

# **Síntesis de columna de sílica estructurada químicamente con níquel para la purificación de proteínas con cola de poli- histidina.**

## **Nombres y apellidos**

Medina Santos Hany Medina

## **Código estudiantil:**

202012224377

Trabajo de Investigación del Programa de microbiología

## **Tutor(es):**

Elwi Guillermo Machado Sierra

## RESUMEN.

La purificación de proteínas actualmente demanda mucho interés en cuanto a su utilización para el diagnóstico de enfermedades y de uso terapéutico. Estos son capaces de resolver muchas de las necesidades científicas requeridas para la implementación de alternativas biotecnológicas y moleculares las cuales cumplen con las adaptaciones experimentales que promueven técnicas eficientes y de costos considerables, teniendo la facilidad de suplir con los resultados deseados. Los métodos para la purificación de proteína pueden considerarse altamente complejos de acuerdo a su utilización y sus requerimientos económicos, por lo que en el siguiente trabajo se empleó una alternativa estructurada químicamente a partir de la sílica cargada con Ni (II) con la posibilidad de retener a la proteína GFP a través de su cola de poli histidina suspendida en una matriz cromatográfica que busca obtener o sustituir otros métodos que requieran más gastos económicos y carezcan de ahorro de tiempo en cuanto a los resultados.

Para la preparación química de la sílica se utilizaron protocolos diseñados en base a información científica y a la experiencia aportada en el centro de investigación de la Universidad Simón Bolívar Adapta. Así mismo se puso a prueba **el comportamiento de la sílica** basado en la experimentación de usos de reactivos y métodos necesarios para la preparación de la sílica a base de la utilización de APS (aminopropilsilano), determinado como el proceso de silanización, fundamental para iniciar con el montaje de la estructura química con la formación de grupos aminos que a su vez son necesarios para adherir el EDTA, el cual, ayudará a desarrollar y fortalecer la superficie química a la que se desea pegar el níquel. Para la unión del EDTA a la sílica se emplearon dos mecanismos con la capacidad de lograr que a la sílica silanizada se le unieran diversos EDTA, tales como; Método por reflujo y por microondas. Además, de incorporar el sulfato de níquel y el cloruro de níquel para

conseguir la adherencia de este a la matriz cromatográfica. Por otro lado, la proteína GFP requerida para probar la columna cromatográfica compuesta de sílica contaba con una cola de poli histidina, obtenida y expresada por *Escherichia coli* BL21, en la que solo fue necesario aplicar un protocolo de inducción con IPTG y lisis bacteriana debido a que estas ya venían transformadas con el plásmido pET28 para la obtención de GFP.

Los resultados del siguiente trabajo demostraron que para la estructuración química de la sílica los protocolos más eficientes provienen del protocolo de Adherencia del EDTA a través de microondas, lo cual, fue de gran ventaja debido a que necesita menor tiempo para elaborar el proceso y es una técnica más práctica. Así mismo, la utilización del sulfato de níquel demostró ser más preciso en cuanto a la retención de GFP en la columna. Por otro lado, en el proceso final de la obtención de GFP pura se suministraron diferentes gradientes de concentración de imidazol durante la purificación, en la cual, se logró desprender a GFP de la columna y tener la proteína purificada.

Por otra parte, se concluyó que es importante explorar diversas alternativas capaces de suplir y reemplazar métodos que demandan elevados costos y complejidad para su obtención, teniendo en cuenta que el fundamento y experimentación sean eficientes y recursivos.

**Palabras claves:** Cromatografía, proteína, biotecnología, *E. coli*, economía, columna y purificación.

## **ABSTRACT.**

Protein purification currently demands much interest in terms of its use for disease diagnosis and therapeutic use capable of solving many of the scientific needs

required for the implementation of biotechnological and molecular alternatives that meet the experimental adaptations that promote efficient and cost-effective techniques capable of supplying the desired results. The methods for protein purification can be considered highly complex according to their use and economic requirements, so in the following work a chemically structured alternative based on silica loaded with Ni (II) with the ability to retain the GFP protein through its polyhistidine tail suspended in a chromatographic matrix was used to replace other methods that require more economic expenses and lack of time savings in terms of results.

For the chemical preparation of the silica, protocols designed on the basis of scientific information and the experience contributed by doctors and professionals of the life sciences research center of the Simón Bolívar University were used. Likewise, the behavior of the silica was tested based on the experimentation of the use of reagents and methods necessary for the preparation of the silica based on the use of APS (aminopropylsilane), determined as the silanization process, fundamental to start with the assembly of the chemical structure with the formation of amino groups that in turn are necessary to adhere the EDTA, which will help to develop and strengthen the chemical surface to which the nickel is to be bonded. For EDTA bonding to the silica, two mechanisms were used with the ability to achieve that the silanized silica is bonded to various EDTA, such as; reflux method and microwave method. In addition, nickel sulfate and nickel chloride were incorporated to achieve their adhesion to the chromatographic matrix. On the other hand, the GFP protein required to test the chromatographic column composed of silica had a polyhistidine tail, obtained and expressed by *E. coli* BL21, in which it was only necessary to apply an induction protocol with IPTG and bacterial lysis because these were already transformed with the plasmid pET28 to obtain GFP.

