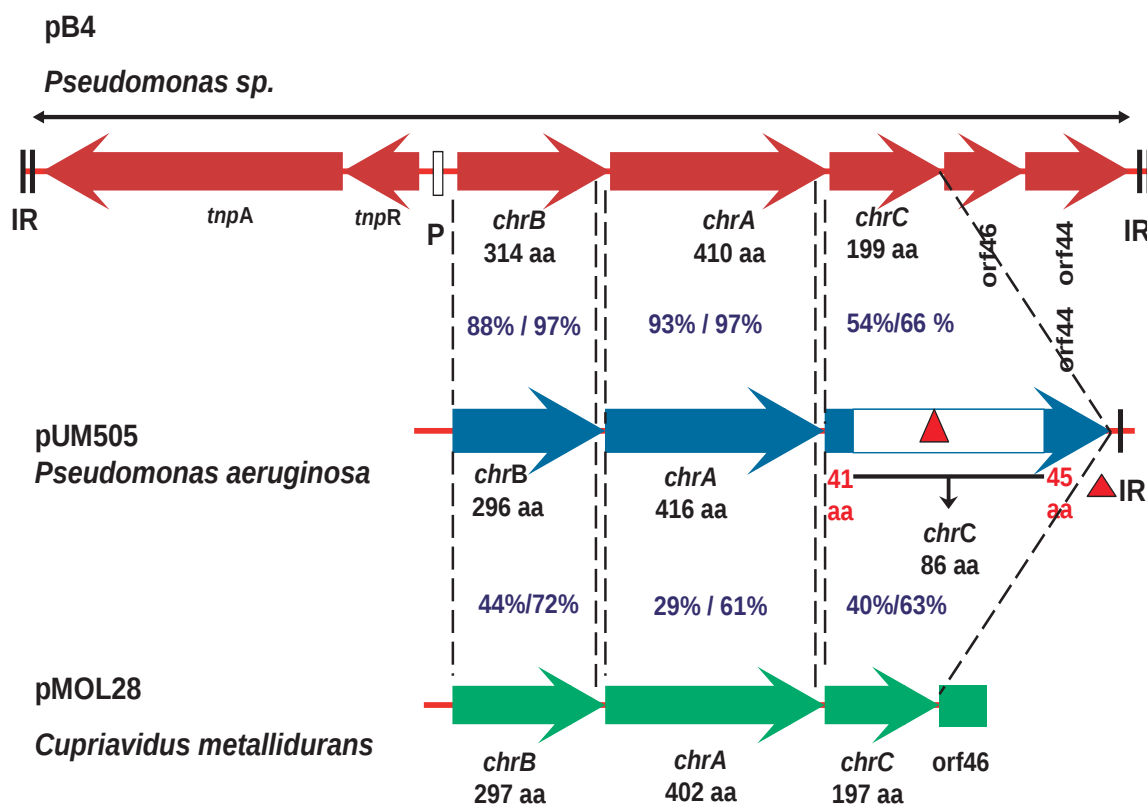


Figura 3. Arreglo estructural de los genes de resistencia a cromato de los plásmidos pB4 de *Pseudomonas sp.*, pUM505 de *P. aeruginosa* y pMOL28 de *C. metallidurans*. Las regiones que codifican son mostradas por las flechas que indican la dirección de la transcripción. Con líneas verticales punteadas se muestran los productos de los genes que se compararon en base a la secuencia de aminoácidos realizando el alineamiento por el método de ClustalW. Se indican el porcentaje de identidad y de similitud de cada uno. La secuencia predicha del promotor (P) del gene *chrB* de pB4 es señalada por un rectángulo. Las secuencias invertidas (IR) se indican con barras verticales de color negro. La deleción de un gen es mostrada con un triángulo (Δ) (Díaz Magaña, 2006).

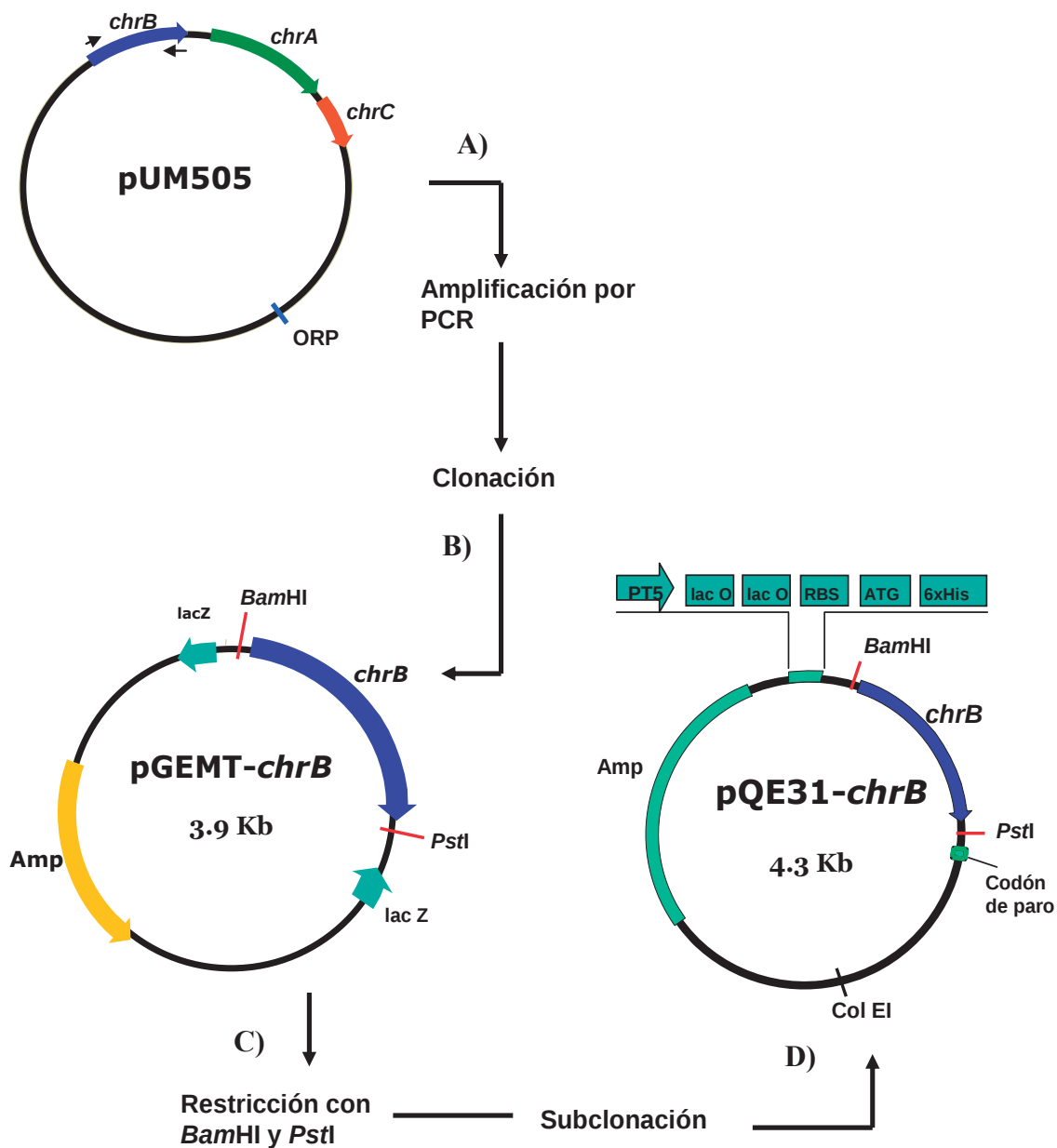


Figura 4. Clonación del gen *chrB* del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. A) Amplificación por PCR del gen *chrB*. B) Clonación del gen *chrB* en el vector pGEMT originando el plásmido recombinante pGEMT-*chrB*. C) Restricción del gen *chrB* del plásmido pGEMT con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I. D) Subclonación del gen *chrB* en el vector de sobreexpresión pQE31 originando el plásmido recombinante pQE31-*chrB*.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

a) HIPÓTESIS

El gen *chrB* del plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa* codifica una proteína de 296 aa.

b) OBJETIVO GENERAL

Realizar la sobreexpresión y purificación del producto del gen *chrB* del plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa*.

c) OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar las condiciones óptimas para sobreexpresar la proteína recombinante ChrB-His del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*.
2. Determinar el tamaño de la proteína ChrB-His
3. Purificar la proteína ChrB-His del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios de cultivo

- a) Caldo Luria (CL): Para un litro de agua destilada adicionar, NaCl al 10%, peptona de caseína al 10% y extracto de levadura al 5%.
- b) Agar Luria (AL): Al caldo Luria previamente preparado se agregó agar bacteriológico a una concentración de 1.5%.

2. Plásmidos

Se utilizó el plásmido pQE31-*chrB* (Ramírez-Díaz, 2006) el cual posee el gen *chrB* del plásmido pUM505 clonado en el vector de sobreexpresión de proteínas pQE31 (Qiagen). El plásmido pQE31-*chrB* posee un gen de resistencia a ampicilina y codifica la proteína ChrB fusionada a una etiqueta de seis histidinas (**Figura 5**).

