



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA



Expresión y Purificación de una Nanopartícula de Encapsulina con Proteína Verde Fluorescente Internalizada

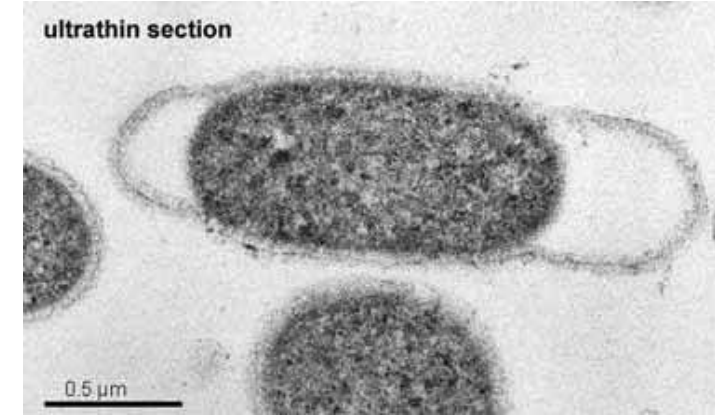
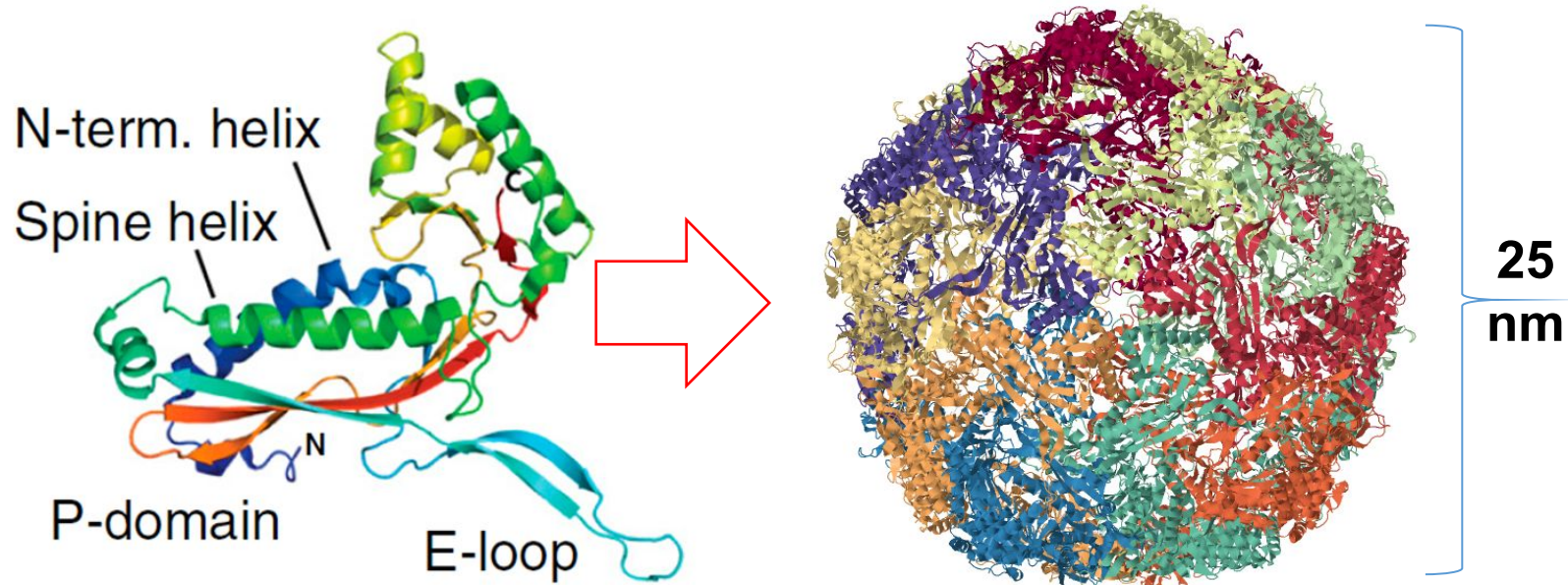
Samira Vera, Walter Cisneros - Laboratorio de Moléculas Individuales
Supervisor: Daniel Guerra Giraldez



INTRODUCCIÓN



Encapsulina se autoensambla formando una partícula “hueca”



Thermotoga maritima, bacteria hipertermófila

Giessen, T. W. (2016). *Current opinion in chemical biology*, 34, 1-10.