The results of the following work showed that for the chemical structuring of silica the most efficient protocols come from the EDTA adhesion protocol through

microwaves, which was of great advantage because it needs less time to elaborate the process and it is a more practical technique, likewise, the use of nickel sulfate proved to be more precise in terms of GFP retention in the column. For the final process of obtaining pure GFP, different concentration gradients of imidazole were supplied during the purification process to finally detach GFP from the column and have the protein in high percentages of purity.

On the other hand, it was concluded that it is important to explore different alternatives capable of replacing methods that require high costs and complexity to obtain, taking into account that the foundation and experimentation must be efficient and recursive.

**Key words:** Chromatography, protein, biotechnology, *E. coli*, economy, column and purification.

## REFERENCIAS

1. Purificación de proteínas mediante cromatografía en columna - LabXchange [Internet]. [cited 2023 Oct 31]. Available from: <https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:185da37f:html:1>
2. Yamal. Memoria presentada por Yamal Al-ramahi González para optar al grado de.
3. Tema\_06\_purificacion\_proteinas.
4. Toledo, A, Grado en química. Aerogeles: Nuevas rutas de síntesis. 2016, España-  
[https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/14637/TFG\\_B%C3%A1rbara\\_Toledo.pdf?sequence=1](https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/14637/TFG_B%C3%A1rbara_Toledo.pdf?sequence=1)
5. John Cowdery Kendrew (1917-1997) y el estudio de la estructura de la mioglobina – Medicina, Historia y Sociedad [Internet]. [cited 2023 Nov 1]. Available from: <https://historiadelamedicina.wordpress.com/2015/03/24/john-cowdery-kendrew-1917-1997-y-estudio-de-la-estructura-de-la-mioglobina/>

6. Mayolo-Deloisa KP, Rito-Palomares M. Proteínas PEGiladas: producción, purificación y aplicaciones. Rev Mex Ing Quim [Internet]. 2010 [cited 2023 Nov 1];9(1):17–27. Available from: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-27382010000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382010000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
7. Purificación de proteínas recombinantes.
8. Técnicas de purificación de proteínas - TRABAJO PRÁCTICO No 1: PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEINAS - Studocu [Internet]. [cited 2023 Nov 1]. Available from: <https://www.studocu.com/es-ar/document/universidad-nacional-de-salta/quimica-biologica/tecnicas-de-purificacion-de-proteinas/21548604?shared=n&sid=01698948310>
9. TRABAJO FIN DE GRADO EN QUÍMICA AEROGEL: NUEVAS RUTAS DE SÍNTESIS MEMORIA PRESENTADA POR ASIER BÁRBARA TOLEDO.
10. Elviro Pérez M. Desarrollo y validación de soportes macroporosos para la separación de proteínas mediante cromatografía IMAC. 2017 [cited 2023 Nov 1]; Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=155321&info=resumen&idioma=SPA>
11. Proteínas y Péptidos – cromlab-instruments.es [Internet]. [cited 2023 Nov 1]. Available from: <https://cromlab-instruments.es/proteinas-y-peptidos/>
12. Andrade G, Alcántara H, González M, Silva R, Vilchis Landeros L. Comité Editorial: Purificación de proteínas [Internet]. 2021. Available from: <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
13. MaldonadoCamilo\_2023\_MetodologiaPurificacionComplejo.
14. Ciencias Con Especialidad Ea Biología Molecular E Ingeniería Genética Monterrey EN. UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON. 2005.
15. Ferrer JC, Ferrer Figura JC, Shimomura O, Chalfie Roger Tsien Figura M, de la medusa Aequorea victoria B. Osamu Shimomura, Martin Chalfie y Roger Y. Tsien, premios Nobel de Química 2008: “por el descubrimiento y desarrollo de la proteína verde fluorescente, GFP” [Internet]. Vol. 104, www.rseq.org An. Quím. 2008. Available from: [www.rseq.org](http://www.rseq.org)
16. Welter K. La proteína verde fluorescente-una herramienta valiosa en la biomedicina. 2008 [cited 2023 Oct 31];3(3):99–103. Available from: [www.saber.ula.ve/avancesenquimica](http://www.saber.ula.ve/avancesenquimica)
17. Ludeña Huaman MA. Proceso Sol-Gel en la Síntesis de Dióxido de Silicio (SiO<sub>2</sub>). Revista Bases de la Ciencia. 2021 Aug 30;6(2):1.
18. Gel de sílice para cromatografía en columnas [Internet]. [cited 2023 Nov 1]. Available from: <https://www.geldesilice.com/es/productos/productos-de-gel-de-silicesilicagel/gel-de-silice-para-cromatografia-en-columnas/27/10/11>
19. Cerna E, Ochoa Y, Mendoza R, Badii M, Gallegos G, Landeros J. Evaluación de métodos de cuantificación de proteínas en *Tetranychus urticae* para su uso potencial en la detección de resistencia a plaguicidas. Phytón (Buenos Aires) [Internet]. 2010 [cited 2023 Oct 31];79(2):147–52. Available from:

