

FERMENTACIÓN Y BIOPROCESAMIENTO DE PROTEÍNAS CROMOGENICAS

Ref.ED-305

5 grupos de estudiantes

¡ATENCIÓN! IMPORTANTE

Esta práctica contiene antibióticos que se utilizan para mantener los cultivos libres de contaminación. Los estudiantes que tienen alergias a los antibióticos, incluido **AMPICILINA**, no deben participar en esta práctica.

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

Este kit abarca prácticamente todas las etapas que tienen lugar en el proceso obtención de un producto de interés mediante la biotecnología.

El **bioprocesamiento** es la producción y separación de productos deseados a partir de células vivas. En esta introducción al bioprocesamiento, los estudiantes usarán fermentadores a pequeña escala para producir proteínas cromogénicas utilizando *Escherichia coli*. Los extractos de proteínas se separarán luego mediante cromatografía en columna para analizar el éxito del proceso de fermentación. Finalmente, las soluciones de proteínas se examinarán mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS para determinar la pureza de las proteínas cromogénicas.

2. COMPONENTES para 5 grupos de estudiantes

COMPONENTES	Conservación
A BactoBeads™ transformado con plásmido púrpura	4°C, con secante
B BactoBeads™ transformado con plásmido rosa	4°C, con secante
C Medio de crecimiento LB concentrado	4°C
D Ampicilina	4°C
E IPTG	4°C
F Tampón de extracción de proteínas	4°C
G Tampón de lavado (10x)	4°C
H Tampón de elución	4°C
I Matriz seca de intercambio de iones	Temperatura ambiente
J Marcadores de proteínas estándar	-20°C
K Solución de glicerol 50%	-20°C
L Solución desnaturizante de proteínas	-20°C

REACTIVOS Y SUMINISTROS

Almacenar todos los componentes detallados a continuación a temperatura ambiente:

- Pipetas de transferencia de plástico estériles.
- Pipetas de transferencia de plástico.
- Tubos de microcentrífuga con tapa a presión de 1,5 ml.
- Tubos de microcentrífuga con tapa a presión de 2,0 ml.

- Tubos de microcentrífuga con tapa de rosca de 2,0 ml.
- Papel de pH
- Tubos de centrífuga de 50 ml.
- Tubos de centrífuga de 15 ml.
- Columnas de cromatografía
- Tampón de electroforesis Tris-glicina-SDS (10x)
- Protein InstaStain[®]
- Solución de carga de gel para prácticas

NOTA: Tras la recepción, almacenar los componentes perecederos a las temperaturas indicadas.

NOTA: Ninguno de los componentes de este kit se ha preparado a partir de material humano.

NOTA: Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

2.1 Material requerido y no suministrado

- Micropipetas automáticas (de 5-50 μ l y 20-200 μ l recomendadas)
- Centrífuga (la velocidad máxima debe ser 10000xG o mayor)
- Aparato de electroforesis en gel vertical y fuente de alimentación
- Contenedor para la basura
- Soportes y abrazaderas de columna
- Placas y varillas de agitación
- Termómetros
- Probetas
- Matraz Erlenmeyer (se recomiendan dos de 250 ml y cinco de 500 ml)
- Etanol 70%
- Agua destilada
- Espectrofotómetro y cubetas.
- Papel de aluminio
- Agitador vortex
- Marcadores de laboratorio o rotuladores
- Baño de agua
- 3 geles de poliacrilamida
- Ácido acético glacial
- Metanol
- Bomba de aire y tubos flexibles (opcional)
- Incubadora con agitación (opcional)
- Autoclave y papel de autoclave u horno (opcional)

NOTA: Asegúrense que el material de vidrio esté limpio, seco y libre de residuos de jabón. Para mayor comodidad, se pueden comprar pipetas de transferencia desechables adicionales para los pasos de extracción y de lavado con líquidos.

3. INTRODUCCIÓN

Durante más de 6000 años, el proceso de fermentación se ha utilizado para la conservación de alimentos. Sin embargo, no fue hasta la década de 1850 que los microbiólogos, incluido **Louis Pasteur**, demostraron que los microorganismos eran los agentes responsables de la fermentación. Desde entonces, los investigadores han aprendido que la fermentación es el resultado de estos microorganismos que rompen los enlaces químicos en las moléculas de azúcar y almidón para crear energía. Los subproductos de este proceso (por ejemplo, ácido láctico, etanol y ácido acético) son alimentos básicos de nuestra dieta, donde se incluyen yogur, chucrut y vino.

Las tecnologías actuales han extendido la utilidad de la fermentación, que ahora se puede explotar para fabricar productos tan diversos como biocombustibles, biofármacos y productos de química fina. Hoy en día, los estudios sobre el proceso de fermentación continúan produciendo nuevos y emocionantes avances. Por ejemplo, los genetistas microbianos han identificado nuevas cepas de microorganismos que crecen más rápido y generan una amplia variedad de vitaminas o antibióticos. La ingeniería genética y el ADN recombinante han permitido a los científicos producir grandes cantidades de proteínas importantes, convirtiendo las células en fábricas vivas. La **insulina**, que es una hormona utilizada para controlar la diabetes, fue la primera medicación para uso humano producida por ingeniería genética. Los medicamentos recombinantes, como antibióticos, interferón y factor VIII de coagulación sanguínea, han ayudado a salvar millones de vidas y han mejorado la calidad de vida de muchos más.

Hoy en día, los productos de fermentación comercialmente relevantes generalmente se clasifican en uno de estos cuatro grupos:

1. Metabolitos producidos naturalmente por las células microbianas:
 - a. Metabolitos primarios que se producen durante el crecimiento, desarrollo o reproducción normal de un organismo. Por ejemplo, etanol, ácido cítrico, lisina, vitaminas, polisacáridos.
 - b. Metabolitos secundarios producidos por un organismo, pero que no son necesarios para su crecimiento, desarrollo o reproducción normal. Por ejemplo, la producción de antibióticos.
 - c. Enzimas producidas naturalmente por las células microbianas. Por ejemplo, amilasa, proteasa, pectinasa, celulasa, lipasa, lactasa, estreptoquinasa.
2. Proteína recombinante expresada por las células microbianas. Por ejemplo, insulina, interferón, factor de coagulación VIII, la vacuna contra la hepatitis B.
3. Compuestos químicos modificados por microbios (**bioconversión**). Por ejemplo, biotransformación de esteroides.
4. Las propias células microbianas. Por ejemplo, extractos de levadura de células enteras, levadura de panadería, *Lactobacillus*, *E.coli*.

La demanda de estos productos ha fomentado el desarrollo de nuevas tecnologías para la ingeniería genética, la fermentación y la purificación de biomoléculas.

ENTENDIENDO EL CRECIMIENTO MICROBIANO

La **fermentación** requiere condiciones de crecimiento que proporcionen a las células oxígeno, agua, minerales esenciales y fuentes de carbono y nitrógeno. Debido a que cada organismo tiene diferentes requisitos físicos y químicos para el crecimiento, la formulación puede variar mucho según el organismo y el proceso. En una fermentación natural, las condiciones de crecimiento son proporcionadas por la fuente de alimento que se fermenta. A la inversa, los científicos pueden fabricar cuidadosamente los medios de crecimiento para optimizar las condiciones y maximizar el rendimiento en un experimento de bioprocésamiento.

El crecimiento microbiano no ocurre inmediatamente después de la inoculación del medio nutriente seleccionado. Un período posterior a la inoculación, llamado **fase de latencia (lag phase)**, permite que las células se adapten al nuevo entorno sintetizando los factores necesarios para el crecimiento y la división celular. Una vez que se aclimatan a las condiciones de crecimiento, los microbios entran en la **fase de desarrollo (log phase)**, el tiempo durante el cual las células crecen y la división se produce a un ritmo exponencial. Esta es la etapa óptima para aplicaciones de bioprocesamiento, ya que la maquinaria biológica dentro de las células está preparada para un rápido crecimiento y expresión de proteínas. Finalmente, la tasa de crecimiento dentro de un cultivo disminuye debido a la menor disponibilidad de nutrientes y un aumento de la concentración de compuestos tóxicos hace que algunas células mueran. Cuando la tasa de muerte celular es igual a la tasa de crecimiento celular, el cultivo ha entrado en lo que se conoce como **fase estacionaria (stationary phase)**. El cultivo persistirá en la fase estacionaria hasta que los nutrientes se agoten o hasta que las toxinas en el cultivo produzcan lisis celular. En este punto, las células entran en la **fase de muerte (death phase)** y mueren a una tasa exponencial (**Figura 1**).

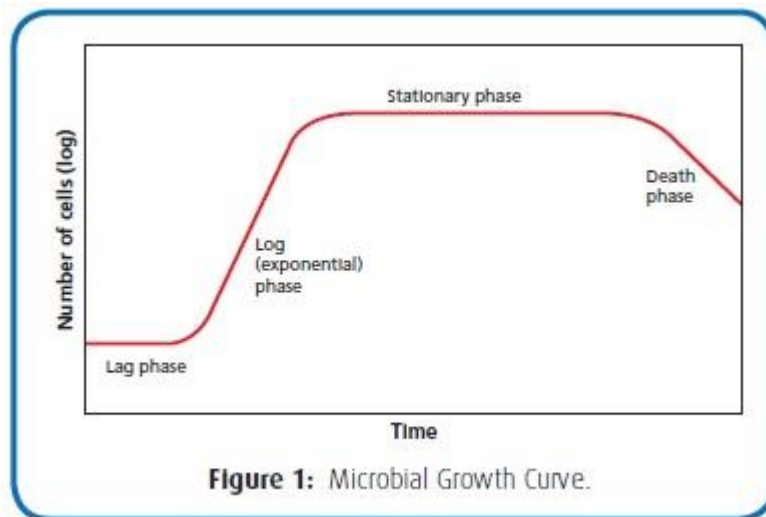


Figure 1: Microbial Growth Curve.

RECIPIENTES DE FERMENTACIÓN (BIORREACTORES O FERMENTADORES)

En la práctica, la fermentación requiere la selección cuidadosa de las condiciones de cultivo para mantener las células en un estado favorable que permita la producción del producto deseado. Las células se cultivan en un equipo conocido como **fermentador** (o **biorreactor**), que está equipado con sensores que monitorizan continuamente las condiciones ambientales durante el proceso de fermentación (**Figura 2**). Esta información se utiliza para optimizar las condiciones de cultivo. Algunos de los factores que los fermentadores pueden controlar incluyen la temperatura, los niveles de oxígeno, el pH, los agentes antiespumantes y la velocidad de mezcla.

