

Inducción a la expresión de la ribonucleasa A a partir de la transferencia de plásmidos de bacterias no competentes a bacterias competentes

Silvia Natalia Diaz Gutierrez

Trabajo de Grado para Optar el Título de Química

Director

Hermisul de Jesus Cano Calle

Doctor en Química

Codirectora

Stefania Correa Duarte

Magister en Biología

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2026

Dedicatoria

A mis santos,

Por mostrarme la grandeza que poseo

Agradecimientos

Quiero agradecer principalmente a mis padres, que nunca cortaron mis alas. A mi familia que siempre estuvo para soportarme. A mi botanita, que sin entender nada me impulsó a ser siempre lo mejor. A Herminul y Stelia que apostaron por mí y regalaron su valioso tiempo a mi crecimiento profesional y personal. A cada persona que conocí gracias al GIBIM y al 402 que compartió conmigo su tiempo y su conocimiento.

A Minciencias y al Sistema General de Regalias por la financiación del proyecto 2021000100331. A Stefania, que me mostró lo bonito de la vida en todas sus facetas.

A los hidro biólogos y Betsy que me enseñaron del hogar lejos de casa. A Heidy, Lala, GGH, Vladimir y el CUS que lucharon conmigo a su modo. A ti baby, que prevaleciste conmigo ante toda sonrisa y cada lagrima A Camila, que me dio un techo y compartió su hogar. A mi panecito de melón que hizo mi vida sabor a limón y me sostuvo incondicionalmente ante toda adversidad. A malejo, que me enseñó de la vida y a materializar mis sueños.

A mi perro y a mi chiquito que me dieron razones para construir una buena vida. A mis santos, que aún en la oscuridad me mostraron la luz

Al profe, que fue mi familia dentro y fuera de todos los ámbitos. A mi esposo, que me acompañó en el proceso de encontrarme. A mis hermanos, Caro, Lore y Erick que aún a la distancia me mostraron el camino a casa.

Tabla de contenido

Introducción	12
1. Objetivos 14	
1.1 Objetivo General.....	14
1.2 Objetivos Específicos.....	14
2. Marco teórico	14
2.1 Ribonucleasa A.....	15
2.2 Aplicaciones y necesidades.....	16
2.2.1 Mecanismo de reacción	18
2.3 Producción de proteínas recombinantes en bacterias	18
2.3.1.1. Promotor	24
2.3.2 Cepa	25
2.3.3 Cultivo bacteriano	26
2.3.4 Purificación de la proteína	27
2.3.4.1. Choque osmótico.....	28
2.3.4.2. Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC).....	28
2.3.4.3. Cromatografía intercambio iónico	30
2.3.4.4. Electroforesis SDS-PAGE	31
2.4 Actividad catalítica	36
2.4.1. Actividad catalítica de la ribonucleasa A (RNasa A)	39

3. Metodología	41
3.1. Materiales.....	42
3.2. Reactivos.....	42
3.3. Extracción del plásmido (bacteria no competente).....	42
3.4. Transformación	43
3.5. Inducción de la expresión proteica	44
3.6. Extracción de proteína recombinante (bacteria competente)	44
3.6.1. Método de choque osmótico:.....	45
3.6.2. Método con detergentes	45
3.6.3. Sonicación:	46
3.7. Caracterización y confirmación de identidad	46
3.7.1. Purificación proteica mediante Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC)	47
3.7.2. Separación por electroforesis SDS PAGE.....	49
3.7.3. Visualización y determinación de peso molecular	50
3.8. Ensayo de actividad enzimática de la RNasa recombinante	50
3.9. Análisis estadístico.....	51
4. Resultados y discusión	51
4.1. Extracción del plásmido (bacteria no competente).....	51
4.2. Transformación	52
4.3. Extracción de la proteína (bacteria competente).....	53
4.3.1. Detergentes	54
4.3.2. Choque osmótico	54

4.3.3. Sonicación	56
4.4. Condiciones de inducción evaluadas para la expresión de RNasa.....	58
4.5. Ensayo 1: Variación de la concentración de IPTG	59
4.6. Ensayo 2: Variación de tiempo y temperatura de inducción	63
4.7. Separación de la proteína	67
4.7.1. Separación por cromatografía de Intercambio Iónico	68
4.8. Actividad catalítica de la RNasa recombinante	70
5. Conclusiones	72
6. Declaración de conflictos de interés.....	73
7. Disponibilidad de datos.....	73
8. Recomendaciones.....	73
Referencias Bibliográficas.....	75
Apéndices.....	74

Lista de Tablas**Pág.**

Tabla 1.	Metodologías implementadas para la extracción con detergentes de la proteína soluble de E. coli transformadas con el plásmido de expresión de la RNasa	45
Tabla 2.	Buffers usados para la separación de la proteína soluble de E. coli transformadas con el plásmido de expresión de la RNasa.....	46
Tabla 3.	Metodologías implementadas para la extracción de las proteínas solubles de E. coli con el plásmido de expresión de la RNasas.....	57
Tabla 4.	Condiciones de inducción evaluadas para la expresión de RNasa.....	58
Tabla 5.	Cuantificación de proteínas solubles de E. coli inducidas con diferentes concentraciones de IPTG	60
Tabla 6.	Cuantificación relativa de proteínas solubles de E. coli inducidas con diferentes concentraciones de IPTG por triplicado	61
Tabla 7.	Cuantificación mediante Bradford de proteínas solubles de E. coli inducidas con diferentes concentraciones de IPTG por triplicado.....	61
Tabla 8.	Cuantificación de las proteínas solubles de E. coli con el plásmido de expresión de la RNasa (correspondientes a las variaciones de tiempo y temperatura evaluadas en el gel de electroforesis y manteniendo concentración de IPTG 0.6 mM).....	64
Tabla 9.	Cuantificación de las proteínas solubles de E. coli con el plásmido de expresión de la RNasa (correspondientes a las variaciones de tiempo y temperatura evaluadas en el gel	64
Tabla 10.	ANOVA (one-way) para concentraciones de IPTG	72

Lista de Figuras

	Pag
Figura 1. Función de la familia de la RNasa A en enfermedades	17
Figura 2. Esquema general de las etapas involucradas en la producción de proteína recombinante	20
Figura 3. Plásmido con genes de resistencia a los antibióticos	21
Figura 4. Diferentes elementos que componen la bacteria.....	22
Figura 5. Plásmido de la RNasa A	23
Figura 6. Mecanismo de acción de un promotor	24
Figura 7. Pasos para la obtención de proteína	28
Figura 8. Montaje del equipo de FPLC	30
Figura 9. Funcionamiento de la columna de intercambio iónico	31
Figura 10. Montaje de electroforesis SDS-PAGE.....	32
Figura 11. Polimerización de monómeros de acrilamida y bis acrilamida.....	33
Figura 12. Molécula de dodecil sulfato sódico (SDS).....	34
Figura 13. Disociación de la molécula al ser tratada con mercaptoetanol y calor	35
Figura 14. Empaquetamiento de las proteínas en el gel de stacking	36
Figura 15. Catálisis de la RNasa A.....	41
Figura 16. Esquema metodología general	42
Figura 17. Buffers propuestos por cytiva para la columna de intercambio catiónico	48
Figura 18. Montaje completo de la separación por electroforesis SDS-PAGE.....	49
Figura 19. Gel de electroforesis de agarosa	52
Figura 20. Colonias de E. coli (NiCo 21) en placa LB-Amp transformadas con el plásmido	53

Figura 21. Gel electroforesis SDS-PAGE proteínas solubles portadoras del plásmido de expresión. Comparación métodos de extracción.....	55
Figura 22. Gel de electroforesis SDS-PAGE proteínas solubles. Comparación de resultados obtenidos de las metodologías usadas	57
Figura 23. Gel electroforesis SDS-PAGE de proteínas solubles con el plásmido de expresión. Ensayo 1 variación de las concentraciones de IPTG	61
Figura 24. Gel de electroforesis SDS-PAGE de proteínas solubles con el plásmido de expresión. Ensayo 2 variación de tiempo y temperatura	65
Figura 25. Cromatograma de separación de RNasa mediante columna de intercambio iónico.....	69
Figura 26. Gel electroforesis SDS-PAGE de la separación por cromatografía de intercambio iónico de la RNasa A.....	70
Figura 27. Gráfica de la hidrólisis de la RNasa.....	72

Lista de Apéndices

	pág.
Apéndice A	89

Resumen

Título: Inducción a la expresión de la ribonucleasa A a partir de la transferencia de plásmidos de bacterias no competentes a bacterias competentes *

Autor: Silvia Natalia Díaz Gutiérrez **

Palabras Clave: Inducción, RNasa A, recombinante, expresión, *Escherichia Coli*.

Descripción: Las ribonucleasas son enzimas que catalizan la degradación del ARN y participan en procesos esenciales como su regulación, procesamiento y maduración celular. Debido a sus propiedades citotóxicas, algunas ribonucleasas han sido ampliamente estudiadas en investigación biomédica y evaluadas como agentes terapéuticos en el tratamiento de tumores sólidos avanzados, así como en enfermedades infecciosas y cáncer. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar y optimizar las condiciones de inducción, extracción y purificación de la ribonucleasa A recombinante, producida mediante la transformación de plásmidos en bacterias competentes. Se analizaron diferentes métodos de extracción proteica, tanto mecánicos como químicos, y se estudiaron variables clave del proceso de inducción, incluyendo la concentración del inductor isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), el tiempo y la temperatura de incubación. Posteriormente, se optimizaron los parámetros de purificación empleando cromatografía líquida de alta resolución para proteínas. Como resultado, se estableció que la extracción por choque osmótico, tras una inducción de 16 horas a 20 °C con una concentración de 0.6 mM de IPTG, permitió obtener una mayor recuperación de la proteína. La purificación se realizó exitosamente mediante cromatografía de intercambio catiónico. Estos resultados evidencian que el uso de sistemas bacterianos para la producción de proteínas recombinantes representa una alternativa eficiente, económicamente viable y ambientalmente sostenible, al reducir la dependencia de fuentes naturales limitadas y disminuir significativamente los tiempos y costos de producción.

* Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Director: Herminio de Jesús Cano Calle. Doctor en química. Codirector: Stefania Correa Duarte. Magister en Biología.

Abstract

Title: Induction of Ribonuclease A Expression from the Transfer of Plasmids from Non-Competent Bacteria to Competent Bacteria *

Author: Silvia Natalia Díaz Gutiérrez ¹

Key Words: Induction, RNase A, recombinant, expression, Escherichia coli.

Description: Ribonucleases are enzymes that catalyze the degradation of RNA and participate in essential processes such as its regulation, processing, and cellular maturation. Due to their cytotoxic properties, some ribonucleases have been extensively studied in biomedical research and evaluated as therapeutic agents for the treatment of advanced solid tumors, as well as infectious diseases and cancer. The present study aimed to evaluate and optimize the conditions for the induction, extraction, and purification of recombinant ribonuclease A, produced through plasmid transformation in competent bacteria. Different protein extraction methods, both mechanical and chemical, were analyzed, and key variables in the induction process were studied, including the concentration of the inducer isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), incubation time, and temperature. Subsequently, the purification parameters were optimized using high-performance liquid chromatography for proteins. As a result, osmotic shock extraction following induction for 16 hours at 20 °C with an IPTG concentration of 0.6 mM was found to provide greater protein recovery. Purification was successfully performed by cation-exchange chromatography. These results demonstrate that the use of bacterial systems for recombinant protein production represents an efficient, economically viable, and environmentally sustainable alternative, reducing dependence on limited natural sources and significantly decreasing production time and costs.

* Degree Work

¹ Advisor: Hermínsul de Jesús Cano Calle, Ph.D. in Chemistry. Co-advisor: Stefania Correa Duarte, M.Sc. in Biology.

Introducción

Las ribonucleasas (RNasas) son enzimas encargadas de catalizar la degradación del ARN y participan en procesos fundamentales como su regulación, procesamiento y maduración celular. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en organismos y participan en procesos celulares tales como la muerte celular programada, la replicación del ADN, la transcripción, el procesamiento y edición del ARN, la defensa del hospedero y el control del crecimiento tumoral [1]. En rumiantes, las ribonucleasas presentan una elevada actividad en el tracto digestivo, particularmente en el páncreas, donde contribuyen a la digestión de grandes cantidades de ARN provenientes del microbiota ruminal, facilitando así el aprovechamiento de los nutrientes derivados de la celulosa. [2]. Debido a sus propiedades catalíticas y, en algunos casos, citotóxicas, ciertas ribonucleasas han sido ampliamente utilizadas en investigación biomédica y evaluadas como agentes terapéuticos en el tratamiento de tumores sólidos avanzados, así como en enfermedades infecciosas y cáncer [3].

La ribonucleasa A pancreática bovina (RNasa A) fue una de las proteínas más estudiadas durante el siglo XX y constituyó un modelo fundamental para el desarrollo de la biología molecular. Su elevada estabilidad, tamaño reducido y estructura tridimensional bien definida la convirtieron en un sistema ideal para el estudio de la catálisis enzimática, el plegamiento de proteínas, la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y los procesos de oligomerización proteica [2]. Esta enzima cataliza la hidrólisis del ARN en residuos de citosina y uracilo, mediante la ruptura del enlace fosfodiéster entre el grupo fosfato 3' de la pirimidina y el grupo hidroxilo 5' del nucleótido adyacente, lo que permite su uso rutinario en protocolos de purificación de ADN libre de ARN [4].

Históricamente, la RNasa A se obtenía a partir de extractos de páncreas bovino, seguida de procesos de precipitación con sulfato de amonio y múltiples etapas de recristalización y purificación con ácidos y sales. Este procedimiento era poco eficiente, ya que a partir de aproximadamente 9.07 kg de páncreas solo se lograban obtener alrededor de 3 gramos de proteína purificada, requiriendo además varios días o semanas de procesamiento [5].

Como alternativa a estas limitaciones, a partir de la década de 1970 surgieron los primeros estudios sobre bacterias genéticamente modificadas para la producción de proteínas recombinantes [6]. En 1979, Goeddel logró la producción de insulina humana recombinante en *Escherichia coli* la cual fue comercializada en 1982, marcando un hito en la biotecnología moderna [7]. El uso de bacterias como sistemas de expresión permite reducir costos económicos y ambientales, eliminar la dependencia de fuentes biológicas limitadas y acelerar los procesos de investigación y producción a gran escala [8].

E. coli es uno de los microorganismos más utilizados para la producción de proteínas recombinantes debido a su rápido crecimiento, facilidad de cultivo y amplio conocimiento de su fisiología y metabolismo [9, 10]. Sistemas de expresión como el vector pET, basado en el promotor T7 y la ARN polimerasa T7, permiten una expresión eficiente del gen de interés en la célula huésped [10].

En el presente estudio se proponen metodologías para la producción, purificación y evaluación de la actividad catalítica de la ribonucleasa A recombinante, empleando sistemas bacterianos de expresión

1. Objetivos

1.1 *Objetivo General*

Establecer un protocolo de expresión y purificación de RNasa en la Universidad Industrial de Santander.

1.2 *Objetivos Específicos*

- Establecer condiciones de cultivo para la expresión de RNasa recombinante en bacterias NiCo 21.
- Proponer un protocolo para la purificación de RNasa usando técnicas cromatográficas.
- Proponer un protocolo para medición de actividad catalítica de la proteína RNasa.

2. Marco teórico

Las ribonucleasas participan en múltiples reacciones de maduración y formación del ARN. Se encargan de degradar cadenas de ARN de bacterias grampositivas y gramnegativa. Según el tipo de escisión se clasifican en exonucleasas (cortan las cadenas de ARN en los extremos 3P o 5P) o endonucleasas (cortan los fosfodiésteres en el interior de la cadena de ARN) [11]. El sitio de escisión puede determinar la vida media, estabilidad y función del ARN [12]. Las Endo ribonucleasas generalmente requieren cationes divalentes para cortar el ARN y producen cadenas más cortas con extremos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato. Algunas ribonucleasas son muy específicas en sus sitios de acción y escisión mientras que otras lo realizan indiscriminadamente. Las exonucleasas registradas en E.Coli digieren ARN en dirección 3'-5' [13].

Poseen actividades terapéuticas biológicas, como antitumorales, anti proliferativas, antivirales, inmunosupresoras, antifúngicas, anti angiogénicas e inductoras de apoptosis [11].

Procesan y controlan la maduración y degradación del ARN [12]. Dependiendo del tipo de reacción que se requiera intervienen distintas ribonucleasas [13], pueden ser intracelulares o extracelulares.

Las ribonucleasas intracelulares se encuentran en el citoplasma, el núcleo y la mitocondria. Se encargan de procesar, madurar y editar en ARN; degradan ARNm, ARN no funcional y participan en el recambio del ARNr. Las ribonucleasas extracelulares se encuentran en sangre, fluidos y en el espacio extracelular. Se encargan de la protección, regulación y defensa de las células sanas ante virus, células tumorales y células dañadas [11].).

2.1 Ribonucleasa A

La Ribonucleasa A está formada por una cadena polipeptídica de 124 residuos, reticulada por 4 enlaces disulfuro que le generan estabilidad a la molécula. Tiene un peso molecular de 13.7 kDa y está compuesta de largas láminas β antiparalelas de cuatro hebras, tres hélices α cortas en su estructura secundaria y posee 19 aminoácidos fundamentales a lo largo de su estructura [2].