3. Cepas

Para los ensayos de inducción se utilizó la cepa de *Escherichia coli* BL21 pLysS (Studier, 1991), transformada con el plásmido recombinante pQE31-*chrB*. Como control se utilizó la cepa de BL21 pLysS sin el plásmido.

4. Aislamiento de plásmidos

El DNA de plásmidos se obtuvo utilizando el método de lisis alcalina (adaptado de Birnboim y Doly, 1979 e Ish-Horowics y Burke, 1981), de acuerdo al siguiente protocolo: Se creció un cultivo bacteriano en CL durante 18 h a 37°C con agitación constante de 220 rpm, se distribuyó en tubos eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó durante 2 min a 13000 rpm, se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución STE (sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.0 y EDTA 10 mM, pH 8.0) se le adicionaron 20 µl de lisozima (20 mg/ml), se mezcló ligeramente y se incubó a 37°C durante 5 min. Posteriormente a la suspensión se le agregó 200 µl de una solución recién preparada de NaOH 0.2 N y SDS (dodecil sulfato de sodio) 1%, se agitó suavemente y se incubó durante 10 min en hielo. Se le adicionó 150 µl de

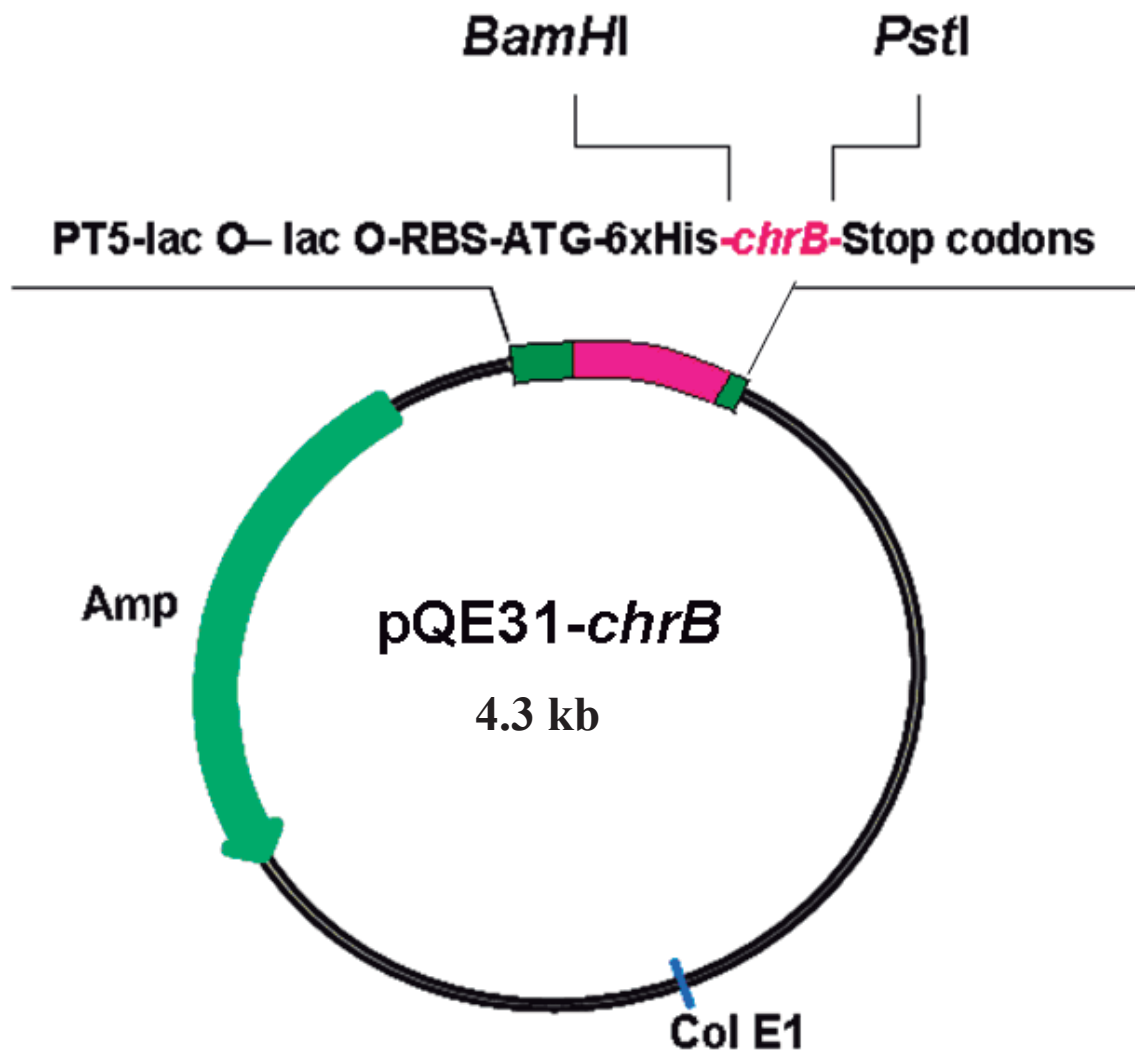


Figura 5. Esquema del plásmido recombinante pQE31-*chrB*. El plásmido pQE31 contiene un gen de resistencia a ampicilina (Amp), un origen de replicación para *E. coli* (Col E1), un promotor (PT5), un sitio de unión a ribosomas (RBS), un codón de inicio (ATG), una secuencia que codifica una etiqueta de 6 histidinas (6xHis) y un codón de paro. Adicionalmente presenta el gen *chrB* clonado en los sitios *Bam*HI y *Pst*I (Ramírez-Díaz, 2006).

una solución de acetato de potasio 3 M, pH 4.8 (acetato de potasio 3 M y ácido acético glacial), se mezcló ligeramente y se incubó 10 min en hielo. Se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm y posteriormente con un palillo estéril se retiraron los restos celulares. Al sobrenadante se le adicionaron 500 µl de una mezcla (24:24:1) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcló moderadamente, procediendo a centrifugar 10 min a 13000 rpm, recuperándose la fase acuosa superior a la que se adicionó 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó durante 1h a -20°C . Se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm, el sedimento se lavó 3 veces con 1 ml de etanol al 70% y al final se le adicionó 1 ml de etanol absoluto. Se secó la pastilla a 65°C y se resuspendió en 50 µl de H₂O grado HPLC estéril. Las muestras se almacenaron a -20°C o fueron sometidas a corrimiento electroforético en geles de agarosa.

5. Electroforesis en geles de agarosa

Para llevar a cabo el corrimiento electroforético del DNA plasmídico, se preparó un gel de agarosa (Sigma) a una concentración de 1% en amortiguador TAE (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M), el gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal, la cual contenía el mismo amortiguador. Se mezclaron 5µl del DNA plasmídico con 2µl de una solución colorante [azul de bromofenol al 0.05%; EDTA 0.1 M, pH 8.0; SDS 0.5%; sacarosa 40%], y se sometió a corrimiento con un voltaje constante de 125 voltios durante ~35 min, empleando una fuente de poder E-C Apparatus Corporation modelo EC452. Como marcador de peso molecular del DNA lineal se utilizó el DNA del fago lambda digerido con la enzima endonucleasa *HindIII* (Sigma).

6. Tratamientos enzimáticos de ácidos nucleicos

Para corroborar las construcciones se llevaron a cabo restricciones con endonucleasas. El DNA previamente purificado fue digerido utilizando una unidad de las endonucleasas por 1 µg de DNA, incubando a 37°C por un mínimo de 2 h. El producto de la restricción se analizó a través de un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1%.

7. Inducción de la expresión de ChrB-His

A partir de cultivos crecidos durante 18 h a 37°C con agitación constante de 220 rpm, se inocularon con una dilución 1:50 del cultivo, matraces con 150 ml de CL adicionando ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml de medio. Los cultivos con las cepas BL21

pLysS y BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) se incubaron a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 590 nm. Se dividió el cultivo en fracciones de 30 ml. A cada fracción se le dio un tratamiento diferente: 1) BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) no inducido, 2) adicionando 0.2 mM de IPTG [(isopropil β-D-tiogalactopiranosido) (USB)], 3) 0.5 mM de IPTG, 4) 1.0 mM de IPTG, 5) 2.0 mM de IPTG y 6) BL21 pLysS no inducido. La incubación se realizó por 4 o 12 h a 30 o 37°C.

8. Extracción de proteínas

Los cultivos obtenidos de los ensayos de inducción fueron procesados de la siguiente manera: se centrifugó a 7000 rpm, durante 10 min a 4°C para obtener las pastillas celulares y se desechó el sobrenadante. Se resuspendieron las pastillas en buffer A (NaCl 300 mM, imidazol 10 mM y Tris-HCl 50 mM, pH 8.0) frío al 10% y se centrifugaron nuevamente. Se decantó el sobrenadante y nuevamente se resuspendieron las pastillas celulares en buffer A al 10%, se agregó a la suspensión triton X-100 a concentración final de 1% y se incubó 30 min en hielo. Posteriormente las pastillas tratadas se centrifugaron a 7000 rpm, por 10 min a 4°C y se separaron en las fracciones nombradas en adelante como fracciones soluble (correspondiente al sobrenadante obtenido de la centrifugación) y fracción membranal (correspondiente a la pastilla celular obtenida de la centrifugación). Ambas fracciones celulares obtenidas en este proceso se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12%.

9. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El corrimiento electroforético de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y se utilizó una cámara de corrimiento electroforético Thermo EC Ec120 Mini vertical gel system.

a) Preparación del gel de poliacrilamida al 12%

GEL SEPARADOR

Acrilamida/bisacrilamida 30%	3 ml	H ₂ O desionizada	2.4 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.95 ml	Persulfato de amonio 30%	75 μl
SDS 10%	75 μl	TEMED	3 μl

GEL CONCENTRADOR

Acrilamida 30%	330 μ l
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	250 μ l
SDS 10%	20 μ l
H ₂ O desionizada	1.4ml
Persulfato de amonio 30%	20 μ l
TEMED	3 μ l

b) Preparación de las muestras

Se cargaron en el gel 10 μ l de cada una de las fracciones solubles, así como 5 μ l de cada una de las fracciones membranales aplicando a cada muestra 4 μ l de buffer de carga (Ditiotreitol; 0.01g, azul de bromofenol; 50 μ l, β -mercaptoetanol; 50 μ l, SDS, 0.2g, glicerol; 100 μ l, Tris-HCl 0.5 M pH 6.0 125 μ l, H₂O desionizada cbp 1 ml).

c) Corrimiento eletroforético

El corrimiento electroforético de las proteínas se realizó por un periodo de ~2 h a 90 V. Se utilizó el amortiguador de corrida Tris –glicina 10X (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1 %, y H₂O cbp 1L) diluido a una concentración 1X con H₂O destilada.

10. Tinción del gel

Se colocó el gel en una solución de tñido [0.25 g de azul brillante de Coomassie, 90 ml de una mezcla metanol-agua (proporción 1:1), 10 ml de ácido acético glacial] por 3 min. Finalmente se incubó en solución de desteñido (metanol 10%, ácido acético glacial 10% y H₂O destilada cbp 1 L) por ~15 minutos.

11. Ensayo de inmunodetección

Luego del corrimiento electroforético en SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Invitrogen) en una cámara húmeda de transferencia (Thermo EC140 MINI BLOT MODULE), utilizando una solución amortiguadora (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%, SDS 0.1 %, H₂O cbp 1 L), por ~30 min a 32 mA (~125 Volts). La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con una solución de leche descremada Blotting Grade

Blocker Non-Fat Dry Milk (Biorad) al 5% en amortiguador TBS-Tween [50µl de Tween 20 (0.05%) en 100 ml de TBS (Tris 20 mM y NaCl 0.5 M)] durante 1 h. Se eliminó la solución bloqueadora y se lavó 2 veces con 10 ml del amortiguador TBS-Tween por 10 min a temperatura ambiente. La membrana se colocó en un agitador orbital a baja velocidad, se decantó el TBS-Tween y se añadió el níquel activado His-Probe (Amersham), en TBS-Tween a una dilución 1:5000, se incubó durante 1 h con agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana 4 veces con 10 ml de la solución de TBS-Tween en cada lavado, por 10 min con agitación suave; finalmente se incubó durante la noche a 4°C sin agitación para aumentar la sensibilidad de la detección.

a) Detección de la proteína recombinante ChrB-His por Western blot

Se realizó la detección con el Kit ECL + plus Western blotting system (Amersham) siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente la membrana se colocó sobre una película de rayos X (Kodak) por 5 min y la película se procesó con una solución de revelado (Kodak).

12. Purificación de proteínas

La purificación de la proteína recombinante ChrB-His se realizó empleando la fracción soluble proveniente de la extracción de proteínas y la fracción membranal a la cual se le dio un segundo pase de extracción con Triton X-100 a concentración final de 2% y se centrifugó a 7000 rpm, durante 10 min a 4°C. Las dos fracciones solubles se adicionaron a una columna vertical [500 µl de resina (Ni-NTA complejo agarosa-nitriloacético-níquel) previamente sedimentada], equilibrada con 2.5 ml de buffer A. Posteriormente la columna se lavó 2 veces con 4 ml de buffer de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 800 mM, imidazol 20 mM, glicerol 30%, β-mercaptoetanol 10 mM y Tween 0.1%) y se obtuvieron dos fracciones de 250 µl. Se adicionó 2 ml de buffer de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM) a pH 8.0 y se recuperaron de 5-7 fracciones de 250µl cada una. Finalmente las fracciones membranales, los lavados y los eluidos obtenidos de la purificación se guardaron a -20 °C o en su caso se corrió un SDS-PAGE.

V. RESULTADOS

1. Caracterización del plásmido recombinante pQE31-*chrB*

El DNA de la cepa *Escherichia coli* (BL21 pLysS) transformada con el plásmido recombinante pQE31-*chrB*, fue analizado con las endonucleasas *Bam*HI y *Pst*I. Después de la restricción se observó una banda de 3.4 kb correspondiente al plásmido lineal pQE31 y una banda de aproximadamente 900 pb correspondiente al gen *chrB* (**Figura 6**). Determinando así que el plásmido pQE31-*chrB* posee el gen *chrB* clonado. Para comprobar la conservación en fase del marco de lectura del gen *chrB* y las 6 histidinas del vector, se mandó secuenciar el DNA del fragmento del gen *chrB* del plásmido recombinante a fin de descartar posibles errores o cambios de nucleótidos a lo largo de la secuencia (**Figura 7**). El resultado mostró la secuencia del gen *chrB* con el codón de inicio y la etiqueta de histidinas adicionados por el plásmido pQE31, una región de nucleótidos que sustituye el codón de inicio del gen *chrB* por la enzima de restricción *Bam*HI y la secuencia de nucleótidos conservados en las secuencias de *chrB* comparadas.

2. Sobreexpresión de la proteína ChrB-His

Con el fin de sobreexpresar la proteína ChrB-His codificada en el plásmido recombinante pQE31-*chrB*, se indujo la expresión de ChrB-His a partir de cultivos tratados con concentraciones variables del inductor de expresión IPTG, diferentes temperaturas y variando también el tiempo de inducción, como se describe en materiales y métodos. A condiciones de 30°C y 12 h post-inducción, no fue posible apreciar la expresión de la banda en ninguna de las dos fracciones obtenidas de los extractos de proteínas (**Figura 8**). La expresión de una proteína de ~32 kDa se pudo apreciar después de inducir a 37°C por 4 o 12 h en los cultivos inducidos con IPTG pertenecientes a las fracciones insolubles y no en las fracciones solubles (**Figura 9**). Adicionalmente se observó la sobreexpresión de una banda mayoritaria en la fracción membranal correspondiente a la proteína recombinante ChrB-His a la concentración de 1 mM de IPTG cuando se incubó a 30°C por 4 h. La banda sobreexpresada presentó un tamaño de ~32 kDa correspondiente al tamaño predicho para ChrB-His del plásmido pQE31-*chrB* (**Figura 10**).

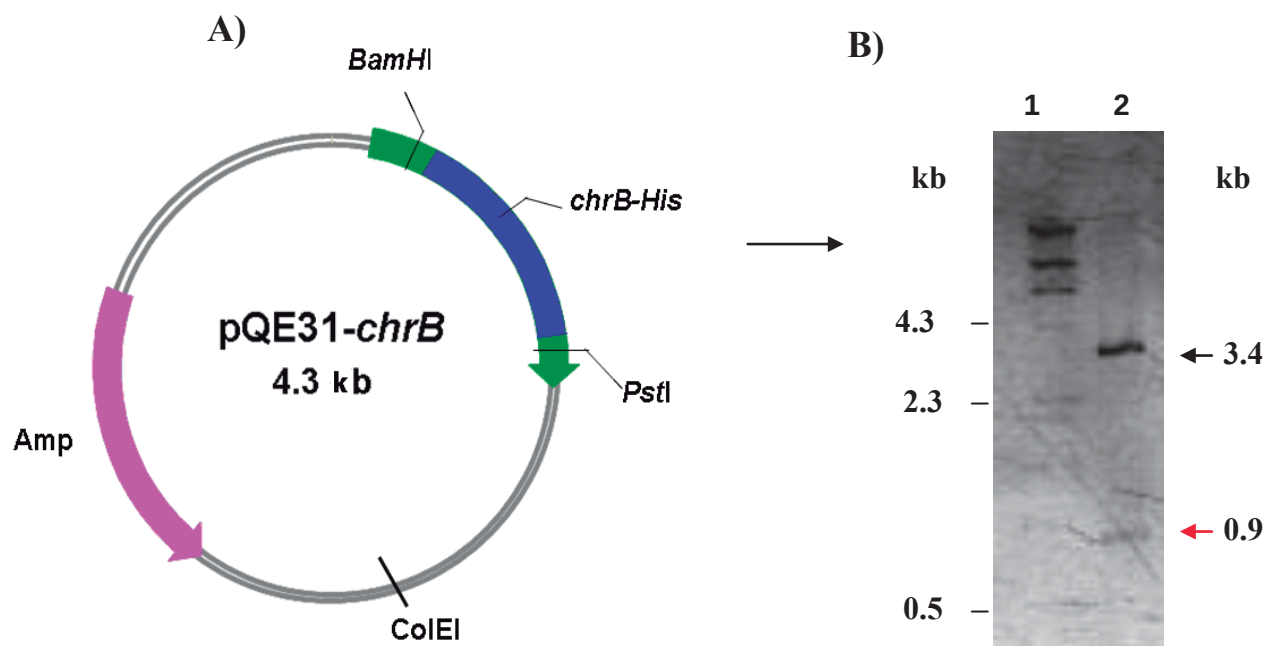


Figura 6. Caracterización del plásmido recombinante pQE31-*chrB* por medio de restricción enzimática. A) Esquema del plásmido recombinante pQE31-*chrB*. **B)** Corrimiento electroforético en gel de azarosa de la restricción enzimática de pQE31-*chrB*. Carril 1, marcador de tamaño molecular λ HindIII; carril 2, DNA de pQE31-*chrB* digerido con las enzimas *Bam*HI y *Pst*I.