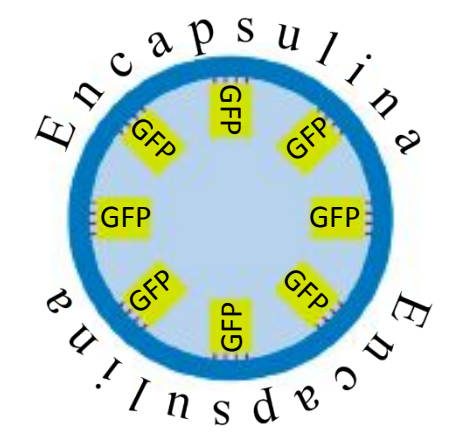
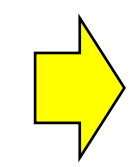
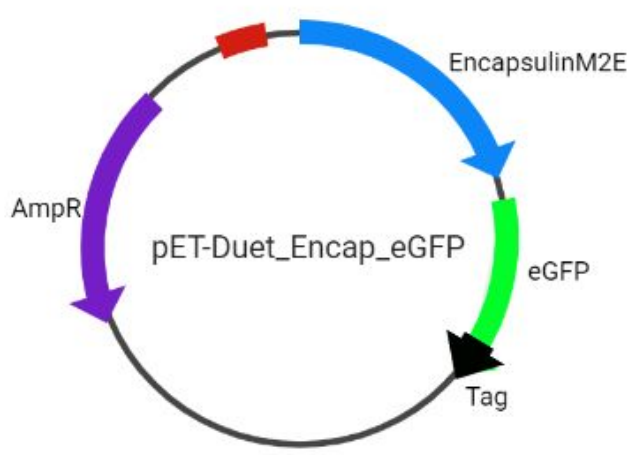
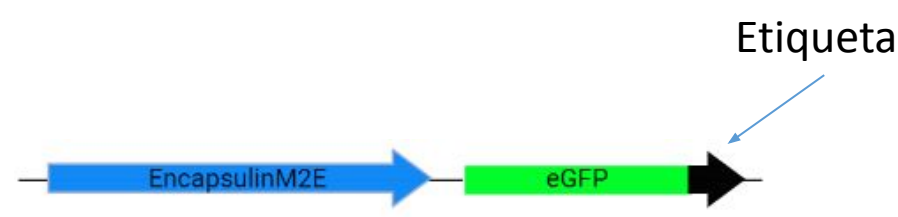
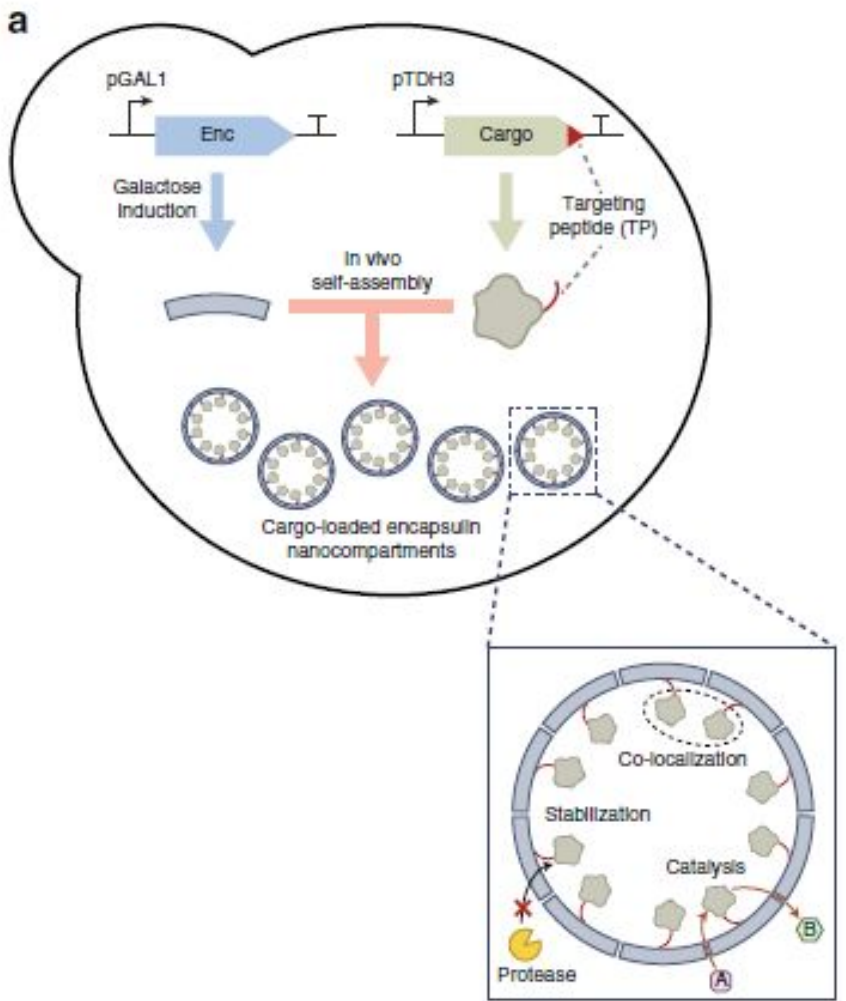
Nichols, R. J., Cassidy-Amstutz, C., Chaijarasphong, T., & Savage, D. F. (2017). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(5), 583-594.