La RNasa A emplea catálisis ácido-base para hidrolizar enlaces fosfodiéster en el ARN. Durante la reacción, los residuos de histidina en el sitio activo transfieren protones para facilitar la formación del estado de transición, estabilizar cargas y reducir la energía de activación, lo que favorece la escisión del enlace y la generación de un mejor grupo saliente [3]. Moléculas como la RNasa A, pueden realizar mayor número de reacciones gracias a esa presencia de residuos de histidina, los cuales tienen la capacidad de modificar el pKa [14].

La histidina es un residuo comúnmente involucrado en la catálisis debido a su capacidad para donar o aceptar protones a pH fisiológico. Gracias a su pKa cercano a la neutralidad ($pK_a = 6$) [3], es posible que actúe como ácido o base durante la reacción, lo que hace que el proceso sea altamente dependiente del pH [2].

2.2 Aplicaciones y necesidades

El estudio de las RNasas es de interés debido a su papel antiviral. Gracias a su carácter catiónico, pueden unirse a la superficie celular, ingresar al citosol y degradar el RNA, lo que induce la muerte celular [15].

Entre sus mecanismos antivirales se incluyen su acción citotóxica sobre la célula blanco lo que limita la replicación viral; y su acción quimiotáctica, que conduce a la inflamación mediada por la neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), la EDN refuerza las defensas y activa mecanismos que favorecen la eliminación del virus [16].

En la figura 1 a manera de ejemplo se puede observar la función de la familia de RNasas en diferentes enfermedades.

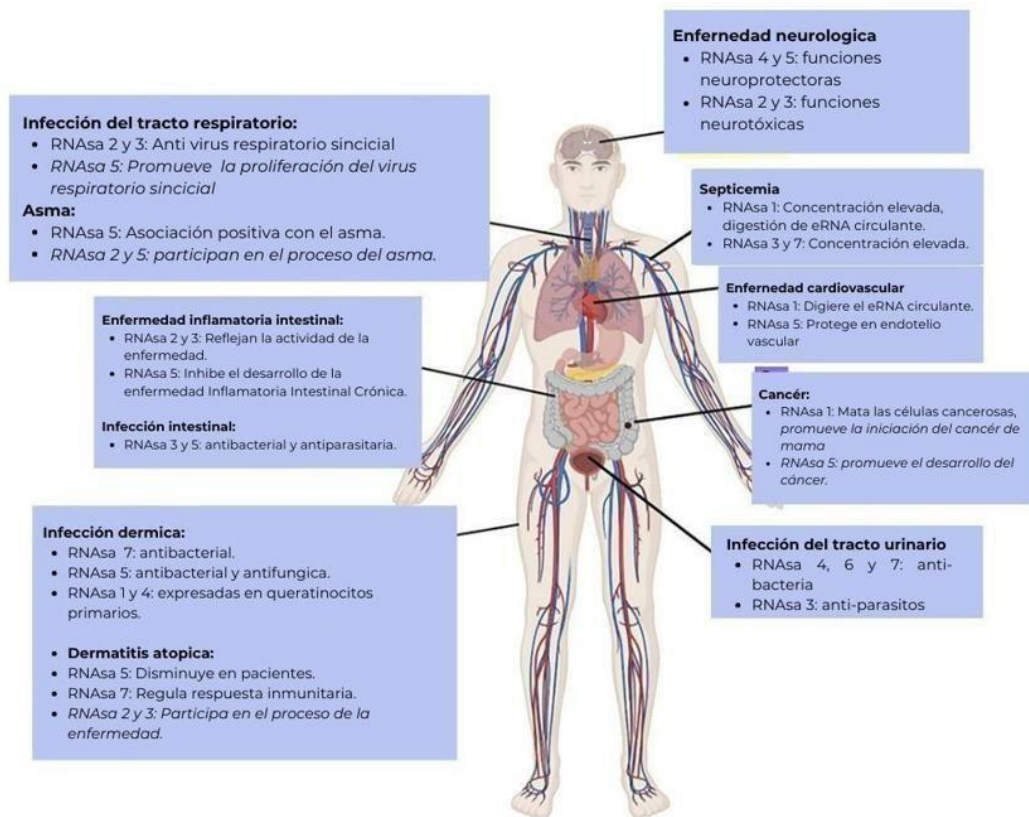
El primer registro del potencial terapéutico de las RNasas se obtuvo con el uso de la RNasa 1 en el tratamiento de la encefalitis transmitida por garrapatas (Tick-borne encephalitis). El rápido alivio de los síntomas meníngeos y la reducción de la pleocitosis en el líquido cerebroespinal marcaron el inicio de más estudios en esta dirección, incluyendo evaluaciones en modelos tumorales, tanto in vitro como in vivo [3].

Se han empleado diferentes variantes de la RNasa para analizar su actividad antitumoral, así como sus perfiles de toxicidad [3]. También se ha estudiado su papel en la regulación de la síntesis de proteínas celulares debido a su actividad catalítica. En el área de enzimología, el estudio del plegamiento, estabilidad, química proteica y evolución molecular de las RNasas ha contribuido al desarrollo de estrategias como la mutagénesis dirigida por sitios y la semisíntesis [17].

Las tecnologías actuales han permitido que el ADN recombinante sea fundamental en diversos campos. Un ejemplo destacado es CRISPR-Cas9, una herramienta utilizada para editar o eliminar secuencias de ADN [18].

Figura 1

Función de la familia de la RNasa A en enfermedades [19].



2.2.1 Mecanismo de reacción.

La actividad catalítica de la RNasa A se refiere a la capacidad de la enzima para formar un complejo enzima-sustrato en el sitio activo de una reacción a medida que avanza el tiempo.

De acuerdo con el modelo de Michaelis-Menten, la velocidad de reacción aumenta proporcionalmente con la concentración de sustrato a bajas concentraciones. Sin embargo, al incrementarse progresivamente la concentración de sustrato, la enzima alcanza un estado de saturación logrando su máxima capacidad catalítica, siendo así que aumentos en la concentración de sustrato ya no generan variación en la velocidad de la reacción [20].

Igualmente, el pH, la temperatura y la carga electrostática del sustrato influyen en la funcionalidad de la enzima. Entre más expuesta este a sustratos cargados tendrá mayores tasas de conversión, así mismo el pH al que se encuentre la enzima determina la exposición de su sitio activo [21]. La dinámica estructural del complejo afecta significativamente la actividad específica, en condiciones celulares reales el flujo del sustrato puede un factor limitante para la reacción [22, 23].

2.3 Producción de proteínas recombinantes en bacterias

La producción de proteínas recombinantes en bacterias constituye una de las estrategias más utilizadas en biotecnología, tanto a nivel académico como industrial, debido a su eficiencia, bajo costo y facilidad de escalamiento [24, 25, 26]. Este enfoque se basa en la introducción de un gen de interés en un sistema de expresión bacteriano, generalmente *E. coli*, mediante vectores diseñados para permitir su replicación y expresión de manera controlada.

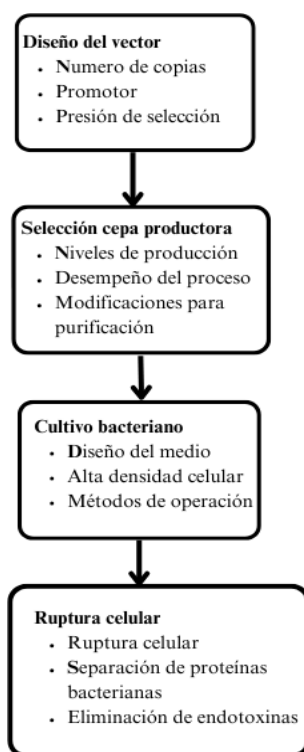
La elección de este sistema se fundamenta en su rápido crecimiento, el amplio conocimiento disponible sobre su fisiología y metabolismo, y la disponibilidad de herramientas moleculares bien establecidas, lo que facilita la manipulación genética y la obtención de altos rendimientos de proteína recombinante.

Para la producción eficiente de proteínas recombinantes, es fundamental seleccionar un sistema de expresión adecuado, el cual está constituido por un vector de expresión, un promotor, secuencias reguladoras y el gen que codifica la proteína de interés [10]. La correcta interacción entre estos elementos determina la eficiencia de la expresión, la estabilidad del producto y la facilidad de recuperación de la proteína.

Los vectores de expresión pueden incorporar o no etiquetas de afinidad, las cuales facilitan la detección, extracción y purificación de la proteína recombinante, dependiendo del diseño experimental y del propósito del estudio. No obstante, el éxito del proceso de expresión depende de múltiples factores, como el diseño del vector, el promotor utilizado, las condiciones de cultivo y las características fisicoquímicas de la proteína producida, los cuales deben ser cuidadosamente considerados y optimizados de acuerdo con los recursos disponibles y los objetivos específicos de la investigación [27].

Figura 2

Esquema general de las etapas involucradas en la producción de una proteína recombinante [10].



2.3.1 Vector de expresión.

Los vectores de expresión son herramientas moleculares diseñadas para permitir no solo la clonación, sino también la transcripción y traducción eficiente de un gen de interés en una célula huésped. A diferencia de los vectores de clonación convencionales, los vectores de expresión contienen señales regulatorias específicas, tales como promotores, sitios de unión al ribosoma (RBS), terminadores de transcripción y elementos reguladores adicionales que controlan el nivel y el momento de la expresión génica [28].

Estas moléculas de ADN se introducen en una célula huésped, comúnmente bacterias como *E. coli*, donde se replican de manera autónoma. A medida que la célula crece y se divide,

el gen clonado se replica junto con el vector, permitiendo la producción de múltiples copias del ADN recombinante y, bajo condiciones adecuadas, la expresión de la proteína de interés [29].

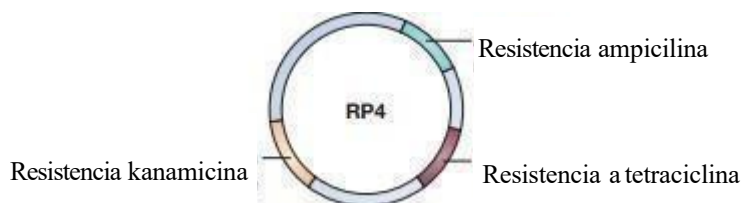
En sistemas bacterianos, se prefieren vectores de tamaño reducido, ya que presentan una mayor estabilidad estructural, menor probabilidad de recombinación y facilitan los procesos de purificación.

En este contexto, los plásmidos constituyen los vectores más utilizados para la producción de proteínas recombinantes. Los plásmidos son moléculas de ADN circular extra cromosómico que suelen portar genes de resistencia a antibióticos, los cuales permiten la selección de las bacterias transformadas que contienen el vector [29].

La presencia de un marcador de selección es fundamental en cultivos bacterianos, dado que la pérdida del plásmido durante la división celular puede ocurrir en ausencia de presión selectiva. Las células que carecen del plásmido presentan una menor carga metabólica y, en consecuencia, pueden crecer más rápidamente que las células portadoras, desplazándolas en el cultivo y reduciendo el rendimiento de la proteína recombinante [3].

Figura 3

Plásmido con genes de resistencia a los antibióticos [29].



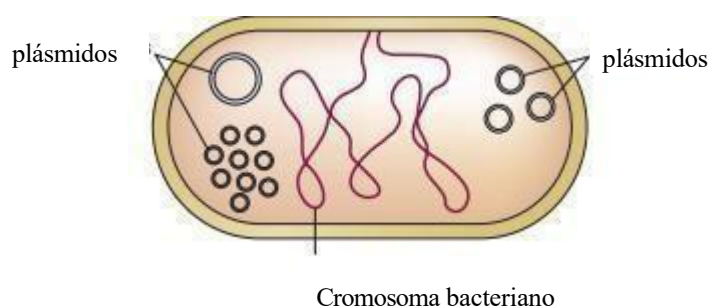
A diferencia de los fagos, los vectores plasmídicos bacterianos son extra cromosómicos y se replican de manera autónoma respecto al cromosoma. Algunos plásmidos de gran tamaño

contienen genes que codifican enzimas específicas implicadas en su replicación, lo que les confiere estabilidad y capacidad de mantenimiento dentro de la célula huésped [29].

Estas propiedades los hacen especialmente útiles como vectores de expresión para la producción de proteínas recombinantes, ya que permiten la copia y expresión eficiente del gen de interés sin interferir con el genoma bacteriano.

Figura 4

Diferentes elementos que componen la bacteria [29].



El número de copias de un plásmido puede variar según su origen de replicación, el tipo de bacteria y la proteína de interés, y en algunos casos puede superar las 500 copias por célula [10].

Un alto número de copias generalmente se traduce en una mayor cantidad de transcritos del gen de interés; sin embargo, también impone una carga metabólica significativa sobre la célula huésped, lo que puede reducir la velocidad de crecimiento y el rendimiento de biomasa. Además del origen de replicación, el número de copias de un plásmido está influenciado por las condiciones ambientales y el estado fisiológico de la bacteria, factores que deben considerarse al diseñar sistemas de expresión recombinante [9].

Figura 5

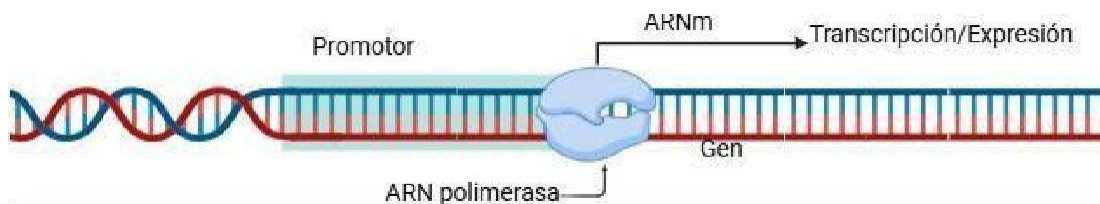
[illegible]

2.3.1.1. Promotor.

Los promotores son regiones cercanas al gen donde se unen proteínas responsables de la transcripción, regulando así los niveles de expresión génica (Figura 6). El grado de expresión de una proteína depende directamente del promotor utilizado en la bacteria [31]. Una expresión excesivamente alta del gen heterólogo puede provocar la formación de cuerpos de inclusión. Si estos son deseados, pueden facilitar la purificación de la proteína recombinante; de lo contrario, requieren pasos adicionales para asegurar su correcto plegamiento y la obtención del producto final [10].

Figura 6

Mecanismo de acción de un promotor. Adaptado en Biorender [33].



La expresión basal del promotor es un factor crítico, ya que niveles bajos facilitan el control de inducción mediante cambios en las condiciones de cultivo, minimizando efectos tóxicos y optimizando la producción de proteína recombinante [10].

La inducción de la expresión puede regularse mediante variaciones de temperatura. En grandes escalas de producción, el aumento de temperatura permite controlar con precisión el momento de inducción, generalmente cuando se alcanza una densidad celular óptima, reduciendo costos al evitar la adición de otros reactivos. Sin embargo, en biorreactores de gran volumen, el calentamiento es más lento, lo que puede favorecer la producción de proteína recombinante pero también generar estrés fisiológico en las células, limitando su crecimiento y afectando sus

funciones metabólicas [34]. Por otro lado, la inducción a bajas temperaturas mejora la solubilidad del oxígeno aproximadamente un 33% respecto a los 37 °C usados normalmente [10].

El promotor T7 es una secuencia de ADN de 18 pares de bases que se extiende hasta el sitio de inicio de la transcripción. Algunos vectores basados en el sistema T7 bacteriano incluyen opciones de doble etiqueta para proteínas de fusión, resistencia a ampicilina, el terminador transcripcional T1T2, el origen de replicación pMB1 (derivado de pBR322), el origen fl y el gen lacI, que regula la represión del promotor T7 [29]. En bacterias, el represor LacI se une al operador, evitando la interacción de la polimerasa con el promotor debido a un impedimento estérico.

El isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) es un análogo químico de la lactosa que no puede ser hidrolizado por la enzima β -galactosidasa. Su función principal es inducir el operón lac de *E. coli*, inhibiendo al represor LacI y liberando el operador lac. Esto permite la transcripción de los genes del operón a niveles elevados en presencia de IPTG [34]. Este inductor se utiliza ampliamente para la expresión de proteínas heterólogas en sistemas regulados por la ARN polimerasa T7, ya que no participa en las rutas metabólicas de la lactosa y permanece en el medio, manteniendo la inducción de proteínas de manera constante [35].

2.3.2 Cepa

La selección de la cepa huésped es un factor crítico en la producción de proteínas recombinantes, ya que el fenotipo y el genotipo del organismo influyen directamente en los niveles de expresión, estabilidad y plegamiento de la proteína de interés. *Escherichia coli* es uno de los sistemas de expresión más utilizados debido a su rápido crecimiento, facilidad de manipulación genética y amplia disponibilidad de herramientas moleculares.

La RNasa A posee múltiples puentes disulfuro esenciales para su estabilidad estructural y actividad catalítica. Para favorecer la formación de este tipo de enlaces, algunas cepas modificadas, como SHuffle T7, contienen mutaciones en sistemas reductores celulares que promueven el plegamiento oxidativo de proteínas en el citoplasma bacteriano [36].

