



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE**  
**DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**  
**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“Obtención y purificación de la proteína MIC3 de *Toxoplasma gondii*”**

**Stefany Alexandra Almeida Mena**

Directora: Torres Arias, Marbel Ph.D.

Sangolquí, 08 de marzo del 2023



Introducción

Justificación del problema

Objetivos e hipótesis

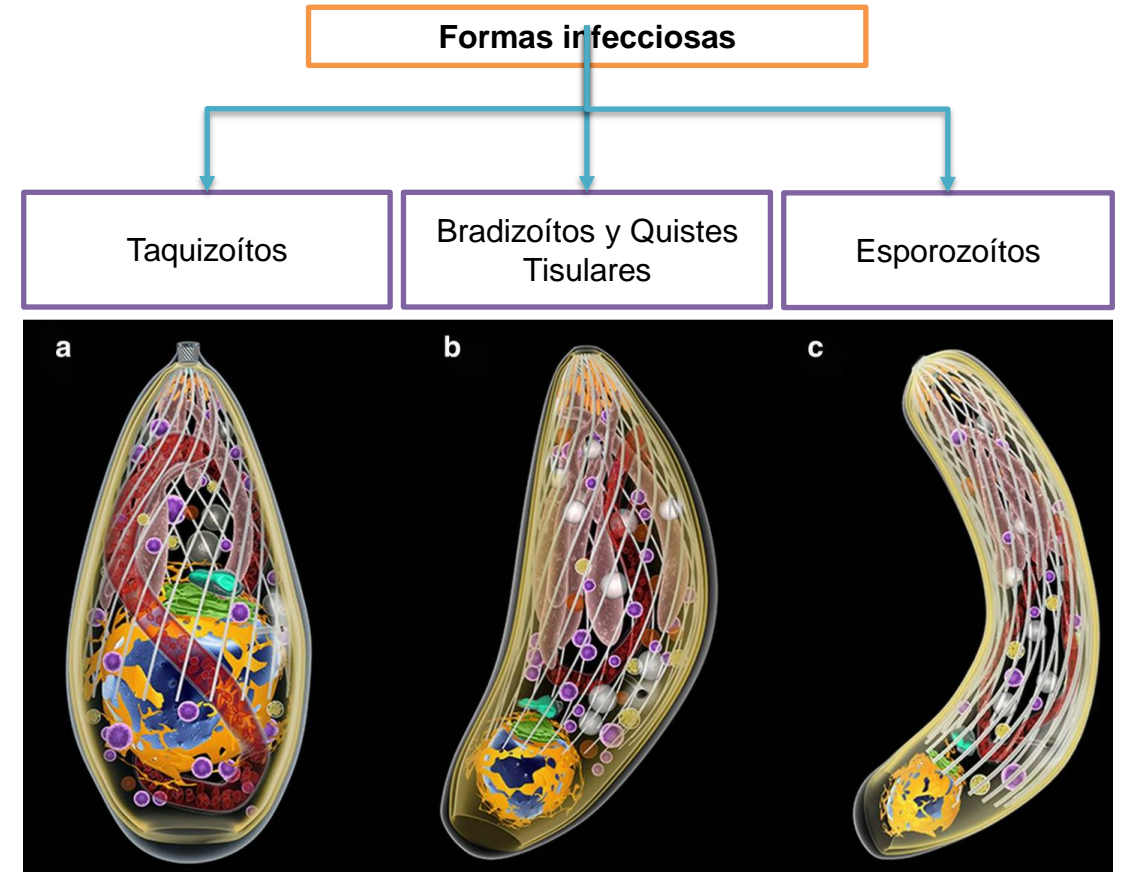
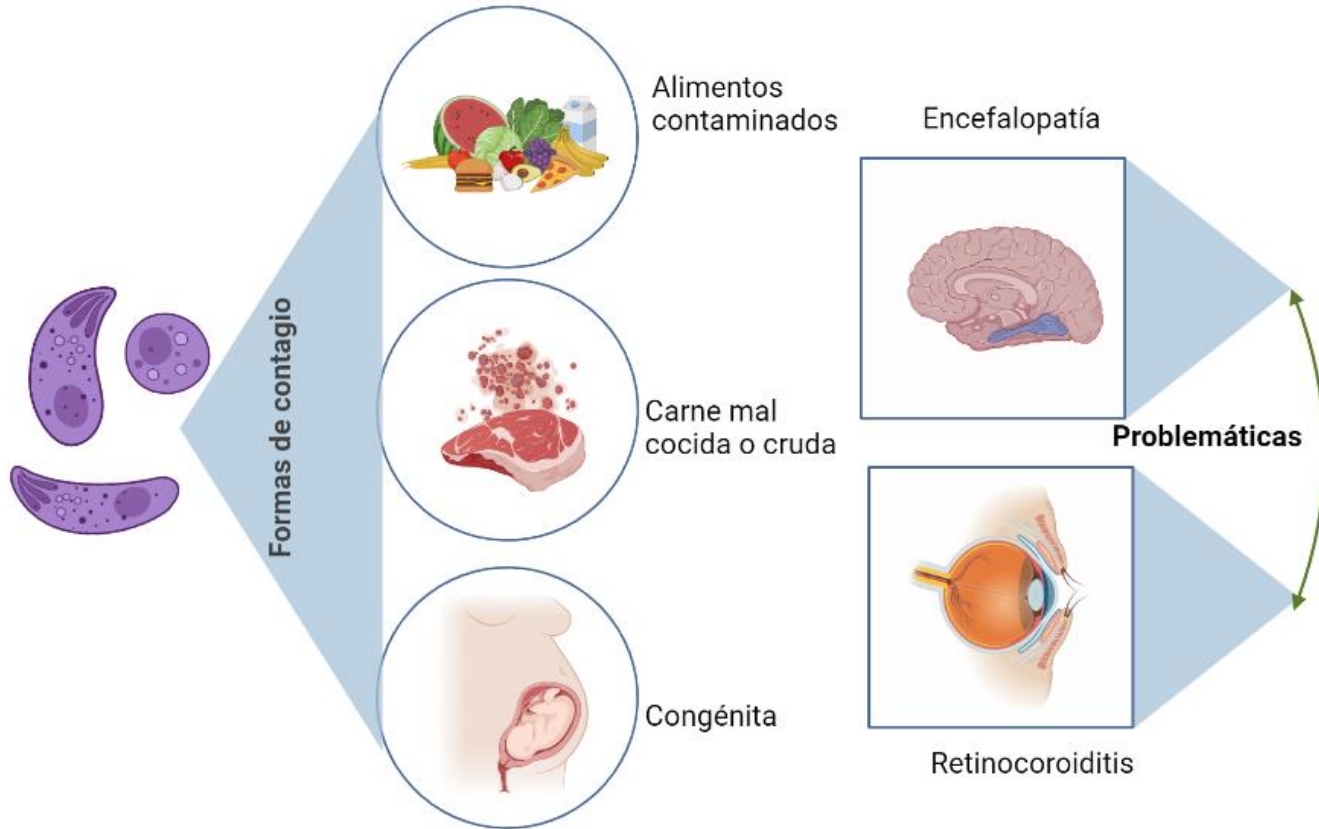
Metodología