Thermotoga maritima



Tag de interiorización

La nanopartícula encapsulina puede interiorizar proteínas cargo exógenas

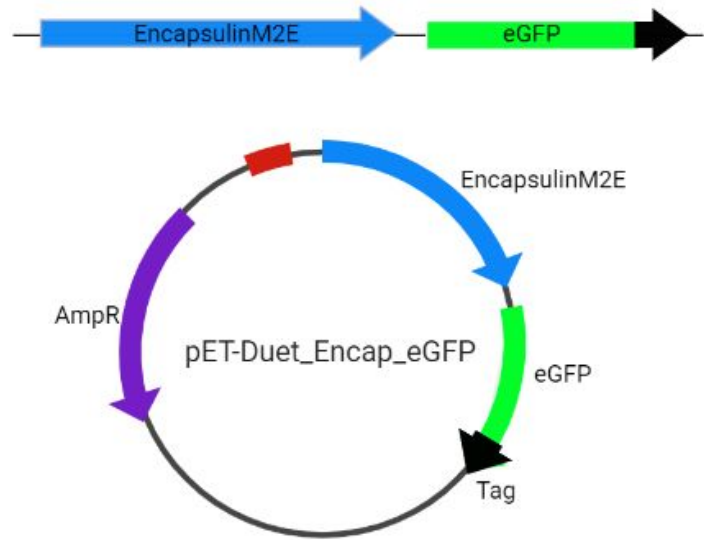


Lau, Y. H., Giessen, T. W., Altenburg, W. J., & Silver, P. A. (2018). Prokaryotic nanocompartments form synthetic organelles in a eukaryote. *Nature communications*, 9(1), 1-7.