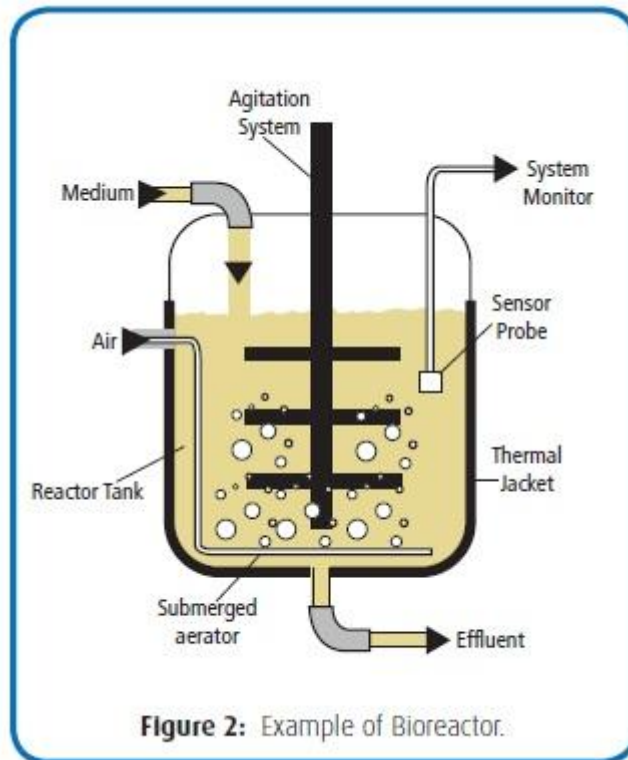


Figure 2: Example of Bioreactor.

Los fermentadores se pueden utilizar para preparar cultivos en escalas muy diferentes. Si bien se pueden preparar cultivos pequeños (1-10 litros), los fermentadores son especialmente útiles para volúmenes de cultivo muy grandes (> 1,000 litros). Sin embargo, una reacción de fermentación a gran escala no puede iniciarse en un volumen tan grande. En su lugar, se prepara un cultivo de "reserva" muy pequeño (5-10 ml) de células, que luego se utiliza para inocular un volumen algo mayor (200 a 1.000 ml) de medio fresco. Cuando estos cultivos alcanzan el crecimiento en fase log, se utilizan, a su vez, para inocular un volumen aún mayor (10-100 litros) en un fermentador de semillas. Como su nombre indica, el cultivo de semillas se usa para "sembrar", o para servir como la fuente inicial de células para el cultivo final, que se cultiva en un fermentador de producción (1,000 a 100,000 litros).

Hay tres tipos principales de sistemas de fermentación: por lotes, por lotes alimentados o continuos (**Figura 3**). En la fermentación **por lotes**, el método más básico, el medio de crecimiento estéril se inocula y la fermentación se realiza sin ninguna adición o eliminación del medio. Desafortunadamente, la fermentación por lotes puede llevar a la acumulación de toxinas y al agotamiento de nutrientes, lo que puede retardar el crecimiento del cultivo. Para contrarrestar el agotamiento de nutrientes, la fermentación **por lotes alimentados** se basa en la adición de medio de crecimiento fresco en diferentes momentos; sin embargo, no se elimina ningún medio de crecimiento hasta el final del proceso. Durante la fermentación **continua**, se agrega medio de crecimiento fresco mientras se elimina el cultivo usado. Esta reposición de nutrientes asegura que el cultivo se mantenga en la fase de desarrollo, lo que permite la producción máxima del producto.

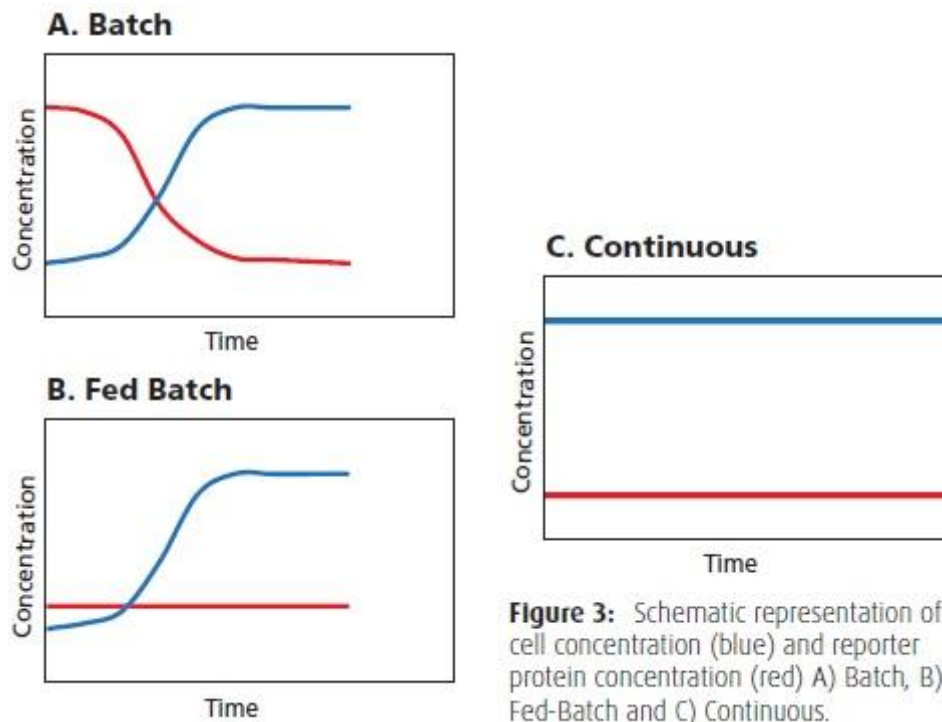


Figure 3: Schematic representation of cell concentration (blue) and reporter protein concentration (red) A) Batch, B) Fed-Batch and C) Continuous.

Una vez que se completa la fermentación, las biomoléculas deseadas deben recogerse del cultivo. Esta práctica es conocida como **bioprocesamiento**. A veces, la molécula del producto puede ser secretada directamente en el medio por las células. Sin embargo, si la molécula se retiene intracelularmente, las células deben romperse para liberar la molécula de interés para su recuperación. Una vez que el producto está disponible en el medio, se puede separar fácilmente de las células o sus residuos mediante centrifugación o filtración. Cuando se purifica, el producto se puede utilizar finalmente para fines comerciales y/o industriales (resumido en la **Figura 4**).

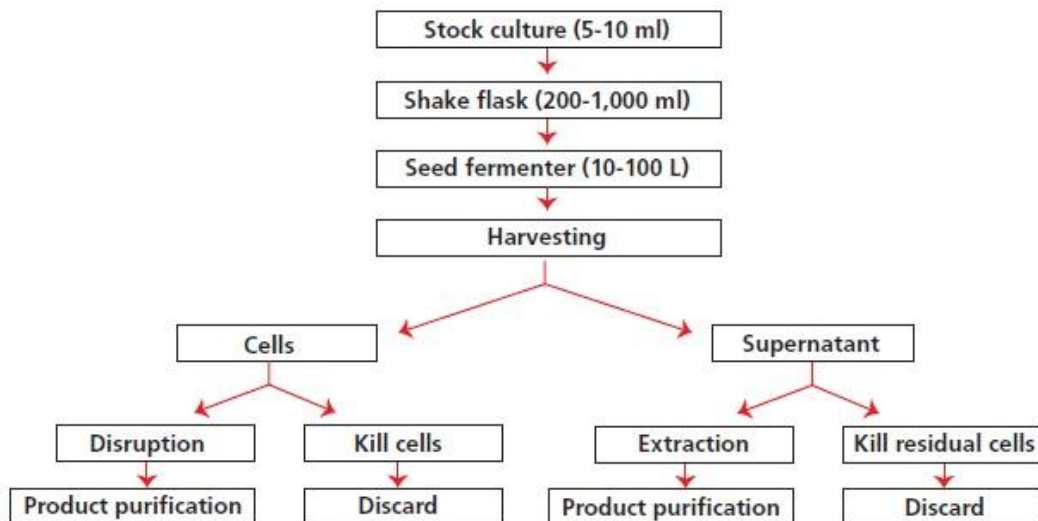


Figure 4: Schematic for large-scale fermentation process.

USO DE MARCADORES PROTEICOS EN BIOTECNOLOGÍA

Los **marcadores proteicos fluorescentes** se han convertido en una herramienta esencial en biología celular y molecular. La mejor proteína fluorescente conocida, la **Proteína Fluorescente Verde** (o **GFP**), posee la capacidad de absorber la luz azul y emitir luz verde en respuesta sin la necesidad de sustratos especiales adicionales,

productos genéticos o cofactores. Usando estrategias de clonación de ADN, las proteínas pueden ser "etiquetadas" con proteínas fluorescentes y luego expresarse en las células. Estas etiquetas simplifican la purificación porque las proteínas marcadas con fluorescencia pueden rastrearse mediante luz UV.

