

Identificación de la proteína hGPN2 recombinante expresada en gel de poliacrilamida empleando análisis de imágenes.

J. J. Juárez Lucero, J. G. García Tovar

Resumen. La búsqueda de la expresión de proteínas recombinantes en bacterias es un proceso tedioso y complicado debida a la cantidad de bandas que expresa al momento de realizar la tinción de Coomassie de la cromatografía en gel de poliacrilamida. Se diseñó un programa que mediante la manipulación de filtros gaussianos y adaptativos permita al analista identificar si se expresó o no la proteína recombinante en bacterias.

Palabras Clave. Gel de Poliacrilamida, análisis de imágenes, proteínas, purificación.

Abstract. The expression of recombinant protein in bacterial is a complicate process a cause of the great quantity of expressed proteins, so with Coomassie blue method revealed appear great quantity of bands in the gel of poliacrilamide. We design a software that manipulate Gaussian and adaptatives filters to verify if the recombinant protein was expressed in bacterials.

Keywords. Poliacrilamide gel, image analysis, protein, purification.

I. INTRODUCCIÓN

La producción de proteínas recombinantes, su expresión y purificación es un área de gran importancia dentro de la biotecnología con gran impacto en la industria farmacéutica. El medio de expresión depende de la proteína que quiera obtenerse y puede ser en *Escherichia coli*, Levadura, Baculovirus y en células de mamíferos [1]. De todos los sistemas de expresión el más sencillo y económico a utilizar es *E. coli*; pero la purificación de proteínas recombinantes en este sistema de expresión que tengan una cola de histidinas y sea purificada en un paso empleando cromatografía de

afinidad por metales inmovilizados con níquel, presentan muchos contaminantes debido a que muchas proteínas internas de *E. coli* se enlazan al níquel cargado de la matriz de Ni-NTA y se eluyen junto con la proteína recombinante [2-5]. Los resultados obtenidos en la expresión de proteínas son analizados mediante el revelado de geles de poliacrilamida por alguna técnica de tinción. Los geles aparecen divididos en columnas con bandas que representan cada una de las proteínas expresadas. Para identificar la proteína recombinante se comparan dos columnas, la primera sin la expresión de la proteína y la segunda que la contenga. El analista deberá de identificar si la banda existe en una de las columnas concluyendo que la expresión de la proteína recombinante fue o no un éxito. La mala interpretación de las bandas lleva a conclusiones erróneas, un gel mal revelado o decolorado son eliminados y se tienen que repetir los experimentos con el incremento en el gasto de material biológico que a veces pueda ser imposible de recuperar como una muestra de sangre o un banco de genes [6].

El procesamiento digital de imágenes es un área que permite segmentar imágenes biomédicas y poder extraer información relevante de la misma imagen. La segmentación permite extraer perfiles de ADN o proteínas en una población específica [7]. Se han desarrollado algunas técnicas para poder desarrollar imágenes de geles, se tienen análisis Top Hat para

Jorge Jaime Juárez Lucero.
Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla.
jjlucero@gmail.com

José Guadalupe García Tovar.
Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla.
jose_garcia_tovar@hotmail.com

realizar análisis de histogramas por parte del equipo de Xiangyun [8], el uso de algoritmos geométricos para identificar manchas similares entre imágenes diferentes [9], Bajla y colaboradores analizan geles de poliacrilamida de secuencias de ADN empleando convoluciones gaussianas para eliminar el ruido de fondo [10]. Dowsey logra representar bandas alineadas y mejora la calidad de las imágenes obtenidas de geles [11]. Brauner en el 2014 consigue eliminar falsos positivos y mejora la calidad de las imágenes de tal forma que el analista pueda distinguir cuales son las proteínas reales dentro del gel [12]. Este proyecto presenta el desarrollo de un software que aplicando diferentes técnicas de filtrado de imágenes permite que el analista pueda diferenciar las bandas presentes en un gel de poliacrilamida y le permita detectar si se dió la expresión de la proteína recombinante expresada en *E. coli*.

II. OBJETIVOS.

Desarrollar un software que permita dar un procesamiento inicial de la imagen obtenida de geles de poliacrilamida que permita ayudar al analista en la búsqueda de la expresión de proteína recombinante en *E. coli*.

III. METODOLOGÍA.

Se realizó la construcción molecular para expresar la proteína Gpn2 humana en el vector de expresión bacteriana pET28 y se introdujo en la bacteria *E. coli* BL-21 (DE3) como se reporta en (13). 100 μ l de resina del kit de novagen se incubaron con 25 μ l de sulfato de níquel mas 175 μ l de una solución amortiguadora constituida de Tris-HCl 100 mM y KCl 100 mM a pH 8.2. Se rotó por 15 minutos para lavarse con la misma solución tampón.