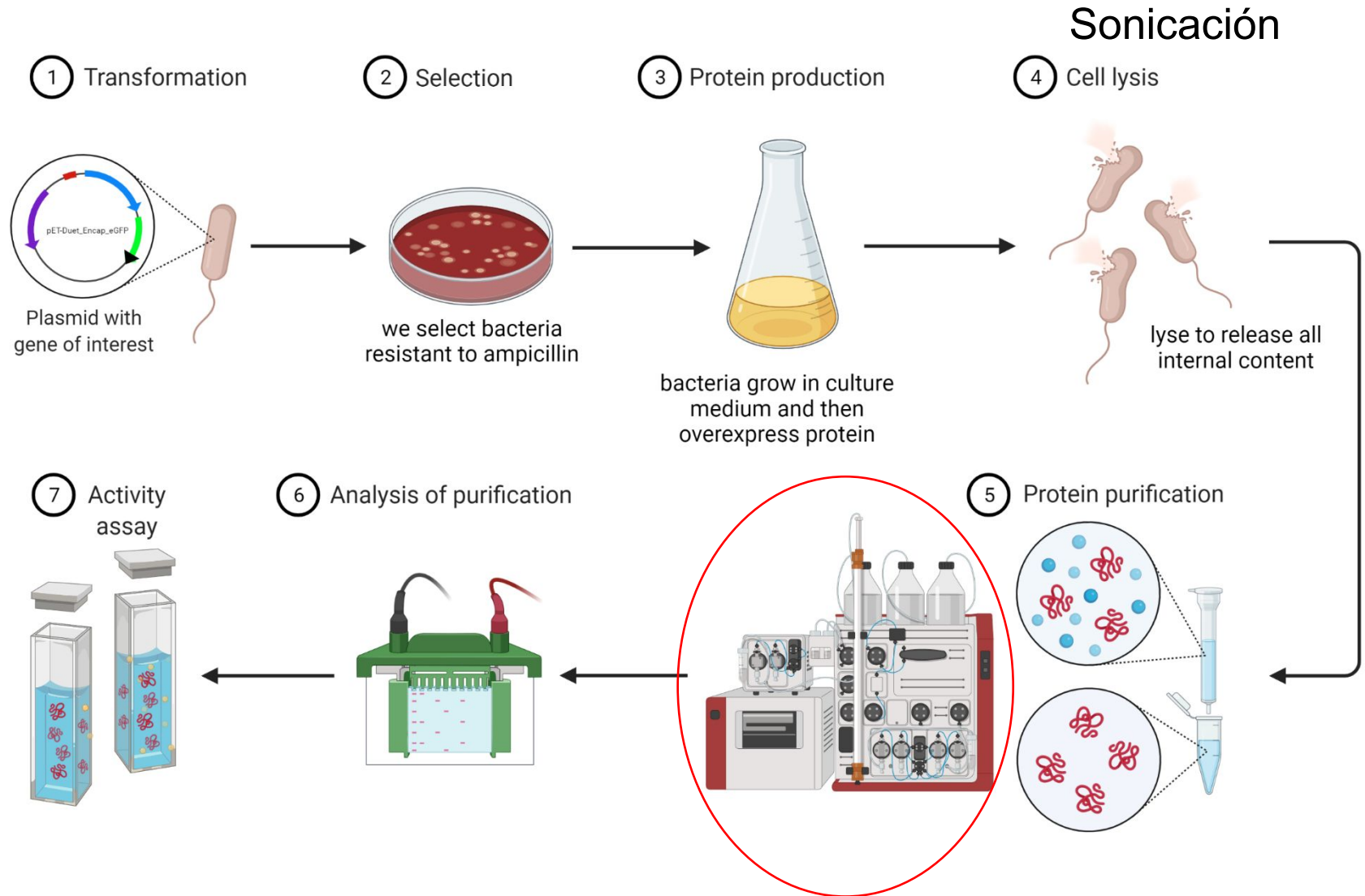
METODOLOGÍA



Metodología – Expresión y Purificación



Plásmido productor de nanopartícula Encapsulina M2E que interioriza eGFP



RESULTADOS



Primer paso cromatográfico: Hi Screen – CaptoCore 700

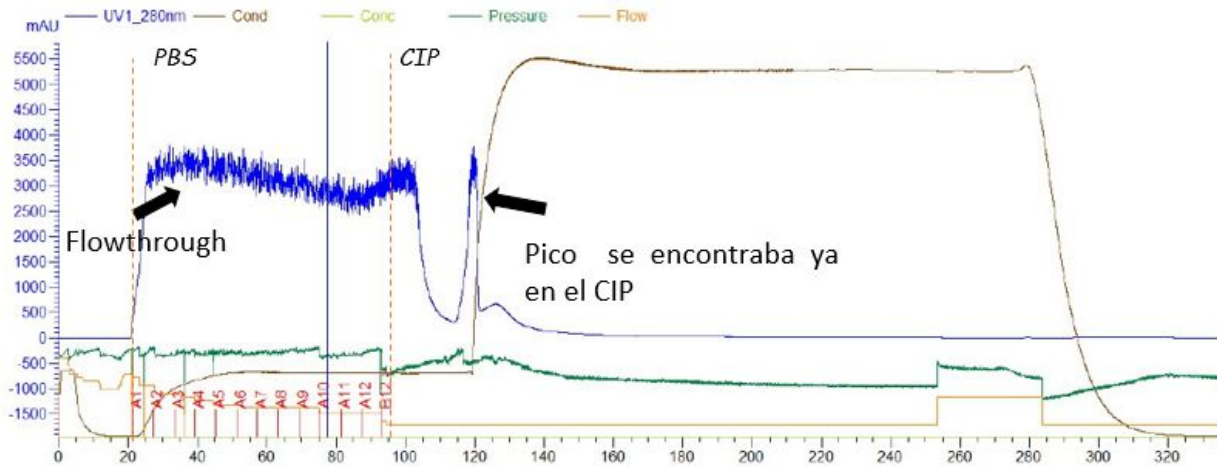