Resultados y discusión

Conclusiones

Recomendaciones





Proteínas micronemales (MIC)

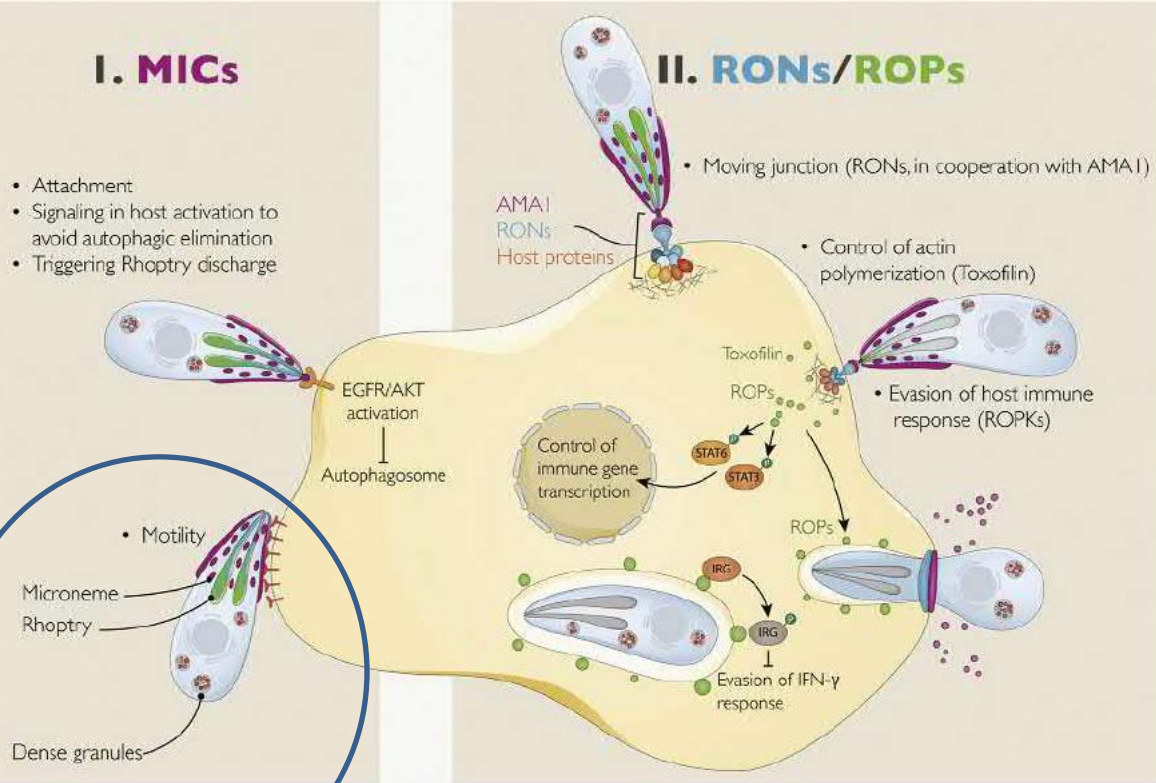


**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

## I. MICs

- Attachment
- Signaling in host activation to avoid autophagic elimination
- Triggering Rhoptry discharge