En este estudio se empleó la cepa E. coli NiCo21(DE3) para la expresión recombinante de RNasa A utilizando el vector pET22b bajo el control del promotor T7 [10]. Esta cepa fue desarrollada para reducir la presencia de proteínas bacterianas endógenas ricas en histidina durante la purificación por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC), mejorando así la pureza de las proteínas recombinantes. Adicionalmente, el vector pET22b dirige la proteína recombinante al espacio periplásmico mediante la secuencia señal pelB, donde el ambiente oxidante favorece la correcta formación de enlaces disulfuro. [36]

2.3.3 Cultivo bacteriano

El medio de cultivo es esencial para el adecuado crecimiento y división celular de las bacterias. Cuando los nutrientes se encuentran a concentraciones óptimas, las bacterias pueden desarrollarse sin inconvenientes y alcanzar la fase logarítmica, momento ideal para la inducción de la expresión de proteínas recombinantes [29]. La composición del medio debe asegurar la presencia de elementos esenciales como carbono, nitrógeno, fósforo, azufre, potasio y magnesio [10].

Uno de los medios más utilizados para el crecimiento de E. coli, incluyendo la cepa Nico21, es Luria-Bertani (LB). Este medio es versátil y no requiere suplementos adicionales, facilitando su uso en diferentes bacterias [29]. Su composición incluye peptona, obtenida mediante digestión ácida o enzimática de proteínas de origen animal o vegetal. La peptona es

rica en triptófano y otros aminoácidos esenciales, como lisina y metionina, y junto con el extracto de levadura, proporciona fuentes de nitrógeno, azúcares y nutrientes orgánicos e inorgánicos necesarios para el crecimiento bacteriano [39].

El control del cultivo se realiza mediante la medición de la densidad óptica (OD). En condiciones estándar (37 °C, agitación orbital de 150–250 rpm con medio LB), las células de *E. coli* Nico21 presentan un tiempo de duplicación aproximado de 20 minutos. A una longitud de onda de 600 nm, 1 unidad de OD corresponde aproximadamente a $0,8 \times 10^9$ células/mL, permitiendo calcular la densidad celular y determinar el momento óptimo de inducción [29].

$$A = \text{Log}_{10} \frac{I_0}{I}$$

de proteínas recombinantes requiere, como primer paso, la lisis celular para liberar el contenido intracelular. Esta puede lograrse mediante métodos físicos, como fuerzas mecánicas, o mediante métodos químicos que debilitan la pared celular y la membrana plasmática [29].

En *E. coli*, el debilitamiento de la pared celular puede realizarse utilizando ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un agente quelante que se une a iones de magnesio (Mg^{2+}) e inhibe la actividad de las DNAsas. Una vez liberado el contenido celular, los restos de la célula se eliminan mediante centrifugación, dejando un sobrenadante más claro donde se encuentra presente la proteína recombinante de interés, en este caso la RNasa A [38].

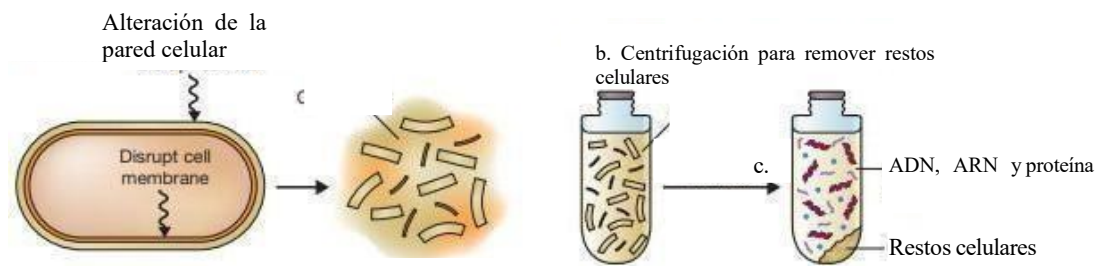
2.3.4 Purificación de la proteína

La purificación de proteínas recombinantes requiere, como primer paso, la lisis celular para liberar el contenido intracelular. Esta puede lograrse mediante métodos físicos, como fuerzas

mecánicas, o mediante métodos químicos que debilitan la pared celular y la membrana plasmática [28].

Figura 7

Pasos para la obtención de proteína [34].



2.3.4.1. Choque osmótico.

El choque osmótico es un método de lisis celular utilizado para liberar proteínas localizadas en el espacio periplásmico de bacterias como *E. coli*. Este método se basa en un cambio rápido en la presión osmótica, que provoca la entrada de agua en la célula y genera lisis selectiva de la membrana, permitiendo liberar la proteína recombinante sin dañar en exceso otras estructuras celulares [34].

Para optimizar la extracción, se emplean soluciones con distintas fuerzas iónicas, que pueden contener compuestos iónicos o no iónicos según las propiedades fisicoquímicas de la proteína de interés. La osmolaridad de la solución depende de la concentración de solutos extracelulares, la densidad celular y la cantidad de proteína producida. En condiciones de alta osmolaridad, las bacterias sintetizan o transportan osmólitos pequeños, que actúan como estabilizadores proteicos, promoviendo el correcto plegamiento de las proteínas y reduciendo su agregación, de manera similar a la función de las chaperonas moleculares [36].

2.3.4.2. Cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC).

La cromatografía líquida de proteínas de alta resolución (FPLC) es una técnica ampliamente utilizada para la purificación de proteínas con alta resolución, reproducibilidad y escalamiento [37].

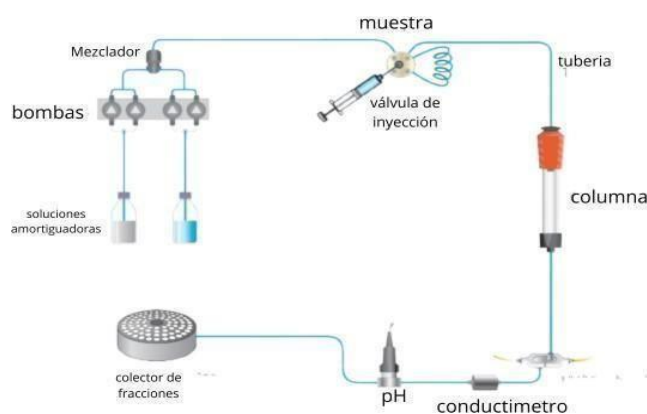
En la FPLC, la fase estacionaria está compuesta por perlas de pequeño diámetro, empaquetadas en columnas de vidrio o plástico, mientras que la fase móvil consiste en soluciones tampón que fluyen a través de la columna. Dado que la composición de la solución tampón se puede mantener constante con frecuencia, se utilizan gradientes de soluciones tampón para optimizar la separación y purificación de proteínas en función de sus propiedades físicas.

Esta tecnología es versátil y permite la aplicación de diferentes modos cromatográficos según la función requerida, incluyendo aquellos que eliminan el color correcto, el color de intercambio iónico y el color exclusivo para todos. La FPLC puede utilizarse en diferentes escalas, desde la obtención de miligramos hasta varios gramos de proteína, con volúmenes de columna que varían desde 5 mL hasta varios litros, lo que resulta en el rendimiento deseado [41].

En este estudio, se utiliza FPLC para la purificación de RNasa A recombinante, optimizando el proceso de separación y asegurando un producto final de alta pureza y actividad biológica.

Figura 8

Montaje del equipo de FPLC. Tomado de cytiva [42]



2.3.4.3. **Cromatografía intercambio iónico.**

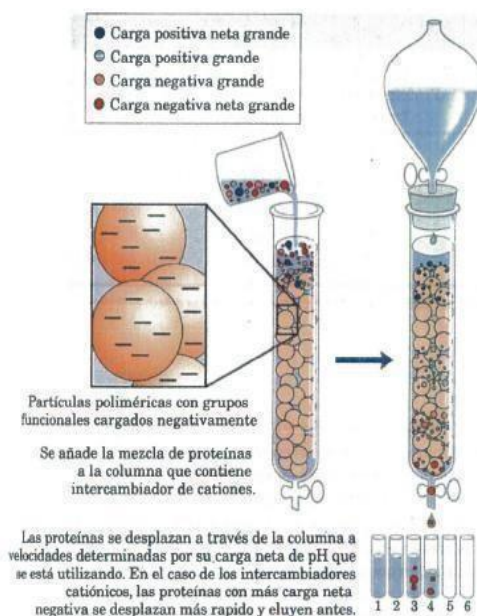
La cromatografía de intercambio iónico es una técnica ampliamente utilizada para la purificación de proteínas basada en la interacción entre las cargas superficiales de la columna y las proteínas.

En esta técnica, la fase estacionaria se realiza a partir de resinas que contienen grupos con carga positiva o negativa. Cuando la proteína de interés se coloca en una carga sobre la base de la resina, determinada por las condiciones de pH, esta permanece en la columna, aunque las proteínas ya hayan sido transportadas por el dispositivo móvil. Posteriormente, la proteína retenida puede eluirse mediante un aumento gradual de la energía iónica, generalmente mediante un gradiente de sales, o mediante cambios en el pH del tampón [43].

Existen tipos principales de cromatografía de intercambio iónico: la de intercambio catiónico, en la que la resina coloca una carga negativa y retiene las proteínas con carga positiva, y la de intercambio aniónico, donde la resina es positiva y contiene proteínas con una carga negativa. La selección del tipo de resina depende de las propiedades físicas de la proteína de interés, en particular de su punto isoelectrico [42].

Figura 9

Funcionamiento de columna de intercambio iónico [14].



La ARNasa A, cuando su punto isoeléctrico es elevado, presenta una carga neta positiva a pH fisiológico, por lo que es especialmente adecuada para su purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico. Esta tecnología, combinada con sistemas FPLC, permite obtener altos niveles de pureza, preservando la actividad catalítica de la enzima y facilitando una recuperación reproducible y eficiente.

2.3.4.4. Electroforesis SDS-PAGE.

El término electroforesis fue introducido por primera vez en 1907 por Michaelis para definir el fenómeno mediante el cual una molécula con carga neta se desplaza en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. La velocidad de migración o movilidad electroforética (u) depende de diversos factores, entre los que se incluyen la intensidad del campo eléctrico (E), la carga neta (z), el tamaño y la forma de las moléculas, así como la fuerza iónica, la viscosidad y la temperatura del medio en el cual estas se desplazan [28].

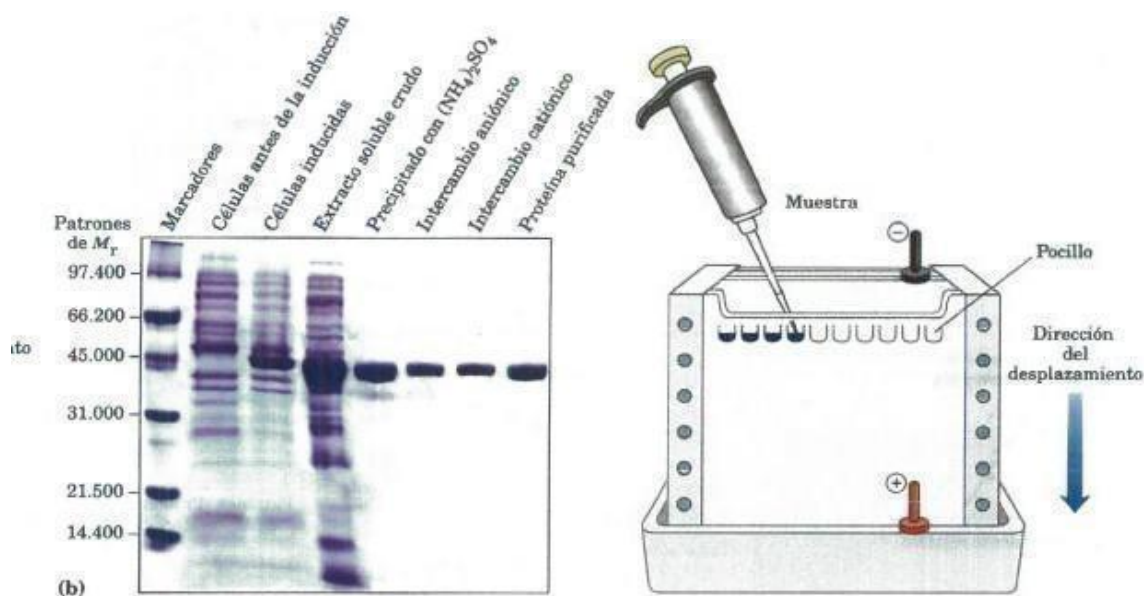
$$v = \frac{Ez}{f} \quad f = 6 * \pi * \eta * r$$

La electroforesis es una herramienta analítica simple, rápida y altamente sensible, lo que la convierte en una técnica de gran utilidad para la separación y el estudio de moléculas cargadas tales como proteínas y ácidos nucleicos

En el caso de las proteínas, migran desde el cátodo hacia el ánodo separadas en bandas correspondientes a las subunidades presentes en cada muestra. Como resultado, se obtiene una banda por cada subunidad proteica, la cual puede visualizarse mediante tinción con azul de Coomassie, un colorante que interactúa exclusivamente con las subunidades proteicas.

Figura 10

Montaje de electroforesis SDS-PAGE [12].

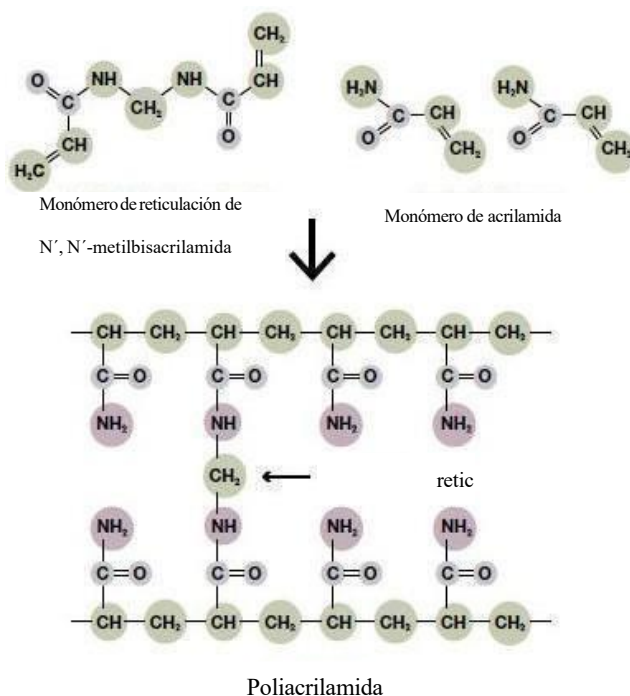


La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) permite la separación de proteínas principalmente en función de su peso molecular. En esta técnica, las proteínas son desnaturalizadas por el SDS, que se une de forma uniforme a la cadena polipeptídica, confiriéndole una carga negativa proporcional a su longitud. Posteriormente, las moléculas migran a través de un tamiz molecular de poliacrilamida [44], formado por la polimerización por radicales libres de acrilamida, utilizando bisacrilamida como agente reticulante comonomero [45].

Los geles de poliacrilamida se componen de dos secciones: un gel de concentración (stacking) y un gel de separación (resolving). El gel de stacking se utiliza para concentrar la muestra en una banda estrecha antes de iniciar la separación, asegurando que todas las proteínas comiencen la migración de forma simultánea. Posteriormente, el gel de separación permite la resolución de las proteínas según su peso molecular.

Figura 11

Polimerización de monómeros de acrilamida y bis acrilamida [45].



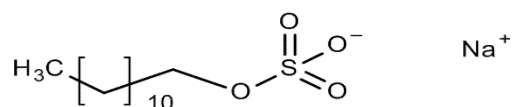
La concentración de poliacrilamida del gel varía en función del tamaño de las proteínas que se desean separar; a mayor concentración de acrilamida, menor tamaño de poro, lo que resulta adecuado para la separación de proteínas de bajo peso molecular [46].

La formación del gel se basa en una reacción de polimerización por radicales libres, iniciada por el persulfato de amonio y catalizada por la tetrametiletilendiamina (TEMED), la cual acelera la generación de radicales libres [47]. La velocidad de polimerización depende de factores como la concentración del monómero, la cantidad de catalizador, la temperatura y la pureza de los reactivos. El control adecuado de estas variables permite obtener una matriz de poliacrilamida homogénea, garantizando una distribución uniforme de los poros y una separación reproducible de las proteínas [45].

El SDS confiere una carga negativa uniforme a las proteínas al unirse de manera proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica, aproximadamente unida cada dos residuos de aminoácidos. Como resultado, se establece una relación carga/masa prácticamente constante entre las proteínas. Bajo la aplicación de un campo eléctrico, las proteínas migran desde el cátodo hacia el ánodo, separándose exclusivamente en función de su peso molecular [44].

Figura 12

Molécula de dodecil sulfato sódico (SDS) [44].

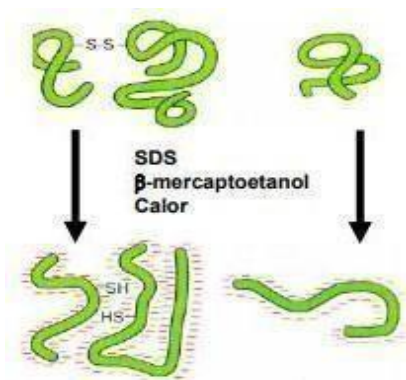


Previo a la carga de la muestra en el gel, es necesario desnaturalizar las proteínas para facilitar su separación exclusivamente en función de su peso molecular. Este proceso se logra mediante calentamiento y el uso de agentes desnaturalizantes, como el 2-mercaptoetanol, el cual

reduce los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) a grupos tioles (Cys-SH), evitando la formación de estructuras terciarias y cuaternarias. Adicionalmente, agentes caotrópicos como la urea rompen los puentes de hidrógeno, permitiendo la disociación de las proteínas en sus subunidades y favoreciendo su migración adecuada a través del gel [47].