Figura 1. Cromatograma obtenido en la columna Hi Screen – CaptoCore 700

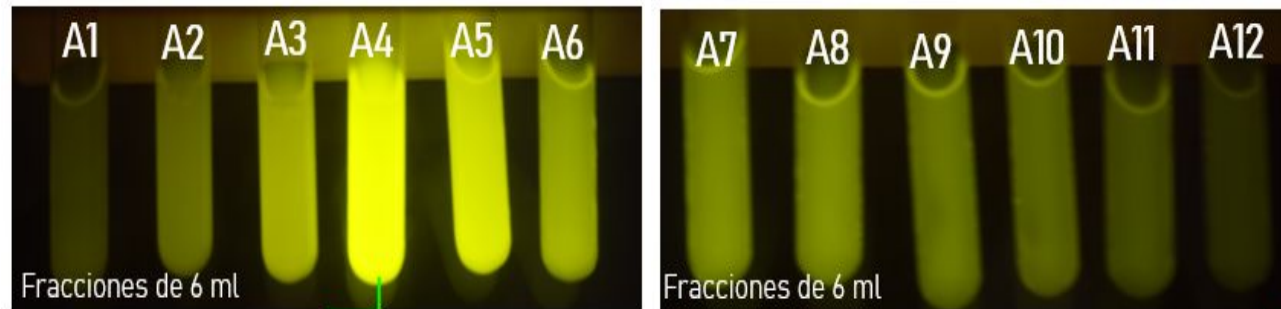


Figura 2. Fracciones obtenidas la columna Hi Screen – CaptoCore 700 sometidas a luz azul

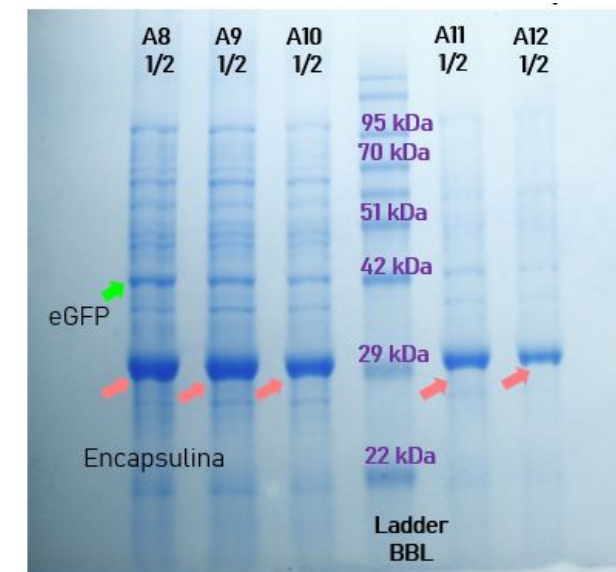
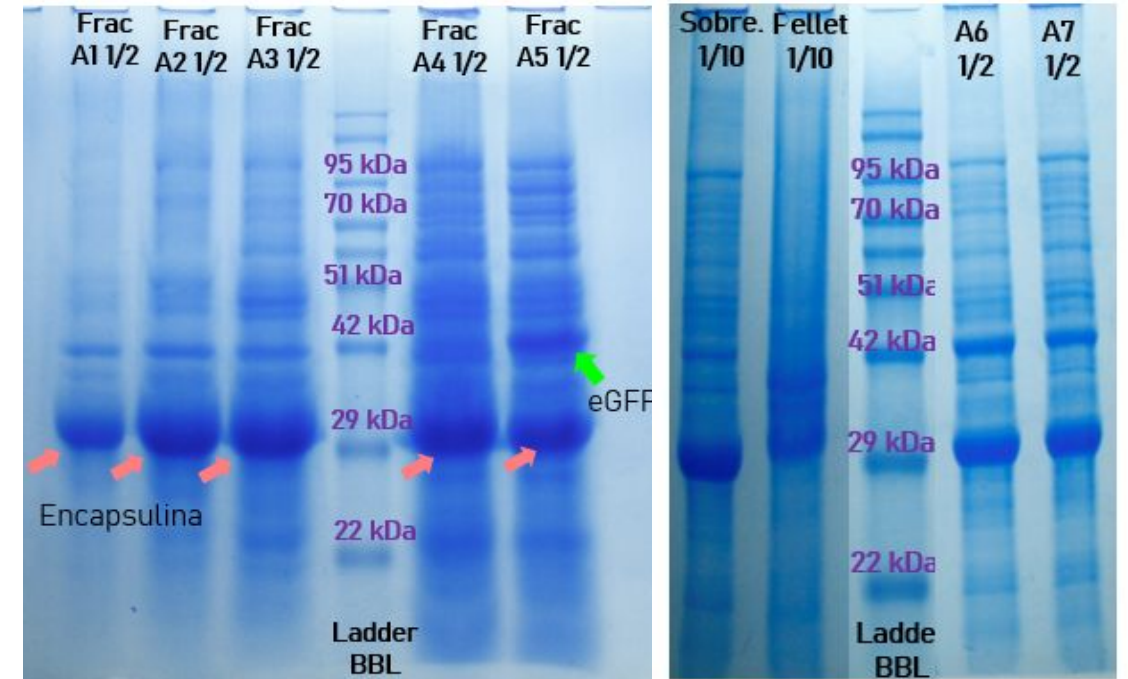