[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-56572010000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-56572010000200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

20. Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichtig J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim Nova* [Internet]. 1998 [cited 2023 Nov 1];21(6):787–93. Available from: <https://www.scielo.br/j/qn/a/pnCxFMPPrQkjW5vj38BT5kbG/?lang=pt>
21. Vigoda De Leyt D, Vázquez C. Determinación Cuantitativa de Espesores de Níquel por Fluorescencia de Rayos X.
22. Jeong H, Barbe V, Lee CH, Vallenet D, Yu DS, Choi SH, et al. Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3). *J Mol Biol*. 2009 Dec 11;394(4):644–52.
23. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE *ESCHERICHIA COLI* PARA LA PRODUCCIÓN DE CUTINASAS RECOMBINANTES.
24. 9.3: Titulación de complejación - LibreTexts español [Internet]. [cited 2023 Oct 31]. Available from: [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica\\_Anal%C3%ADtica/Qu%C3%ADmica\\_Anal%C3%ADtica\\_2.1\\_%28Harvey%29/09%3A\\_M%C3%A9todos\\_Titrim%C3%A9tricos/9.03%3A\\_Titulaci%C3%B3n\\_de\\_complejaci%C3%B3n](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica/Qu%C3%ADmica_Anal%C3%ADtica_2.1_%28Harvey%29/09%3A_M%C3%A9todos_Titrim%C3%A9tricos/9.03%3A_Titulaci%C3%B3n_de_complejaci%C3%B3n)
25. Universidad ORT Uruguay Facultad de Ingeniería.
26. Giudice CA, Alfieri P V, Canosa G. SILOXANOS SINTETIZADOS “IN SITU” POR EL PROCESO SOL-GEL PARA EL CONTROL DEL ATAQUE FÚNGICO EN MADERAS DE *ARAUCARIA ANGUSTIFOLIA*.
27. Alejandra M, Santana H. Amidación Directa de Ácidos Carboxílicos Asistida por Microondas.
28. 7.- amidas.
29. Yang XD, Zeng XH, Zhao YH, Wang XQ, Pan ZQ, Li L, et al. Silica gel-mediated amide bond formation: An environmentally benign method for liquid-phase synthesis and cytotoxic activities of amides. *J Comb Chem*. 2010 May 10;12(3):307–10.
30. ¿Cómo funciona la inducción de IPTG? | GoldBio [Internet]. [cited 2023 Oct 31]. Available from: <https://goldbio.com/articles/article/unciona-induccion-IPTG>
31. Lucero J, Jaime J, Villa G, Del Rayo Graciela M, Felipe OG, Kiichi AT, et al. Universidad Autónoma Metropolitana, Ciudad de México.
32. Repositorio Institucional Universidad de Pamplona: Purificación del PÉPTIDO POLYGLY y evaluación de sus propiedades interfaciales y emulsificantes. [Internet]. [cited 2023 Nov 1]. Available from: <http://repositoriodspace.unipamplona.edu.co/jspui/handle/20.500.12744/5514>
33. Trujillo E, Fonseca G, García MA, Martínez V. Evaluación de la Cromatografía Iónica para Fomentar su Uso en la Investigación y Estudios de Posgrado en Ciencias del Agua. *Formación universitaria* [Internet]. 2009 [cited 2023 Nov 1];2(1):7–16. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-50062009000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-50062009000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

34. Mirkalantari S, Amirmozafari N, Kazemi B, Irajian G. Molecular cloning of virB12 gene of *Brucella melitensis* 16M strain in pET28a vector Asian Pacific Journal of Tropical Medicine Brucella Cloning virB12 pET28a pJE1.2 [Internet]. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2012. Available from: [www.elsevier.com/locate/apjtm](http://www.elsevier.com/locate/apjtm)
35. Larrieux Idarreta NC, Maresca Stewart FJ. Expresión heteróloga y purificación de Green Fluorescent Protein para su atrapamiento en nanohíbridos con sílica biomimética. 2015 [cited 2023 Nov 1]; Available from: <https://dspace.ort.edu.uy/handle/20.500.11968/3179>
36. Bálint EÉ, Petres J, Szabó M, Orbán CK, Szilágyi L, Ábrahám B. Fluorescence of a histidine-modified enhanced green fluorescent protein (EGFP) effectively quenched by copper(II) ions. J Fluoresc [Internet]. 2013 Mar 6 [cited 2023 Nov 1];23(2):273–81. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10895-012-1145-y>