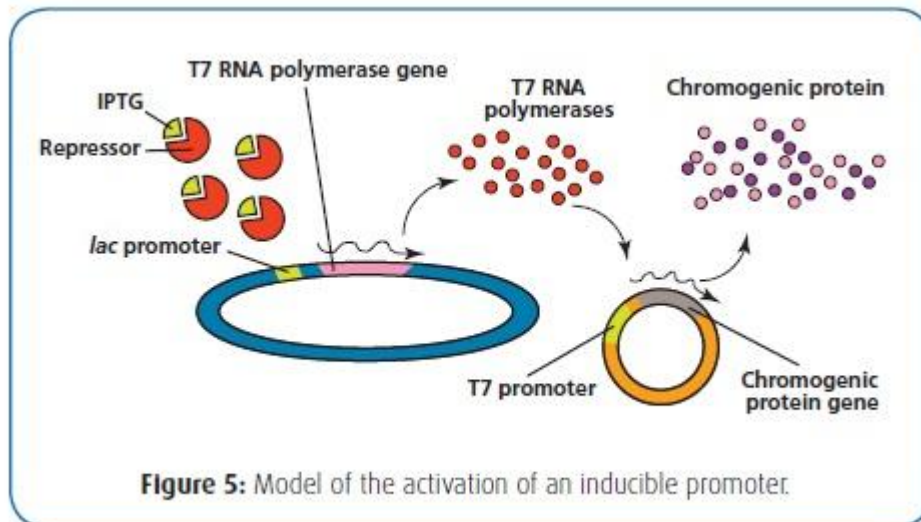
Una de las aplicaciones más útiles de las proteínas fluorescentes es como una herramienta de visualización durante los estudios de microscopía fluorescente. Usando técnicas de ingeniería genética, los científicos han introducido la secuencia de ADN para GFP en otros organismos, incluidos *E. coli* y el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Recientemente, los biólogos especializados en la síntesis de proteínas han diseñado una gran variedad de proteínas para ser utilizadas en lugar de GFP. Primero, los científicos buscaron en una base de datos de secuencias de ADN para identificar los genes que se predijo que producirían proteínas coloreadas. Los fragmentos de estos genes se unieron para crear pequeñas proteínas quiméricas (con una masa de, aproximadamente, 27 kilodaltons). Estos nuevos genes se clonaron en un plásmido y se transformaron en *E. coli*. Curiosamente, además de una variedad de proteínas fluorescentes, los científicos también descubrieron varios genes que producían células altamente pigmentadas. Estas coloridas **proteínas cromogénicas** eran visibles a simple vista, lo que significa que no era necesaria una fuente de luz UV o un microscopio fluorescente para la visualización. Las proteínas cromogénicas ya se están utilizando en biotecnología como controles para la expresión de proteínas y como marcadores visuales para la purificación de proteínas.

EXPRESIÓN DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EN CÉLULAS MICROBIANAS

La fabricación de productos proteicos en microbios es una aplicación extremadamente importante de la ingeniería genética. Usando tecnología de ADN recombinante, los científicos copian genes específicos y los insertan en un **plásmido**, que es una pequeña pieza de ADN extracromosómica que se propaga por las bacterias. El gen puede luego transcribirse por la ARN polimerasa y traducirse a proteínas, después de lo cual se extrae de las células.

Muchas veces, la expresión de nuestro gen de interés está bajo el control de un **promotor** inducible. Estos promotores solo son activos en presencia de una molécula particular, como arabinosa, tetraciclina o isopropil- β -D-tiogalactopirano (IPTG). En este experimento, la cepa bacteriana huésped utilizada para la expresión de proteínas ha sido diseñada genéticamente para contener el gen de una ARN polimerasa especial (T7), que está bajo el control del **promotor lac**. En circunstancias normales, una proteína llamada **represor lac** se une al promotor lac y bloquea la transcripción de la proteína cromogénica. El represor Lac se inactiva en presencia de IPTG, lo que permite la expresión de la polimerasa T7.

La ARN polimerasa de T7 luego reconoce el promotor T7 en el plásmido, transcribiendo de forma selectiva grandes cantidades de ARNm de pChromoPink o pChromoPurple. Luego, el ARNm se traduce para producir las proteínas cromogénicas de color rosa y púrpura (**Figura 5**).



CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO DE IONES

Después de expresar con éxito la proteína, el paso final de la mayoría de los experimentos de bioprocesamiento implica la purificación. En este experimento, las proteínas cromogénicas se purificarán utilizando una **cromatografía de intercambio iónico**. Este proceso utiliza una matriz con carga permanente para unir débilmente las moléculas diana. La mayoría de los compuestos biológicos se cargan positiva o negativamente cuando se exponen a un pH en el rango de 2-10. El lisado celular crudo se pasa sobre la matriz en una columna, lo que permite que las moléculas cargadas correctamente se unan. Las proteínas y otras moléculas que no se unen se lavan. Finalmente, las proteínas restantes se eluyen con un tampón iónico que elimina las moléculas cargadas de la matriz.

En este experimento, los estudiantes explorarán la fermentación y el bioprocesamiento de proteínas cromogénicas de color rosa y púrpura. Las proteínas cromogénicas se expresarán cultivando *E. coli* transformado en un fermentador a pequeña escala. La producción de proteínas se inducirá utilizando IPTG y las condiciones de cultivo se controlarán para optimizar la producción de proteínas. Las células se recolectarán del fermentador y las proteínas cromogénicas se aislarán y purificarán mediante cromatografía de intercambio iónico. Finalmente, se realizará la electroforesis en **gel de SDS-poliacrilamida** (SDS-PAGE) para determinar la pureza de la purificación de la proteína.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

El **bioprocesamiento** es la producción y el aislamiento de productos deseados a partir de células vivas. En esta introducción al bioprocesamiento, los estudiantes usarán fermentadores a pequeña escala para producir proteínas cromogénicas utilizando *Escherichia coli*. Los extractos de proteínas se separarán luego mediante cromatografía en columna para analizar el éxito del proceso de fermentación. Finalmente, las soluciones de proteínas se examinarán mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS para determinar la pureza de las proteínas cromogénicas.

4.1 Precauciones

¡ATENCIÓN! IMPORTANTE

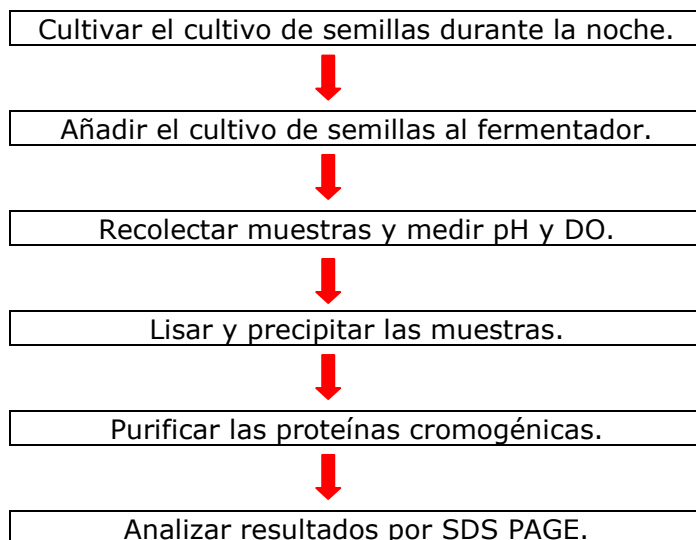
Esta práctica contiene antibióticos que se utilizan para mantener los cultivos libres de contaminación. Los estudiantes que tienen alergias a los antibióticos, incluido **AMPICILINA, no deben participar en esta práctica.**

Aunque las bacterias utilizadas en este experimento no se consideran patógenas, es una buena práctica de laboratorio seguir pautas simples de seguridad en el manejo y eliminación de materiales contaminados con bacterias.

1. Se deben usar los guantes y gafas de protección de forma rutinaria como buenas prácticas de laboratorio.
2. Deben tener mucho cuidado al trabajar con equipos que utilizan calor y/o fusión de los reactivos.
3. NO PIPETEAR LOS REACTIVOS CON LA BOCA - PIPETEAR CON PERAS DE SUCCIÓN.
4. Lavarse bien siempre las manos con agua y jabón después de manipular reactivos o materiales biológicos del laboratorio.
5. Tener cuidado al usar cualquier equipo eléctrico en el laboratorio.
6. La bacteria *E. coli* utilizada en este experimento no se considera patógena. Aunque rara vez se asocia con alguna enfermedad en personas sanas, es una buena práctica seguir pautas de seguridad simples para el manejo y eliminación de materiales contaminados con bacterias.
7. Disponer adecuadamente los materiales después de completar la práctica:
 - a. Limpiar la poyata de trabajo del laboratorio con una solución de lejía al 10% o un desinfectante de laboratorio.
 - b. Todos los materiales, incluidas las pipetas, las pipetas de transferencia y los tubos que entran en contacto con las bacterias deben desinfectarse antes de desecharlos en la basura. Desinfectar los materiales tan pronto como sea posible después de usarlos de una de las siguientes maneras:
 - Autoclavar a 121°C durante 20 minutos. Recoger todos los materiales contaminados en una bolsa desechable y autoclavable. Sellar la bolsa y colócala en una bandeja metálica para evitar cualquier posibilidad de que el medio líquido o el agar se derramen en la cámara del esterilizador.

- Sumergir en solución de lejía 10% durante la noche. Sumergir los tubos abiertos y otros materiales contaminados en un recipiente que contenga una solución de lejía al 10%. Sumergir los materiales durante la noche y luego desecharlos. Usar guantes y gafas protectoras al trabajar con lejía.

4.2 Diagrama de flujo de la práctica



4.3 Requisitos de tiempo (aproximados) de los procedimientos de la práctica

ORGANIZACIÓN Y EJECUCIÓN DEL EXPERIMENTO.

Antes de comenzar este experimento, revise cuidadosamente la lista de Componentes y requisitos en las páginas 1 y 2 para asegurarse de tener todos los componentes y equipos necesarios.

Las pautas que se presentan en este manual se basan en cinco grupos de laboratorio. El experimento se divide en cuatro módulos y debe durar aproximadamente una semana. Las siguientes son pautas de implementación, que se pueden adaptar para adaptarse a su conjunto específico de circunstancias.

REQUISITOS DE TIEMPO APROXIMADOS

Etapa	Que se hace	Cuando	Tiempo requerido
Modulo I: Producción de proteínas cromogénicas	Preparar y esterilizar el medio de cultivo LB	Hasta <u>dos días antes</u> de la práctica	2 horas
	Preparar el cultivo celular (durante la noche)	<u>Un día antes</u> de la práctica	1 hora
	Preparar la incubación con agitación y espectrofotómetro	<u>Una hora antes</u> de la práctica	10 minutos
	Preparar y alicuotar reactivos. Separar los materiales para cada grupo	En cualquier momento antes de la práctica	20 minutos

Modulo II: Separación de las proteínas	Alicuotar el tampón de extracción de proteínas. Separar los materiales para cada grupo	En cualquier momento antes de la práctica	20 minutos
	Preparar baño de agua, congelador, centrifuga y agitador vortex	<u>Una hora antes</u> de la práctica	10 minutos
Modulo III: Purificación de proteínas por cromatografía en columna	Preparar y alicuotar reactivos	<u>Una hora antes</u> de la práctica	10 minutos
	Preparar la matriz de intercambio iónico	<u>Una hora antes</u> de la práctica	30 minutos
Modulo IV: Electroforesis en gel SDS-PAGE	Preparar tampón SDS-PAGE	Hasta <u>un día antes</u> de la práctica	10 minutos
	Preparar y alicuotar reactivos y equipos	En cualquier momento antes de la práctica	30 minutos
	Preparar baño de agua a 99°C	En cualquier momento antes de la práctica	5 minutos
	Preparar las soluciones de tinción y lavado de geles	En cualquier momento antes de la práctica	5 minutos

4.4 Preparaciones previas

Notas a los preparativos del profesor de la práctica

El tamaño de la clase, la duración de las clases de prácticas y la disponibilidad de los equipos son factores que deben ser considerados en la planificación e implementación de esta práctica con sus alumnos. Estas directrices pueden adaptarse para encajar en sus circunstancias específicas.