Figura 3. SDS-PAGE al 15% de poliacrilamida con las fracciones diluidas 1:2

Tamaños esperados

:

Encapsulina 30.7 kDa

eGFP: 32 kDa

Segundo paso cromatográfico: Hi Load 26/600

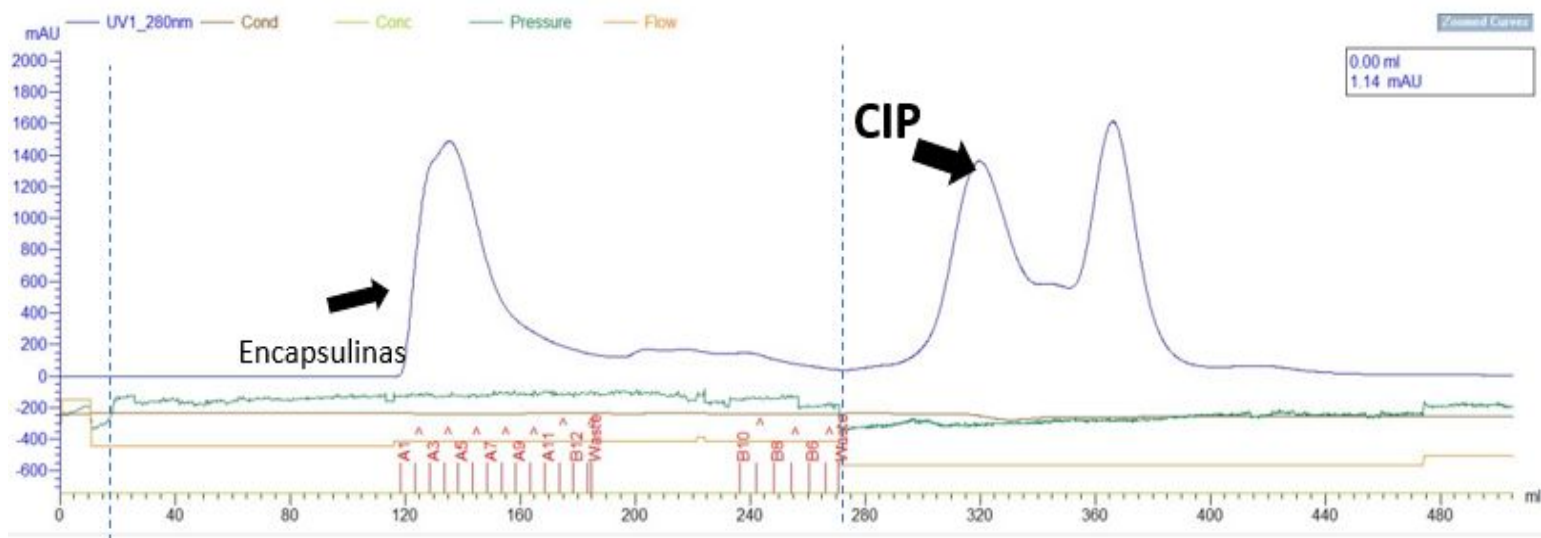


