



Universidad del Mar
Campus Puerto Escondido

Obtención del péptido recombinante abaecina de *Apis mellifera*

Tesis

Que para obtener el Título Profesional de
Licenciada en Biología

Presenta

Elizabeth López Torres

Directora

Dra. Itzel López Rosas

Codirector

Dr. Luis David Maldonado Bonilla

Puerto Escondido, Oaxaca 2019

Dedicatoria

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este, gracias por todo, hoy puedo decir Ebenezer.

Y ti querido lector curioso.

Agradecimientos

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de este trabajo. Quiero comenzar agradeciendo a la Dra. Itzel López Rosas directora del trabajo de tesis, me apoyó de manera personal y académica, me impulsó a creer en mis capacidades, compartió conmigo sus experiencias, me permitió vivir experiencias en este hermoso mundo de la investigación y me alentó para que concluyera esta investigación. Agradezco al Dr. José Luis (JL) por alentarme, apoyarme y enseñarme a trabajar en equipo y lo más importante me enseñó que ningún trabajo es útil si no se comprende y comparte y al Dr. Maldonado por ayudarme en el proceso de redacción de esta tesis.

Gracias a la Universidad del Mar Campus Puerto Escondido donde me he formado y donde he recibido apoyo de todo tipo, a los profesores que influyeron en mi vida académica, en especial a la Dra. Rosalía Guerrero Arenas por siempre escucharme y aconsejarme, a mis compañeros de carrera (Lau, Mely, Ada, Balby, Dani, Rama, Les) y al Colegio de Postgraduados Campus Campeche y a toda su comunidad.

Al área de Proteómica del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional por permitirme hacer uso de los equipos e instalaciones, bajo la dirección de la Dra. Itzel López Rosas quien recibió para su realización financiamiento a través de Recursos institucionales para Apoyo de la Actividades para Profesores Investigadores del Colegio de Postgraduados Campus Campeche.

A mis amigos: Lucy, Limber, Chi, Orlando, Jhony, Mane, Dany, Balby y Toño por siempre estar ahí y hacerme sentir en familia.

A mis padres Antonio López y Minerva Torres por apoyarme en todas las decisiones que he tomado, por inculcarme la fe en Dios y amarlo a él por sobre todas las cosas. A mis hermanos, Oscar, Susy, Tony, Paty, mis sobrinos Mey, Joshua y mi pequeña Dunita, gracias a todos por sus mensajes de aliento y por creer en mí.

Gracias a todas las personas que de una u otra manera me han apoyado con palabras de ánimo y de muchas maneras más, la lista es interminable pero les tengo presente.

Y gracias infinitas a Dios y a la vida por vivir esta experiencia.

Índice

Índice de figuras	vi
Índice de tablas	vii
Lista de símbolos y abreviaturas	viii
Resumen	x
Abstract	xi
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
2.2. Factores que disminuyen la población de <i>Apis mellifera</i>	4
2.3. Sistema inmune de la abeja <i>Apis mellifera</i>	5
2.4. Péptidos antimicrobianos (AMP)	6
2.4.1. Clasificación de los AMP	7
2.4.2. Mecanismo de acción	8
2.4.3. Familias de péptidos antimicrobianos presentes en abejas	8
2.5. Péptido antimicrobiano Abaecina	10
2.6. Herramientas moleculares	11
2.6.1. Electroforesis	11
2.6.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	11
2.6.3. Tecnología de ADN recombinante o clonación de genes	12
2.6.4. Expresión y Purificación de proteínas recombinantes	13
III. Justificación	15
IV. Hipótesis	15
V. Objetivos	15
5.1. Objetivo general	15
5.2. Objetivos específicos	16
VI. Estrategia experimental	16
6.1. Análisis <i>in silico</i>	17
6.1.1. Predicción estructural del péptido recombinante abaecina	17
6.2. Amplificación de abaecina	18
6.2.1. Extracción de ARN	18
6.2.2. RT-PCR	18
6.2.3. Amplificación del gen abaecina	19
6.2.4. Purificación del amplicón de abaecina	20
6.3. Clonación	20
6.3.1. Ligación en el vector de clonación pJET1.2/blunt	20