Registro de las actividades de laboratorio

Los alumnos deben registrar en su libreta de prácticas las actividades indicadas a continuación.

Antes de iniciar la práctica:

- Leer atentamente la introducción y el protocolo.
- Escribir una hipótesis que refleje la práctica.
- Predecir los resultados experimentales.

Durante la práctica:

- Registrar (dibujar) sus observaciones, o fotografiar los resultados.

Al finalizar la práctica:

- Interpretar los resultados y formular una explicación de los mismos, ¿los datos obtenidos respaldan o contradicen la hipótesis inicial?
- Determinar lo que podría cambiar en la práctica si la repites.
- Escribir una hipótesis que refleje este cambio.

Instrucciones generales

A. PREPARATIVOS ANTES DE LA PRÁCTICA

Preparaciones Pre-Laboratorio del Módulo I

PREPARACIÓN DE LOS FERMENTADORES.

Cada grupo mantendrá un fermentador. Recomendamos el uso de frascos de 500 ml con 250 ml de medio, aunque se pueden usar frascos y volúmenes más pequeños. Asegurarse siempre que los frascos mantienen suficiente espacio libre en su interior; recomendamos no llenar los frascos por encima del 50% de capacidad.

ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL DE LABORATORIO

- Una fermentación exitosa depende en gran medida de mantener los cultivos de bacterias libres de contaminación por microorganismos como la levadura, los hongos y los virus. Todos los materiales que entren en contacto con los fermentadores deben ser estériles, y las manipulaciones no deben permitir ningún contacto directo entre los cultivos y los entornos no estériles.
- Para evitar la contaminación, deben esterilizarse los tubos, los cilindros graduados y las barras de agitación utilizadas para este experimento. Se pueden utilizar muchas técnicas diferentes para esterilizar el equipo. Consulte con los fabricantes para garantizar la temperatura o la resistencia química que puede soportar cada equipo antes de seleccionar el método a utilizar.
- Autoclave: Cubrir las aberturas del equipo con papel de aluminio. Autoclave a 121°C durante 15 minutos.

NOTA: se debe utilizar cinta indicadora de autoclave para garantizar que se hayan alcanzado las temperaturas adecuadas.

- Calor seco (horneado): Colocar los componentes en un horno precalentado a 170°C y hornearlos durante 60 minutos. Retirar con cuidado el equipo y cubrir las aberturas con papel de aluminio mientras aún esté caliente.
- Limpieza con alcohol: enjuagar con etanol 70%, asegurando la cobertura de todas las superficies. Dejar que el equipo se seque al aire antes de cubrir las aberturas con papel de aluminio.

Recomendamos que se esterilice: una probeta graduada de 500 ml, una probeta graduada de 100 ml, cinco frascos de 500 ml, dos frascos de 250 ml y siete barras magnéticas de agitación.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CRECIMIENTO LB

Los medios de crecimiento LB pueden prepararse hasta 48 horas antes de comenzar el experimento. El concentrado de medios de crecimiento LB (componente C) que se proporciona en este kit es estéril. Se puede comprar agua destilada o se puede hervir brevemente el agua del grifo para esterilizarla antes de preparar el medio final.

1. En la **Tabla A** se indican las cantidades para PREPARAR los medios que se necesitan para el experimento.

Volumen final	Agua destilada	Medio de cultivo LB concentrado (componente C)
375 ml	262,5 ml	112,5 ml
750 ml	525 ml	225 ml
1000 ml	1050 ml	450 ml

TABLA A

NOTA: Recomendamos 5 grupos con 250 ml de cultivos cada uno, pero se pueden usar fermentadores más pequeños si es necesario. Los medios se pueden mezclar en volúmenes individuales o como un gran volumen y luego dividirse en alícuotas.

2. DISPENSAR 250 ml de medio en 5 frascos estériles. Conservar los medios restantes para preparar cultivos de semillas y para usarlo como blanco en los espectrofotómetros.

3. AGREGAR 0.6 ml de agua estéril al tubo de Ampicilina (Componente D). Mezclar por inversión.

4. AGREGAR 0.1 ml de la solución de ampicilina a cada frasco de 250 ml de medio. Remover para mezclar. Almacenar la ampicilina restante a 4°C para la preparación de cultivos de semillas.

PREPARACIÓN DEL CULTIVO DE SEMILLAS

Este kit incluye bacterias que expresan proteínas cromogénicas de color rosa o púrpura. Las dos proteínas no se separarán durante el experimento de cromatografía, por lo que es importante que cada grupo seleccione una opción por adelantado.

1. ALIQUOTAR 125 ml de medio de crecimiento LB en dos frascos Erlenmeyer estériles de 250 ml. GUARDAR los medios restantes a 4°C para el Módulo IV.

2. AGREGAR 50 µl de ampicilina a los medios de crecimiento en cada frasco.

3. ETIQUETAR cada frasco como "Cultivo de semilla de proteína cromogénica púrpura" o "Cultivo de semilla de proteína cromogénica rosa".

4. AGREGAR el contenido completo de BactoBeads™ transformado con viales de plásmidos de color púrpura o rosa al frasco apropiado. Agitar suavemente para MEZCLAR, asegurándose de que las perlas se disuelvan completamente. CUBRIR con papel de aluminio para evitar la contaminación.

5. INCUBAR los frascos durante la noche a 37°C en una incubadora con agitación.

NOTA: Si no tiene una incubadora con agitador, recomendamos mantener el cultivo en agitación a temperatura ambiente.

6. ALIQUOTAR 25 ml del cultivo de semillas en tubos cónicos de 50 ml para cada grupo de estudiantes.

PREPARACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS CROMOGÉNICAS EN EL FERMENTOR

1. PREPARAR cualquier equipo opcional que vaya a ser utilizado para airear los fermentadores. Esto incluye bombas de aire, platos de agitación e incubadoras con agitación.

2. PREPARAR el espectrofotómetro, las cubetas y el papel de pH para la clase.

5. AGREGAR 0.6 ml de agua estéril al tubo de IPTG (Componente E). Mezclar por inversión.

6. ALIQUOTAR 110 µl de IPTG en un tubo de microcentrífuga con tapa a presión para cada grupo. Almacenar las alícuotas a -20°C hasta que sea necesario.

Preparaciones Pre-Laboratorio del Módulo II

PREPARACIÓN PARA LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS

1. ALIQUOTAR 2.5 ml de tampón de extracción de proteínas (componente F) en un tubo cónico de 15 ml para cada grupo.

2. PREPARAR una centrífuga, un congelador y un agitador vórtex.

3. PREPARAR un baño de agua a 37°C.

Preparaciones Pre-Laboratorio del Módulo III

PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR CROMATOGRAFÍA DE COLUMNA

Empaquetar la columna durante el Módulo III debería llevar a los estudiantes entre 15 y 30 minutos. Para ahorrar tiempo, los alumnos pueden preparar columnas con un día de antelación durante los pasos de incubación del Módulo II o como una actividad separada. Las columnas empaquetadas deben taparse y almacenarse con de tampón de lavado 1x a 4°C hasta que sea necesario.

IMPORTANTE: ¡No dejar que la matriz se seque!

1. ETIQUETAR cinco vasos o frascos como "Tampón de lavado" (Wash Buffer).
2. DILUIR el tampón de lavado concentrado (Componente G) agregando 10 ml de tampón a 90 ml de agua destilada para obtener una solución 1x.
3. ALICUOTAR 5 ml de tampón de lavado para cada uno de los vasos de precipitados o frascos. Guardar el tampón restante para preparar la matriz de intercambio iónico.
4. ETIQUETAR cinco tubos de microcentrífuga con tapa a presión de 2 ml como "Tampón Elución" (Elution Buffer).
5. ALICUOTAR 2 ml de tampón de elución (Componente H) en cada uno de los tubos de microcentrífuga.

PREPARACIÓN DE LA MATRIZ DE INTERCAMBIO IONICO (SLURRY)

1. VERTER todo el contenido de la Matriz de Intercambio de Iones Seca (Componente I) a un vaso de precipitados de 100 ml.
2. AGREGAR 30 ml del tampón de lavado 1x al vaso que contiene la matriz de intercambio iónico. Remover ocasionalmente durante 15 minutos. Usar una cuchara o espátula para separar cualquier grumo duro.
3. ETIQUETAR cinco tubos cónicos de 15 ml como "Matriz de intercambio iónico".
4. VERTER 5 ml de la matriz en cada tubo, mezclando antes de verter cada alícuota.

Preparaciones Pre-Laboratorio - Módulo IV

BUFFER DE ELECTROFORESIS SDS

El tampón Tris-Glycine-SDS se suministra como un concentrado 10x y debe diluirse antes de su uso. Para diluir, agregar 1 parte de tampón concentrado a 9 partes de agua destilada. Consultar las instrucciones del fabricante para conocer el volumen de tampón necesario para su unidad de electroforesis.

1. AGREGAR 160 µl de agua destilada o desionizada al tubo de Marcadores de proteínas estándar (Componente J) y permitir que la muestra se hidrate durante varios minutos. Agitar en vórtex o hacer girar el tubo vigorosamente para mezclar.
2. ALICUOTAR 25 µl de marcadores de proteínas estándar resuspendidos en tubos de microcentrífuga con tapa de presión de 1.5 ml para cada grupo. Las alícuotas se pueden mantener a temperatura ambiente para su uso inmediato o congeladas hasta que se necesiten. ETIQUETAR los tubos como "Marcador estándar".
3. ALICUOTAR 25 µl de glicerol 50% (Componente K) en tubos de microcentrífuga con tapa de presión de 1.5 ml para cada grupo. ETIQUETAR los tubos como "Glicerol 50%".
4. ALICUOTAR 25 µl de solución desnaturalizante de proteínas (Componente L) en tubos de microcentrífuga con tapa de presión de 1.5 ml para cada grupo. ETIQUETAR los tubos como "Solución desnaturalizante".
5. PREPARAR un baño de agua a 99°C para la clase.