## II. RONs/ROPs

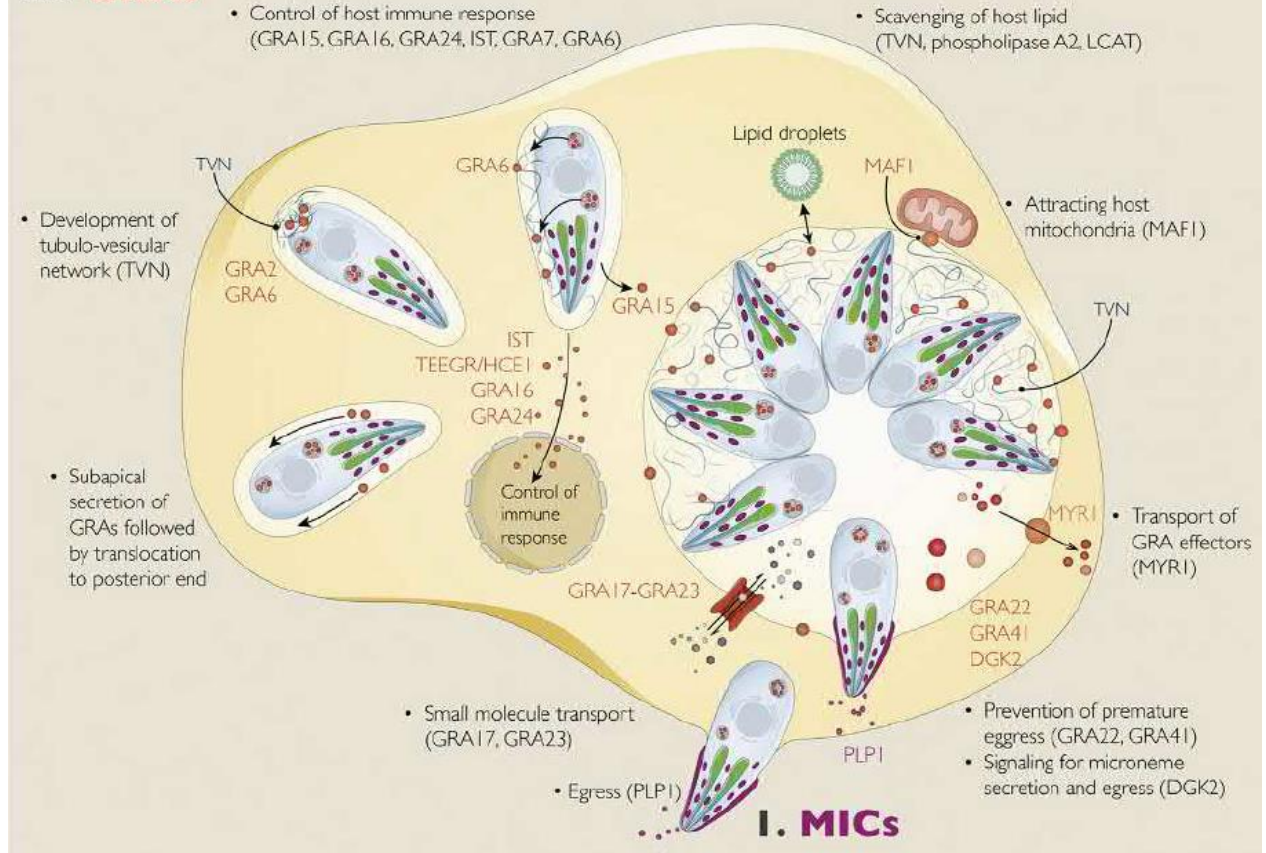