Figura 13

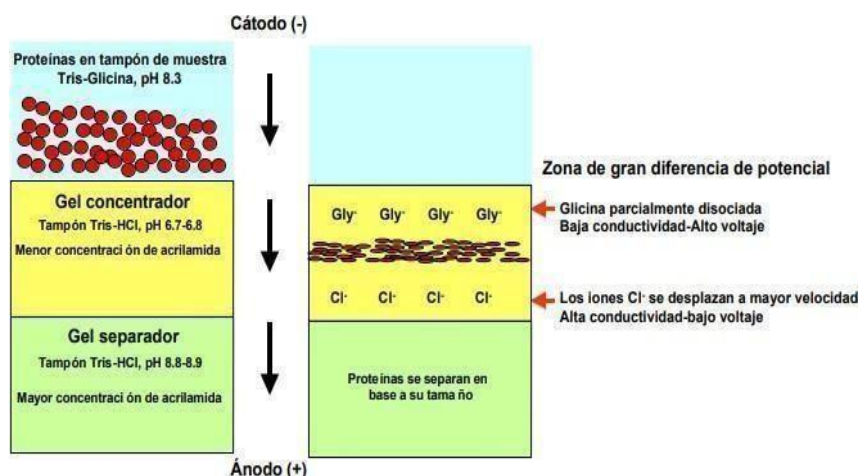
Disociación de la molécula al ser tratada con mercaptoetanol y calor. [47]



La separación se realiza mediante un sistema discontinuo, en el cual las proteínas migran entre los iones cloruro presentes en el gel de stacking y los iones glicina del tampón de corrida. Este sistema genera una zona de baja conductividad y alta diferencia de voltaje, lo que provoca la concentración de las proteínas en una banda estrecha. Al ingresar al gel de separación, el pH más básico favorece la ionización de la glicina, permitiendo que esta migre más rápidamente y que las proteínas previamente concentradas se separen de manera uniforme en función de su peso molecular [47].

Figura 14

Empaquetamiento de las proteínas en el gel de stacking [47].



Las proteínas separadas se visualizan mediante tinción con azul de Coomassie, un colorante que se une a los aminoácidos de cadenas laterales básicas (arginina, histidina, lisina) y a los grupos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina), permitiendo la observación de las bandas correspondientes a las subunidades proteicas [48]. Este método presenta una sensibilidad aproximada de hasta 50 ng de proteína. El peso molecular de la proteína de interés se determina mediante la comparación del factor de retención (R_f) de la muestra con el de proteínas patrón de peso molecular conocido, lo que permite estimar su tamaño de manera confiable [47].

$$R_f = \frac{\text{Distancia que migra una determinada proteína}}{\text{Distancia que migra el frente del gel}}$$

2.4 Actividad catalítica

La actividad catalítica describe la capacidad de una enzima para convertir moléculas de sustrato en producto por unidad de tiempo [20]. En términos cinéticos, se refiere al número de

veces que cada molécula de enzima transforma sustrato en producto por segundo. La catálisis enzimática modifica la velocidad de una reacción química sin alterar su equilibrio termodinámico. Los equilibrios de una reacción pueden representarse mediante un diagrama de coordenadas de reacción, en el cual se ilustran los cambios energéticos que experimenta el sistema a lo largo del proceso. Estos cambios se expresan en función de la energía libre de Gibbs (G). Mientras que la diferencia de energía libre determina el sentido de la reacción, la energía de activación determina la velocidad a la que esta ocurre [49]. El equilibrio de una reacción reversible se describe mediante la constante de equilibrio (K_{eq}), definida como:

$$K_{eq} = \frac{[P]}{[S]}$$

donde $[P]$ y $[S]$ corresponden a las concentraciones de producto y sustrato, respectivamente.

La velocidad de una reacción depende de la concentración de los reactivos y de una constante de velocidad (k). Cuando la velocidad depende únicamente de la concentración del sustrato, la reacción se considera de primer orden; si depende de dos especies diferentes o de la interacción entre dos moléculas del mismo compuesto, se clasifica como de segundo orden.

Desde la segunda mitad del siglo XIX, se han aprovechado procesos biológicos que involucran actividad enzimática, como la fermentación alcohólica y la transformación de azúcares [51].

Los primeros avances en el estudio de los procesos catalíticos mediados por microorganismos se consolidaron con los trabajos de Eduard Buchner en 1897, quien demostró que la fermentación alcohólica podía llevarse a cabo mediante extractos celulares libres de células vivas. Este hallazgo permitió establecer que ciertos procesos biológicos eran catalizados

por enzimas presentes en los microorganismos y constituyó uno de los fundamentos del desarrollo de la bioquímica y la enzimología moderna. [50]

En décadas más recientes, las enzimas han sido incorporadas en procesos industriales, como la producción de acrilamida mediante nitrilo hidratasa [52]. El estudio de las enzimas es de gran relevancia bioquímica, ya que estas son, en su mayoría, proteínas que regulan la velocidad de reacciones químicas fundamentales para el metabolismo celular. Los organismos vivos dependen de la ocurrencia continua de reacciones bioquímicas que requieren un aporte inicial de energía, conocida como energía de activación. Los catalizadores reducen esta barrera energética sin ser consumidos en el proceso, lo que les permite actuar repetidamente y aumentar la eficiencia de las reacciones [53].

Las enzimas son catalizadores biológicos altamente específicos, capaces de reconocer uno o pocos sustratos. Su actividad depende de la conformación tridimensional del sitio activo, el cual se ajusta de manera precisa al sustrato, facilitando la catálisis y garantizando la selectividad del proceso. Además, algunas moléculas de ácido ribonucleico (ARN) también presentan actividad catalítica, conocidas como ribozimas [53, 54].

La cinética enzimática permite comprender los mecanismos de reacción a partir de los cambios en la velocidad de reacción en función de parámetros experimentales [14]. Durante el transcurso de una reacción enzimática, la concentración de sustrato varía, y al aumentar esta concentración, la velocidad de reacción también aumenta hasta alcanzar un valor máximo (V_{max}), punto en el cual todas las moléculas de enzima se encuentran formando complejo con el sustrato.[54]

La concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción corresponde a la mitad de V_{max} se denomina constante de Michaelis (K_m) y se describe mediante la ecuación de Michaelis–Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

Esta ecuación relaciona la velocidad inicial (V_0) con la concentración de sustrato, siendo V_{max} y K_m parámetros característicos de cada enzima [14].

2.4.1. Actividad catalítica de la ribonucleasa A (RNasa A)

La RNasa A cataliza la ruptura de los enlaces fosfodiéster del ARN mediante la formación de un estado de transición con un fosfato pentavalente, seguido de la degradación de un intermediario de fosfato cíclico 2',3'. Este proceso ocurre en el sitio activo de la proteína y está mediado por tres residuos catalíticos clave: His12, Lys41 e His119 [3].

El sitio activo de la RNasa A presenta afinidad por regiones específicas del ARN monocatenario. Alrededor de este se localizan subsitios de unión enriquecidos en residuos con carga positiva, como Lys7, Arg10, Arg39, Lys41 y Lys66, que facilitan la interacción electrostática con el ARN, cuya carga negativa proviene de los grupos fosfato [55].

Adyacente al sitio activo se encuentra el residuo Treonina 45, el cual interactúa mediante enlaces de hidrógeno con bases pirimidínicas. Esta interacción limita la unión de purinas en la cadena con extremo 5'-OH debido a impedimentos estéricos, disminuyendo la velocidad de hidrólisis del ARN rico en purinas (como poli-A) en comparación con cadenas ricas en pirimidinas (como poli-U o poli-C) [3].

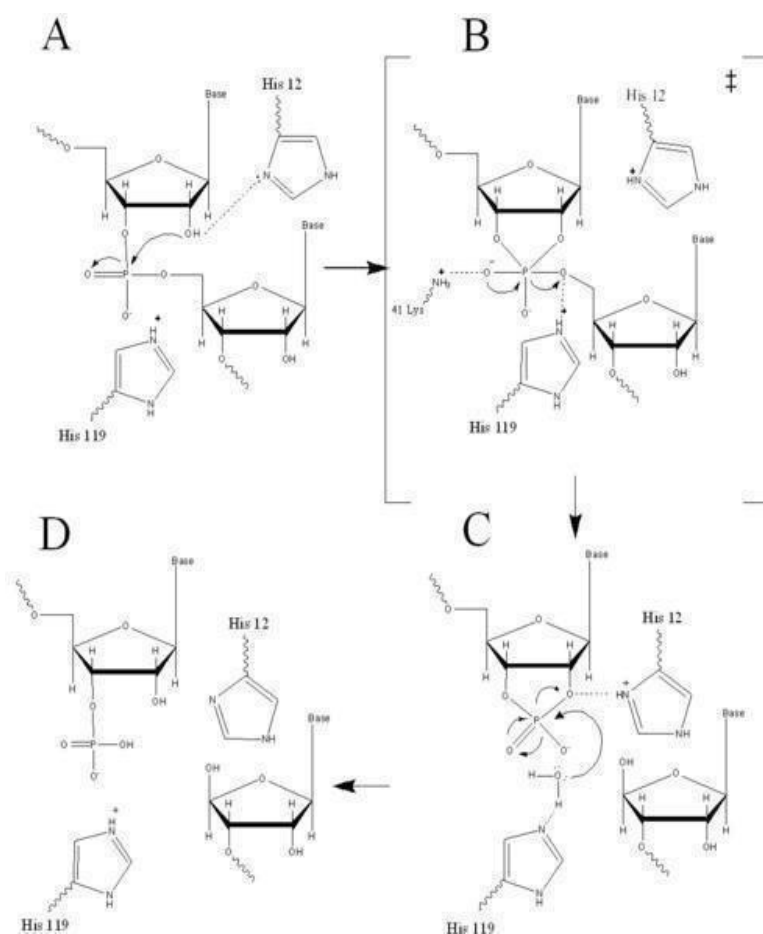
La RNasa A emplea un mecanismo de catálisis ácido-base, cuya eficiencia depende del pH y la temperatura, ya que estos factores influyen directamente en la conformación estructural de la

proteína. Cambios en estas condiciones pueden exponer o proteger el sitio activo, afectando la actividad catalítica [3, 56] Durante la reacción, His12 actúa como base al extraer un protón del grupo hidroxilo 2' del ARN, facilitando el ataque nucleofílico del oxígeno 2' sobre el átomo de fósforo. El estado de transición es estabilizado por Lys41 y por el nitrógeno amida de la cadena principal de Phe120. Posteriormente, His119 actúa como ácido, protonando el oxígeno 5' de la ribosa y dando lugar a la formación del intermediario de fosfato cíclico 2',3' [3].

En una reacción secundaria e independiente, el fosfato cíclico 2',3' es hidrolizado para generar un fosfato 2' y un hidroxilo 3'. En esta etapa, His12 dona un protón al oxígeno 3', mientras que His119 activa una molécula de agua al sustraerle un protón. El agua activada ataca nucleofílicamente al fosfato cíclico, provocando su escisión y liberando un nucleótido con un grupo fosfato terminal [3]. Este mecanismo se ilustra en la Figura 15.

Figura 15

Catálisis de la RNasa A. (A) Ataque del hidroxilo 2' estabilizado por His 12. (B) Intermedio fósforo pentavalente. (C) Degradación del intermedio cíclico 2' 3'. (D) Producto final dos secuencias de nucleótidos distintas [2, 58].



3. Metodología

La metodología experimental realizada en este trabajo de investigación se ilustra de manera general en la figura 16.

Figura 16

Esquema metodología general.



3.1. Materiales

El plásmido pET22b que contiene el gen de RNasa A fue adquirido comercialmente en addgene [83] y se utilizó para transformar las cepas de *E. coli*.

E. coli DH5 alfa, y NiCo21(DE3) fueron adquiridos comercialmente de Monarc y almacenadas a -80 ° C en glicerol al 10%.

La enzima RNasa A empleada para pruebas de actividad fue adquirida comercialmente en Merck como referencia.

3.2. Reactivos

Los reactivos como cloruro de sodio, extracto de levadura y peptona, acrilamida; tris e isopropanol fueron adquiridos comercialmente por Merck, Thermo Scientific y Panreac.

3.3. Extracción del plásmido (bacteria no competente)

La extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando el kit de preparación de plásmidos Monarch (New England Biolabs) [59], siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cepa bacteriana no competente se cultivó en medio LB suplementado con ampicilina a 37 °C durante 16 horas, seguidamente, el cultivo se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El pellet celular se resuspendió cuidadosamente en 200 µL de buffer de resuspensión (B1) hasta obtener una suspensión homogénea, y se añadieron 200 µL de buffer de lisis (B2), mezclando suavemente por inversión sin usar vortex, hasta que la mezcla adquirió una coloración rosa viscosa. La suspensión se incubó durante 1 minuto para prevenir la desnaturalización irreversible del ADN plasmídico. Seguidamente, se añadieron 400 µL de buffer de neutralización (B3), homogeneizando suavemente hasta lograr un color uniforme y permitiendo la formación de un precipitado; la mezcla se incubó durante 2 minutos y se centrifugó a 16,000 g durante 2-5 minutos, obteniéndose un sobrenadante claro que se transfirió a la columna de purificación. La columna se centrifugó durante 1 minuto y se descartó el flujo a través; a continuación, se reincorporó al tubo de recolección y se añadieron 200 µL de buffer de lavado 1, incubando durante 5 minutos antes de centrifugar nuevamente 1 minuto para eliminar ARN, proteínas y endotoxinas. Posteriormente, se añadieron 400 µL de buffer de lavado 2 y se repitió la centrifugación durante 1 minuto. Finalmente, la columna se colocó en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL, se añadieron 30 µL de buffer de elución en el centro de la matriz para cubrirla completamente y se incubó 1 minuto, tras lo cual se centrifugó durante 1 minuto para obtener el ADN plasmídico eludido en agua libre de nucleasas (pH 7–8.5).

3.4. Transformación

La transformación de *E. coli* NiCo21(DE3) se realizó utilizando células competentes comerciales, las cuales se descongelaron en hielo durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 2 µL de ADN plasmídico y la mezcla se homogenizó suavemente mediante 4–5 inversiones del

tubo, evitando el uso de vortex, y se mantuvo en hielo por 30 minutos sin agitación. Transcurrido este tiempo, se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 10 segundos y de inmediato la suspensión se colocó nuevamente en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadieron 950 µL de caldo super óptimo con represor de catabolito (SOC) estéril y el cultivo se incubó en un agitador orbital a 37 °C y 250 rpm durante 1 hora. Finalizado este periodo, las células se mezclaron cuidadosamente mediante inversiones del tubo, se tomó una proporción 1:1 en SOC y se sembraron 50–100 µL de la dilución sobre placas de medio Luria-Bertani (LB) suplementadas con ampicilina (0.1 mg/mL). Las placas se incubaron durante la noche a 37 °C hasta la aparición de colonias.

3.5. Inducción de la expresión proteica.

Previo al proceso de inducción, una colonia bacteriana transformante (1 Unidad Formadora de Colonia, UFC) se inoculó en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB) líquido suplementado con ampicilina y se incubó a 37 °C con agitación orbital a 200 rpm durante 16 horas. Posteriormente, el cultivo se diluyó en una proporción 1:100 en medio LB fresco y se incubó nuevamente bajo las mismas condiciones hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento. La densidad óptica se midió a una longitud de onda de 600 nm (OD_{600}) y, al alcanzar un valor aproximado de 0.7, se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). Se evaluaron diferentes condiciones de tiempo y temperatura con el fin de optimizar la expresión de la proteína recombinante. Tras la inducción, los cultivos se incubaron con agitación a 200 rpm.

3.6. Extracción de proteína recombinante (bacteria competente)

Tras finalizar la inducción, el cultivo se centrifugó a 7650 rpm durante 30 min a 4°C, separándose el sobrenadante del pellet celular. Con el objetivo de obtener la proteína recombinante, ensayaron tres metodologías: choque osmótico, tratamiento con detergentes y sonicación

descritas a continuación.

3.6.1. Método de choque osmótico:

La extracción periplásmica de la proteína recombinante se realizó mediante el método de choque osmótico. El pellet celular se resuspendió en un tónico compuesto por Tris-HCl 30 mM, sacarosa al 20 % (p/v) y EDTA 1 mM (pH 8.0), en una proporción 1:50 con respecto al volumen inicial del cultivo. La suspensión se incubó en baño de hielo durante 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 7650 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido se recuperó para la cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford [60], utilizando albúmina sérica bovina (BSA) como patrón estándar y el buffer hipertónico como blanco y diluyente. El pellet resultante se resuspendió nuevamente en un buffer hipotónico de MgSO₄ 5 mM, manteniendo la misma proporción 1:50, y se incubó durante 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, la suspensión se centrifugó en las mismas condiciones, y el sobrenadante obtenido se almacenó a 4 °C para su posterior cuantificación y análisis.

3.6.2. Método con detergentes:

Se evaluaron cuatro ensayos diferentes, los cuales se describen en la [Tabla 1](#). En cada caso, el pellet celular se trató con detergentes no iónicos, Triton X-100 y Tween 80, en una proporción 1:5 con respecto al volumen celular. Las suspensiones se mantuvieron en baño de hielo durante 10 y 20 minutos, según el surfactante utilizado. Finalizado el tiempo de incubación, las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, y los sobrenadantes obtenidos se recuperaron para su posterior análisis de contenido proteico.