NOTA: varios grupos pueden compartir un solo gel de SDS-PAGE.

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TINCIÓN Y DECOLORANTE

1. MEZCLAR 180 ml de metanol, 140 ml de agua destilada y 40 ml de ácido acético glacial. Almacenar a temperatura ambiente hasta que se necesite.

NOTA: La solución almacenada se puede usar para teñir y decolorar los geles SDS-PAGE con Protein InstaStain®.

4.5 Material que debe recibir cada grupo

Cada grupo de prácticas debe recibir los siguientes componentes antes de iniciar el procedimiento experimental:

Módulo I

Para el Módulo I, cada grupo debe recibir:

- 1 frasco Erlenmeyer (500 ml)
- 4 pipetas de transferencia estériles
- 4 tubos de centrifuga (15 ml)
- 1 tubo de IPTG

Módulo II

Para el Módulo II, cada grupo debe recibir:

- 6 tubos de microcentrifuga con tapa a presión (2 ml)
- 4 pipetas de transferencia
- 1 tubo de tampón de extracción de proteínas

Módulo III

Para el Módulo III, cada grupo debe recibir:

- 1 contenedor de residuos
- 4 tubos de microcentrifuga con tapa a presión
- 2 pipetas de transferencia
- 1 columna de cromatografía
- Soporte con anillo
- Abrazaderas de columna
- Tampón de lavado
- Mezcla de matriz de intercambio iónico
- Tampón de elución

Módulo IV

Para el Módulo IV, cada grupo debe recibir:

- 4 tubos de microcentrifuga con tapa de rosca
- 1 tubo de marcadores de proteínas estándar
- 1 tubo de solución de carga en gel de práctica
- 1 tubo de glicerol 50%
- 1 tubo de solución desnaturizante de proteínas
- SDS-PAGE gel
- Solución de tinción de gel

- Tarjeta Protein InstaStain®

4.6 Evitar los errores más comunes

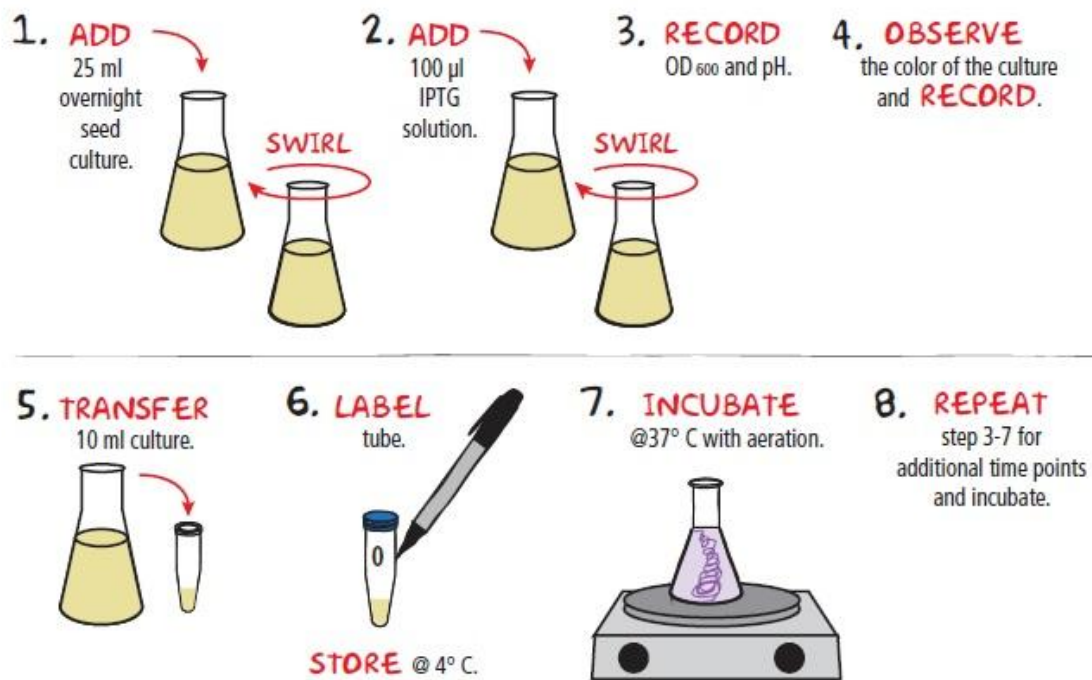
1. Los estudiantes han de tener **mucho cuidado** al transvasar soluciones.
2. Usar solo pipetas limpias y correctamente marcadas y evitar la contaminación cruzada.

5. PRÁCTICA

¡ATENCIÓN! IMPORTANTE

Este experimento contiene antibióticos que se utilizan para mantener los cultivos libres de contaminación. Los estudiantes que tienen alergias a los antibióticos, incluido **AMPICILINA**, no deben participar en este experimento.

Módulo I: Producción de proteínas cromogénicas en el fermentador.



1. INOCULAR el medio en su frasco al agregar 25 ml del cultivo de semilla durante la noche. AGITAR, mediante un movimiento circular, para mezclar.
2. AÑADIR 100 µl de solución de IPTG al frasco. AGITAR, mediante un movimiento circular, para mezclar.
3. Usando el espectrofotómetro y el papel de pH, REGISTRAR la densidad óptica inicial a 600 nm (DO₆₀₀) y el valor de pH en la **Tabla 1**.

Tiempo medición	DO (A600)	pH	Color

Tabla 1: Seguimiento de la fermentación de proteínas cromogénicas.

NOTA: En un cultivo típico, los valores aproximados son DO₆₀₀ inicial 0.2 y el pH 7.0.

4. OBSERVAR el color del cultivo. REGISTRAR las observaciones de DO₆₀₀ y pH a lo largo del tiempo en la **Tabla 1**.

5. Usando una pipeta de transferencia estéril, TRANSFERIR 10 ml del cultivo en un tubo de centrifuga de 15 ml.

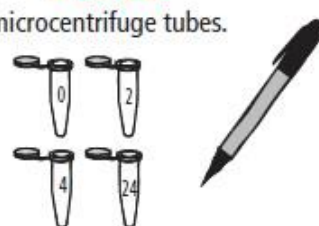
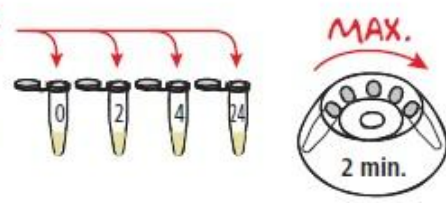

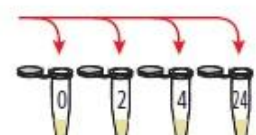



6. ETIQUETAR el tubo con el nombre o número del grupo y la hora en que se tomó la muestra. ALMACENAR el tubo a 4°C para su posterior análisis.

7. INCUBAR el cultivo a 37°C con aireación (por ejemplo: barra de agitación, agitador, bomba de aire).

8. REPETIR los pasos 3 a 7 para obtener puntos de tiempo adicionales. Recomendamos recoger mediciones y muestras adicionales a las 2 horas, 4 horas y 24 horas después de la inoculación.

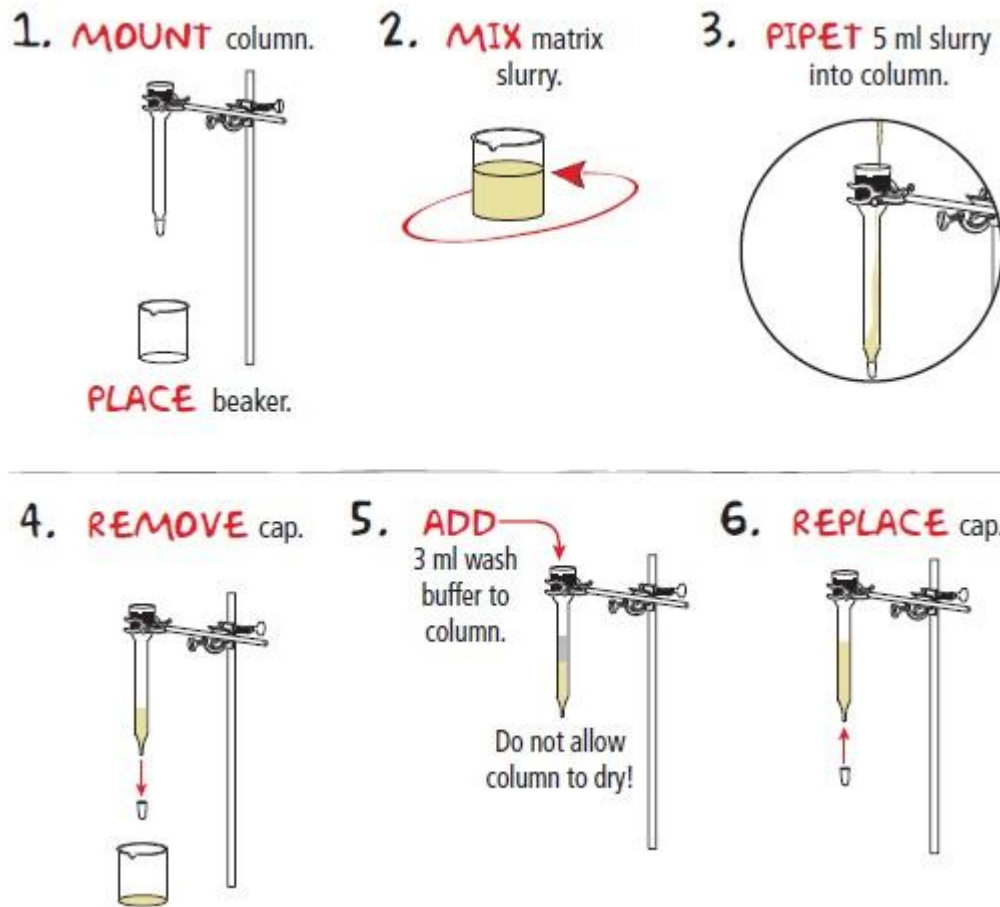
NOTA: Para el análisis del crecimiento celular, usar medio de crecimiento LB+AMP sobrante como blanco para las mediciones de absorbancia del DO₆₀₀. Una vez que se hayan registrado las mediciones, la muestra debe ser descartada de forma segura.