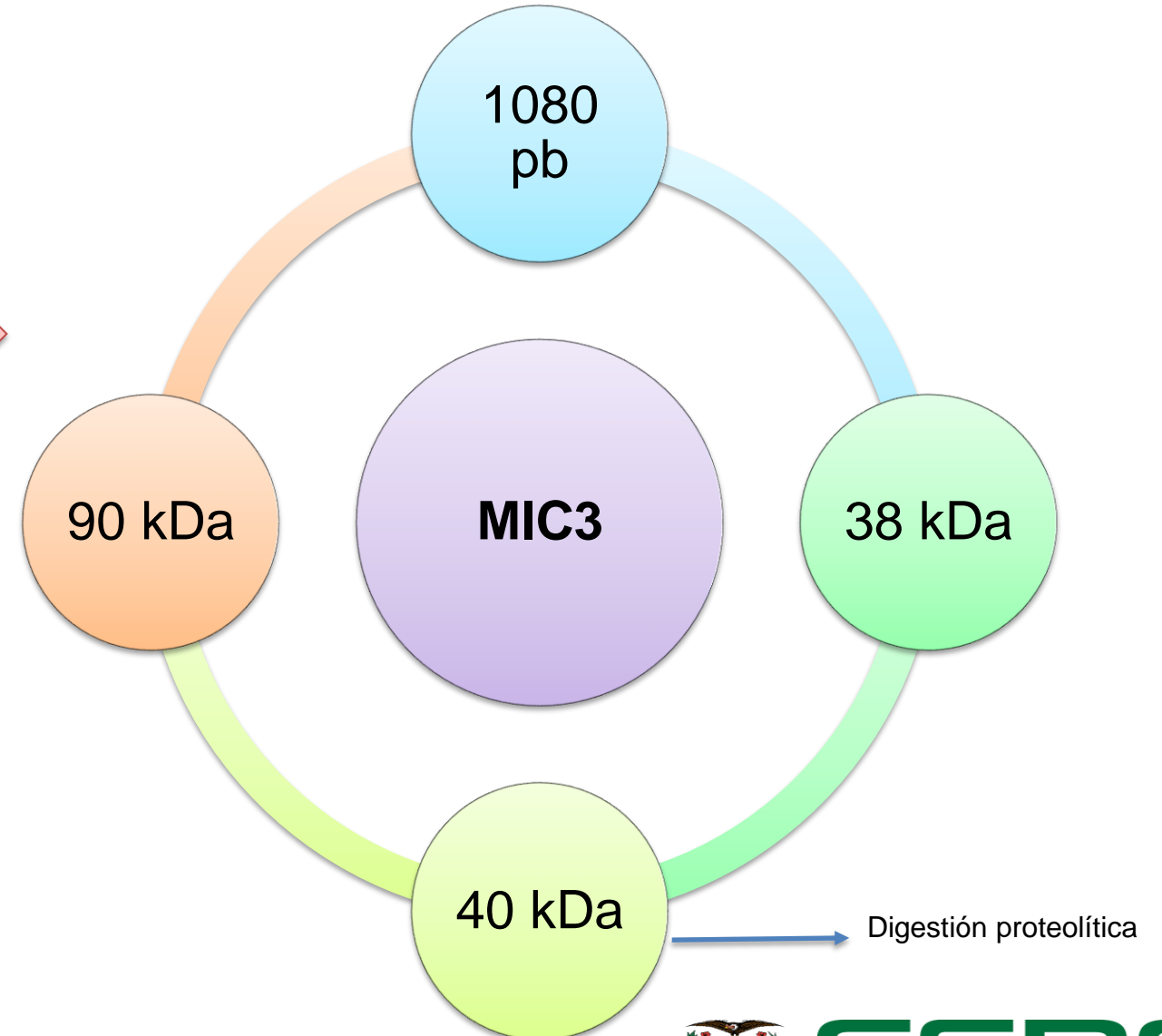
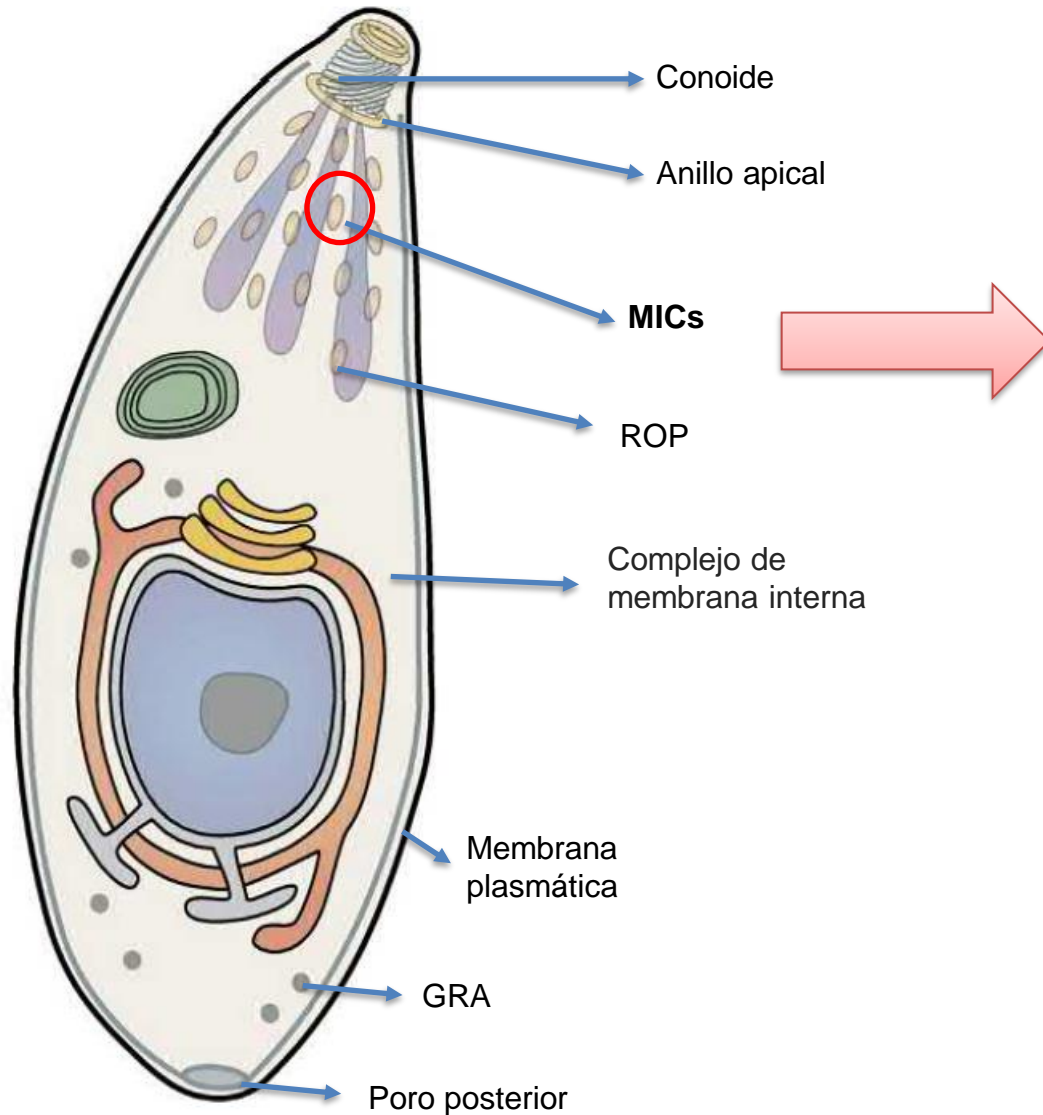
Acoplamiento