Tabla 1.

Metodologías implementadas para la extracción con detergentes de la proteína soluble de E. coli transformadas con el plásmido de expresión de la RNasa.

Numero de ensayo	Detergente	Tiempo[min]	Concentración
1	Tritonx 100	10	0.5%
2		20	
3	Tween80	10	
4		20	

3.6.3. Sonicación:

El pellet celular se re suspendió en buffer hipertónico en una proporción 1:50 respecto al volumen inicial del cultivo. La suspensión se sometió a sonicación durante 30 min, aplicando ciclos de 20 S ON y 40 S OFF, con una amplitud de 80%. Finalizado el proceso, la muestra se etiquetó y se filtró para su posterior purificación.

3.7. Caracterización y confirmación de identidad

La caracterización e identificación de proteínas se realizó mediante cromatografía líquida de proteínas rápida (FPLC) y la electroforesis SDS PAGE. Finalmente, la posterior identificación de la proteína de interés. Estas metodologías constituyen herramientas clave para avanzar desde la detección inicial de una proteína hasta su caracterización funcional y estructural.

3.7.1. *Purificación proteica mediante Cromatografía Líquida Rápida de Proteínas (FPLC).*

La proteína recombinante se purificó utilizando un sistema de cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) con una columna de intercambio catiónico HiTrap SP HP de 5 mL. La separación cromatográfica se realizó utilizando un flujo de 0,5 mL/min, valor inferior al rango operacional recomendado para columnas HiTrap SP HP de 5 mL. Sin embargo, esta condición se seleccionó con el fin de favorecer una interacción más controlada entre la proteína y la fase estacionaria, minimizar fluctuaciones de presión durante el proceso y preservar la estabilidad de la muestra proteica durante la purificación. Previo al inicio del gradiente, la columna se equilibró con cinco volúmenes de agua tipo I hasta que la absorbancia a 280 nm y la conductividad alcanzaron valores cercanos a cero. Posteriormente, se conectaron las líneas del sistema al buffer A y al buffer B (Tabla 2), iniciando el gradiente de elución según el protocolo establecido. Las fracciones obtenidas, aproximadamente 20, se recolectaron en tubos Falcon de 15 mL mediante el fraccionador automático del sistema. Una vez finalizado el procedimiento, la columna y el sistema se lavaron con cinco volúmenes de agua tipo I y se almacenaron en etanol al 20 % para su conservación.

Tabla 2.

Buffers usados para la separación de la proteína soluble de E. coli transformadas con el plásmido de expresión de la RNasa.

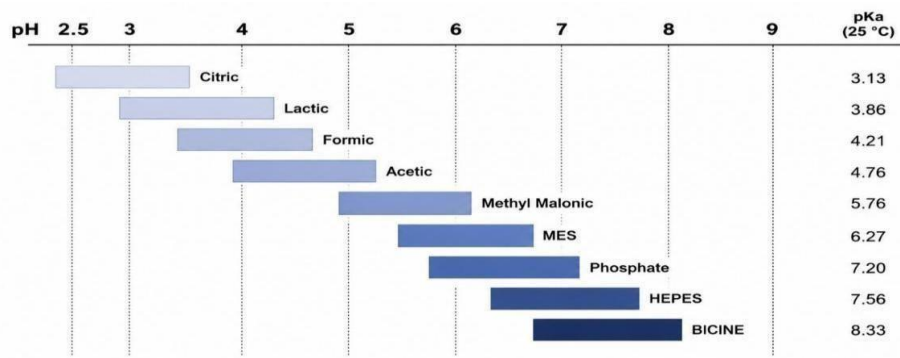
Buffer	Componentes	pH	Concentración
A	Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)	7.48	50 mM
B	Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4) Cloruro de sodio (NaCl)	7.48	50 mM 1 M

Figura 17

Buffers propuestos por cytiva para la columna de intercambio de intercambio catiónico HiTrap SP HP de 5 mL.[63]

Intervalo de pH	Sustancia	Conc. (mM)	Contraión	pKa (25 °C) ¹
1.4 – 2.4	Ácido maleico	20	Na ⁺	1.92
2.6 – 3.6	Ácido metilmalónico	20	Na ⁺ o Li ⁺	3.07
2.6 – 3.6	Ácido cítrico	20	Na ⁺	3.13
3.3 – 4.3	Ácido láctico	50	Na ⁺	3.86
3.3 – 4.3	Ácido fórmico	50	Na ⁺ o Li ⁺	3.75
3.7 – 4.7; 5.1 – 6.1	Ácido succínico	50	Na ⁺	4.21; 5.64
4.3 – 5.3	Ácido acético	50	Na ⁺ o Li ⁺	4.76
5.2 – 6.2	Ácido metilmalónico	50	Na ⁺ o Li ⁺	5.76
5.6 – 6.6	MES	50	Na ⁺ o Li ⁺	6.27
6.7 – 7.7	Fosfato	50	Na ⁺	7.20
7.0 – 8.0	HEPES	50	Na ⁺ o Li ⁺	7.56
7.8 – 8.8	BICINA	50	Na ⁺	8.33

¹ Ref: Handbook of Chemistry and Physics, 83rd edition. CRC, 2002–2003.



3.7.2. *Separación por electroforesis SDS PAGE.*

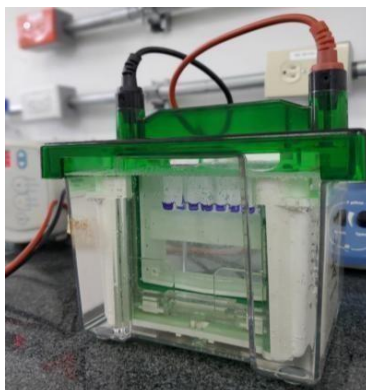
La separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia SDS, siguiendo la metodología previamente descrita en la literatura [57]. El gel de resolución o separación se preparó al 12 %, utilizando como componentes agua tipo I, solución de acrilamida/bisacrilamida al 30 %, Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), Tris-HCl 0.5 M (pH 6.8), SDS al 10 % (p/v), persulfato de amonio al 10 % (p/v) y TEMED al 0.2 % (v/v).

Las muestras de proteína, con una concentración de 0.2 mg/mL, se mezclaron con un buffer de carga compuesto por Tris base 100 mM, SDS 4 % (p/v), azul de bromofenol 0.2 % (p/v), glicerol 20 % (v/v) y 2-mercaptoetanol 10 % (v/v). Posteriormente, las muestras se calentaron a 90 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y se sembraron en los pocillos del gel. La electroforesis se llevó a cabo en un buffer de corrida compuesto por Tris base 0.2 % (p/v), SDS

0.1 % y glicina 1.44 % (p/v), aplicando un voltaje de 150 V durante 30 minutos hasta completar la separación de las proteínas según su tamaño molecular.

Figura 18

Montaje completo de la separación por electroforesis SDS-PAGE



3.7.3. Visualización y determinación de peso molecular

Una vez finalizada la corrida, las proteínas separadas en el gel se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie G-250, un colorante que se une específicamente a las proteínas, permitiendo observar las bandas correspondientes a cada subunidad proteica. El gel se sumergió en la solución de tinción durante 1 hora y posteriormente se realizó un proceso de decoloración con una solución de metanol y ácido acético (metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v) para eliminar el exceso de colorante y resaltar las bandas de interés.

Para estimar el peso molecular de la proteína recombinante, se comparó la migración de sus bandas con la de un marcador de peso molecular conocido. Finalmente, el gel se conservó en agua tipo 1 y se documentó utilizando una foto documentador gel doc XR+.

3.8. Ensayo de actividad enzimática de la RNasa recombinante

La actividad catalítica de la RNasa A recombinante se evaluó mediante la hidrólisis de una mezcla de ácidos nucleicos (ADN y ARN). La concentración del sustrato se ajustó a menos de 1 ng/ μ L y se verificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop. El ensayo se realizó en una celda de cuarzo de 3 mL, empleando como blanco 1.5 mL de buffer acetato de sodio 100 mM (pH 5.0) y 1.5 mL de agua tipo I.

La mezcla de reacción contenía 1.5 mL de buffer y 1.5 mL de la solución de ácidos nucleicos, con una absorbancia inicial de 0.627 a 300 nm, establecida como condición de referencia según el protocolo de Merck [62] y específicamente para detectar la formación de productos de degradación de ARN, siguiendo otros protocolos reportados en la literatura [61].

La reacción enzimática se inició mediante la adición de 0.9 unidades Kunitz de RNasa A, y la hidrólisis se monitorizó espectrofotométricamente a 300 nm en intervalos de 30 segundos durante 50 minutos.

Se empleó RNasa A comercial como control positivo, utilizando 1,4 uL de enzima teniendo presente que la concentración era de 10 mg/mL La actividad específica reportada por el fabricante (63 kU/mg de enzima) fue utilizada como referencia para estimar la cantidad de enzima empleada en cada ensayo.

La selección de esta actividad enzimática se realizó con el fin de obtener una señal detectable dentro del rango de sensibilidad del método espectrofotométrico usado y permitir la comparación cualitativa con la proteína recombinante obtenida. Evaluando la velocidad de degradación de los ácidos nucleicos y confirmando su funcionalidad después de los procesos de expresión y purificación.

3.9. Análisis estadístico

Los datos obtenidos experimentalmente fueron analizados mediante estadística descriptiva, expresándose como media $\pm$ desviación estándar (DE). Para evaluar diferencias significativas entre los grupos experimentales se aplicó un análisis de varianza (ANOVA). Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software correspondiente.

4. Resultados y discusión

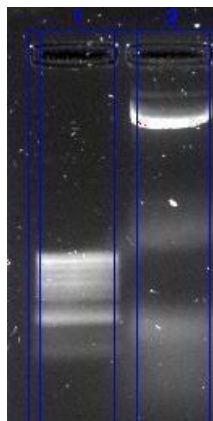
4.1. Extracción del plásmido (bacteria no competente)

La extracción del plásmido mostró una recuperación eficiente del ADN plasmídico, separándolo claramente del ADN cromosómico y de otros componentes celulares. La electroforesis en gel de agarosa evidenció bandas definidas correspondientes al plásmido intacto y

la ausencia de bandas de ADN genómico, lo que confirma la especificidad y eficacia del método [29]. La concentración obtenida fue de 206.33 ng/ μ L, indicando que las condiciones de cultivo y el protocolo empleado fueron óptimas para obtener suficiente material para posteriores transformaciones. Además, la relación A260/A280 de 1.86 sugiere una baja contaminación proteica y una adecuada pureza del ADN, lo que es crítico para garantizar que el plásmido pueda replicarse correctamente y expresar la proteína de interés en la cepa competentes [64]. Estos resultados permiten concluir que el método implementado es confiable para la obtención de plásmidos listos para la transformación y que cumple con los estándares de pureza requeridos para experimentos de expresión proteica recombinante.

Figura 19

Gel de electroforesis de agarosa. Carril 1 marcador de peso, Carril 2 plásmido que contiene la RNasa.



4.2. Transformación

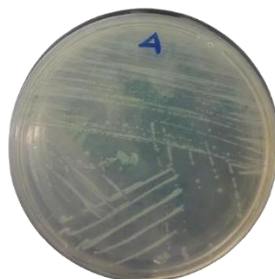
La transformación del plásmido en *E. coli* NiCo21(DE3) se realizó con éxito, como lo evidencia el crecimiento de colonias en placas de medio LB suplementado con ampicilina (0.1 mg/mL) (Figura 20). La aparición de estas colonias confirma que las bacterias adquirieron y

mantienen el plásmido de interés, ya que solo las células que portan el gen de resistencia alantibiótico sobreviven en el medio selectivo [65].

Este resultado indica que el procedimiento de transformación y las condiciones de cultivo fueron adecuadas para introducir el ADN plasmídico en la cepa huésped, estableciendo una población bacteriana competente para la expresión de la proteína recombinante. Además, la proliferación uniforme de colonias sugiere que el plásmido no generó un efecto citotóxico significativo en las células transformadas y que la replicación del plásmido dentro de la bacteria es estable, lo cual es crucial para asegurar un rendimiento reproducible en etapas posteriores de inducción y purificación proteica.

Figura 20

Colonias de E. coli (Nico 21) en placa LB-Amp transformadas con el plásmido.



4.3. Extracción de la proteína (bacteria competente)

La recuperación de la proteína recombinante de *E. coli* competente se vio inicialmente limitada debido a la doble membrana celular, lo que dificultó la liberación eficiente de la proteína al medio. Por ello, se evaluaron diferentes estrategias de lisis, incluyendo choque osmótico y tratamientos con detergentes no iónicos, siguiendo metodologías previamente reportadas para la liberación de proteínas recombinantes [10, 66]. Los resultados mostraron que el método de choque

osmótico permitió recuperar una fracción significativa de proteína soluble, mientras que los detergentes no iónicos presentaron una menor eficiencia de recuperación proteica. Estos resultados sugieren que el método de extracción influye directamente en el rendimiento y pureza de la proteína recombinante obtenida. En este estudio, el choque osmótico representó la estrategia más adecuada para las etapas posteriores de purificación y evaluación de actividad enzimática.

4.3.1. Detergentes

La extracción de la proteína recombinante de *E. coli* se evaluó mediante choque osmótico y tratamientos con detergentes no iónicos (Tween 80 y Tritón X-100), y las fracciones solubles obtenidas se analizaron por SDS-PAGE al 12% (Figura 21).

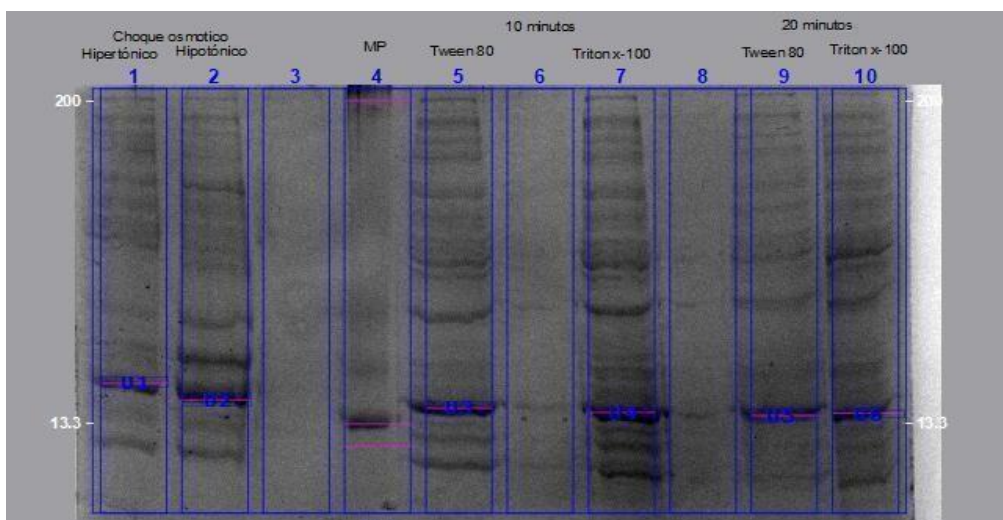
4.3.2. Choque osmótico.

El choque osmótico constituye un método de lisis suave, que permite liberar proteínas del espacio periplásmico sin el uso de detergentes, mediante un cambio repentino de condiciones osmóticas de hipertónicas a hipotónicas, generando permeabilización de la membrana celular [67].

La eficiencia de la extracción se evaluó mediante electroforesis SDS-PAGE al 12% (Figura 21), lo que permitió observar la presencia y el patrón de migración de las proteínas liberadas.

Figura 21

Gel de SDS-PAGE al 12% (150 V, 45 min) de proteínas solubles obtenidas a partir de E. coli portadora del plásmido de expresión de la RNasa. Se compararon diferentes métodos de extracción



Los carriles correspondientes al choque osmótico (1 y 2, condiciones hipertónica e hipotónica) mostraron un patrón proteico heterogéneo, sin una banda claramente identificable con el peso molecular esperado de la RNasa (13.7 kDa), lo que indica que este método no fue suficiente para romper eficazmente la doble membrana de *E. coli*, concordando con reportes previos que señalan que el choque osmótico es más efectivo en bacterias Gram positivas o en sistemas sin membrana externa [68, 69].

El carril 4, correspondiente al control positivo con la proteína comercial, permitió establecer el referente de peso molecular. En cuanto a los detergentes, se observaron diferencias significativas según el tipo y tiempo de incubación. A 10 minutos de tratamiento (carriles 5 y 7, Tween 80 y Tritón X-100), se detectaron bandas compatibles con la proteína recombinante, aunque con intensidad reducida; mientras que a 20 minutos (carriles 9 y 10), la intensidad de las bandas

aumentó, evidenciando una mayor liberación proteica. Esto confirma que la disrupción de membrana mediada por detergentes fue más eficiente que el choque osmótico, consistente con estudios previos que destacan el uso de Tritón X-100 para la recuperación de proteínas recombinantes en *E. coli* [70, 71, 72].