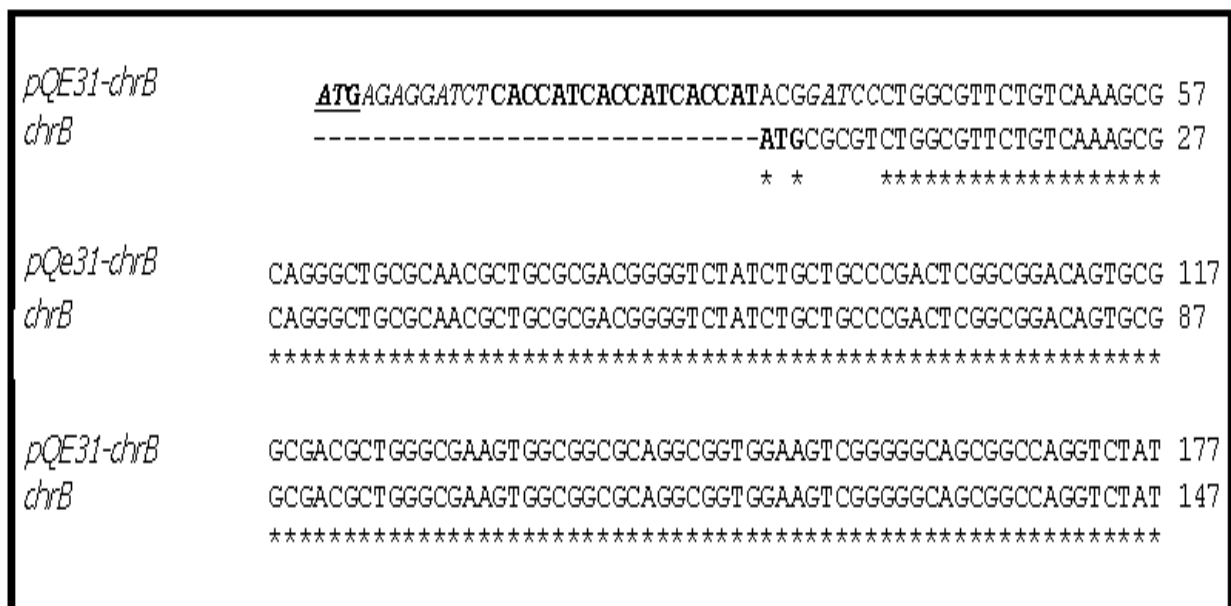
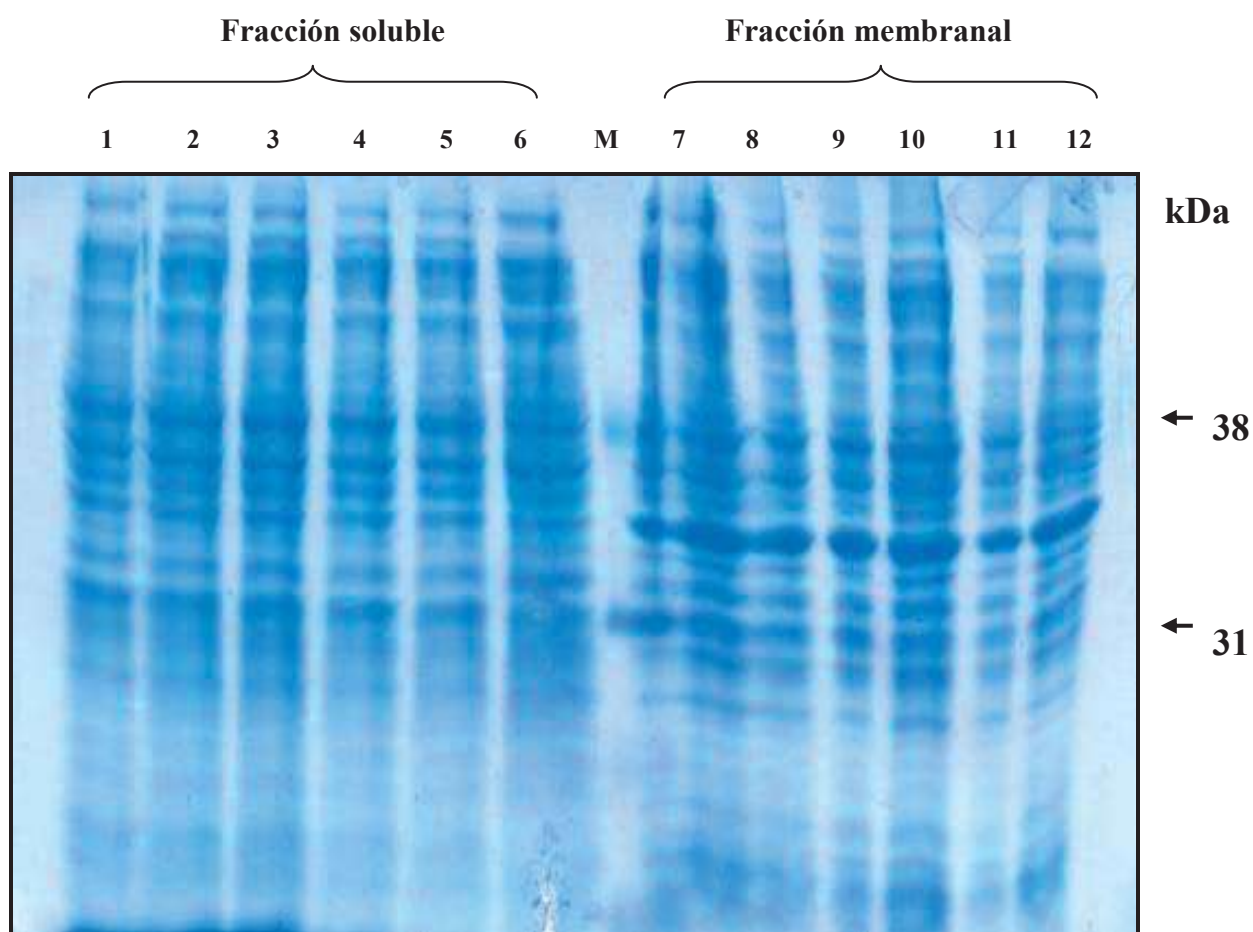


Figura 7. Alineamiento del DNA de pQE31 -*chrB* con el gen *chrB* del plásmido pUM505. Secuencia del gen *chrB* clonado en el plásmido pQE31 comparado con el gen obtenido del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa*. Secuencia que codifica a la etiqueta de 6 histidinas (azul), codón de inicio adicionado por el plásmido pQE31 (negro y subrayado), nucleótidos conservados (*), espacios vacíos (--).



12 h, 30°C

Figura 8. Inducción de la sobreexpresión de ChrB-His. Gel SDS-PAGE 12% de extractos celulares obtenidos a partir de cultivos bacterianos post-inducción a 12 h y 30 °C. Carriles 1 a 5, fracción soluble y 7 a 11, fracción membranal de BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) no inducido, inducido con 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mM de IPTG, respectivamente. Carriles 6 y 12, BL21 pLysS de las fracciones soluble y membranal, respectivamente. M, marcador de peso molecular Rainbow (Amersham).