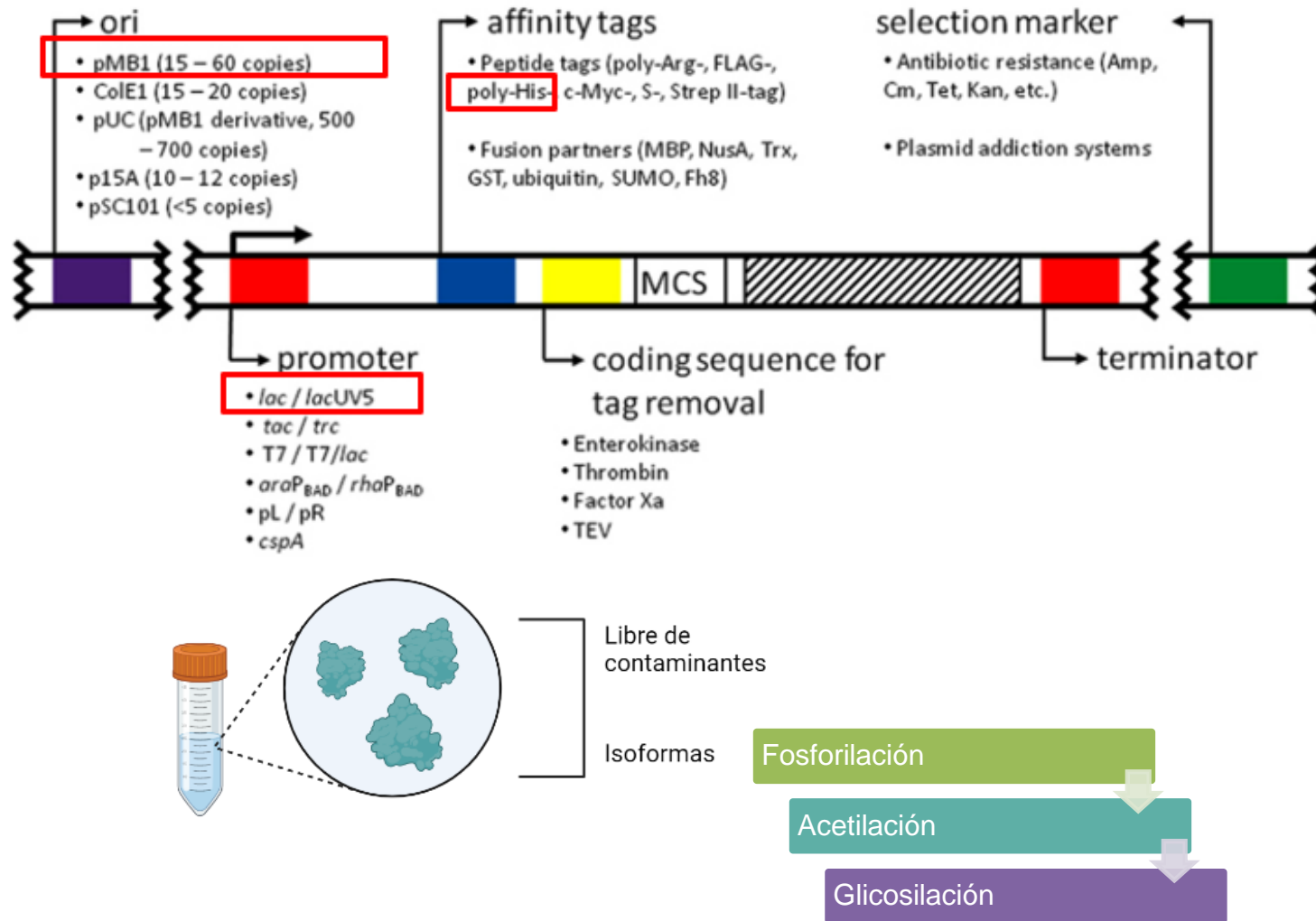
Señalización

Adhesión

## III. GRAs



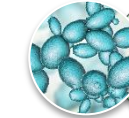




## Sistemas de expresión



Bacterias



Levaduras



Baculovirus/ Células de insectos



Mamíferos



Libre de células

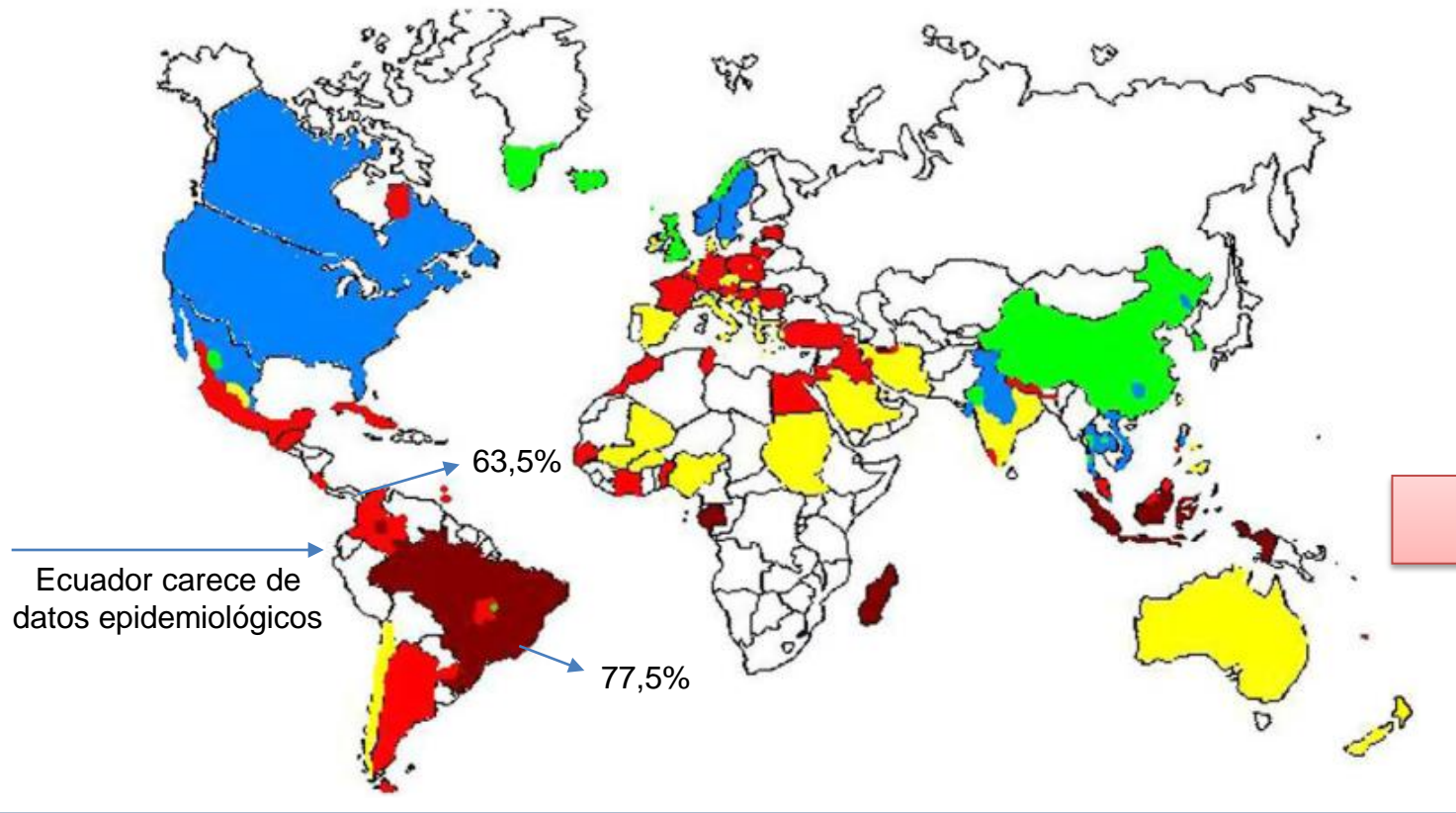
# Formulación del problema

# Justificación del problema

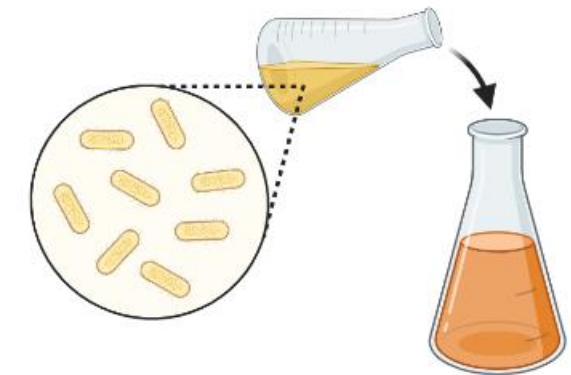
Segunda causa de muerte por enfermedades transmitidas por alimentos

- 327 muertes en los EE.UU

Estado global de la seroprevalencia de *Toxoplasma gondii*



- Prevalencia superior al 60 %
- Prevalencia entre el 40-60%
- Prevalencia entre el 20-40%
- Prevalencia entre el 10-20%
- Prevalencia <10 %.
- Ausencia de datos

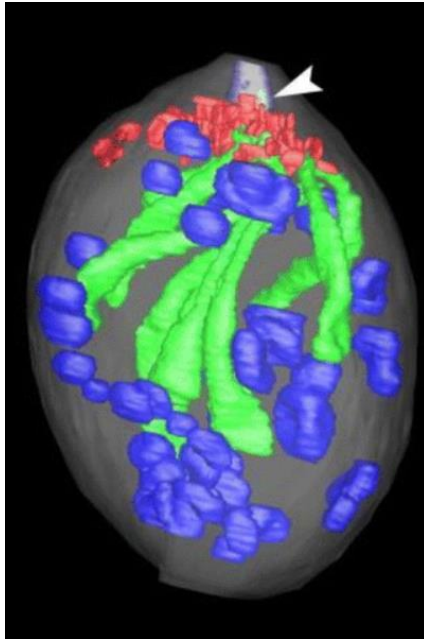