6.3.2.	Transformación de células <i>E. coli</i> DH5 α	21
6.3.3.	PCR de colonia con oligos de pJET1.2/blunt	22
6.3.4.	Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina	22
6.3.5.	Análisis de digestión enzimática	23
6.3.6.	Purificación del inserto abaecina y vector pQE80L	24
6.3.7.	Ligación del inserto abaecina y el vector pQE80L	24
6.3.8.	Transformación en células <i>E. coli</i> DH5 α	25
6.3.9.	Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina	25
6.3.11.	Digestión de la construcción pQE80L-abaC5 con enzimas <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III.	26
6.3.12.	Transformación en células <i>E. coli</i> M15 por choque térmico.	26
6.3.13.	PCR de colonia con oligos de abaecina	26
6.4.	Expresión	27
6.4.1.	Perfil de expresión de la proteína recombinante abaecina inducida con IPTG	27
6.5.	Purificación del péptido recombinante abaecina	27
6.5.1.	Prueba de solubilidad	27
6.5.2.	Cromatografía de afinidad a níquel	28
VII	Resultados	29
7.1.	Análisis <i>in silico</i> del péptido antimicrobiano abaecina	29
7.1.1.	Gen abaecina de <i>A. mellifera</i>	29
7.1.2.	Predicción estructural	31
7.1.3.	Dominios conservados en la secuencia de abaecina	34
7.1.4.	Análisis de corte para la cadena sentido y anti-sentido	35
7.2.	Amplificación del péptido abaecina de <i>Apis mellifera</i>	36
7.2.1.	ARN total	36
7.2.2.	Amplificación del péptido abaecina	36
7.3.	Clonación	37
7.3.1.	PCR de colonia con oligos de pJET1.2/blunt	37
7.3.2.	Cuantificación e integridad de plásmidos	38
7.3.3.	Amplificación con oligos abaecina	39
7.3.4.	Análisis de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Hind</i> III a la construcción pJET-abaC1	40
7.3.5.	Análisis de restricción al vector de expresión pQE80L	41
7.3.6.	Integridad y cuantificación vector linearizado e inserto liberado	42

7.3.7.	Ligación pQE80L-aba	42
7.3.8.	PCR de colonia con oligos pQE80L	43
7.3.9.	Cuantificación e integridad del plásmido	43
7.4.	Expresión del péptido recombinante abaecina	44
7.4.1.	Transformación en células <i>E. coli</i> M15	44
7.4.2.	Cinética de inducción e inmunodetección	45
7.5.	Purificación del péptido recombinante abaecina	47
7.5.1.	Perfil de solubilidad	47
7.5.2.	Purificación por cromatografía de afinidad a níquel	49
VIII.	Discusión	50
8.1.	Análisis <i>in silico</i> y amplificación de abaecina	50
8.2.	Clonación	52
8.3.	Expresión	53
8.4.	Purificación	54
IX.	Conclusión	55
X.	Recomendaciones	55
XI.	Referencias	56
	Anexos	66

Índice de figuras

Figura 1. Síntesis de ADN complementario.	19
Figura 2. Programa para amplificación de abaecina.	19
Figura 3. Transformación de células <i>E. coli</i> .	21
Figura 4. Programa de PCR colonia con oligos de pJET1.2/blunt	22
Figura 5. Programa de PCR para oligos pQE80L.	26
Figura 6. Posición genómica del gen abaecina.	30
Figura 7. Estructura en 3D del péptido recombinante abaecina.	33
Figura 8. Estructura 3D de la región funcional del péptido abaecina.	34
Figura 9. Dominio conservado en abaecina.	35
Figura 10. ARN de <i>A. mellifera</i> .	36
Figura 11. Amplificación con oligos abaecina.	37
Figura 12. PCR de colonia con oligos de pJET.	38
Figura 13. Gel de integridad de ADNp de la construcción pJET-aba.	39
Figura 14. Amplificación con oligos para abaecina.	40
Figura 15. Digestión con enzimas de restricción para la construcción pJET-aba.	41
Figura 16. Digestión del vector de expresión pQE80L.	42
Figura 17. Amplificación con oligos específicos de pQE80L.	43
Figura 18. Gel de integridad de plásmido de la construcción pQE80L-abaC5.	44
Figura 19. Amplificación con oligos abaecina de la clona 5.	45
Figura 20. Cinética de inducción de abaecina con IPTG.	46

Índice de tablas

Tabla I. Taxonomía de <i>Apis mellifera</i>	3
Tabla II. Reacciones de ligación pQE80L-aba	25
Tabla III. Secuencias del péptido abaecina de <i>Apis mellifera</i>	30
Tabla IV. Secuencia de aminoácidos de abaecina	31
Tabla V. Predicción de estructura secundaria del péptido abaecina	31
Tabla VI. Predicción de estructura secundaria del péptido funcional abaecina	33
Tabla VII. Dominio conservado Antimicrobial_5 presente en abaecina	34
Tabla VIII. Enzimas de restricción y sus secuencias de corte	35
Tabla IX. Secuencia de oligos sentido y anti-sentido para abaecina	36
Tabla X. Cuantificación de plásmidos pJET-aba	39
Tabla XI. Cuantificación vector pQE80L linearizado	42
Tabla XII. Crecimiento de colonias	42
Tabla XIII. Cuantificación de ADNp pQE80L-aba	43
Tabla XIV. Transformación con células <i>E. coli</i> M15 observado vs esperado	44