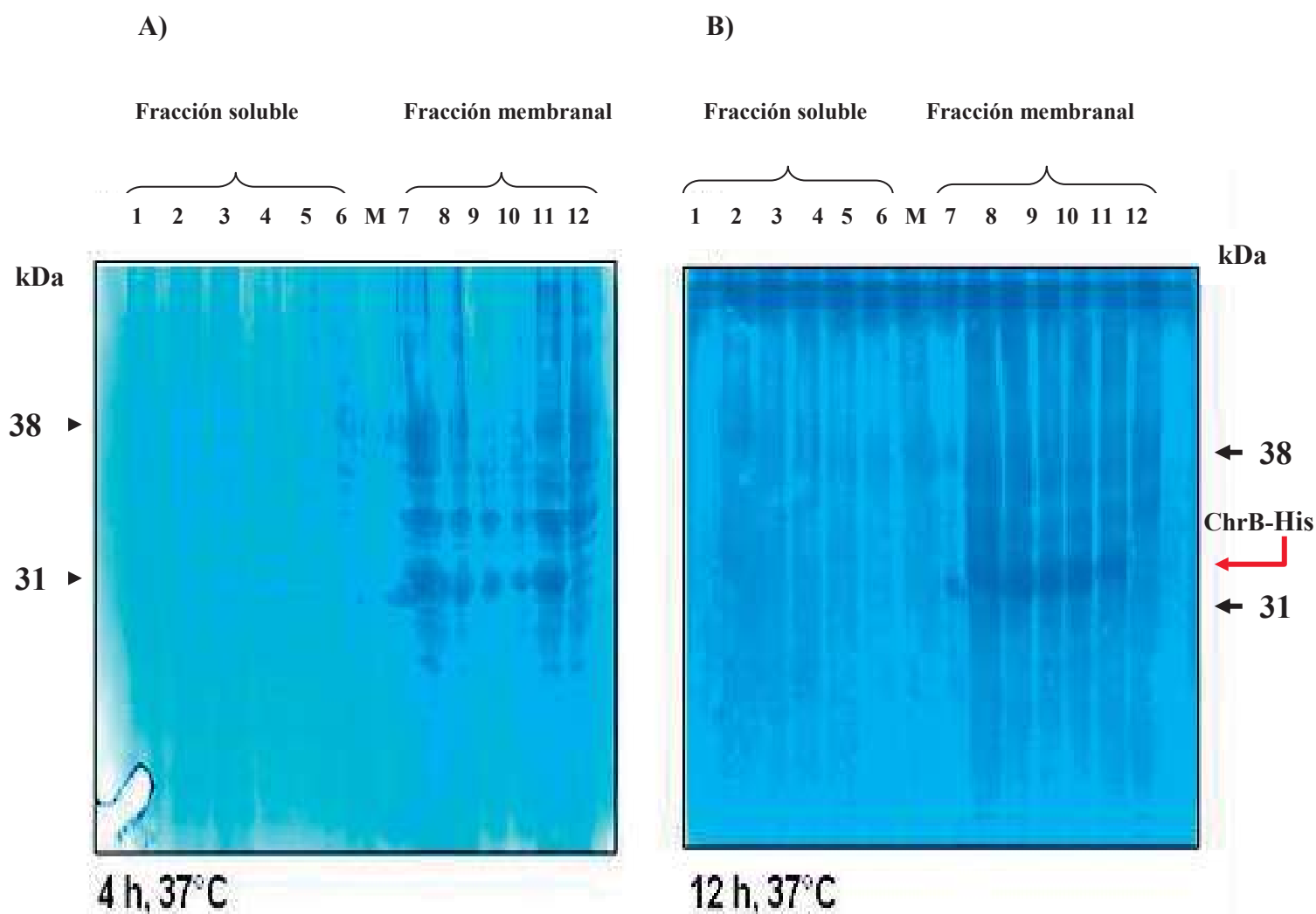


Figura 9. Inducción de la sobreexpresión de ChrB-His. Gel de SDS-PAGE 12% de extractos celulares obtenidos a partir de cultivos bacterianos post-inducción a 4 o 12 h a 37°C, **A)** Inducción a 4 h y 37°C. **B)** inducción a 12 h y 37°C. Carriles 1 a 6, fracción soluble y 7 a 11, fracción membranal. 1 a 5 BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) no inducido, inducido con 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mM de IPTG, respectivamente. Carriles 6 y 12, BL21 pLysS, correspondiente a las fracciones soluble y membranal respectivamente. M, marcador de peso molecular Rainbow (Amersham).

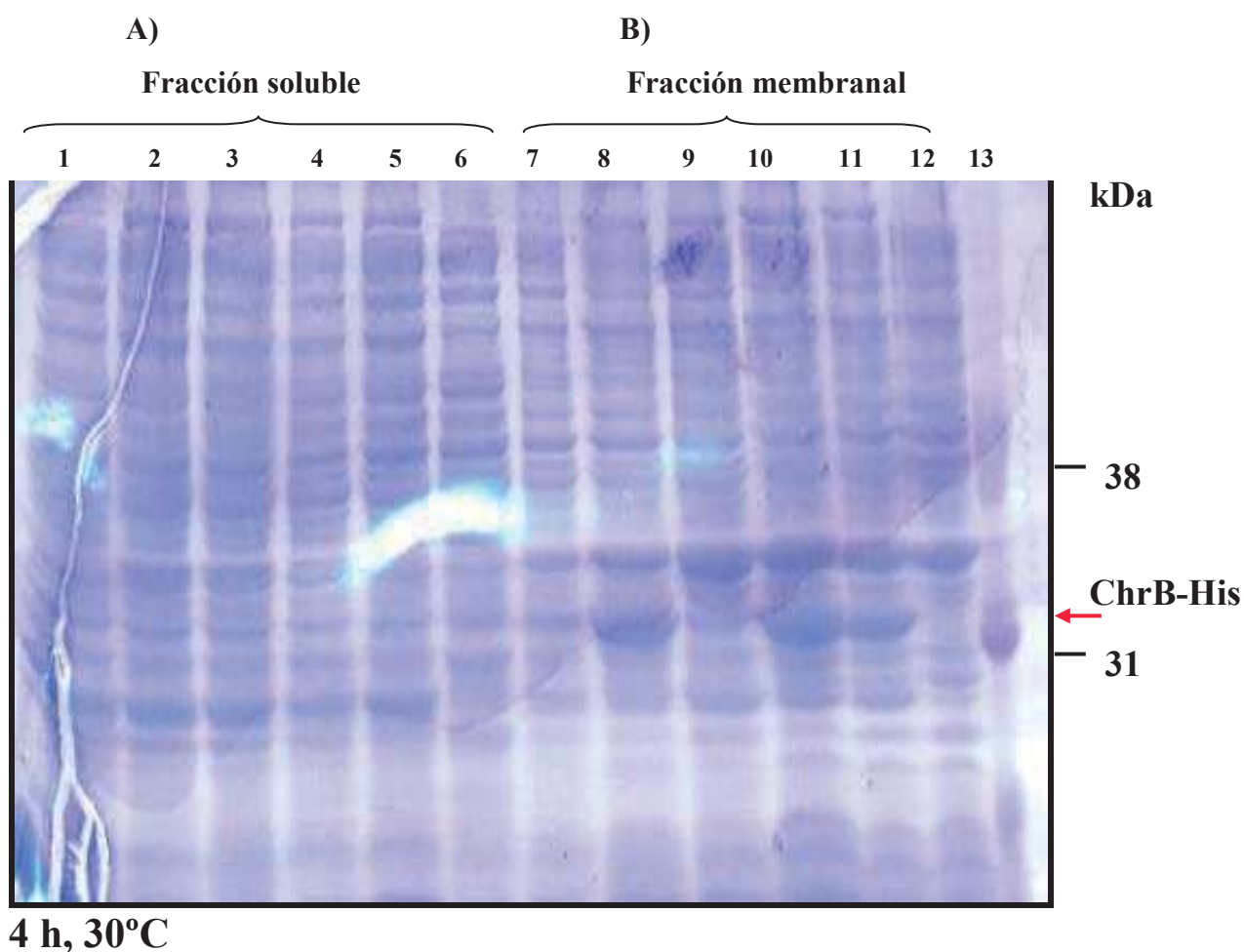


Figura 10. Inducción de la sob reexpresión de ChrB-His. SDS-PAGE 12%, el cultivo de la cepa BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) se creció en CL a 37°C con agitación constante, al llegar a D.O de 0.5₅₉₀ se adicionó IPTG a diferentes concentraciones y se incubó por 4 h. **A)** Fracción soluble; carriles 1-5 BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) no inducida, 0.2, 0.5, 1.0 y 2.0 mM IPTG respectivamente; carril 6, BL21 pLysS. **B)** Fracción membranal; carriles 7-11 BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) no inducida, 0.5, 0.2, 1.0, y 2.0 mM IPTG respectivamente, carril 12 BL21 pLysS, carril 13 marcador de peso molecular All blue precision plus STD prestained (Biorad).

3. Detección de ChrB-His por Western blot

A fin de confirmar que la proteína mayoritaria identificada en el SDS-PAGE corresponde a ChrB-His, se llevó a cabo la detección de la proteína recombinante por medio de la interacción con el reactivo His-probe (Amersham), el cual se une de manera específica a la etiqueta de 6 histidinas. Se detectó una banda única de ~32 kDa, que corresponde a la banda mayoritaria de la inducción a 30°C por 4 h (**Figura 11**), con lo que se confirmó que esta banda corresponde a la proteína ChrB-His, la cual se sobreexpresa bajo estas condiciones.

4. Purificación de ChrB-His

Con el propósito de purificar a la proteína recombinante ChrB-His se llevó a cabo la purificación de proteínas fusionadas a histidinas por el método de cromatografía de afinidad utilizando una resina de Ni-NTA. Se logró obtener eluidos con la proteína recombinante ChrB-His (**Figura 12**). Sin embargo, los eluidos inicialmente presentaron una cierta proporción de proteínas contaminantes. Con la finalidad de obtener eluidos más puros de la proteína ChrB-His se modificó el método de purificación empleando una columna de afinidad con resina de cobalto (Stratagene). Con esta última estrategia se obtuvieron eluidos de la proteína recombinante ChrB-His con mayor grado de pureza (**Figura 13**). De esta manera se obtuvo una fracción altamente enriquecida de ChrB-His.