**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

# Objetivos

## Objetivo General

Obtener y purificar la proteína MIC3 de *Toxoplasma gondii*.



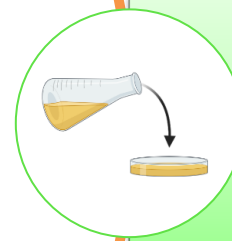
## Hipótesis

- El sistema procariota de *Escherichia coli* BL21 permite obtener proteína recombinante MIC3 y posteriormente purificar mediante cromatografía de afinidad.

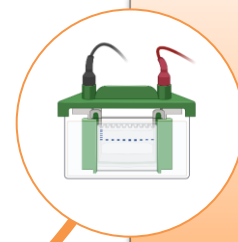
## Objetivos Específicos



Expresar la proteína recombinante MIC3 de *Toxoplasma gondii* en *Escherichia coli* BL21, mediante el uso del sistema pET por inducción de IPTG para el control de su producción.



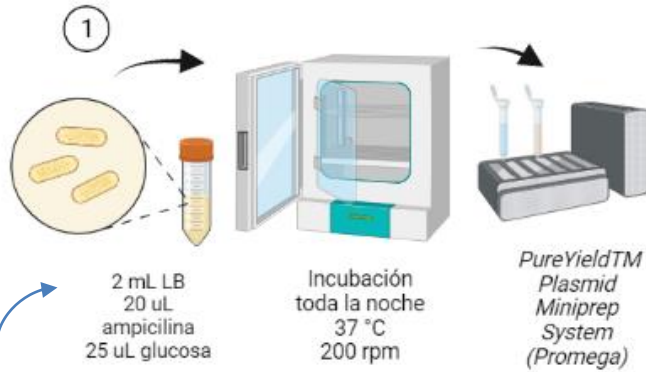
Purificar la proteína recombinante MIC3 de *Toxoplasma gondii* mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel con el fin de concentrar y estabilizar el producto conservando su potencia y actividad.