Las bacterias con la construcción molecular se crecieron a 37 grados en 600 ml de LB y se indujeron con IPTG a 200 μ M dejando crecer por 24 horas a 10 grados. Se tomó 1 ml de muestra de bacterias antes y después de la inducción, se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4 grados y se realizó la purificación por el método IMAC.

Para realizar la purificación se sonicaron las muestras de *E. coli* (Branson sonifier) 3 pulsos por 30 segundos con un intervalo de descanso. La muestra final se centrifugó a 13,000 rpm por 20 minutos y se rotó en la resina por el mismo tiempo para finalmente realizar lavados con la misma solución amortiguadora conteniendo 80 mM de imidazole.

El resultado de la purificación se analizó en gel desnaturizante dd poliacrilamida SDS y se tiñeron con azul de Coomassie.

Programación de transformadas gaussianas y de filtros adaptativos para analizar las imágenes obtenidas de geles de poliacrilamida.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La purificación por el método IMAC empleando como vector de expresión a *E. coli* retiene proteínas contaminantes que son eluidas junto con la proteína recombinante [3-5]. Posterior al tratamiento de purificación, las muestras son separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida y se revela con azul de Coomassie. Las muestras se acomodan por columnas donde se comparan las bandas que representan a las proteínas. Para identificar si se ha expresado la proteína recombinante deberá de existir una banda que solamente aparecerá en una columna pero no en las demás tal y como aparece remarcada en la figura 1.

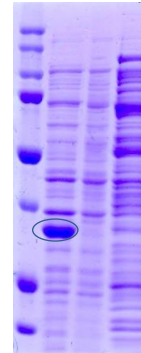


Figura 1. Gel de poliacrilamida revelado con azul de Coomassie. Línea 1 marcador de peso molecular. Línea 2 control positivo de expresión de la proteína recombinante. Línea 3 control negativo. Línea 4 purificación de la proteína recombinante.

Sin embargo, las bandas pueden traslaparse o aparecer de una manera muy tenue y el analista no siempre logra distinguir si se ha expresado o no la proteína recombinante (figura 2) lo que conlleva a repetición de experimentos, gastos de reactivos y tiempo para poder verificar si se está funcionando el sistema de expresión.

Debido a que el uso de *E. coli* presenta un elevado número de contaminantes lo que se traduce a un gel con una gran cantidad de manchas, utilizando técnicas de análisis de imágenes empleando filtros gaussianos y adaptativos se puede ir eliminando la cantidad de contaminantes e ir identificando si se encuentra expresada la proteína recombinante dentro del gel.

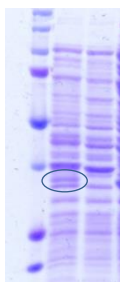


Figura 2. Gel de poliacrilamida revelado con azul de Coomassie. Línea 1 marcador de peso molecular. Línea 2 control positivo de expresión de la proteína recombinante. Línea 3 control negativo.

Primero se diseñó la interfaz inicial que permitió la captura y el procesamiento de los gels (ver figura 3)

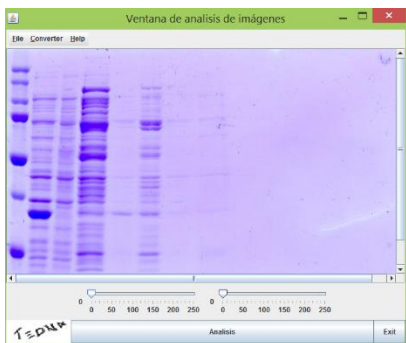


Figura 3. Interfaz inicial para procesar las imágenes de gels de poliacrilamida.

Se aplican filtros gaussianos los cuales permiten recortar el contorno de las imágenes, en este caso, recortar o delimitar las bandas del gel (figura 4).

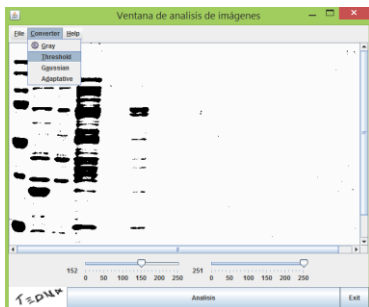


Figura 4. Filtro gaussiano delimitando contorno de las bandas analizadas en el gel de poliacrilamida.

Por último se realiza un ajuste mediante un filtro adaptativo donde las bandas se encuentran completamente separadas (figura 5).