Lista de símbolos y abreviaturas

°C: grados Celcius

µl: microlitros

µm: micrómetros

Å: angstrom

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMP: antimicrobial peptide o péptido antimicrobiano

ARN: ácido ribonucleico

dNTPs: desoxirribonucleótido trifosfato

EDTA: ácido etilendiaminotetra acético

h: hora

HPLC: High Performance Liquid Chromatography o Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

HRP: Peroxidasa de rábano

IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

kb: kilobases

kDa: kiloDaltones

LB: medio Luria Bertani

min: minutos

ml: mililitros

mM: miliMolar

NaCl: Cloruro de sodio

NaH₂PO₄: Fosfato diácido de sodio

ng: nanogramos

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis o Electroforesis en gel de poliacrilamida

pb: pares de bases

PVDF: fluoruro de polivinilideno

RMSD: Desviación cuadrática media de las posiciones atómicas

rpm: revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa.

s: segundos

SDS: Dodecilsulfato sódico

TBS: Solución salina tamponada con Tris

T_m: temperatura de fusión del ADN o Temperatura de melting

U: unidades de enzima

xg: rcf (fuerza centrífuga relativa)

Resumen

La abeja *Apis mellifera* es un organismo que pertenece al orden Hymenoptera, presenta dos pares de alas membranosas, un par de antenas y tres pares de patas; presenta una metamorfosis holometábola y cumple un rol importante en la polinización de especies de interés agrícola jugando un papel económico y ecológico. Esta especie ha presentado una alta disminución en su población, este fenómeno es conocido como el Trastorno del Colapso de la Colmena donde diferentes factores como la pérdida de su hábitat, el uso excesivo de pesticidas y plaguicidas, los efectos del cambio climático y enfermedades causadas por endo y ectoparásitos como *Nosema ceranae* y *Varroa destructor*. Uno de los mecanismos utilizados por las abejas contra el combate de agentes patógenos está mediado por péptidos antimicrobianos (AMPs). Uno de ellos es el péptido antimicrobiano abaecina que se acumula en la hemolinfa de las abejas y se conoce que es de amplio espectro. En este estudio nos enfocamos en la obtención del péptido recombinante abaecina de *A. mellifera*. El análisis *in silico* y modelado de la estructura terciaria reveló que es un péptido con estructura alfa hélice, con un peso de 11 kDa. La secuencia codificante para abaecina se clonó de manera exitosa en el vector de almacenamiento pJET1.2/blunt y se subclonó en el vector de expresión pQE80L. El péptido recombinante abaecina fue expresado en células *Escherichia coli* M15 con la adición del compuesto IPTG. El péptido abaecina se encontró en la fracción soluble lo que permitió purificarlo en condiciones nativas. Abaecina recombinante fue detectada mediante western blot en un peso aproximado de 20 kDa, lo que sugiere que forma dímeros.

Palabras claves: *abaecina, abeja, AMPs. Clonación, expresión, purificación.*

Abstract

The honey bee *Apis mellifera* is an organism that belongs to the order Hymenoptera, it presents two pairs of membranous wings, a pair of antennae and three pairs of legs; it presents a holometabolic metamorphosis and fulfills an important role in the pollination of species of agricultural interest playing an economic and ecological role. This species has presented a high decrease in its population, this phenomenon is known like the Disorder of the Collapse of the Beehive, where different factors as the loss of its habitat, the excessive use of pesticides and insecticides, the effects of the climate change and diseases caused for endo and ectoparasites *Nosema ceranae* and *Varroa destructor*. One of the mechanisms used by the bees against pathogenic agents is mediated by antimicrobial peptides (AMPs). One of them is the abaecin, that is accumulated in the hemolymph of the bees and one is known that it is of wide boogey. In this study we focus in the securing of the abaecina recombinant peptide of *A. mellifera*. The *in silico* analysis and modeling of the tertiary structure revealed that alpha helix is a peptide with structure, with a weight of 11 kDa. The coding sequence for abaecin was successfully cloned into the pJET storage vector and subcloned into the pQE80L expression vector. The recombinant abaecin peptide was expressed in *Escherichia coli* M15 cells by addition of the IPTG compound. The abaecin peptide was found in the soluble fraction which allowed it to be purified under native conditions. Recombinant abaecin was detected by western blot at an approximate weight of 20 kDa, which suggests that it forms dimers.

Keywords: *abaecina, bee, AMPs, clonation, expression and purification.*