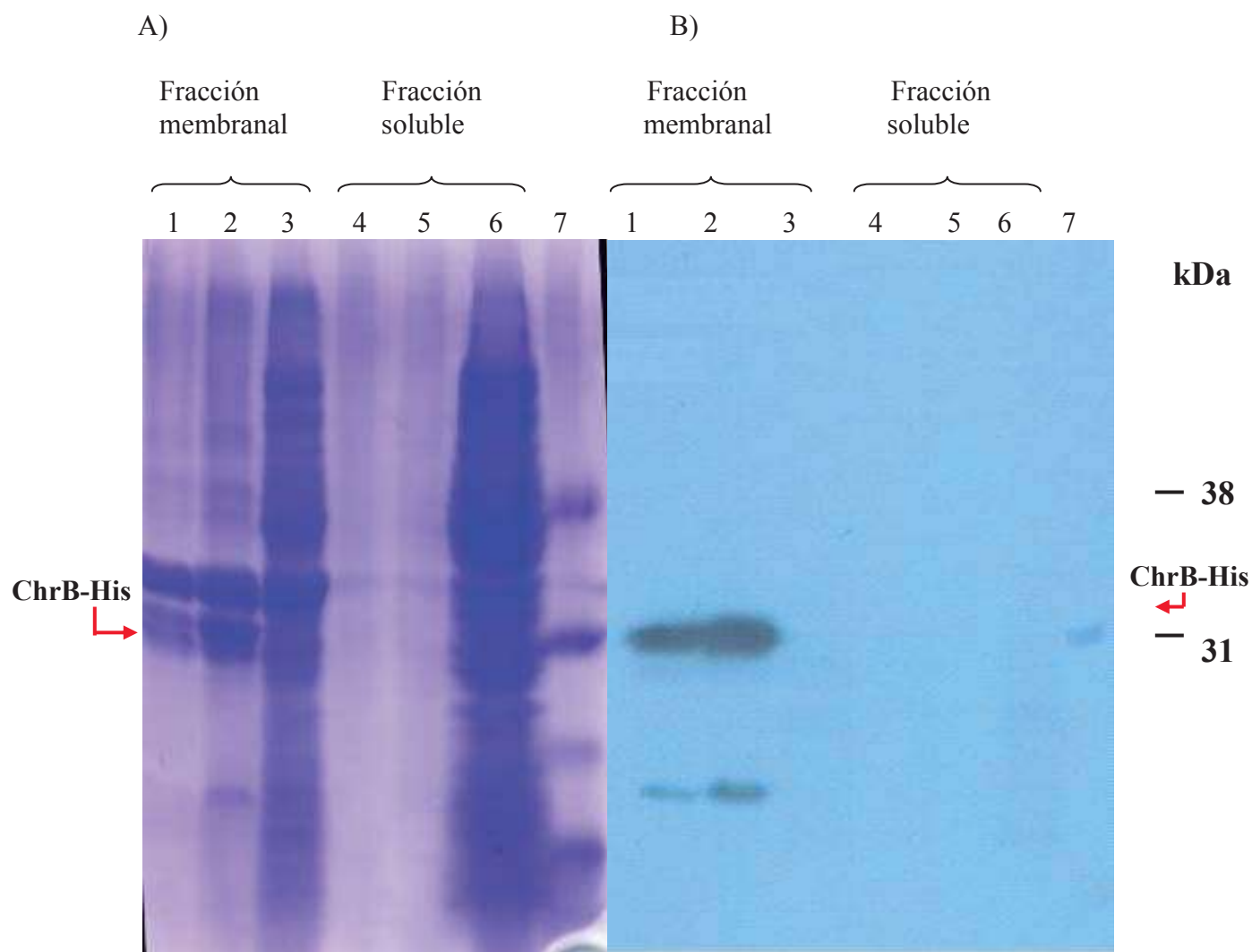


Figura 11. Inmunodetección de ChrB-His por Western blot. **A)** Electroforesis en SDS-PAGE de las fracciones soluble y membranal de los cultivos BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) inducido a 1 y 2 mM de IPTG por 4 h a 30°C y BL21 pLysS. **B)** Autorradiografía de la detección de ChrB-His por western blot con el reactivo His-probe. Carriles 1 y 2) BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) inducido con 2 y 1 mM de IPTG; respectivamente, carril 3, BL21 pLysS. Carriles 4 y 5, BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) inducido con 2 y 1 mM de IPTG, respectivamente. Carril 6, BL21 pLysS; carril 7), Marcador de peso molecular Rainbow (Amersham).

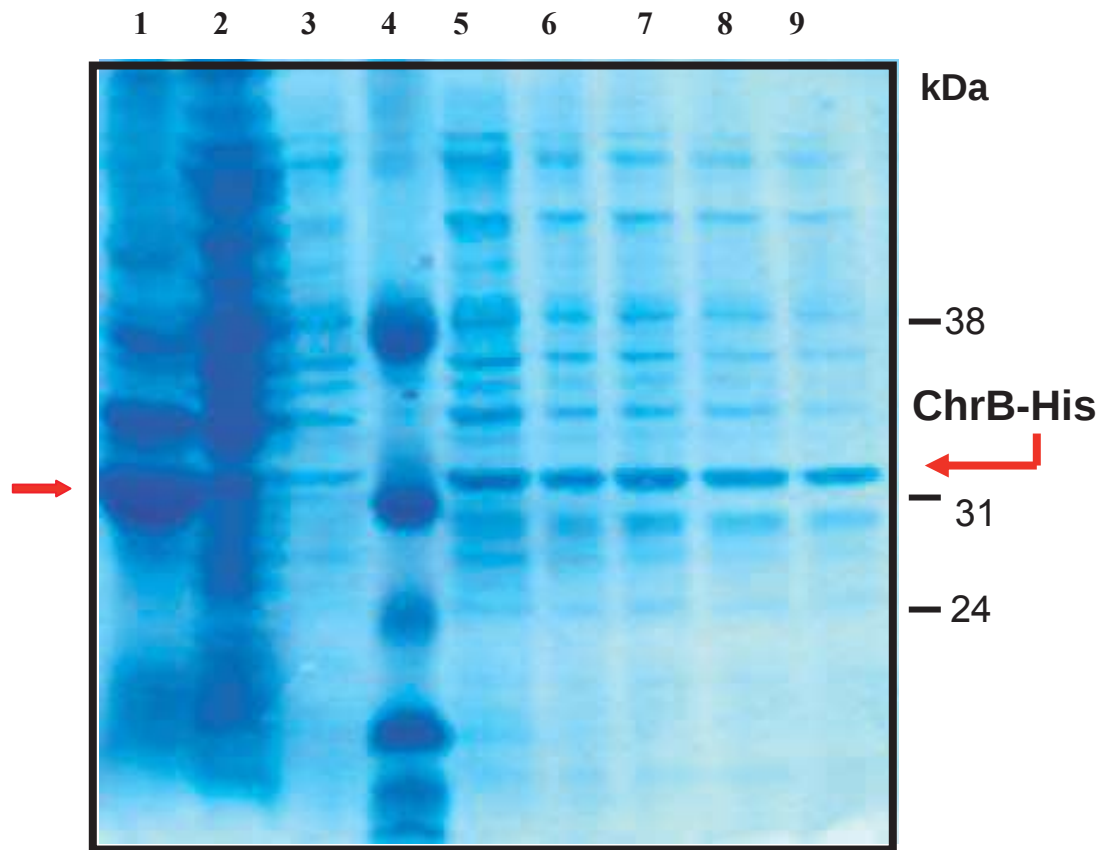


Figura 12. Purificación de la proteína recombinante ChrB-His. Se utilizó el extracto soluble de BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) inducido con 1 mM de IPTG por 4 h a 30°C y se purificó utilizando una columna con una resina de níquel. 1) Extracto crudo BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) inducido con 1 mM IPTG, 2) flujo de proteínas que no se unieron a la resina, 3) proteínas que se eliminan con el buffer de lavado, 4) marcador de peso molecular Rainbow (Amersham), 5-9) proteína ChrB-His eluida por la adición de un buffer de imidazol 200 mM.