Como puede apreciarse, después de éste último análisis entonces las bandas quedan completamente separadas y el analista puede apreciar la banda que corresponde a la proteína recombinante expresada en

bacterias. La figura 6 indica el resultado final donde puede apreciarse la banda correspondiente a la proteína expresada en bacterias y que con éste tratamiento inicial permite su identificación.



Figura 5. Filtro adaptativo aplicado a la imagen del gel de poliacrilamida.

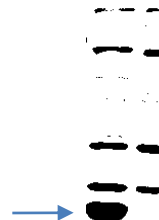


Figura 6. La flecha indica la proteína recombinante expresada en E. coli.

V. CONCLUSIONES

La búsqueda de la expresión de proteínas recombinantes en bacterias resulta complicado debido a la expresión de proteínas contaminantes que pueden traslapar o esconder la banda de interés. El desarrollo de este software permite mediante filtros gaussianos y adaptativos poder eliminar la mayoría de los contaminantes y facilitar al analista la ubicación de la proteína recombinante expresada.

VI. REFERENCIAS

- [1]. Messerschmidt A. Structural Genomics. X-ray crystallography of biomacromolecules. Wiley P. Wiley-Vch, Germany, 203-219. 2007.
- [2]. Gelūnaite L., Luksa V., Sudziuvienė O., Bumelis V., Pesliakas H. Chelated mercury as a ligand in immobilized metal ion affinity chromatography of proteins. *J. Chromatogr. A.* (904):131-143. 2000
- [3]. Boden V., Winzerling J.J., Vijayalakshmi M., Porath J. Rapid one-step purification of goat immunoglobulins by immobilized metal ion affinity chromatography, *J. Immunol. Meth.* (181):225-232. 1995.

- [4]. Tishchenko G, Hodrová B, Simunek J, Bleha M. Nickel and copper complexes of a chelating methacrylate sorbent in the purification of chitinases and specific immunoglobulin G1 by immobilized metal ion affinity chromatography. *J. Chromatogr. A.* (983):125-132. 2003.
- [5]. Todorova-Balvay D., Pitiot O., Bourhim M., Srikrishnan T., Vijayalakshmi M. Immobilized metal-ion affinity chromatography of human antibodies and their proteolytic fragments. *J. Chromatogr. B.* (808):57-62. 2004.
- [6]. Koprowski R., Wróbel Z., Korzyńska A., Chwiałkowska K., Kwasniewski M. Automatic analysis of 2D polyacrylamide gels in the diagnosis of DNA polymorphisms. *Biomedical Engineering Online.* (12): 1-14. 2013.
- [7]. Deserno T. M. *Biomedical Image Processing.* USA. Springer. 2011.
- [8]. Ye X., Suen C. Y., Cheriet M., Wang E. A recent Development in Image Analysis of Electrophoresis Gels. *Vision Interface. Canada,* May 19-21. 1999.
- [9]. Efrat A., Hoffmann F., Kriegel K., Schultz C., Wenk C. Geometric algorithms for the analysis of 2D-Electrophoresis gels. RECOMB 01, *Proceedings of the fifth annual international conference on computational biology.* USA. 114-123. 2011.
- [10]. Bajla I., Holländer I., Burg K. Improvement of electrophoretic gel image analysis. *Measurement Science Review.* (1): 5-10. 2011.
- [11]. Dowsey A., Morris J. S., Gutsein H. B., Yang G. Z. Informatics and statistics for analyzing 2-D gel electrophoresis images. *Methods Mol. Biol.* (604): 239-255. 2010.
- [12]. Brauner J. M., Groemer T. W., Stroebel A., Grosse-Holz S., Oberstein T., Wiltfang J., Kornhuber J., Maler J. M. Spot quantification in two dimensional gel electrophoresis image analysis: comparison of different approaches and presentation of a novel compound fitting algorithm. *Bioinformatics.* (181): 112. 2014.
- [13]. Armengaud J., Urbonavicius J., Fernandez B., Chaussinand G., Bujnicki J. M., Grosjean H. N2-Methylation of guanosine at position 10 in tRNA is catalyzed by a THUMP domain-containing, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, conserved in Archaea and Eukaryota. *J. Biol. Chem.* (279):37142-152. 2004.

VII. BIOGRAFÍA



Jorge Jaime Juárez Lucero es investigador en la Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla. Obtuvo su licenciatura en Ciencias de la Computación y su maestría en Ciencias en Optoelectrónica por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Realizó sus estudios doctorales en Biomedicina en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

José Guadalupe García Tovar es alumno del último cuatrimestre de la Ingeniería en Sistemas Computacionales de la Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla.