

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA aSFP RECOMBINANTE BOVINA USANDO FABRICAS CELULARES BACTERIANAS

Recombinant expression and purification of the bovine aSFP using bacterial cell factories

Fabián L. Rueda¹; Jesús A. Polo-Olivella^{1,2}; Jaime A. Cardozo Cerquera¹

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, AGROSAVIA.

Grupo de Investigación en Reproducción Animal Tropical. C.I. Tibaitatá, Kilómetro 14, Vía a Mosquera, Cundinamarca – Colombia

² Maestría en Biología, Universidad del Atlántico, Puerto Colombia, Atlántico – Colombia

Introducción

Las proteínas del plasma seminal (PPS) juegan un papel fundamental en los cambios que sufre la célula espermática desde la eyaculación hasta la fecundación del ovocito. En los bovinos, la estructura y función de las PPS han sido descritas en múltiples trabajos y se ha destacado a las espermadhesinas como un grupo de PPS con gran importancia. Por sus características estructurales, las espermadhesinas están relacionadas con la motilidad espermática y con la protección del espermatozoide contra el estrés oxidativo. Se ha determinado que, dentro de la familia de las espermadhesinas, proteínas como la aSFP (acidic Seminal Plasma Protein) tienen una actividad redox importante que brinda protección al espermatozoide frente a las especies reactivas de oxígeno (ROS) y que esta actividad puede ser aprovechada para mejorar la calidad seminal en procesos de criopreservación.

Objetivo: Evaluar la producción de aSFP de forma heteróloga en una fábrica celular bacteriana (*Escherichia coli*)

Metodología

La secuencia genética reportada para la aSFP (NCBI prot NM_174616.3) fue sintetizada y optimizada para el uso de codón de *E. coli* (inserto). El inserto fue ligado a un plásmido que fue replicado *Escherichia coli* DH5α

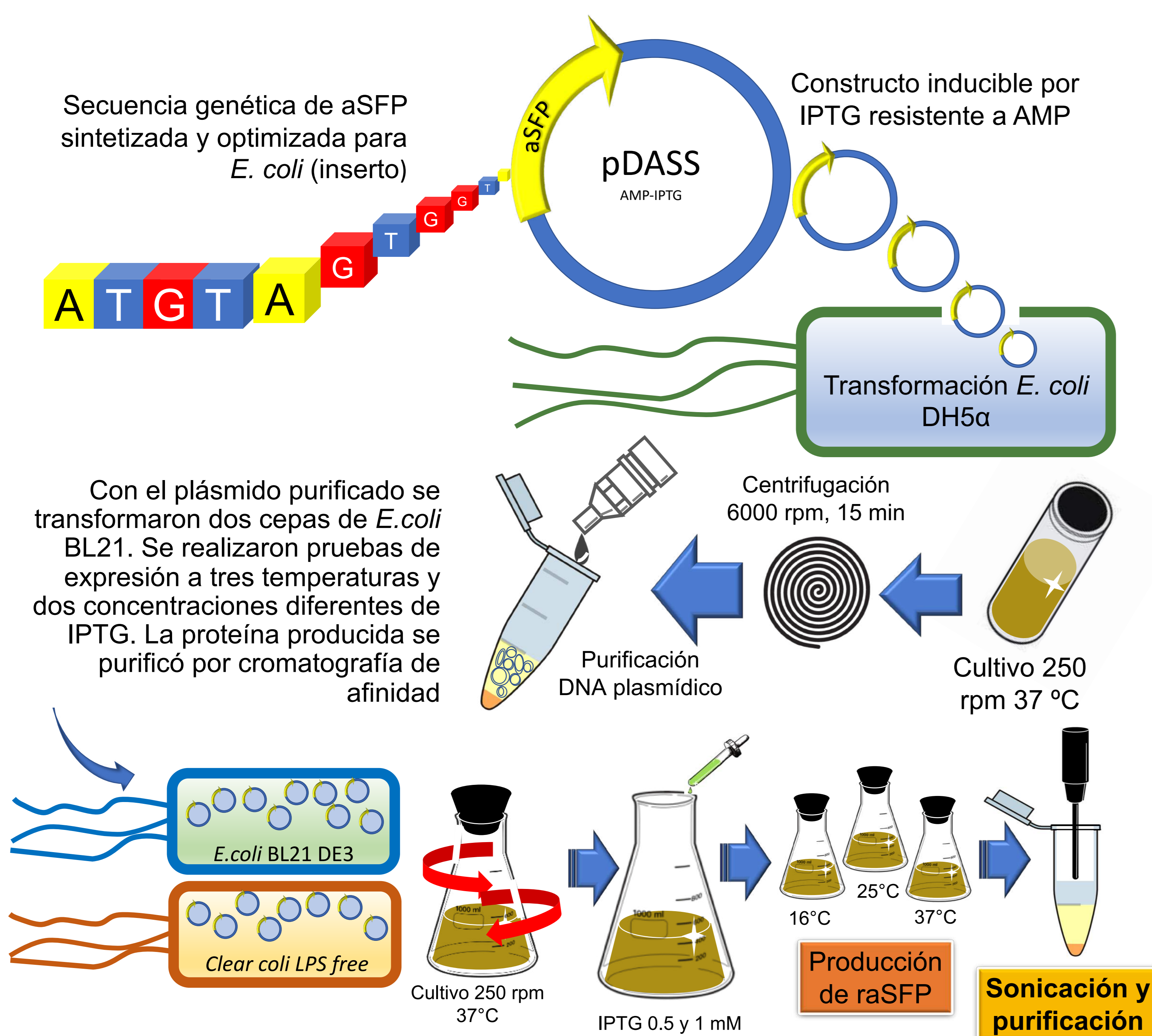


Fig 1. Expresión de aSFP recombinante usando *E. coli*

Resultados

Los resultados obtenidos evidenciaron que la cepa *Clear coli* tiene un crecimiento más lento y alcanza densidades ópticas más bajas que la BL21-DE3

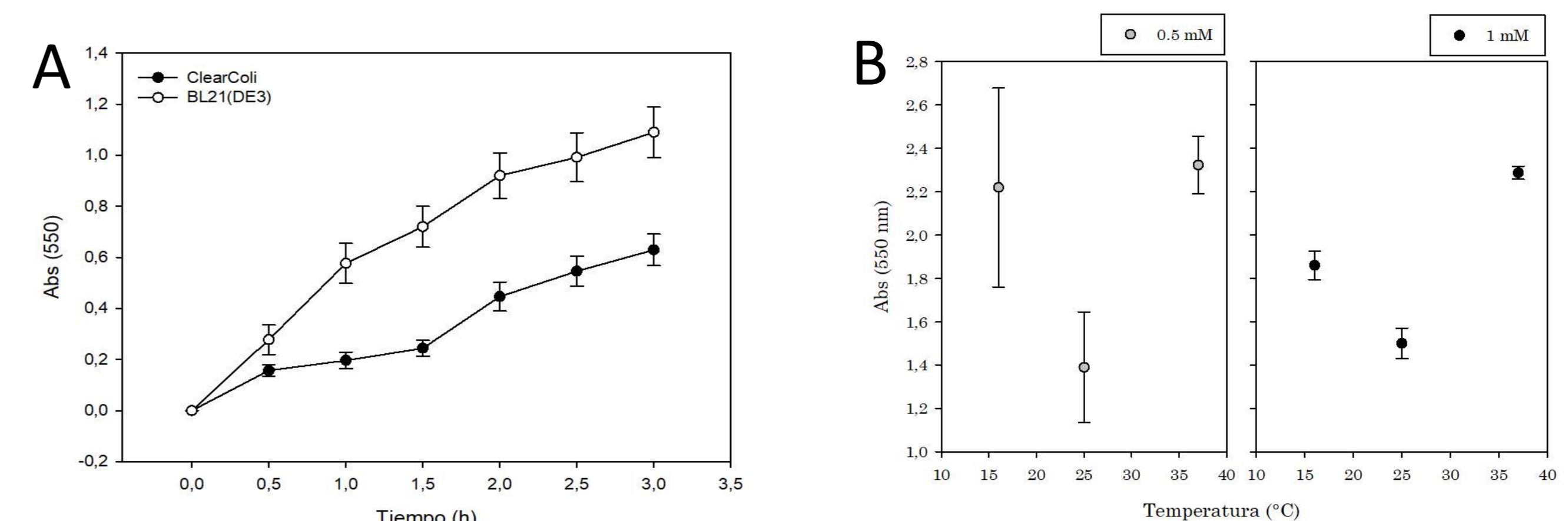


Fig 2: A) Curva de crecimiento de *E. coli* BL21 DE3 y *Clear coli* (LPS free) y B) Crecimiento promedio post-inducción a diferentes concentraciones de IPTG de la cepa *Clear coli* transformada

Sin embargo, en la cepa *Clear coli* se logró expresar la raSFP, en mayor cantidad, mientras en la BL21-DE3 los niveles de proteína fueron prácticamente indetectables por western blot

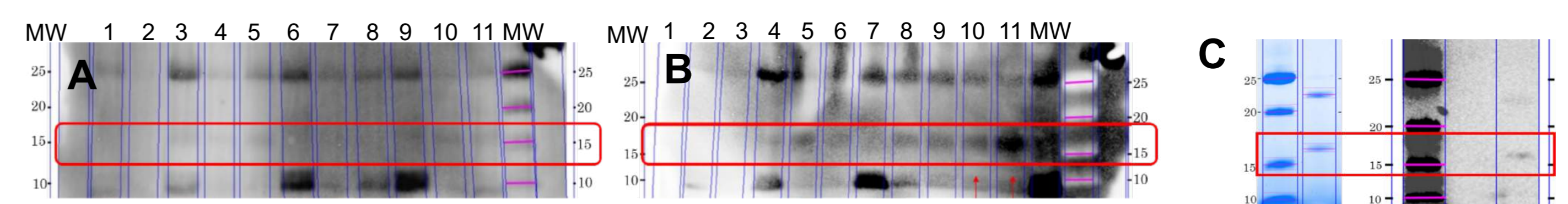


Fig 3: Western blot revelado con anti-his de: A) raSFP soluble e insoluble producido en *E. coli* BL21 DE3 (no se detectan bandas); B) raSFP producido en *Clear coli* a 1 mM de IPTG de forma soluble (líneas 2, 4, 6, 8, y 10) e insoluble (líneas 3, 5, 7, 9 y 11). Se destaca la banda de mayor área cuando la producción se realiza a 16°C; y C) SDS PAGE y Western blot de la raSFP producida a 16°C después de la purificación por cromatografía de afinidad.

Las mejores condiciones para expresar raSFP usando *Clear coli* fueron 16°C y con IPTG 1mM. Sin embargo, hay una alta tendencia de la proteína a la agregación. A estas condiciones se logró purificar alrededor de 2 µg/mL. La identificación por espectrometría de masas confirmó la secuencia de la proteína.

Conclusión

Se logró producir la proteína aSFP bovina de forma recombinante usando la maquinaria celular de *E. coli*. Sin embargo, es necesario optimizar las condiciones de producción para poder realizar ensayos de criopreservación espermática. Así, teniendo en cuenta la estructura y función de la aSFP, su producción de forma recombinante podría convertirse en una alternativa para el mejoramiento de medios de criopreservación y, en consecuencia, los procesos de fertilización *in vivo* e *in vitro*

Agradecimientos

Este trabajo fue posible gracias a la colaboración de la plataforma de producción de proteínas PPP del instituto de biotecnología y biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Gracias especiales al Dr. Paolo Saccardo y a la Dra. Neus Ferrer

Referencias

- Bustamante-Filho, I., Salton, G. D., Munari, F. M., Schneider, M. R., Mattos, R. C., Laurino, J. P., ... Jobim, M. I. M. (2014). Recombinant expression and purification of the bovine acidic Seminal Fluid Protein. *Animal Reproduction*, 11(2), 96–103.
- Cajazeiras, J. B., Melo, L. M., Albuquerque, E. S., Rádis-Baptista, G., Cavada, B. S., & Freitas, V. J. F. (2009). Analysis of protein expression and a new prokaryotic expression system for goat (*Capra hircus*) spermadhesin Bdh-2 cDNA. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 8(3), 1147–1157. <https://doi.org/10.4238/vol8-3gmr639>
- Rueda, F., Herrera, R., Arbeláez, L., Garcés, T., Velasquez, H., Peña, M., & Cardozo, J. A. (2013). Increase in post-thaw viability by adding seminal plasma proteins to Sanmartinero and Zebu sperm. Incremento en la viabilidad espermática post-descongelación por la adición de proteínas del plasma. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26, 98–107