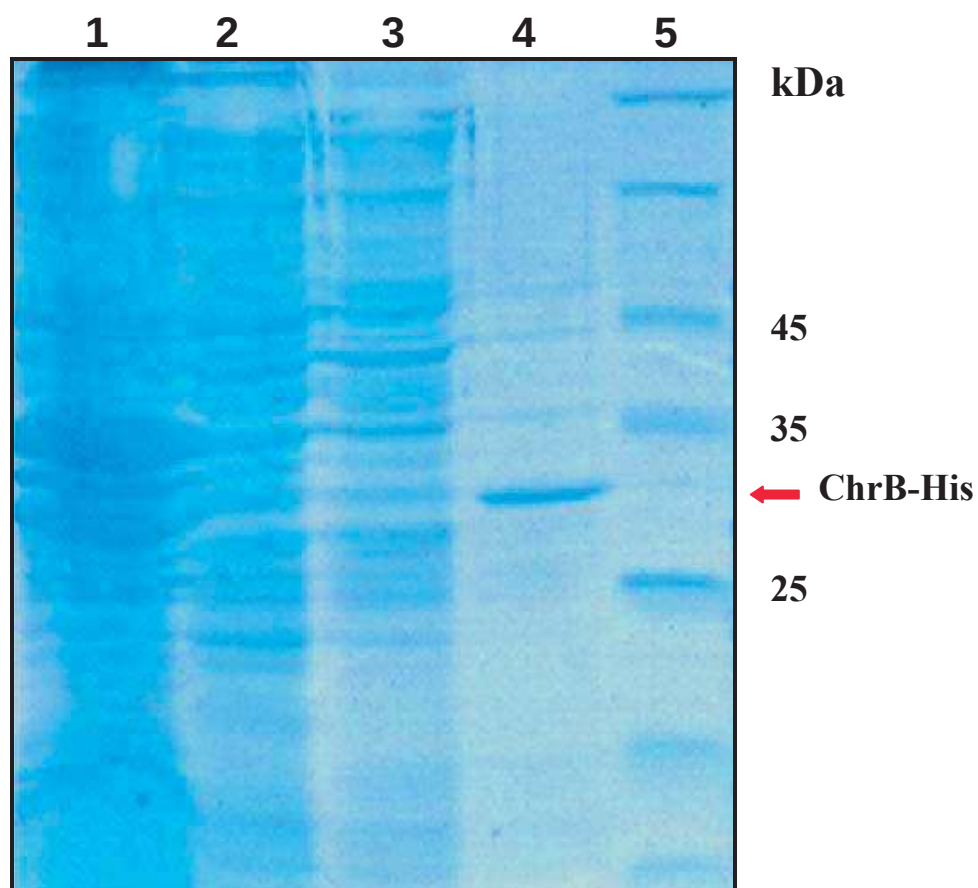


Figura 13. Purificación de la proteína recombinante ChrB-His con resina de cobalto. El cultivo de BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) proveniente de la inducción con 1 mM de IPTG por 4 h a 30°C se sometió a extracción con triton X-100 al 1% y la fracción soluble obtenida del proceso se mezcló con una resina de cobalto. **1)** Extracto crudo BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) inducido con 1 mM IPTG, **2)** flujo de proteínas a través de la resina, **3)** proteínas que se eliminan con el buffer de lavado, **4)** proteína ChrB-His eluida al adicionar un buffer de imidazol 200mM y **5)** marcador de peso molecular de proteínas [unstained protein molecular weight marker SM0431 (Fermentas)].

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Debido al interés que surge actualmente por mejorar la calidad del medio ambiente, se ha estimulado la realización de investigaciones que evalúan el comportamiento químico y los efectos biológicos de la contaminación por metales pesados sobre la hidrósfera y litósfera terrestres (Zelibor y col., 1987). Los metales son introducidos al ambiente por varias vías: 1) por procesos industriales, 2) durante su extracción de los minerales o 3) por fuentes naturales, entre otras, esto ha causado un importante incremento en las cantidades de metales liberados al ambiente, donde su reciclaje natural a través de los ciclos biogeoquímicos ha sido rebasado (Collins y Stotzky, 1992).

El Cr por ser un elemento con diferentes estados de oxidación puede jugar un papel dual en los organismos, el Cr(VI) en forma de cromato es uno de los iones inorgánicos más tóxicos que se conocen. Es nocivo tanto en organismos superiores como en microorganismos y se considera mutágeno y carcinogénico (Petrilli y De Flora, 1977; Albert, 1991). Por otra parte, se ha propuesto que el Cr(III) participa como un oligoelemento esencial para los seres humanos, debido a que participa en el metabolismo de la glucosa y de lípidos (Anderson, 1997). Sin embargo, intracelularmente el Cr(III) es responsable de la mayoría de los efectos tóxicos debido a la capacidad que tiene de interaccionar con los grupos fosfatos del DNA (Kortenkamp y col., 1991) y los grupos carboxilo y sulfhidrilo de las proteínas (Levis y col., 1982).

Con el incremento en las concentraciones de cromato en el ambiente se han seleccionado bacterias que poseen mecanismos para vivir en presencia de este agente tóxico (Williams y Silver, 1984). Un ejemplo de ello es la reducción bacteriana del Cr(VI) a Cr(III) en el exterior celular, el cual es considerado un mecanismo de resistencia a cromato debido a que a pH fisiológico el Cr(III) es menos soluble y a pH neutro tiende a precipitar (Ehrlich 2002). Sin embargo, altos niveles del ión tóxico pueden sobrepasar la capacidad de reducción en el ambiente e inhibir el desarrollo bacteriano. La resistencia a cromato conferida por plásmidos se ha establecido que se debe a una disminución en la acumulación intracelular del ión, lo cual le confiere a las bacterias mayor tolerancia a cromato que el proceso de reducción (Cervantes y Silver, 1992). La mayoría de los estudios de determinantes de resistencia bacteriana a cromato se han realizado en cepas Gram-negativas (Horitsu y col., 1978; Summers y Jacoby, 1978; Luli

y col., 1983; Ohtake y col, 1987, Bopp y Ehrlich, 1988; Ohtake y col., 1990), aunque también existen trabajos hechos con bacterias Gram-positivas (Efsthathiou y Mckay, 1977; Campos y col., 1995). Sin embargo, hasta ahora sólo se han caracterizado a nivel molecular los determinantes de resistencia a cromato de los plásmidos pUM505 de *P. aeruginosa* (Cervantes y col., 1990) y pMOL28 de *C. metallidurans* (Nies y col., 1990). En el 2006 Díaz Magaña determinó dos secuencias aledañas al gen *chrA* de *P. aeruginosa* obtenidas a través de la amplificación por PCR-Inverso del plásmido pUM505, mostrando que, al igual que los plásmidos pMOL28 y pB4, posee los genes *chrB* y *chrC* a los extremos 5' y 3' de *chrA*, respectivamente, manteniendo así el mismo arreglo génico que en los plásmidos antes descritos (**Figura 3**). Actualmente las bases de datos contienen decenas de homólogos del gen *chrA* de pUM505 (*C. metallidurans*, *Burkholderia fungorum*, *Vibrio vulnificus* etc.), incluyendo proteínas de eucariontes (*Neurospora crassa*) (Díaz-Pérez, 2007). Algunos de estos homólogos (*B. fungorum*, *Burkholderia sp.*) presentan el mismo arreglo génico *chrBAC*, lo cual indica que los genes *chrB* y *chrC* se han mantenido a lo largo de la evolución, posiblemente por su importancia en la resistencia a cromato (Díaz-Pérez, 2007).

Interesantemente, el gen *chrB* de 888 nucleótidos del plásmido pUM505 codifica una proteína de 296 aa que, además de mostrar identidad significativa con las proteínas ChrB de pMOL28 y pB4, presenta similitud con proteínas de la familia de las rodanasas (datos no mostrados). Se ha propuesto que las enzimas tipo rodanasa participan en la eliminación de complejos selenio-glutación, que son formados por la reacción de selenito con glutación (Self y col., 2000). A partir de que el cromato puede interactuar con el glutación se puede sugerir que una de las funciones de ChrB sea romper algunos de los complejos cromo-glutación formados en la célula. Los resultados obtenidos en las pruebas de susceptibilidad a cromato en la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 mostraron que la proteína ChrB por sí sola no confiere resistencia a cromato, no descartando su papel en la regulación de la resistencia a cromato en presencia de la proteína ChrA (Díaz-Magaña, 2006). La comparación con las proteínas ChrB reportadas a través de un alineamiento tipo ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), mostró que la proteína ChrB del plásmido pUM505 posee un 44% y 88% de identidad con las ChrB homólogas de los plásmidos pMOL28 de *C. metallidurans* y pB4 de *Pseudomonas sp*, respectivamente. El alto porcentaje de identidad de ChrB de pUM505 con la proteína ChrB de pMOL28 sugiere que esta proteína podría tener la misma función que su homóloga ChrB en *C. metallidurans*.

Aunque se predice a ChrB-His como una proteína soluble en base a su secuencia de aa, cuando se expresó en *E. coli* se localizó como una banda enriquecida únicamente en la fracción membranal. Sin embargo, no se descarta que la presencia de la proteína ChrB-His de pUM505 en la fracción membranal se deba a la formación de cuerpos de inclusión de la proteína como resultado de la sobreexpresión, los cuales se quedan en la fracción de la membrana y no son disgregados por el proceso empleado. Adicionalmente, la proteína homóloga ChrB de *C. metallidurans* también se ha observado asociada a la membrana (Nies y col., 1990; Junke y col., 2002). Sin embargo, también se ha propuesto que la asociación de ChrB de *C. metallidurans* a la membrana está dada por una región hidrofóbica localizada en el extremo carboxilo terminal de la proteína, región que esta ausente en la proteína ChrB-His de pUM505.

En este trabajo se logró sobreexpresar la proteína recombinante ChrB-His a partir de cultivos bacterianos de BL21 pLysS (pQE31-*chrB*) inducidos 4 h con 1 mM IPTG a 30°C. La detección se realizó por western blot después de corrimientos electroforéticos en geles de poliacrilamida, mostrando una banda con un peso de ~ 32 kDa, mismo que concuerda con el peso deducido de la secuencia de aminoácidos. Esto sugiere que la banda sobreexpresada corresponde al producto del gen *chrB*. La purificación de la proteína ChrB-His empleando cromatografía de afinidad en columna con una resina de níquel-nitrioacético-agarosa dio como resultado la obtención de una fracción enriquecida de ChrB-His, sin embargo, dicha fracción presenta una alta proporción de proteínas contaminantes. Con la finalidad de obtener una mayor purificación de ChrB-His se empleó una columna con resina de cobalto (Talon) la cual presenta requerimientos más estrictos para el posicionamiento espacial de las histidinas. Estas resinas constan de un núcleo reactivo que une solo las polihistidinas de la etiqueta y no las localizadas en diferentes sitios en la proteína. La resina de afinidad Talon con su matriz uniforme proporciona alta afinidad de unión en una variedad de condiciones de purificación, asegurando la purificación óptima de proteínas. Al emplear esta columna se logró obtener una purificación de la proteína ChrB-His de aproximadamente un 80%. En conclusión, se determinó que el gen *chrB* del plásmido pUM505 de *P. aeruginosa* codifica a una proteína de ~ 32 kDa, misma que fue purificada empleando técnicas cromatográficas de afinidad.