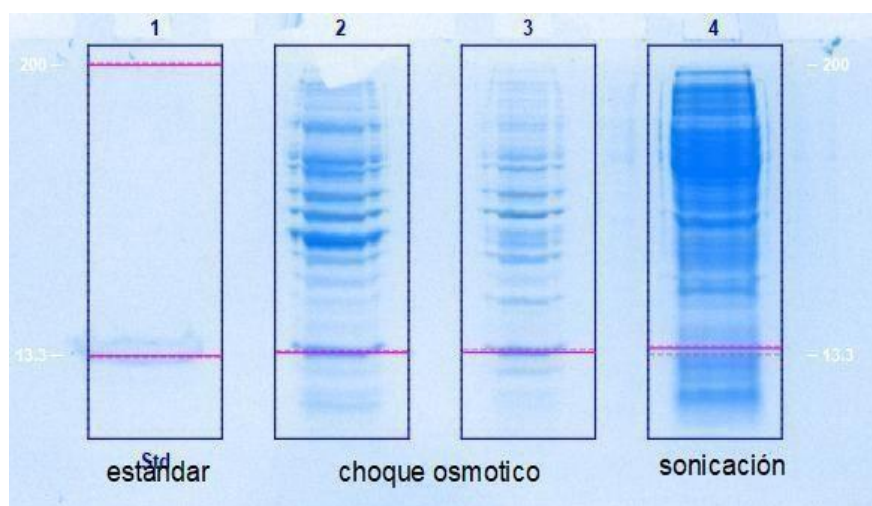
Sin embargo, la cuantificación de proteína mediante el ensayo de Bradford presentó interferencias debido a la unión de los detergentes a sitios hidrofóbicos, subestimando la concentración; por ello, se recomienda emplear métodos alternativos como el ensayo BCA o densitometría de geles para evaluaciones futuras [73]. En conjunto, estos resultados indican que la lisis con Tritón X-100 durante 20 minutos proporcionó las mejores condiciones para la recuperación de proteína soluble, aunque se requieren análisis adicionales para confirmar el estado conformacional y funcional de la proteína extraída.

4.3.3. *Sonicación.*

La sonicación utiliza ondas ultrasónicas de alta frecuencia para lisar células bacterianas, generando una ruptura generalizada de la membrana y liberación simultánea de proteínas citoplasmáticas y periplásmicas [74]. Aunque este método permite una recuperación eficiente de proteínas, la presencia de múltiples proteínas inespecíficas en la fracción soluble puede complicar la purificación de proteínas localizadas específicamente en el espacio periplásmico, como la RNasa recombinante en este estudio. El análisis por SDS-PAGE al 12% (Figura 22) mostró que, en comparación con el choque osmótico, la banda correspondiente a la proteína de interés fue menos definida y se acompañó de un mayor fondo de proteínas no específicas.

Figura 22

Gel de electroforesis SDS-Page al 12% (150 V, 45 min) de las proteínas solubles de E.coli con el plásmido de expresión de la RNasa. Comparación de los resultados obtenidos de las diferentes metodologías usadas para la extracción de la proteína recombinante.



En la Figura 22 se presentan los perfiles de las proteínas solubles obtenidas por los distintos métodos: carril 1, RNasa comercial como control positivo; carriles 2 y 3, choque osmótico a partir de 100 y 400 mL de cultivo, respectivamente; carril 4, sonicación.

El análisis comparativo evidencia que el choque osmótico produce una recuperación más selectiva y limpia de la proteína recombinante, con bandas bien delimitadas, mientras que la sonicación genera un perfil más complejo y menos definido. Estos resultados, resumidos en la Tabla 3, respaldan la selección del choque osmótico como el método preferido para la extracción de RNasa recombinante bajo las condiciones estandarizadas del protocolo [27].

La cuantificación realizada mediante Bradford determina la concentración de proteína presente en cada extracto soluble, sin embargo no es apropiada para determinar la concentración exacta de proteína de interés presente en el gel. Aunque es una buena aproximación para calcular la cantidad de proteína que se adicionaba en cada pozo a la hora de realizar electroforesis de SDS-PAGE.

Tabla 3.

Metodologías implementadas para la extracción de las proteínas solubles de E. coli con el plásmido de expresión de la RNasa.

Método	Reactivos usados	Tiempo	Resultados u observaciones
Detergentes	Triton x 100	10 min *	Produjo interferencia en la cuantificación mediante Bradford
		20 min *	
	Tween 80	10 min *	
		20 min *	
Choque osmótico	Buffer hipertónico: Tris, Sacarosa, EDTA	30 min *	Separación favorable de la proteína de interés
	Buffer hipotónico: 5 mM MgSO ₄	30 min *	
Sonicación	Tris, Sacarosa, EDTA	30 min *	No se evidencio una separación amplia de la proteína de interés

4.4. Condiciones de inducción evaluadas para la expresión de RNasa

Se evaluaron diferentes combinaciones de temperatura, tiempo de inducción y concentración de IPTG para determinar las condiciones más adecuadas para la expresión de RNasa recombinante en *E. coli*. Los ensayos se organizaron en dos grupos (Tabla 4): en el primero se modificaron las concentraciones de IPTG manteniendo constantes la temperatura y el tiempo de inducción; en el segundo, se variaron la temperatura y el tiempo de inducción manteniendo fija la concentración de IPTG.

Los resultados indicaron que concentraciones bajas de IPTG (0.1 mM), combinadas con tiempos de inducción intermedios y temperaturas moderadas (30–37 °C), favorecieron la recuperación de una mayor fracción de proteína soluble. En contraste, concentraciones más altas de IPTG o temperaturas elevadas se asociaron con una disminución en la solubilidad de la proteína obtenida. Estos hallazgos sugieren que la modulación de los parámetros de inducción influye directamente en la expresión y recuperación de proteínas recombinantes, posiblemente debido al equilibrio entre la velocidad de síntesis proteica y la capacidad celular de procesamiento y plegamiento [75].

Tabla 4.

Condiciones de inducción evaluadas para la expresión de RNasa.

No. Ensayo	Temperatura	Tiempo	Concentración IPTG
1	20 °C	16 h	0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM, 0.6 mM, 0.8 mM, 1 mM y 2 mM.
	37 °C	3 h	
2	20 °C	16 h	0.6 mM
	20 °C	24 h	
	23 °C	10h	

4.5. Ensayo 1: Variación de la concentración de IPTG.

La cuantificación de proteína total mediante el método de Bradford mostró valores entre 0,32 y 0,70 mg/mL para las concentraciones evaluadas (Tabla 5). El análisis densitométrico de las bandas en SDS-PAGE (Figura 22) indicó que la concentración de 0,6 mM de IPTG presentó la mayor intensidad relativa de banda asociada a la RNasa recombinante (1,15), mientras que concentraciones superiores, como 0,8 mM y 1 mM, mostraron valores inferiores (0,48 y 0,46, respectivamente). Para complementar el análisis comparativo, se realizó un análisis de varianza de una vía (One-way ANOVA) sobre los datos de cuantificación relativa obtenidos en tres réplicas

por condición. Los resultados no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones evaluadas ($F(6,14) = 1,180$; $p = 0,3709$), resultado respaldado por la prueba de homogeneidad de varianzas de Brown-Forsythe ($p = 0,3544$).

No obstante, el análisis de estadística descriptiva reveló que la concentración de 0,6 mM presentó la mayor media de cuantificación relativa ($1,44 \pm 0,31$) con la menor dispersión entre todos los grupos (Tabla 10, Anexos). En contraste, las concentraciones de 0,8 mM y 1 mM, si bien presentaron medias numéricamente superiores (3,99 y 2,11, respectivamente), mostraron desviaciones estándar considerablemente más altas (5,87 y 2,72), lo que refleja una marcada inconsistencia entre réplicas y baja reproducibilidad experimental. Este comportamiento es consistente con reportes previos que señalan que concentraciones moderadas de IPTG, entre 0,5 y 0,8 mM, ofrecen el mejor balance entre la activación de la expresión génica y la viabilidad celular, mientras que concentraciones elevadas del inductor pueden imponer una carga metabólica excesiva sobre el hospedero bacteriano, comprometiendo el rendimiento y la consistencia de la expresión proteica. En consecuencia, se seleccionó 0,6 mM de IPTG como concentración de trabajo por representar la condición con mayor expresión relativa promedio y mayor reproducibilidad experimental [76, 77].

Figura 23

Gel de electroforesis SDS-Page al 12% (150 V, 45 min) de las proteínas solubles de E. coli con el plásmido de expresión de la RNasa. Ensayo número 1 (variación de las concentraciones de inducción de IPTG manteniendo una temperatura de 20 °C durante 16 h).

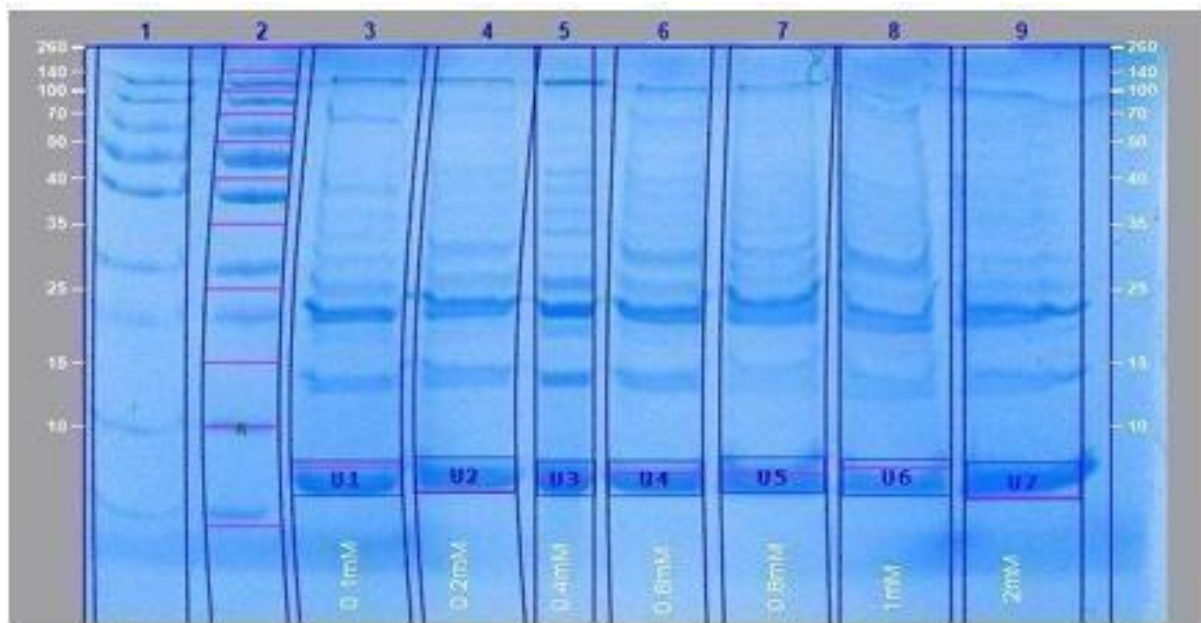


Tabla 5.

Cuantificación de proteínas solubles de E. coli inducidas con diferentes concentraciones de IPTG.

Concentración de IPTG	Cuantificación Bradford [mg/mL]	Cuantificación relativa de la banda*
0.1 mM	0.47	0.66
0.2 mM	0.42	0.77
0.4 mM	0.32	0.68
0.6 mM	0.43	1.15
0.8 mM	0.70	0.48
1 mM	0.54	0.46
2 mM	0.53	0.83

* La cuantificación relativa corresponde a la intensidad densitométrica relativa de la banda proteica obtenida mediante análisis en Image Lab 6.1 (Bio-Rad), normalizada respecto a la muestra de referencia. Los valores son adimensionales y representan la intensidad relativa de las bandas detectadas por SDS-PAGE.

Tabla 6.

Cuantificación relativa de proteínas solubles de E. coli inducidas con diferentes concentraciones de IPTG por triplicado.

Concentración IPTG [mM]	Cuantificación relativa						
	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2
1	0,2	2,91	1,46	17,61	10,72	5,22	2,49
2	0,31	0,11	0,45	1,41	0,78	0,64	0,31
3	0,66	0,77	0,68	1,15	0,48	0,46	0,83
PROMEDIO	0,390	1,263	0,863	6,723	3,993	2,107	1,210
DESVIACION ESTANDAR	0,240	1,464	0,529	9,429	5,827	2,698	1,139

Aunque algunas concentraciones, particularmente 0,8 y 1,0, presentaron mayores valores promedio de intensidad de la proteína de interés, la alta variabilidad observada entre réplicas impidió detectar diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos mediante ANOVA de una vía. especialmente en las concentraciones 0,6 0,8 y 1,0 con valores en las replica de 17,61 10,72 7 5,22

Tabla 7.

Cuantificación mediante Bradford de proteínas solubles de E. coli inducidas con diferentes concentraciones de IPTG por triplicado.

	Bradford (n=3)						
	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1	2
1	0,320	0,370	0,450	0,330	0,290	0,330	0,380
2	0,270	0,430	0,550	0,450	0,330	0,490	0,500
3	0,350	0,310	0,210	0,340	0,600	0,500	0,470
Promedio	0,313	0,370	0,403	0,373	0,407	0,440	0,450
DESVIACION ESTANDAR	0,040	0,060	0,175	0,067	0,169	0,095	0,062

4.6. Ensayo 2: Variación de tiempo y temperatura de inducción.

Manteniendo fija la concentración de IPTG en 0,6 mM, se evaluaron cuatro combinaciones de tiempo y temperatura (Tabla 6). Los valores de cuantificación relativa de banda fueron similares entre todas las condiciones evaluadas, con un rango de 4,74 a 4,97, sin que ninguna condición presentara una diferencia marcada respecto a las demás. Sin embargo, la condición U3 (16 h – 20°C) registró la mayor concentración de proteína total soluble determinada por Bradford (0,3775 mg/mL), superando a las demás condiciones evaluadas.

En contraste, la inducción a 37 °C durante 3 h (U1) resultó en la menor recuperación de proteína soluble (0,2351 mg/mL), lo que puede atribuirse al incremento en la velocidad de síntesis proteica bajo condiciones de estrés térmico, que supera la capacidad celular de procesamiento y plegamiento correcto, favoreciendo la formación de cuerpos de inclusión [78]. Asimismo, la condición U4 (24 h – 20 °C) no mostró un incremento significativo en la proteína recuperada respecto a U3 (0,3270 mg/mL), lo que sugiere que tiempos de inducción excesivamente prolongados pueden estar asociados a degradación proteica o agotamiento de recursos metabólicos en fases avanzadas del cultivo [79].

La selección de U3 como condición óptima responde tanto al mayor rendimiento de proteína soluble total como a una cuantificación relativa de banda adecuada, y se sustenta en evidencia bibliográfica consolidada: la inducción a temperaturas entre 15 °C y 25 °C durante 16 a 20 horas favorece un aumento significativo en el rendimiento de proteína soluble, dado que la menor tasa de síntesis permite un plegamiento proteico más adecuado, reduciendo la formación de agregados insolubles. Esto ha sido corroborado experimentalmente, reportándose que la combinación de temperaturas bajas de inducción con tiempos de expresión prolongados puede resultar en rendimientos de proteína soluble hasta tres veces superiores a los obtenidos bajo condiciones estándar, facilitando adicionalmente los procesos de purificaciones subsiguientes [80].

Figura 24

Gel de electroforesis SDS-Page al 12% (150 V, 45 min) de las proteínas solubles de E. coli con el plásmido de expresión de la RNasa. Ensayo número 2 (variación de tiempo y temperatura en la inducción con concentración de IPTG 0.6 mM.)

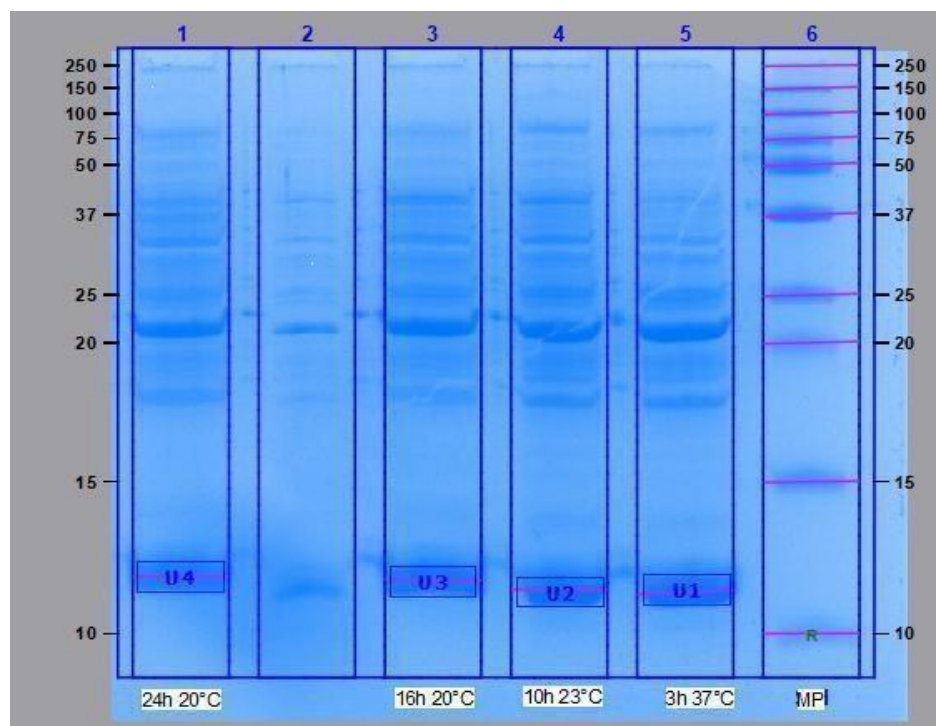


Tabla 8.