Módulo II: Separación de Proteínas

- LABEL** microcentrifuge tubes. 
- TRANSFER** 2 ml of each sample to each tube. 
- DECANT**  Save pellet.
- ADD** 2 ml additional sample to each tube. 
- REPEAT** steps 2-4 until centrifuged the entire 10 ml sample.
- OBSERVE** and select most vibrant pellet. 
- ADD** 0.5 ml of Protein Extraction Buffer. 
- PIPET** up & down 

1. TOMAR las muestras de cultivo recogidas en el Módulo I y ETIQUETAR un tubo de microcentrífuga con tapa a presión de 2 ml por cada punto de tiempo.
 2. TRANSFERIR 2 ml de cada muestra a los tubos apropiados y CENTRIFICAR durante 2 minutos a la velocidad máxima.
 3. Cuidadosamente DECANTAR y desechar el sobrenadante y guardar el sedimento.
 4. AGREGAR 2 ml de muestra adicional a cada tubo.
 5. REPETIR los pasos 2-4 hasta que se haya centrifugado la muestra completa de 10 ml de cada punto de tiempo.
 6. OBSERVAR cada tubo y seleccionar el tubo que contenga el pellet de color más intenso y vivo. Este punto de tiempo debe contener la mayor concentración de su proteína cromogénica.
 7. AGREGAR 0,5 ml de tampón de extracción de proteínas al tubo elegido en el paso 6.
 8. PIPETEAR hacia arriba y hacia abajo o agitar con agitador vórtex el tubo para asegurarse de que el pellet esté completamente resuspendido.
 9. COLOCAR el tubo de microcentrífuga que contiene las células en el congelador a -20°C durante 15 minutos o hasta que se congele. COLOCAR el tubo de lado para asegurar una congelación rápida.
 10. Una vez que las células estén completamente congeladas, DESCONGELAR las células colocando el tubo en un baño de agua a 37°C.
 11. AGITAR con vórtex vigorosamente las muestras durante 30 segundos.
 12. REPETIR los pasos 9 a 11 dos veces más para lisar completamente las células.
 13. CENTRIFUGAR el tubo en una microcentrífuga durante 10 minutos a la velocidad máxima.
- NOTA:** Después de la centrifugación, el sobrenadante debe contener la proteína. Si el sobrenadante no es de color brillante, repita los pasos 9-13 para congelar, descongelar y centrifugar hasta que el sobrenadante adquiera un color brillante con la proteína cromogénica. Es posible que permanezca algo de color en el pellet.
14. TRANSFERIR 250 µl de sobrenadante en dos tubos limpios y ETIQUETAR cada uno como "Extracto de proteína" y la identificación del grupo al que correspondan.
 15. GUARDAR el extracto en el congelador para la purificación en el Módulo III y el Módulo IV.

Módulo III: Purificación de proteínas mediante cromatografía en columna.



EMPAQUETAR Y EQUILIBRAR LA COLUMNA.

1. MONTAR la columna de cromatografía verticalmente en un soporte con anilla. Asegurar que la columna esté recta. COLOCAR un vaso de precipitados vacío debajo de la columna para recoger el tampón de lavado.

2. MEZCLAR la suspensión de la matriz de intercambio iónico removiendo o agitando suavemente.

3. PIPETEAR 5 ml de la mezcla y verter con cuidado en el interior de la columna dejándola correr por las paredes internas de la columna.

NOTA: Si el flujo se detiene en una bolsa de aire, deje de verter la suspensión y golpear firmemente las paredes de la columna hasta que se elimine el aire y la suspensión continúe fluyendo hacia abajo por el lateral de la columna.

4. QUITAR la tapa de la parte inferior de la columna y permitir que la matriz se empaque en la columna.

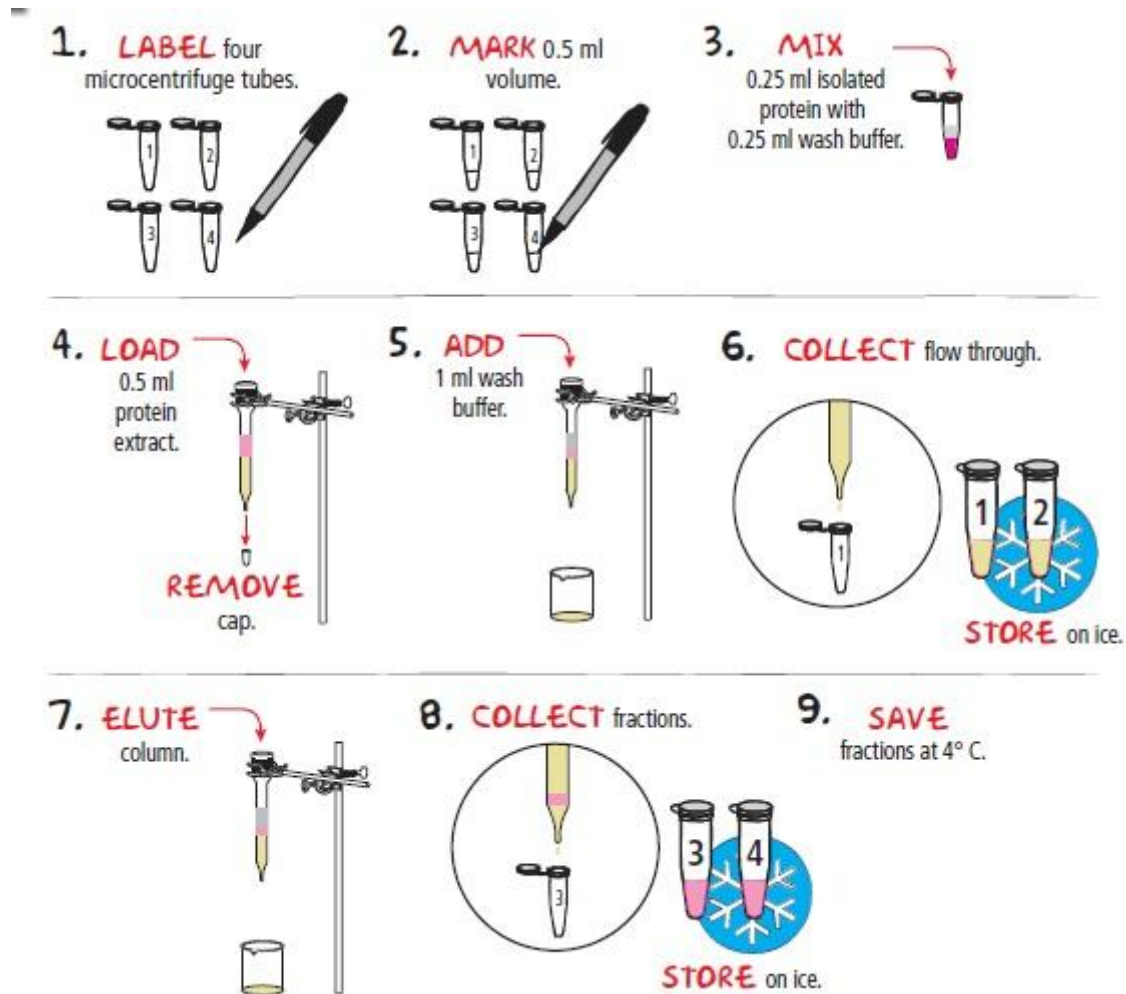
5. AGREGAR 3 ml de tampón de lavado a la columna y dejar que el tampón se drene hasta justo por encima de la matriz. **iNo permitir que la columna se seque!**

6. Volver a COLOCAR la tapa inferior y asegurarse que no gotee la columna (podría provocar que la matriz se seque).



Punto de parada opcional

La columna preparada se puede almacenar a 4°C hasta que sea necesario. Asegúrese de que la tapa esté apretada y selle cuidadosamente la parte superior para evitar que la matriz se seque.

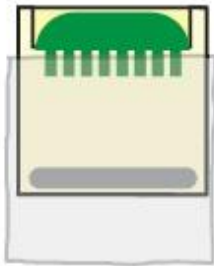


COLECCIONAR LAS FRACCIONES DE PROTEINA DE LA COLUMNA

1. ETIQUETAR cuatro tubos de microcentrífuga con tapa de cierre a presión del 1 al 4.
2. MARCAR cada tubo con un marcador permanente el nivel de volumen de 0,5 ml.
3. MEZCLAR 0.25 ml de la proteína aislada en el Módulo II con un volumen igual de tampón de lavado.
4. CARGAR la columna lentamente con 0,5 ml de extracto de proteína. Retirar la tapa para PERMITIR que el extracto entre por completo en la columna.
5. AGREGAR 1 ml de tampón de lavado para eliminar la proteína que está en el flujo.
6. RECOLECTAR 0.5 ml de flujo a través del tubo #1 y guardarlo en hielo. Repita con el tubo #2.
7. A continuación ELUIR la columna con 2 ml de tampón de elución. Cuando la banda de proteína de color casi alcance la parte inferior de la columna (cerca de la fritada), comenzar a recoger las fracciones en los tubos de microcentrífuga.
8. RECOLECTAR 0.5 ml de elución de proteínas en el tubo #3 y almacenar en hielo. Repetir con el tubo #4.
9. GUARDAR las fracciones a 4°C para su posterior análisis.

Módulo IV - Electroforesis en gel SDS-PAGE

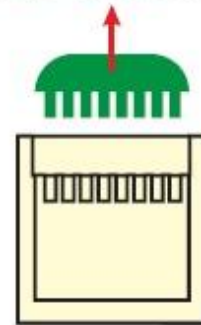
1. **OPEN** pouch & remove cassette.



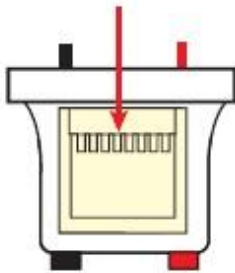
2. **REMOVE** tape.



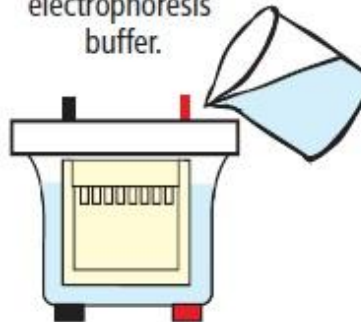
3. **REMOVE** comb.



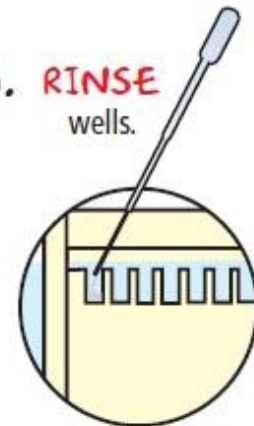
4. **INSERT** gel into electrophoresis chamber.