Figura 4. Cromatograma obtenido en la columna Hi Load 26/600

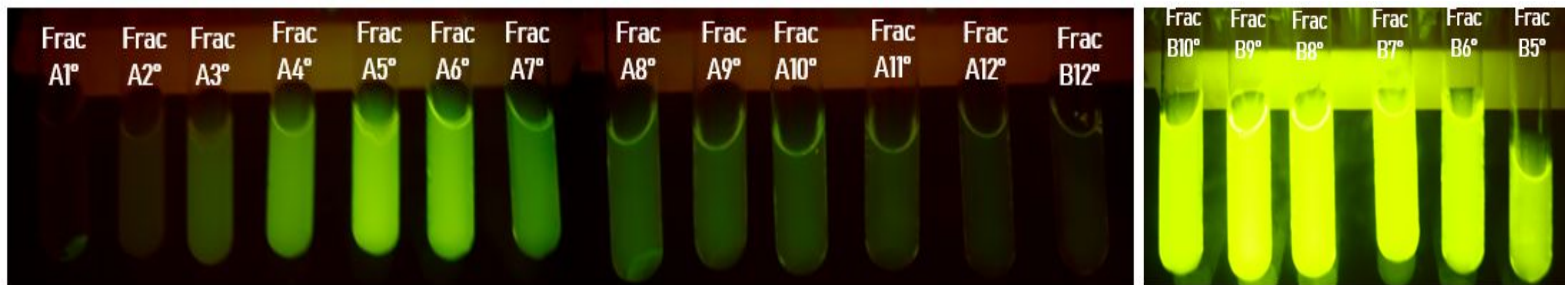


Figura 5. Fracciones obtenidas la columna Hi Load 26/600 sometidas a luz azul

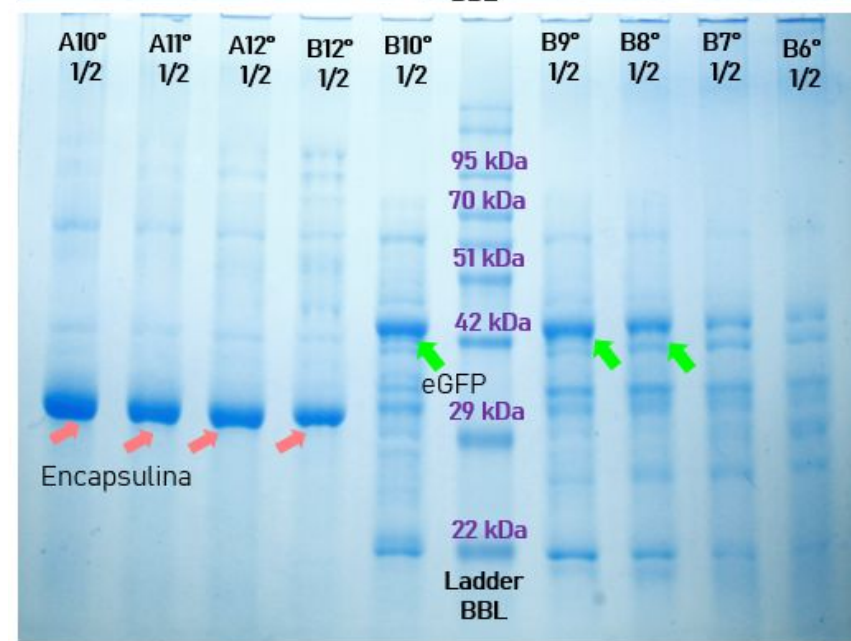
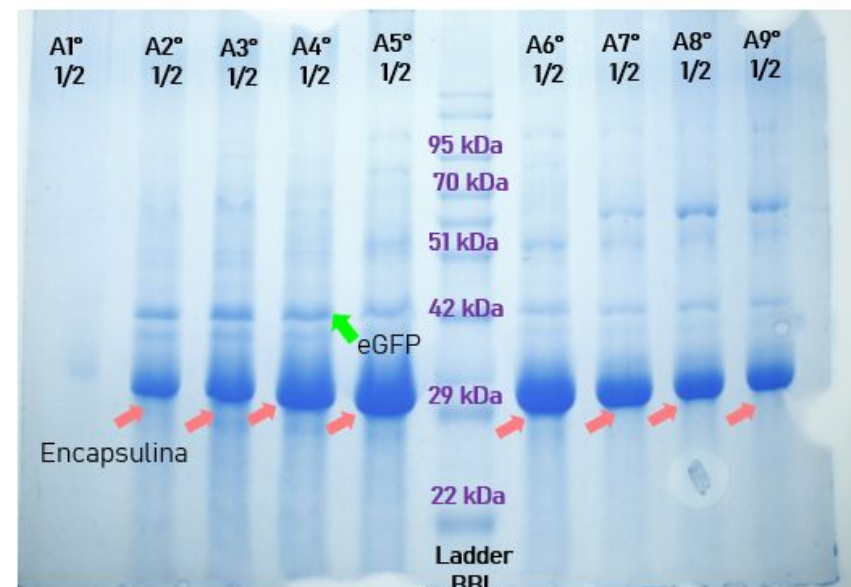