Cuantificación de las proteínas solubles de E. coli con el plásmido de expresión de la RNasa (correspondientes a las variaciones de tiempo y temperatura evaluadas en el gel de electroforesis y manteniendo concentración de IPTG 0.6 mM)

Posición de la banda	Condiciones evaluadas	Cuantificación Bradford [mg/mL]	Cuantificación relativa de la banda *
U1	3h 37 °C	0.2351	4.93
U2	10 h 23°C	0.2625	4.97
U3	16 h 20 °C	0.3775	4.74
U4	24 h 20 °C	0.3270	4.75

* La cuantificación relativa corresponde a la intensidad densitométrica relativa de la banda proteica obtenida mediante análisis en Image Lab 6.1 (Bio-Rad), normalizada respecto a la muestra de referencia. Los valores son adimensionales y representan la intensidad relativa de las bandas detectadas por SDS-PAGE.

Tabla 9.

Cuantificación de las proteínas solubles de E. coli con el plásmido de expresión de la RNasa (correspondientes a las variaciones de tiempo y temperatura evaluadas en el gel)

	Cuantificación relativa (n=3)				Bradford (n=3)			
	3h 37°C	10h 23°C	16h 20°C	24h 20°C	3h 37°C	10h 23°C	16h 20°C	24h 20°C
1	0,08	0,02	0,03	0,01	0,2783	0,3602	0,327	0,2625
2	0,01	0,03	0,12	0,04	0,1672	0,4204	0,1422	0,418
3	4,93	4,97	4,74	4,75	0,2351	0,2625	0,3775	0,3270
Promedio	1,67	1,67	1,63	1,60	0,2269	0,3860	0,2654	0,3143
Desviación estándar	2,82	2,86	2,69	2,73	0,056	0,031	0,107	0,090

El análisis de ANOVA fue realizado para los datos tomados mediante la cuantificación por Bradford. Debido a la cuantificación relativa obtenida experimentalmente luego del análisis del gel electroforético tenían una dispersión muy alta. Sin embargo, se determinó que, aunque no habían diferencias significativas era importante tener en cuenta el análisis realizado debido a que este indicador de la intensidad de banda en cada gel para cada concentración nos brinda una buena aproximación cualitativa de la comparación de los datos. En conjunto, los resultados obtenidos indican que la condición más eficiente para la producción de la RNasa recombinante es la inducción con 0,6 mM de IPTG durante 16 h a 20 °C. Esta estrategia maximiza tanto la expresión relativa de la proteína de interés como su recuperación en forma soluble, factores críticos para las etapas posteriores de purificación y para su aplicación en estudios funcionales o biotecnológicos.

4.7. Separación de la proteína

Tras la extracción, la muestra se filtró mediante un filtro de 0.45 µm para eliminar restos celulares y partículas insolubles que pudieran interferir en la resolución cromatográfica. Previo a la separación, los tampones utilizados como fase móvil se prepararon cuidadosamente y se sometieron a ultrasonido durante al menos 10 minutos, con el objetivo de eliminar burbujas que pudieran causar variaciones de presión o inestabilidad en la señal del equipo durante la corrida cromatográfica [72].

El sistema FPLC se configuró siguiendo el protocolo establecido para la separación de la proteína recombinante. La columna fue inicialmente lavada con cinco volúmenes de agua tipo I y posteriormente con cinco volúmenes de buffer A (NaH_2PO_4 50 mM, pH 7.48), equilibrando la fase estacionaria y asegurando condiciones óptimas para el inicio de la elución. Este

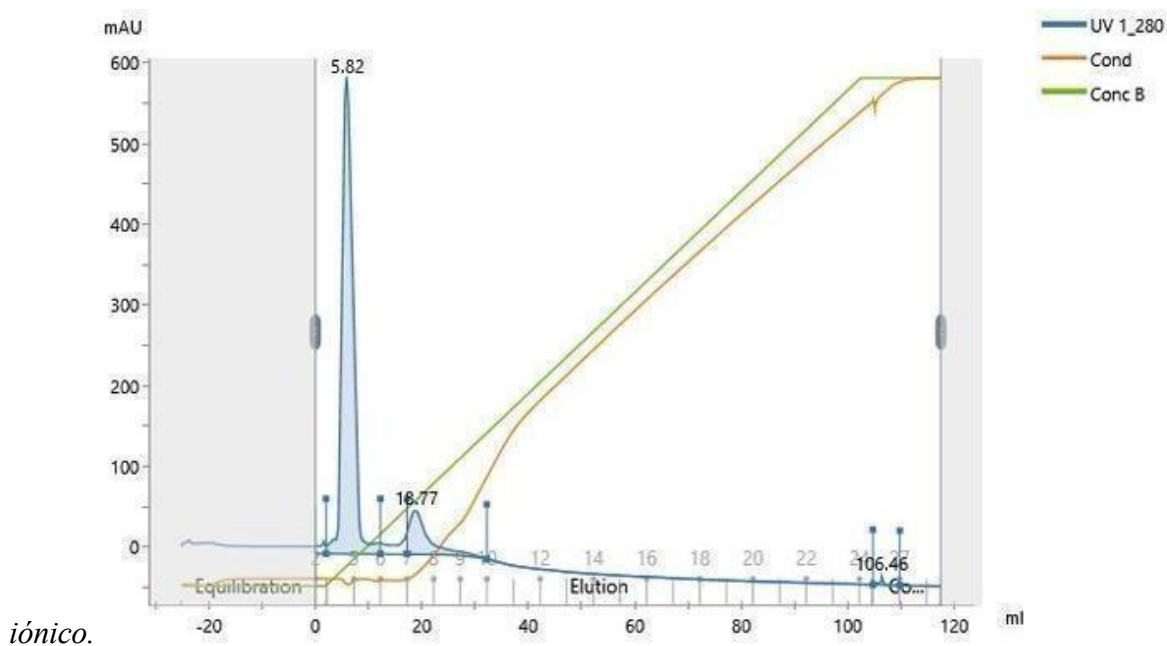
preacondicionamiento resulta crucial para garantizar la reproducibilidad, estabilidad y resolución de la separación proteica, evitando variaciones en el perfil de elución que puedan afectar la pureza y el rendimiento del producto final [43].

4.7.1. Separación por cromatografía de Intercambio Iónico

La purificación de la RNasa recombinante se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna HiTrap SP HP de 5 mL, cargando un volumen de muestra de 2 mL y manteniendo un flujo constante de 0.5 mL/min. Se aplicó un gradiente lineal de elución desde 0 hasta 100% de buffer B (NaCl 1 M, pH 7.48), teniendo como fase inicial el buffer A (NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7.48). La columna se equilibró previamente con el buffer A durante los volúmenes de columna indicados en el protocolo, garantizando la uniformidad de la fase estacionaria y la reproducibilidad del sistema. El cromatograma resultante (Figura 25) mostró varios picos, de los cuales se seleccionaron las fracciones 2, 3, 7 y 8, correspondientes a los máximos de intensidad, para su análisis mediante SDS-PAGE al 12% (150 V, 45 min).

Figura 25

Cromatograma de la separación de RNasa mediante la columna de intercambio

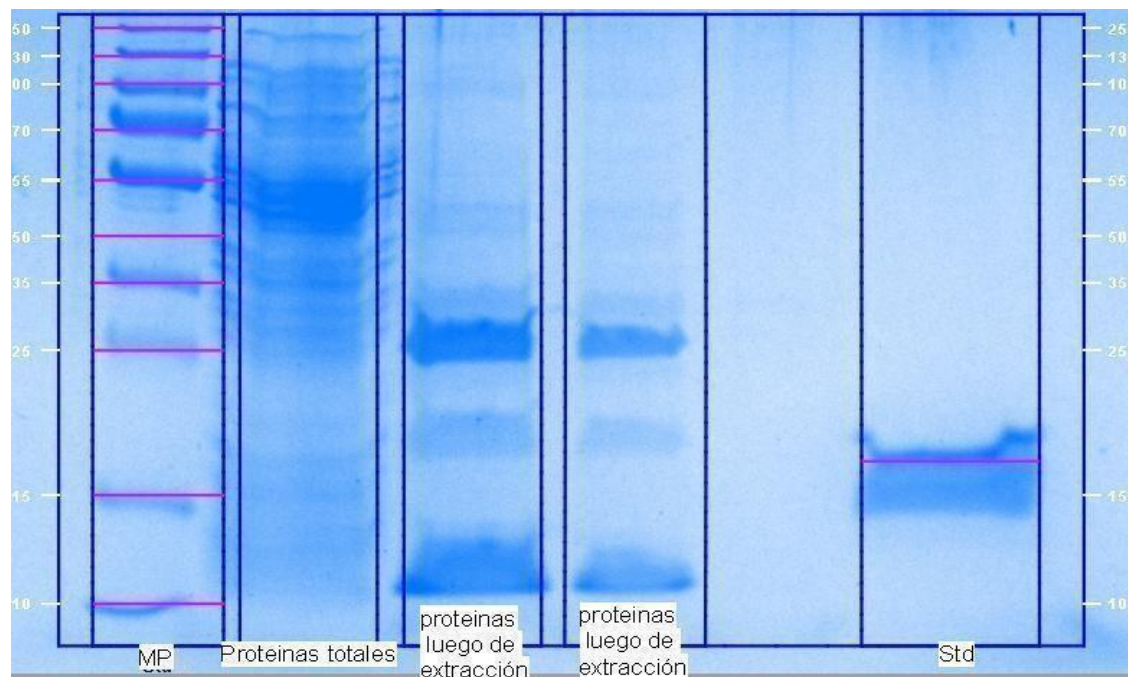


Los resultados de la electroforesis (Figura 26) evidenciaron que la proteína de interés se encontraba principalmente en el pico 2, observándose una banda predominante compatible con el peso molecular esperado para la RNasa recombinante. Estos resultados sugieren que la cromatografía de intercambio iónico permitió una separación eficiente de la proteína recombinante respecto a otras proteínas celulares, obteniéndose fracciones enriquecidas en la proteína de interés.

Finalmente, la columna se lavó y almacenó en etanol al 20% con el fin de preservar su funcionalidad y mantener la estabilidad de la fase estacionaria para usos posteriores.

Figura 26

Gel SDS-PAGE al 12% (150 V, 45 min) de la separación por cromatografía de intercambio iónico de la RNasa A.



4.8. Actividad catalítica de la RNasa recombinante

La RNasa recombinante expresada en *E. coli* mostró actividad frente a ácidos nucleicos, evidenciada por la disminución progresiva de la absorbancia a 300 nm durante el transcurso de la reacción en comparación con el control sin enzima (Figura 27a, 27b), lo que indica que la proteína conservó actividad catalítica tras las etapas de expresión y purificación. Al comparar la preparación recombinante con la enzima comercial, se observó que la pendiente de la curva de hidrólisis fue menor en la muestra experimental (Figura 26b) que en la enzima comercial (Figura 26a), sugiriendo una menor velocidad catalítica relativa. Esta diferencia podría estar asociada al grado de pureza de cada preparación: mientras que la RNasa comercial presenta aproximadamente

un 95% de pureza, la preparación recombinante mostró un menor grado de enriquecimiento proteico, lo que podría reducir la concentración efectiva de enzima activa y afectar la tasa de hidrólisis observada [81]. Cabe señalar que las tendencias de absorbancia entre ambas condiciones fueron comparadas de manera cualitativa, y las diferencias en la escala de los ejes de representación gráfica limitan la comparación visual directa, por lo que las interpretaciones realizadas tienen carácter descriptivo y no cuantitativo.

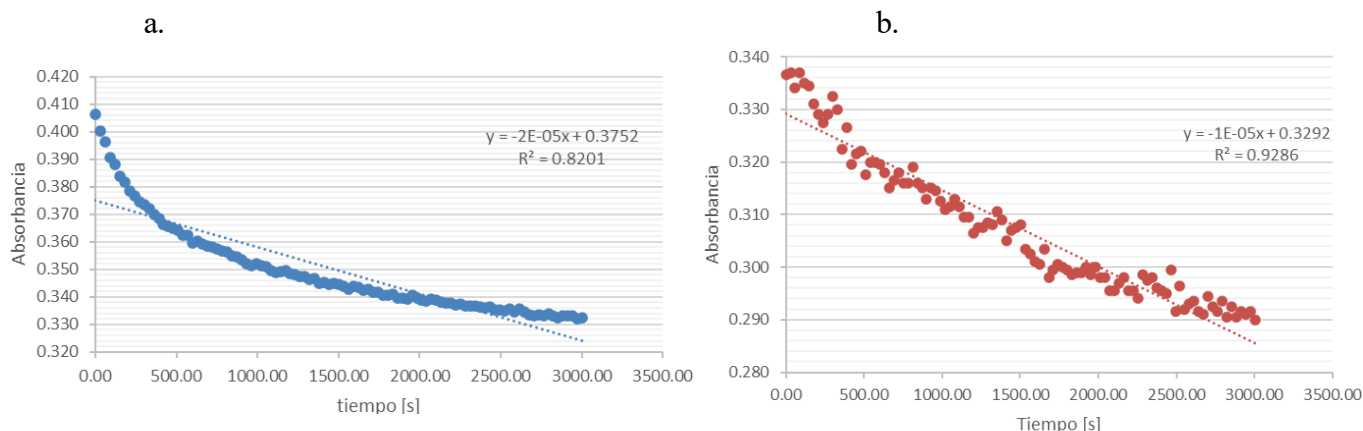
A pesar de estas diferencias, la RNasa recombinante mantuvo actividad catalítica durante todo el ensayo, indicando que una fracción de la proteína obtenida conservó funcionalidad biológica. Estos resultados concuerdan con reportes previos en los que proteínas recombinantes presentan actividad enzimática detectable aún en preparaciones parcialmente purificadas [82]. Sin embargo, dado que en éste trabajo no se realizaron estudios cinéticos detallados como la determinación de K_m , V_{max} , actividad específica o eficiencia catalítica, no es posible establecer equivalencia funcional completa entre ambas preparaciones.

La identificación de la proteína recombinante se realizó principalmente mediante SDS-PAGE y estimación de peso molecular; metodologías complementarias como Western blot, espectrometría de masas o ensayos específicos de inhibición enzimática permitirían confirmar de manera más precisa su identidad y funcionalidad, aunque su implementación excedió el alcance del presente trabajo de pregrado.

En consecuencia, los resultados obtenidos permiten concluir que la proteína recombinante presentó actividad ribonucleasa detectable bajo las condiciones experimentales evaluadas, aunque se requieren análisis cinéticos y estructurales adicionales para establecer comparaciones cuantitativas rigurosas con la RNasa A comercial.

Figura 27

Gráfica de la hidrólisis de la RNasa (absorbancia en función del tiempo). a) RNasa obtenida de manera comercial. b) RNasa obtenida experimentalmente.



5. Conclusiones

En este trabajo se estableció un esquema metodológico para la expresión y purificación de RNasa recombinante en bacterias NiCo21, permitiendo definir condiciones de cultivo e inducción asociadas a una mayor recuperación de proteína soluble.

La comparación de métodos de lisis mostró que el choque osmótico favoreció la recuperación de la proteína recombinante con menor presencia de proteínas celulares adicionales, mientras que la purificación mediante cromatografía de intercambio iónico permitió obtener fracciones enriquecidas en la proteína de interés, evidenciado mediante SDS-PAGE. La actividad catalítica de la proteína recombinante fue evaluada mediante ensayos de hidrólisis de ácidos nucleicos, observándose actividad enzimática en comparación con el control sin enzima. Asimismo, la proteína recombinante presentó un comportamiento funcional comparable al de la RNasa comercial, aunque con diferencias en la velocidad relativa de hidrólisis posiblemente asociadas al grado de pureza de las preparaciones. No obstante, debido a que no se realizaron

estudios cinéticos detallados ni técnicas adicionales de identificación estructural, no fue posible establecer equivalencia funcional completa con la RNasa A comercial.

En conjunto, estos resultados demuestran que el sistema de expresión y purificación empleado permitió obtener una RNasa recombinante funcional, constituyendo una base metodológica para futuras optimizaciones relacionadas con rendimiento, pureza y caracterización estructural de la enzima. Además, el trabajo resalta la importancia de las condiciones de cultivo, inducción y purificación en la recuperación de proteínas recombinantes con actividad biológica detectable.

6. Declaración de conflictos de interés

La autora declara que no existen conflictos de interés financieros, académicos o personales que puedan haber influido en el desarrollo, análisis o presentación de los resultados de este trabajo.

7. Disponibilidad de datos

Los datos experimentales obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de grado se encuentran disponibles bajo solicitud razonable a la autora y/o al director del proyecto.

8. Recomendaciones

Se recomienda modificar el plásmido y agregar la cola de histidina para facilitar la purificación de la proteína. Los protocolos establecidos pueden ser usados en futuros análisis para optimizar la producción y purificación de la proteína.

También se recomienda durante la transformación realizar el choque térmico de 42 °C a 30 segundos, ya que solo 10 segundos es subóptimo y reduce la eficiencia de la transformación.

Para el aprovechamiento de las técnicas cromatográficas se recomienda probar la separación a un pH de 5-6.5 en columnas SP/CM según lo indica el manual de intercambio iónico de cytiva. Finalmente, se sugiere realizar la medición de la actividad con otro tipo de sustrato como extracto de RNA a 0.02 - 0.8 mg/mL.

Referencias Bibliográficas

1. Karyolaimos, A., & de Gier, J.-W. (2021). Strategies to Enhance Periplasmic Recombinant Protein Production Yields in *Escherichia coli*, 9, 797334. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.797334>
2. Ronald T. Raines (1998). Ribonuclease A. Chemical Reviews, 98(3), 1045–1066. <https://doi.org/10.1021/cr960427h>
3. ÚSUGA X, RUGELES MT. RIBONUCLEASAS: [subtitle]SU POTENCIAL TERAPÉUTICO EN INFECCIONES VIRALES. Acta Biolo Colomb [Internet]. 2006 [citado el 28 de febrero de 2025];11(2):31–44. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2006000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=es
4. Montioli, Campagnari & Fasoli (Life 11(2):168, 2021. RNase A Domain-Swapped Dimers Produced Through Different Methods: Structure–Catalytic Properties and Antitumor Activity», <https://doi.org/10.3390/life11020168>
5. Kunitz M. (1940) Crystalline Ribonuclease. J. Gen. Physiol. 24:15–32.
6. Rosano, G., y Ceccarelli, E. (2014). Expresión de proteínas recombinantes en sistemas microbianos. *Fronteras en microbiología*, 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00341>
7. Goeddel, D. V., Kleid, D. G., Bolivar, F., Heyneker, H. L., Yansura, D. G., Crea, R.,

- Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K., & Riggs, A. D. (1979). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(1), 106–110. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.106>
8. Burdette, L., Leach, S., Wong, H. y Tullman-Ercek, D. (2018). Desarrollo de bacterias Gram negativas para la secreción de proteínas heterólogas. *Fábricas de células microbianas*, Tomado de: <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1041-5>.
9. Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. In *Biotechnology Advances* (Vol. 27, Issue 3, pp. 297–306). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
10. Lara ÁR. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química* [Internet]. agosto de 2011 [citado 28 de febrero de 2025];10(2):209-23. Tomado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1665-27382011000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
11. Heng-Huan Lee, Ying-Nai Wang, Mien-Chie Hung, Functional roles of the human ribonuclease A superfamily in RNA metabolism and membrane receptor biology, *Molecular Aspects of Medicine*, Volume 70, 2019, Pages 106-116, ISSN 0098-2997. Tomado de: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.03.003>.
12. Nicholson, A. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases.. *FEMS microbiology reviews*, 23 3, 371-90. Tomado de: <https://doi.org/10.1111/j.1574->

[6976.1999.tb00405.x](#)

13. Deutscher, M. (1993). Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity.. *The Journal of biological chemistry*, 268 18, 13011-4 .
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)38609-](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)38609-)
14. Lehninger AL, Nelson DN, Cox MM. Principios de bioquímica de Lehninger. 5^a ed. New York: WH Freeman; 2008.
15. Leland, P. A., Schultz, L. W., Kim, B. M., Raines, R. T., & Collier, R. J. (1998). Ribonuclease A variants with potent cytotoxic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(18), 10407–10412.
<https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10407>
16. Rosenberg H. F. (2015). Eosinophil-Derived Neurotoxin (EDN/RNase 2) and the Mouse Eosinophil-Associated RNases (mEars): Expanding Roles in Promoting Host Defense. *International journal of molecular sciences*, 16(7), 15442–15455.
<https://doi.org/10.3390/ijms160715442>
17. Messmore JM, Fuchs DN, Raines RT. Ribonuclease A: Revealing Structure–Function Relationships with Semisynthesis. *J Am Chem Soc* [Internet]. agosto de 1995 [citado 28 de febrero de 2025]; 117(31):8057-60. Tomado de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3137125/>
18. Guzmán Y Valle, E., Máter, A., Magisterio, D., Facultad, N., Ciencias, D. E., Misshell, J., & Chura, M. (n.d.). UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN La tecnología del ADN recombinante. Genoma humano.
19. Sun, D., Han, C., & Sheng, J. (2022). iScience The role of human ribonuclease A

- family in health and diseases: A systematic review. *ISCIENCE*, 25, 105284.
<https://doi.org/10.1016/j.isci>
20. Michaelis, L., & Menten, M. L. (1913). Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift*, 49, 333–369.
21. Stefan, A., & Hochkoeppler, A. (2025). The catalytic action of enzymes exposed to charged substrates outperforms the activity exerted on their neutral counterparts.. *Biochemical and biophysical research communications*, 751,151436. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2025.151436>
22. Karvelis, E., Swanson, C., & Tidor, B. (2024). Substrate Turnover Dynamics Guide Ketol-Acid Reductoisomerase Redesign for Increased Specific Activity. *ACS Catalysis*, 14, 10491-10509. <https://doi.org/10.1021/acscatal.4c01446>
23. Zotter, Á., Bäuerle, F., Dey, D., Kišš, V., & Schreiber, G. (2017). Quantifying enzyme activity in living cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 292, 15838 - 15848. <https://doi.org/10.1074/jbc.m117.792119>
24. Chen R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnol Adv.* 2012;30(5):1102–7. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.013.
25. Rosano, G., Morales, E., & Ceccarelli, E. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>.
26. De Marco, A. (2025). Avances recientes en la producción recombinante de proteínas solubles en *E. coli*. *Fábricas de células microbianas*, 24.

<https://doi.org/10.1186/s12934-025-02646-8>.

27. Cityva, Affinity Chromatography, tomado de:
<https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11495-pdf>
28. Berg, J. Timoczko, J. Stryer, L. Biochemistry. (5 ed). Tomado de:
<https://biokamikazi.wordpress.com/wp-content/uploads/2013/10/biochemistry-stryer-5th-ed.pdf>
29. Brown, T.A. GENE CLONING AND DNA ANALYSIS. (ed 6). 2010, Manchester. Tomado de: [http://www.uop.edu.pk/ocontents/Lec%20no%201\(8\).pdf](http://www.uop.edu.pk/ocontents/Lec%20no%201(8).pdf)
30. delCardayré, S. B., Ribó, M., Yokel, E. M., Quirk, D. J., Rutter, W. J., & Raines, R. T. (1995). Engineering ribonuclease A: production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein engineering*, 8(3), 261–273.
<https://doi.org/10.1093/protein/8.3.261>
31. Pribnow, D. (1975). Nucleotide sequence of an RNA polymerase binding site at an early T7 promoter. *Journal of Molecular Biology*, 99(3), 419–443.
32. Raghava, Barua, Singh, M. N. Gupta. (2008). Refolding and simultaneous purification by three-phase partitioning of recombinant proteins from inclusion bodies. *Protein Science*, 17(11), 1987–1997.
<https://doi.org/10.1110/ps.036939.108>
33. Scientific Image and Illustration Software | BioRender [Internet]. [citado 18 de febrero de 2025]. Tomado de: <https://www.biorender.com/>
34. Wittmann, C., Weber, J., Betiku, E., Kromer, J., “ Bohm, D. y Rinas, U. (2007). Response “ of fluxome and metabolome to temperatureinduced recombinant protein

- synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* 132, 375-384.
35. Lewis M, Bell CE. A closer view of the conformation of the Lac repressor bound to operator. *Nature Structural Biology*. 2000 Mar 1;7(3):209–14.
36. Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., & Berkmen, M. (2012). SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide-bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories*, 11, 56. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>
37. Purificación de proteínas por FPLC [Internet]. Facultad de Química. [citado 19 de febrero de 2025]. Tomado de: <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/purificacion-de-proteinas-por-fplc/>
38. Chen, X., Li, C., & Liu, H. (2021). Enhanced Recombinant Protein Production Under Special Environmental Stress. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.630814>
39. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., & D'Ari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in *Luria-Bertani* broth. *Journal of Bacteriology*, 189(23), 8746–8749. <https://doi.org/10.1128/JB.01368-07>
- 40 Show, K. Y., Lee, D. J., Tay, J. H., Lee, T. M., & Chang, J. S. (2015). Microalgal drying and cell disruption - Recent advances. In *Bioresource Technology* (Vol. 184, pp. 258–266). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.139>
41. Pontis, H. G. (2017). Protein and Carbohydrate Separation and Purification. In *Methods for Analysis of Carbohydrate Metabolism in Photosynthetic Organisms* (pp. 45–63). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803396-8.00003-x>

42. Cytiva [Internet]. [citado 19 de febrero de 2025]. Benefits of automated protein purification.
43. Tomado de: <https://www.cytivalifesciences.com/en/us/news-center/benefits-of-automated-protein-purification> 10001?srsId=AfmBOopHfgk6Zxao7QrNMkpSvkO8fARgByBWqY4i1meTh3F1hYMuc3iO
44. cytiva, Principles and methods Ion Exchange chromatogra. Tomado de: <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-13101-pdf>
45. Separating Protein with SDS-PAGE: Procedure and Applications [Internet]. Jove.com. 2023. Tomado de: <https://app.jove.com/v/5058/separating-protein-with-sds-page-procedure-and-applications>
46. Introduction to Polyacrylamide Gels [Internet]. Bio-Rad Laboratories. 2023 [cited 2025 Dec 19]. Tomado de: <https://www.bio-rad.com/es-co/applications-technologies/introduction-polyacrylamide-gels?ID=LUSPBRM5B>
47. Blue-White Screening & Protocols for Colony Selection. Merck [Internet]. 2025;1(1). Tomado de: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/en/technical-documents/technical-article/genomics/cloning-and-expression/blue-white-screening>
48. Maldonado, A., Jorrín, J. , Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Análisis de proteínas de hojas de Arabidopsis thaliana. Córdoba. Tomado de: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/16%20ELECTROFORESIS%20GELES%20PAA.pdf>
49. Brunelle, E., Le, A. M., Huynh, C., Wingfield, K., Halámková, L., Agudelo, J., &

- Halámek, J. (2017). Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye: An Application for Forensic Fingerprint Analysis. *Analytical chemistry*, 89(7), 4314–4319. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00510>
50. Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Elements of Thermodynamics and Biochemical Kinetics. , 141-152. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803550-4.00007-0>.
51. Buchner, E. (1897). *Alcoholic fermentation without yeast cells*. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 30, 117–124.
52. Ghisalba, O. (2000). Biocatalyzed reactions. New Trends in Synthetic Medicinal Chemistry, 175-219. doi:10.1002/9783527613403
53. Bell, E. L., Finnigan, W., France, S. P., Green, A. P., Hayes, M. A., Hepworth, L. J., Flitsch, S. L. (2021). Biocatalysis. Nature Reviews Methods Primers, 1(1). doi:10.1038/s43586-021-00044-z
54. Mazzei, L., Ciurli, S., & Zambelli, B. (2014). Hot biological catalysis: isothermal titration calorimetry to characterize enzymatic reactions. Journal of Visualized Experiments: JoVE, (86), 51487. <https://app-jove-com.bibliotecavirtual.uis.edu.co/v/51487/hot-biological-catalysis-isothermal-titration-calorimetry-to>
55. Choi, B., Rempała, G., & Kim, J. (2017). Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17072-z>.
56. Wlodawer A, Svensson LA, Sjölin L, Gilliland GL. Estructura de la ribonucleasa

- A libre de fosfato refinada a 1,26 A. *Bioquímica*. 19 de abril de 1988;27(8):2705-17. PMID: 3401445
57. Moussaoui, Guasch, Boix et al. The Role of Non-catalytic Binding Subsites in the Endonuclease Activity of Bovine Pancreatic Ribonuclease A. (*J. Biol. Chem.* 271(9):4687–4692 <https://doi.org/10.1074/jbc.271.9.4687>
58. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York .1989. Tomado de: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley, New York.
59. Cuchillo, C. M., Nogués, M. V., & Raines, R. T. (2011). Bovine pancreatic ribonuclease: fifty years of the first enzymatic reaction mechanism. *Biochemistry*, 50(37), 7835–7841. <https://doi.org/10.1021/bi201075b>
60. New England Biolabs. Neb.com. 2024 [cited 2025 Dec 19]. Tomado de: https://www.neb.com/en/products/t1010-monarch-plasmid-miniprep-kit?srsId=AfmBOopUk8YkH1XUhh77FzVjgVkh9imai-1oyi_GcJvbZ8GGD1ziAcV8
61. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254. Tomado de: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
62. KUNITZ, M. (1946). A spectrophotometric method for the measurement of

- ribonuclease activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 164(2), 563–568.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)41259-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)41259-2) Merck, Enzymatic Assay of Ribonuclease A (EC 3.1.27.5) Tomado de:
<https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/enzymatic-assay-of-ribonuclease-a>
63. Lide DR, editor. Handbook of Chemistry and Physics. 83.^a ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 2002–2003.
64. Thermo scientific [Internet]. Wilmington, Delaware US. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers, 260/280 and 260/230 Ratios. Tomado de: https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf.
65. JoVE. Bacterial transformation using plasmids. Cambridge (MA): JoVE; Tomado de: <https://www.jove.com/es/science-education/v/10573/bacterial-transformation-using-plasmids-concept>
66. Mergulhão FJM, Summers DK, Monteiro GA. Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*. 2005 May;23(3):177–202. Tomado de: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2004.11.003>
67. Lysis & Protein Extraction [Internet]. Tomado de: <https://www.sigmaaldrich.com/CO/en/applications/protein-biology/lysis-and-protein-extraction?srltid=AfmBOooDHBzUWD9gxkguelUtsL-6OEP7sWWjObFxcVPHMEj1GdrKGLOY>
68. Pilizota, T y Shaevitz, J. (2012). Adaptación rápida y multifásica del

volumen al shock hiperosmótico por *Escherichia coli*. PLoS UNO, 7.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035205>

69. Pilizota, T. y Shaevitz, J. (2013). La plasmólisis y la forma celular dependen de la permeabilidad de la membrana externa del soluto durante el choque hiperosmótico en *E. coli*. Revista biofísica, 104 12, 26 3-42 .
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.011>.

70. Jalalirad, R. (2013). Extracción selectiva y eficiente de proteínas recombinantes del periplasma de *Escherichia coli* utilizando bajas concentraciones de sustancias químicas. Revista de microbiología y biotecnología industrial, 40, 1117-1129.
<https://doi.org/10.1007/s10295-013-1307-1>.

71. Naglak, T. y Wang, H. (1990). Recuperación de una proteína extraña del periplasma de *Escherichia coli* mediante permeabilización química.. Tecnología enzimática y microbiana, 12 8, 603-11 . [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(90\)90134-c](https://doi.org/10.1016/0141-0229(90)90134-c).

72. Kusuma, S., Subroto, T., Parwati, I., Rukayadi, Y., Fadhlillah, M., Pardede, R., Berlian, A. y Sabila, G. (2022). Mejora de la proteína MPT64 secretada por pelB liberada por *Escherichia coli* BL21 (DE3) utilizando Triton X-100 y Tween-80. Revista de investigación y tecnología farmacéutica avanzada, 13, 171-176.
https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_25_22

73. Rabilloud T. (2018). Optimization of the cydex blue assay: A one-step colorimetric protein assay using cyclodextrins and compatible with detergents and reducers. PLoS one, 13(4), e0195755.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195755>.

74. Traditional Methods of Cell Lysis | Thermo Fisher Scientific- US [Internet]. Thermofisher.com.2025[cited 2025 Dec 19]. Tomadode <https://www.thermofisher.com/co/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-ethods/traditional-methods-cell-lysis.html>
75. Mühlmann, M., Forsten, E., Noack, S., & Büchs, J. (2017). Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. *Microbial cell factories*, 16(1), 220. Tomado de: <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0832-4>
76. Cabadaj, P., Illeová, V., Dobiašová, H., Bučko, M., & Polakovič, M. (2025). Optimization of growth and induction conditions for the production of recombinant whole cell cyclohexanone monooxygenase in *Escherichia coli*. *Scientific reports*, 15(1), 14447. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-99461-3>
77. Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., de Lorenzo, V., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial cell factories*, 14, 201. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>
78. Villaverde, A., & Carrió, M. M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology letters*, 25(17), 1385–

1395. Tomado de: <https://doi.org/10.1023/a:1025024104862>
79. Rozkov A, Schweder T, Veide A, Enfors SO. Dynamics of proteolysis and its influence on the accumulation of intracellular recombinant proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000 Dec;27(10):743–8. Tomado de: [https://doi.org/10.1016/S01410229\(00\)00294-5](https://doi.org/10.1016/S01410229(00)00294-5)
80. Francis, D. M., & Page, R. (2010). Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current protocols in protein science*, Chapter 5(1), 5.24.1–5.24.29. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61>
81. Machuga, E., & Klapper, M. (1975). Catalytic activity of Ntau-carboxymethylhistidine-12 ribonuclease.. *The Journal of biological chemistry*, 250 6, 2319-23 .
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)41719-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)41719-5).
82. Scott JE, Williams KP. Validación de identidad, pureza de masa y pureza enzimática de preparaciones enzimáticas. 1 de mayo de 2012 [Actualizado el 1 de octubre de 2012]. En: Markossian S, Grossman A, Baskir H, et al., editores. *Manual de orientación para ensayos [Internet]*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company y el Centro Nacional para el Avance de las Ciencias Traslacionales;2004-. Tomado de:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK91995/?utm_source=chatgpt.com
83. pET22b RNase A was a gift from Ronald Raines (Addgene plasmid # 58903 ; <http://n2t.net/addgene:58903> ; RRID:Addgene_58903)

Apéndices**Apéndice A****Tabla 10.** *ANOVA (one-way) para concentraciones de IPTG*

Concentración (mM)	Media	Desviación estándar	n
0.1	0.39	0.24	3
0.2	1.26	1.47	3
0.4	0.86	0.53	3
0.6	1.44	0.31	3
0.8	3.99	5.87	3
1	2.11	2.72	3
2	1.21	1.14	3