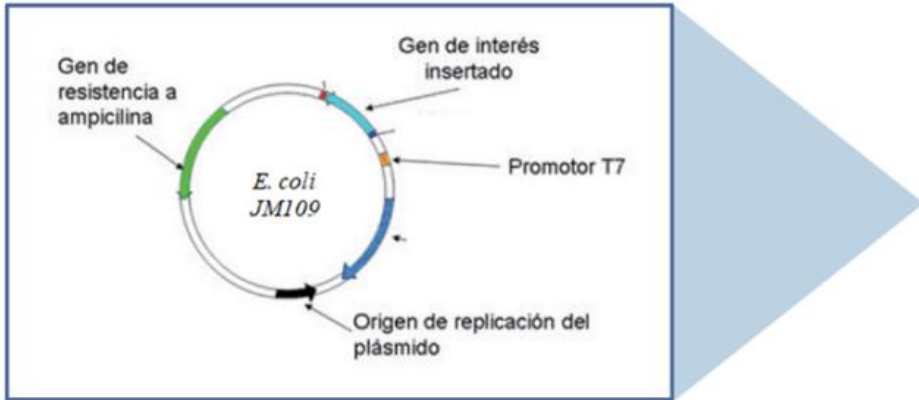
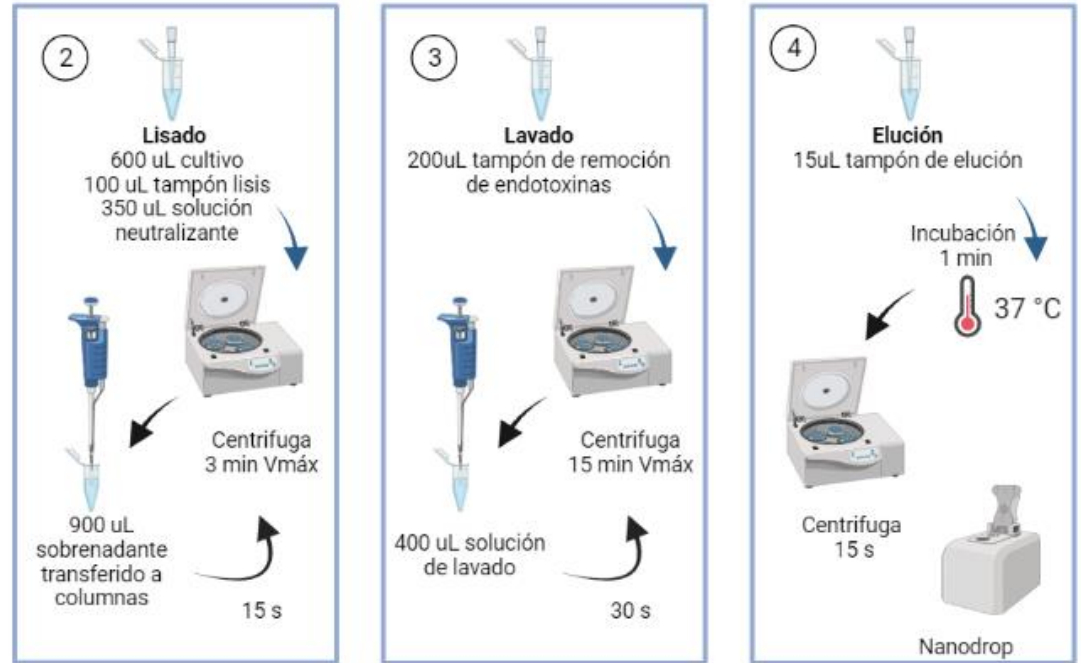
Aplicar la técnica de electroforesis SDS-PAGE a fin de verificar la presencia de la proteína recombinante MIC3 producida por *Escherichia coli* BL21



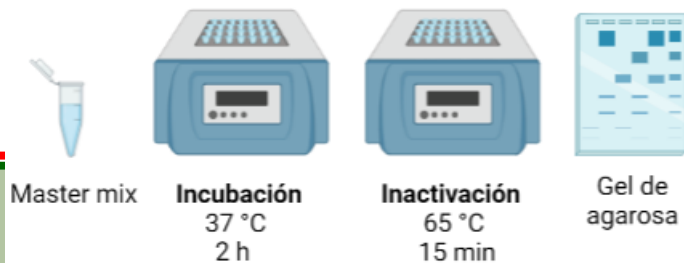




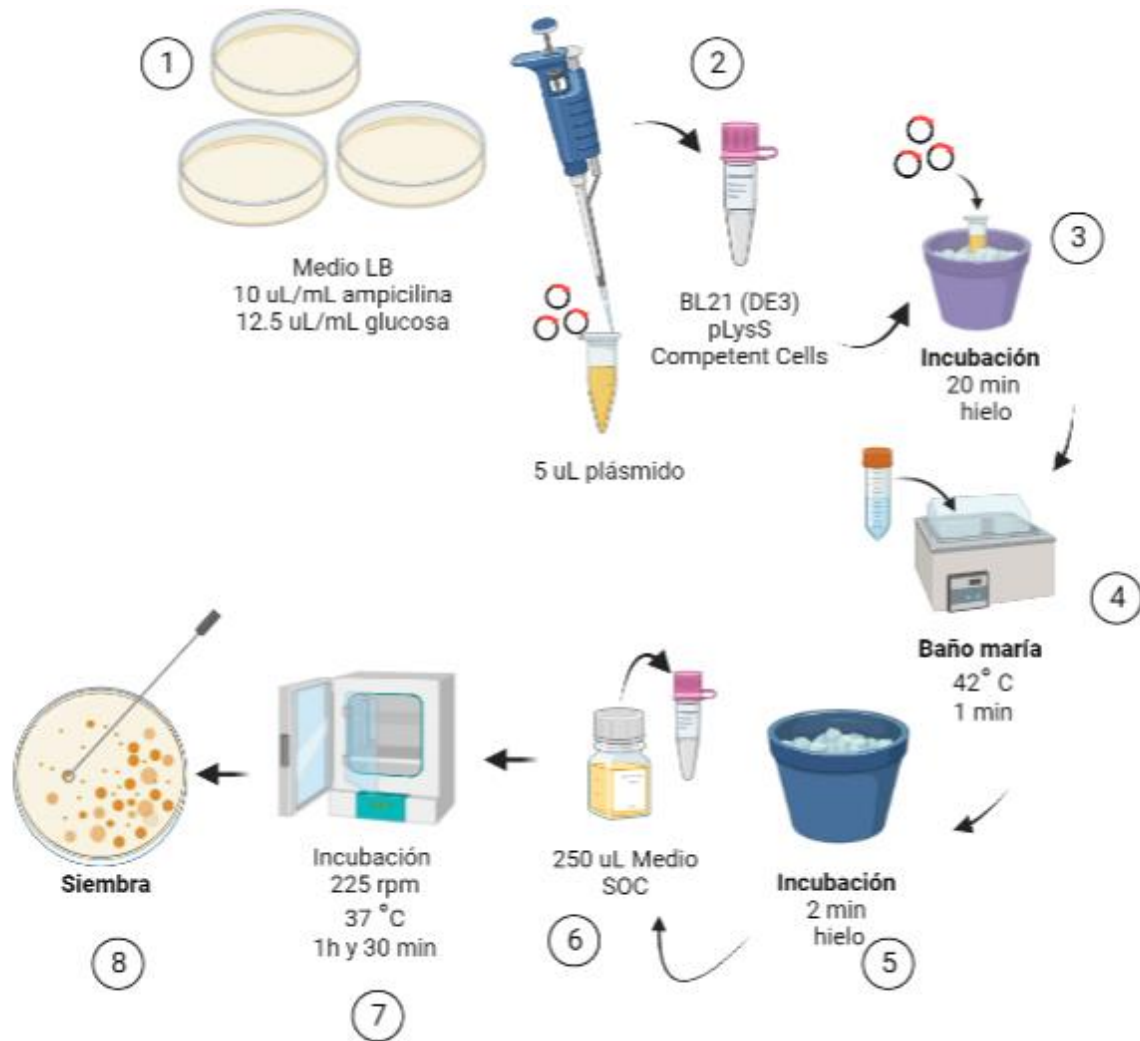
## Purificación del plásmido *E. coli* JM109