Figura 6. SDS-PAGE al 15% de poliácridamida con las fracciones A1° – B6° diluidas 1:2

Evaluación de la Capacidad de Interiorización

Tabla I. Cuantificación de proteínas e intensidad de Fluorescencia de fracciones obtenidas de Hi Load

Muestra	[] mg/ml	UF gain 50
Sobre. HiScreen	3.4	7855
A1°	0.1	17
A2°	1.1	170
A3°	1.8	174
A4°	2.0	386
A5°	2.2	906
A6°	1.9	946
A7°	1.6	658
A8°	1.2	365
A9°	1.0	282
A10°	1.0	195
A11°	0.7	77
A12°	0.6	145
B12°	0.7	122
B10°	1.0	3996
B9°	0.9	7144
B8°	0.6	4800
B7°	0.6	3895
B6°	0.5	2163
B5°	0.3	1811

Curva estándar de eGFP

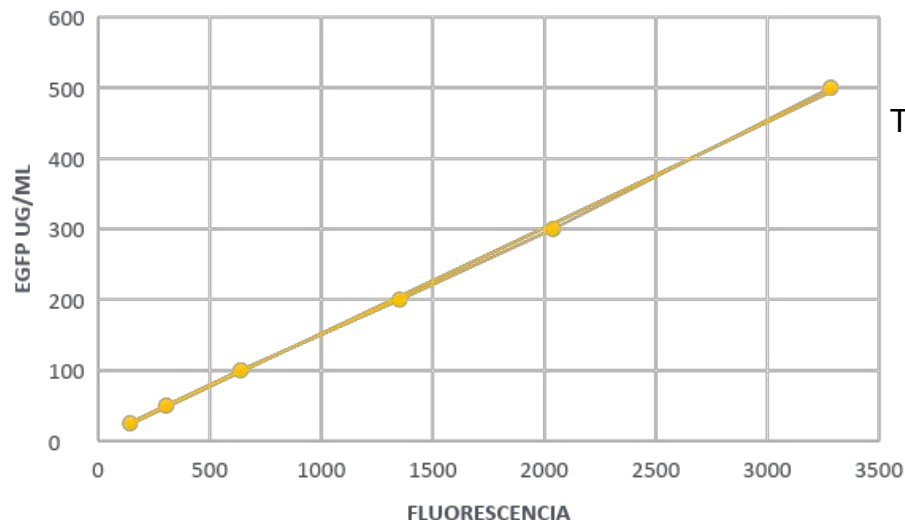


Tabla II. Concentración de eGFP en muestras de encapsulina

Muestra	Fluor 50	[] ug/ml
EncapM2E_eGFP (234)	165	25.7
EncapM2E_eGFP (56)	490	74.5

Tabla III. Evaluación de los ratios de interiorización. Set A: fracciones A2°-A4°, Set B: fracciones A5°-A6°

Muestra	Proteína a cuantificar	[] ug/ml	Ratio (eGFP/ P.T.)	Ratio Interiorización (mol eGFP/ mol Nanop.)
Set A	eGFP	25.7		
Set A	Total	1000	0.02	1.3
Set B	eGFP	74.5		
Set B	Total	1000	0.07	3.7

CONCLUSIONES

- Se obtuvo 44 mg de proteína encapsulina 83 % pura por litro de cultivo
- El ratio de internalización varió de 1.3 a 3.7 moléculas de eGFP por partícula de encapsulina.
- Se obtuvo eGFP libre como excedente no internalizado.

PERSPECTIVAS

- Utilizar la nanopartícula producida para la detección de fisuras en materiales como alternativa de ensayo NDT
- Modificar a la nanopartícula para cambiar algunas propiedades. Ejem: adsorción
- Interiorizar otras proteínas cargo

GRACIAS