VII. PERSPECTIVAS

Una vez comprobada la expresión de la proteína ChrB de pUM505, se pretende modificar el método de purificación con el objeto de obtener un mayor grado de pureza de la proteína ChrB-His. De esta manera será posible utilizarla en posteriores ensayos para determinar su actividad y su posible participación como regulador transcripcional de la resistencia a cromato en *P. aeruginosa*.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alloway, B. J. (1990). Heavy Metals in Soil. Ed. Wiley, Nueva York.
2. Álvarez, A. H., R. Moreno-Sanchez y C. Cervantes (1999). Chromate efflux by means of the ChrA chromate resistance protein from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 181:7398-7400.
3. Anderson, R. A. (1997). Chromium as an essential nutrient for humans. Regul Toxicol Pharmacol 26:535-541.
4. Bartlett, R. J. (1991). Chromium cycling in soils and water: links, gaps and methods Environ. Health Perspect. 92:17-24.
5. Birnboim, H. C. y J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7:1513-1523.
6. Bopp, L. H. y H. L. Ehrlich (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. Arch. Microbiol. 150:426-431.
7. Campos, J., M. Martinez-Pacheco y C. Cervantes (1995) Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus sp.* Strain. Antonie van Leeuwenhoek 8:203-208.
8. Cervantes, C., H. Ohtake, L. Chu, T. K. Misra y S. Silver (1990). Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. J. Bacteriol. 172:287-291.
9. Cervantes, C. y S. Vaca (1991). Cromatos: resistencia y detoxificación en bacterias. Rev. Lat-Amér. Microbiol. 33:71-76.
10. Cervantes, C. y S. Silver (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction Plasmid. 27:65-71.

11. Cervantes, C. y S. Silver (1996). Metal resistance systems in *Pseudomonas*. Rev. Latinoamer Microbiol. 38:45-64.
12. Cervantes C., A. E. Espino-Saldaña, F. Acevedo-Aguilar, I. L. León-Rodríguez, M. E. Rivera-Cano, M. Ávila-Rodríguez, K. Wróbel-Kaczmarczyk, K. Wróbel-Zasada, J. F. Gutiérrez-Corona, J. S. Rodríguez-Zavala y R. Moreno-Sánchez (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. Rev. Latinoamer. Microbiol. 48:203-210.
13. Collins, Y. E. y Stotzky (1992). Heavy metals alter the electrokinetic properties of bacterial, yeast and clay minerals. Appl. Environ. Microbiol. 58:1592-1600.
14. Coney, V. E., M. D. James y E. P. Rybicki (2003). Molecular Biology Techniques Manual. 3r edition. University of Cape Town. South Africa.
15. Díaz-Pérez, C., C. Cervantes, J. Campos-García, A. Julián-Sánchez y H. Riveros-Rosas (2007). Phylogenetic análisis of the chromate ion transporter (CHR) superfamily. FEBS J. 274:6215-6227.
16. Díaz-Magaña, A. (2006). Caracterización de los genes aledaños al gen *chrA* del plásmido pUM505 de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de licenciatura. Químico-Farmacobiología, UMSNH.
17. Dreyfuss, J. (1964). Characterization of a sulfate and thiosulfate transporting system in *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. 239:2292-2297.
18. Efstathiou, J. D. y L. L. McKay (1977). Inorganic salts resistance associated with a lactose-fermenting plasmid in *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 130:257-265.
19. Ehrlich, H. L. (2002). How microbes mobilize metals in ores: A view of current understandings and proposals for further research. Miner Metall Process 19:220–224

20. Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood y N. R. Krieg (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology (Eds.) ASM. Washington, D. C. pp. 126-128.
21. Holzinger, A., K. S. Phillips, y T.E. Weaver (1996). Single-step purification/solubilization of recombinant proteins: application to surfactant protein B. *BioTechniques*. 20:804–808.
22. Horitsu, H., H. Nishida y H. Kato (1978). Isolation of potassium chromate-tolerant bacterium and chromate uptake by the bacterium. *Agric. Biol. Chem.* 42:2037-2043.
2. Jiménez-Mejía, R., J. Campos y C. Cervantes (2006). Membrane topology of the chromate transporter ChrA of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett* 262:178-184.
24. Juhnke, S., N. Peitzsch, N. Hubener, C. Grosse y D. H. Nies (2002). New genes involved in chromate resistance in *Ralstonia metallidurans* strain CH34. *Arch. Microbiol.* 179:15-25.
25. Kawanishi, S., S. Inoue y S. Sano (1986). Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 261:5952-5958.
26. Kortenkamp, A., P. O'Brien y D. Beyersmann (1991). The reduction of chromate is a prerequisite of chromium binding to cell nuclei. *Carcinogenesis* 12:1143–1144.
27. Levis, A. G. y V. Bianchi (1982). Mutagenic and cytogenetic effects of chromium compounds. In: Langard S (ed) *Biological and environmental aspects of chromium*. Elsevier, Amsterdam, pp 171-208.
28. Losi, M. E., C. Amrhein y W. T. Frankenberger (1994). Environmental biochemistry of chromium. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 136:91-121.
29. Mathews, C. K. y K. E. Van Holde (1983). *Biochemistry*. The benjamín/Cummings Publishing Company. Redwood City, CA. pp. 258.

- 30.** Marzluf, G. A. (1970). Genetic and metabolic controls for sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: isolation and study of chromate-resistant and sulfate transport negative mutants. *J. Bacteriol.* 102:716-721.
- 31.** McGrath, S. P. y S. Smith (1990). Chromium and Nickel. In: Heavy metals in soils. (Alloway, B. J., Ed), p.p. 125-150. Wiley, New York.
- 32.** Nies, A., D. H. Nies y S. Silver (1990). Nucleotide sequence and expression of a plasmid encoded chromate resistance determinant from *Alcaligenes eutrophus*. *J. Biol. Chem.* 265:5648-5653.
- 33.** Nishio, A. y E. M. Uyeki (1985). Inhibition of DNA synthesis by chromium compounds. *J. Toxicol. Environ. Health* 15:237-244.
- 34.** Ohtake, H., C. Cervantes y S. Silver (1987). Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* 169:3853-3856.
- 35.** Ohtake, H. y S. Silver (1994). Bacterial detoxification of toxic chromate. En: Biological Degradation and Biorremediation of Toxic Chemicals. G. R. Chaudhry. (Ed). Dioscorides Press. P. 403-415.
- 36.** Pardee, A. B., L. S. Prestidge, M. B. Whipple y J. Dreyfuss (1966). A binding site for sulfate and its relation to sulfate transport into *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 241:3962-3969.
- 37.** Petrilli, F. L. y S. De Flora (1977). Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:805-809.
- 38.** Ramírez-Díaz, M. I., C. Díaz-Pérez, E. Vargas, E. Riveros-Rosas, J. Campos-García y C. Cervantes (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals.* 21:321-332.

- 39.** Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.
- 40.** Self, W. T., L. Tsai y T. C. Standtman (2000). Synthesis and characterization of selenotrisulfide-derivatives of lipoic acid and lipoamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12481-12486.
- 41.** Shi, X. y N. S. Dalal (1990). On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (V) species. *Arch. Biochem. Biophys.* 277:342-350.
- 42.** Silver, S. y L. T. Phung (2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:587-605.
- 43.** Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219:37-44.
- 44.** Tauch, A., A. Schluter, N. Bischoff, A. Goesmann, F. Meyer y A. Puhler (2003). The 79, 370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 β backbone loaded with a chromate resistance transposon, the *strA-strB* streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene *bla* NPS-1, and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance nodulation-division family. *Mol. Genet. Genomics* 268:570-584.
- 45.** Vagpayee, P., S. Sharma, R. D. Tripathi, U.N. Rai y M. Yunus (1999). Bioaccumulation of chromium and toxicity to photosynthetic pigments, nitrate reductase activity and protein content of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Chemosphere* 39:2159-2169.
- 46.** Voitkun, V. A., Zhitkovich y M. Costa (1998). Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or aminoacids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. *Nucleic Acids. Res.* 26:2024-2030.

47. Wiegand, H. J., H. Ottenweilder y H. H. Bolt (1985). Fast uptake kinetics in vitro of Cr(VI) by red blood cells of man and rat. *Arch. Toxicol.* 57:31-34.
48. Wingfield, P. T., J. E. Coligan, B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher (1995a). Overview of the purification of recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. In: Current protocols in protein science. eds. John Wiley and Sons, New York, pp. 1:6.1.1–6.1.22.
49. Williams, J. W. y S. Silver (1984). Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. *Enzyme Microb. Technol.* 6:531-537.
50. Zelibor, J. L., M. W. Doughten, D. J. Grimes y R. R. Colwell (1987). Testing for bacterial resistance to arsenic in monitoring well water by the direct viable counting method. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2929-2934.