5. **ADD** diluted electrophoresis buffer.



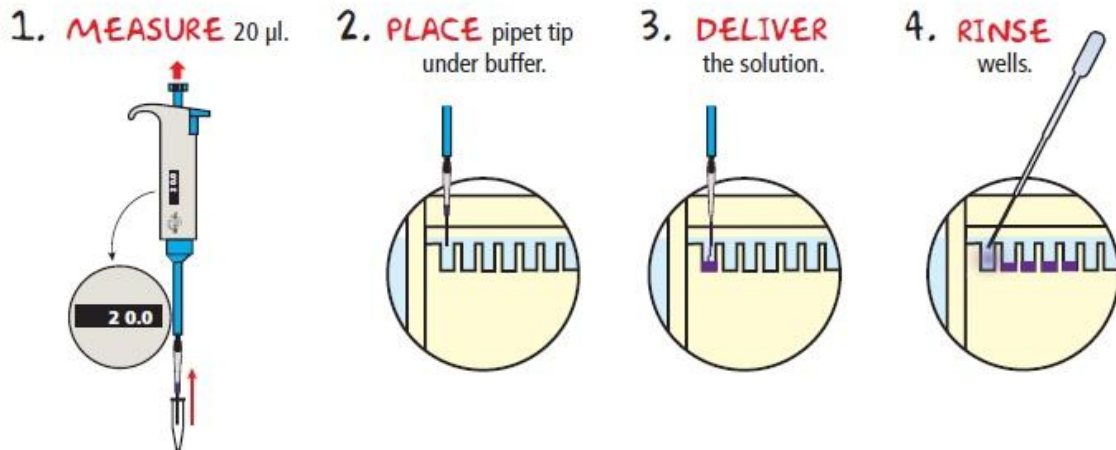
6. **RINSE** wells.



PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA PRECAST PARA ELECTROFORESIS

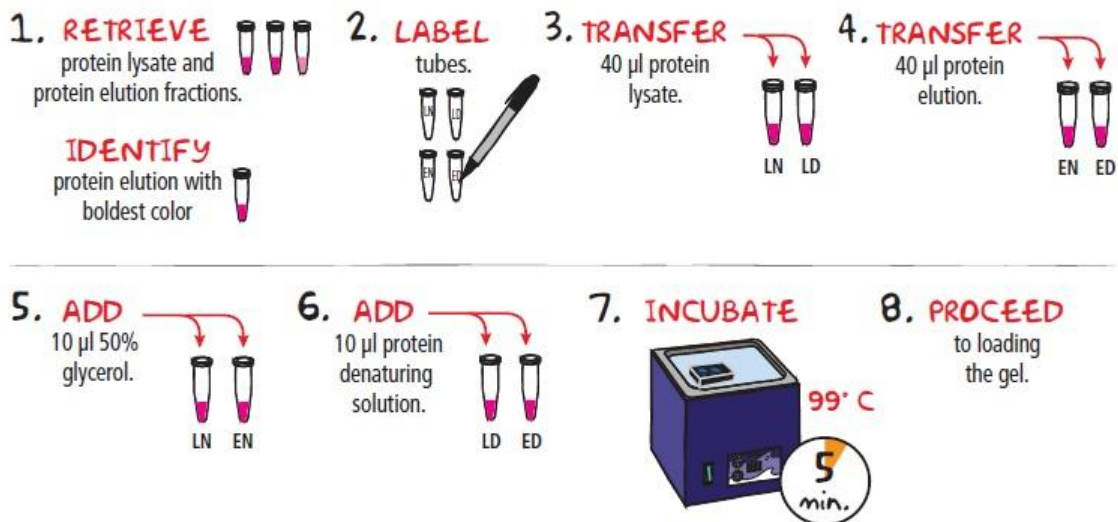
NOTA: Aunque los geles de poliacrilamida y las cámaras de proteínas prefabricados variarán ligeramente en el diseño, el procedimiento para su uso será similar.

1. **ABRIR** la bolsa que contiene el cartucho de gel. Retirar el cassette y colocarlo en su banco con la placa frontal más corta hacia arriba.
2. Muchos geles tienen una etiqueta o cinta adhesiva en la parte inferior de la placa frontal. **RETIRAR** la cinta para exponer la parte inferior del gel.
3. Retirar con cuidado el peine tirando suavemente hacia arriba. Tirar del peine hacia arriba para evitar daños en los pocillos del gel.
4. **INSERTAR** el gel en la cámara de electroforesis. Orientar el gel de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
5. **VERTER** el tampón de electroforesis diluido en la cámara. El tampón debe cubrir la parte superior de la placa frontal, más corta.
6. **ENJUAGAR** cada pocillo introduciendo tampón de electroforesis en los pocillos con una pipeta de transferencia. Ahora el gel está listo para practicar la carga del gel o la carga de muestras.



PRACTICAR LA CARGA DEL GEL

- Usando una punta de micropipeta fina, PIPETEAR 20 µl de solución de práctica de carga de gel.
- COLOCAR la punta de la pipeta debajo del tampón y directamente sobre el pocillo de la muestra, descansando suavemente contra la placa posterior del cartucho de gel.
- DESCARGAR la muestra lentamente presionando el émbolo y luego retirar la pipeta. Continuar practicando con pozos adicionales hasta que los alumnos se sientan cómodos cargando las muestras de proteínas.
- ENJUAGAR la solución de carga de gel de práctica de los pocillos de la muestra antes de cargar las muestras de proteínas obtenidos en los Módulos anteriores. Usando una pipeta de transferencia, DESCARGAR suavemente tampón de electroforesis en los pocillos para desplazar la solución de la práctica.



PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA LA ELECTROFORESIS EN GEL DE SDS-PAGE

- RECUPERAR el lisado de proteínas guardado a 4°C del Módulo II, así como las fracciones de elución de proteínas del Módulo III. IDENTIFICAR el tubo de elución de proteínas con el color más brillante y vivo, esta muestra se utilizará para el análisis de proteínas.
- ETIQUETAR cuatro tubos limpios de microcentrífuga con tapón de rosca como "LN", "LD", "EN" y "ED".

3. TRANSFERIR 40 μ l de lisado de proteína a los tubos "LN" y "LD".
 4. TRANSFERIR 40 μ l de elución de proteínas a los tubos "EN" y "ED".
 5. AGREGAR 10 μ l de glicerol 50% a los tubos "LN" y "EN", luego MEZCLAR cada tubo y reservar. Estas serán sus muestras de proteínas nativas.
 6. AGREGAR 10 μ l de solución desnaturalizante de proteínas a los tubos "LD" y "ED", luego MEZCLAR cada tubo y reservar. Estas serán tus muestras de proteínas desnaturalizadas.
 7. INCUBAR los tubos "LD" y "ED" en un baño de agua a 99°C durante 5 minutos.
- NOTA:** Desnaturalizar las proteínas puede eliminar su color.
8. Proceder inmediatamente a cargar el gel.

Muestra	Etiqueta tubo	Solución proteína	Glicerol 50%	Solución desnaturalizada
Proteína lisada	LN	40 μ l	10 μ l	--
	LD	40 μ l	--	10 μ l
Proteína Eluida	EN	40 μ l	10 μ l	--
	ED	40 μ l	--	10 μ l

Tabla 2: Resumen de la preparación de la muestra de proteína

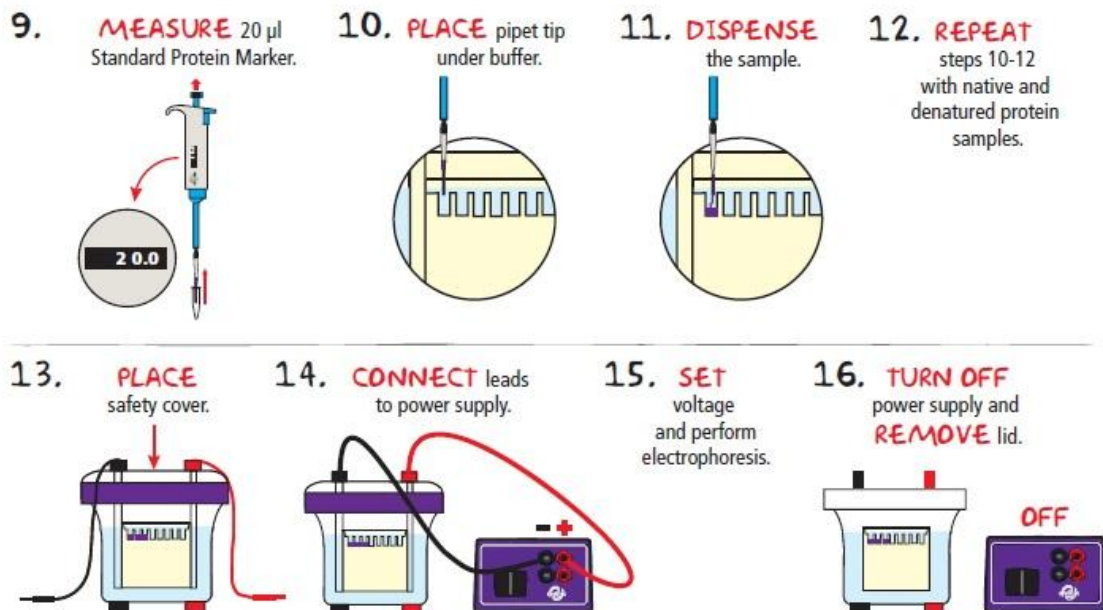


Tabla B	Guía de tiempos y voltajes	
	Tiempos recomendados	
Voltios	Mínimo	Óptimo
100	80 min.	95 min.
125	60 min.	75 min.
150	50 min.	60 min.

9. Con una punta de pipeta nueva, PIPETEAR 20 μ l del Marcador de Proteínas Estándar.

10. COLOAR la punta de la pipeta debajo del tampón y directamente sobre el pocillo de la muestra, descansando suavemente contra la placa posterior del cartucho de gel.

11. DESCARGAR lentamente la muestra presionando el émbolo.

12. REPITIR los pasos 10-11 con las muestras de proteínas nativas y desnaturalizadas, cambiando la punta entre cada nueva muestra. Ver **Tabla 3**.

Ejemplo de gel para grupo del color Rosa	
Línea 1	20 μ l de marcador de proteínas estándar
Línea 2	20 μ l de lisado rosa nativa
Línea 3	20 μ l de lisado rosa desnaturalizado
Línea 4	20 μ l de eluido rosa nativa
Línea 5	20 μ l de eluido rosa desnaturalizado
Ejemplo de gel para grupo del color Púrpura	
Línea 1	20 μ l de marcador de proteínas estándar
Línea 2	20 μ l de lisado púrpura nativa
Línea 3	20 μ l de lisado púrpura desnaturalizado
Línea 4	20 μ l de eluido púrpura nativa
Línea 5	20 μ l de eluido púrpura desnaturalizado

Tabla 3: Carga de gel

13. Una vez que se hayan cargado todas las muestras, COLOCAR la cubierta con cuidado sobre los terminales del electrodo.

14. CONECTAR los cables eléctricos a la fuente de alimentación.

15. AJUSTAR el voltaje de la fuente de alimentación y REALIZAR la electroforesis (consulte la **Tabla B** para conocer las pautas de tiempo y voltaje). Permitir que las proteínas se separen en el gel durante el tiempo recomendado, o hasta que el tinte de rastreo llegue al fondo del gel.

16. APAGAR la fuente de alimentación y retirar con cuidado la tapa. El gel ahora se puede retirar de la cámara y analizar.

NOTA: Aunque las proteínas nativas a menudo son visibles inmediatamente después de concluir la electroforesis, las proteínas desnaturizadas a menudo son invisibles en el gel. Para visualizar las proteínas, es necesario utilizar las tarjetas Protein InstaStain® (consulte el apartado TINCIÓN DE GELES CON PROTEIN INSTASTAIN®).



TINCIÓN DE GELES CON PROTEIN INSTASTAIN®

1. Para retirar el gel del cassette, coloque el cassette y separe con cuidado la placa frontal colocando una moneda o una espátula en la ranura del borde superior, cerca de los pocillos de muestra. GIRAR para separar las dos placas del cassette.
2. Levantar suavemente la placa frontal para alejarla de la placa posterior más grande. El gel debe permanecer en la placa posterior. Si el gel se pega parcialmente a la placa frontal, dejarlo caer sobre la placa posterior.
3. VERTER aproximadamente 100 ml de solución fijadora en una bandeja pequeña.
4. TRANSFERIR la placa posterior de la cassette (con el gel) a la bandeja que contiene la solución fijadora. Mojar los dedos enguantados con solución fijadora y extraiga suavemente el gel de la placa posterior y retire la placa, dejando el gel sumergido en la solución fijadora.
5. Dejar suavemente una hoja de Protein InstaStain® FLOTANDO con el lado de la mancha (azul) orientado hacia el líquido. Retirar la tarjeta Protein InstaStain® después de 30 minutos.
6. CUBRIR la bandeja de tinción con envoltura de saran para evitar la evaporación.
7. AGITAR suavemente en una plataforma oscilante durante 1 a 3 horas o durante la noche.
8. Después de la tinción, OBSERVAR los resultados del gel. Las bandas de proteínas aparecerán de azul medio a oscuro sobre un fondo claro* y estarán listas para obtener excelentes resultados fotográficos.

*Normalmente no es necesario desteñir, pero se puede llevar a cabo si el fondo del gel es demasiado oscuro. Los geles pueden ser desteñidos con varios cambios de solución de decolorante fresca hasta que mejore la apariencia y el contraste de las bandas de proteínas con el fondo.

NOTA: Los geles de poliacrilamida son muy finos y frágiles. Tener cuidado en el manejo para evitar rasgar el gel.

NOTA: Preparación de la solución fijadora y decolorante para cada gel:

Para 100 ml	
Metanol	50 ml
Ácido acético glacial	10 ml
Agua destilada	40 ml

Almacenar el gel

Una vez que se logra un resultado satisfactorio, el gel se puede almacenar en agua destilada. Para un almacenamiento permanente, el gel se puede secar entre dos hojas de envoltorio plástico estiradas en un bastidor. Seque el gel al aire durante varios días hasta que el gel sea fino como el papel. Cortar envoltorio plástico "extra" que rodea el gel seco. Colocar el gel seco durante la noche entre dos libros pesados para evitar que se doble. Pegarlo en la libreta de laboratorio.

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS DE LA PRÁCTICA

6.1 Resultados

A continuación se presentan los resultados del experimento de fermentación de proteínas cromogénicas púrpuras y rosadas cultivadas a 37°C con agitación. Sus resultados pueden variar en función de varios factores, incluida la duración de la incubación, la temperatura y la precisión del pipeteo.

Módulo I: Producción de proteínas cromogénicas en el fermentador.

Frasco #1 - Proteína Cromogénica Púrpura

Tiempo	DO (A₆₀₀)	pH	Color
10:00 AM	0,184	7,0	Marrón claro
12:00 PM	0,788	7,0	Marrón claro
02:00 PM	1,381	7,0	Marrón oscuro
10:00 AM	2,423	8,0	Purpura

Frasco #2 - Proteína Cromogénica Rosa

Tiempo	DO (A₆₀₀)	pH	Color
10:00 AM	0,164	7,0	Marrón claro
12:00 PM	0,889	7,0	Marrón claro
02:00 PM	1,487	7,0	Marrón claro
10:00 AM	2,571	8,0	Rosa



Cultivo de proteínas rosa y purpura después de 24 horas



Línea temporal de la fermentación de la proteína purpura

Módulo II: Separación de Proteínas

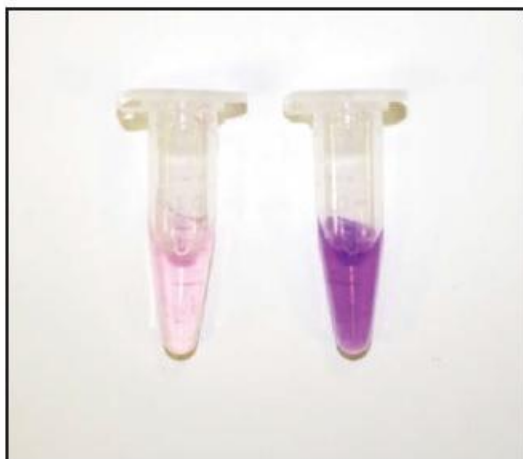


Imagen representativa de extractos de proteínas de color rosa y púrpura.

Módulo III: Purificación de proteínas mediante cromatografía en columna.

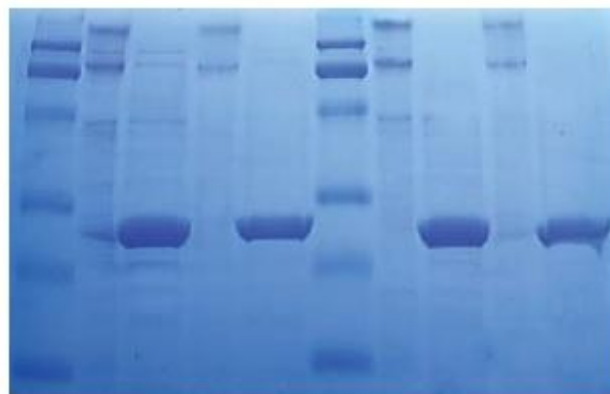


Imagen representativa de la elución de la proteína púrpura.

Módulo IV - Electroforesis en gel SDS-PAGE

Ejemplo de gel para grupo del color Rosa	
Línea 1	20 μ l de marcador de proteínas estándar
Línea 2	20 μ l de lisado rosa original
Línea 3	20 μ l de lisado rosa desnaturalizado
Línea 4	20 μ l de eluido rosa original
Línea 5	20 μ l de eluido rosa desnaturalizado

Ejemplo de gel para grupo del color Púrpura	
Línea 1	20 μ l de marcador de proteínas estándar
Línea 2	20 μ l de lisado púrpura original
Línea 3	20 μ l de lisado púrpura desnaturalizado
Línea 4	20 μ l de eluido púrpura original
Línea 5	20 μ l de eluido púrpura desnaturalizado



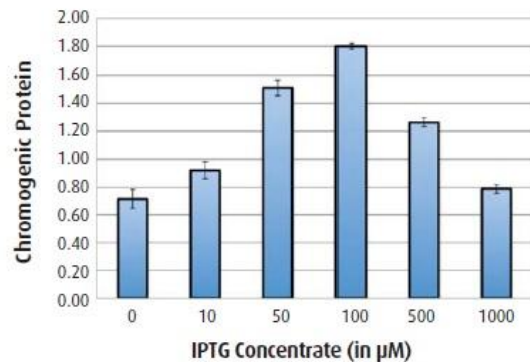
Resultados esperados para el gel de SDS-PAGE teñido con Protein Instastain®

6.2 Preguntas

Responder a las siguientes preguntas en la libreta de prácticas:

1. Comparar y contrastar los tres tipos de fermentación. ¿Qué tipo de fermentación se realizó en este experimento?
2. ¿En qué paso del experimento las células comienzan a producir la proteína cromogénica? ¿Por qué?
3. ¿Por qué podría cambiar el pH del medio de crecimiento durante la fermentación?
4. ¿Cuáles son los productos de fermentación más comunes disponibles en el mercado?
5. ¿Qué tipo de producto son las proteínas cromogénicas? ¿Son intra o extracelulares?
6. Los estudios previos de bioprocesamiento implica optimizar las condiciones de crecimiento microbiano para producir la máxima cantidad de producto. Como ingeniero de bioprocesos, ha decidido cambiar la temperatura y la concentración de IPTG de su proceso de fermentación para aumentar el rendimiento de la proteína. Usted realizó los siguientes experimentos y recopiló los siguientes datos. ¿Qué condiciones utilizarías?

CHROMOGENIC PROTEIN					
Concentration IPTG (uM)	Trial 1	Trial 2	Trial 3	Average	ST DEV
0	0.79	0.69	0.66	0.71	0.068
10	0.95	0.85	0.92	0.92	0.061
50	1.50	1.46	1.57	1.51	0.056
100	1.80	1.82	1.78	1.78	0.020
500	1.24	1.25	1.30	1.26	0.032
1000	0.75	0.80	0.81	0.79	0.032



CHROMOGENIC PROTEIN					
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Trial 1	Trial 2	Trial 3	Average	ST DEV
25	1.51	1.46	1.61	1.53	0.076
30	2.01	1.90	2.22	2.04	0.163
35	1.37	1.01	1.54	1.31	0.271
37	0.99	0.62	0.87	0.83	0.189
40	0.63	0.51	0.43	0.52	0.101