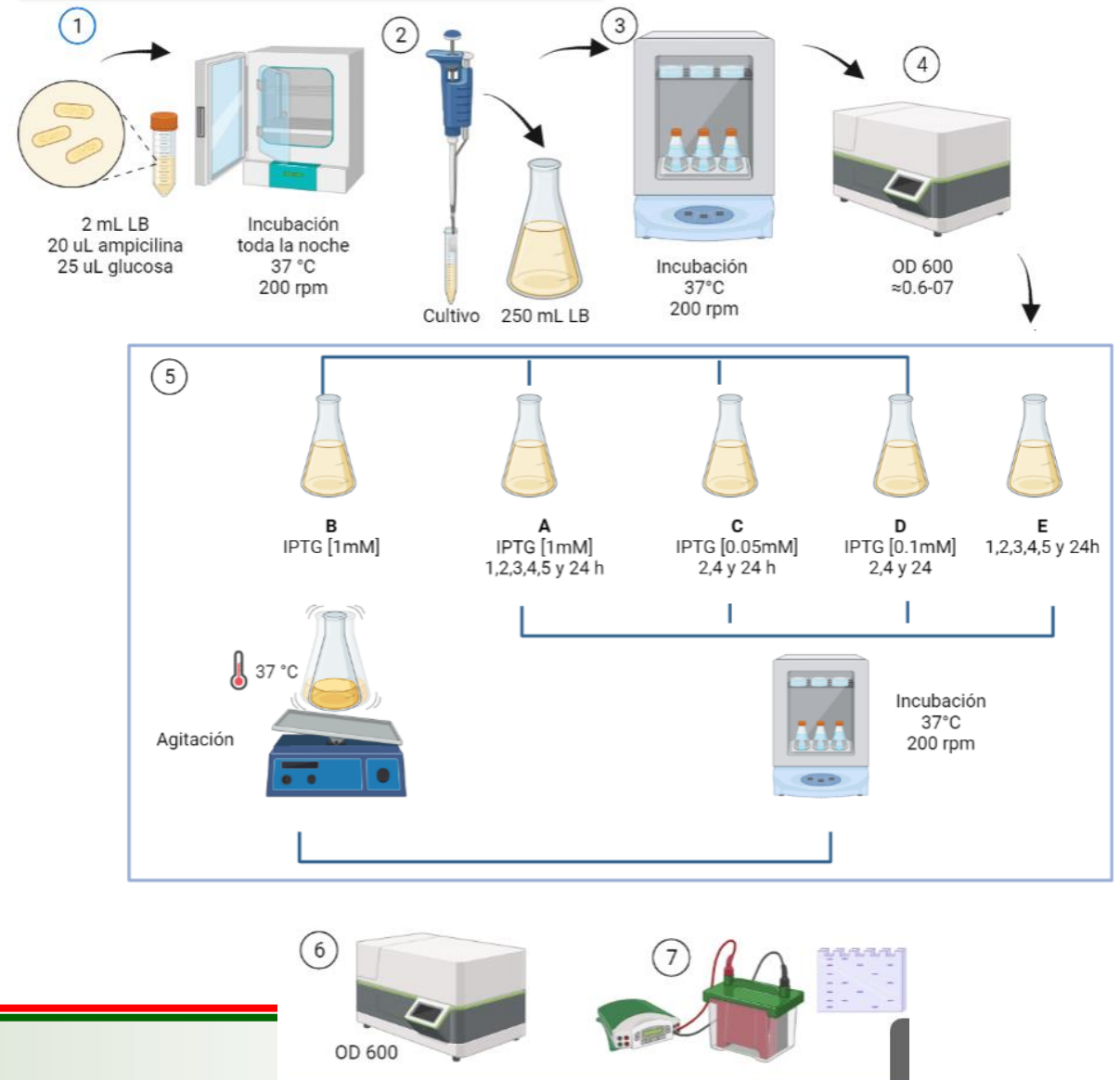
## Corte con enzima de restricción EcoRV



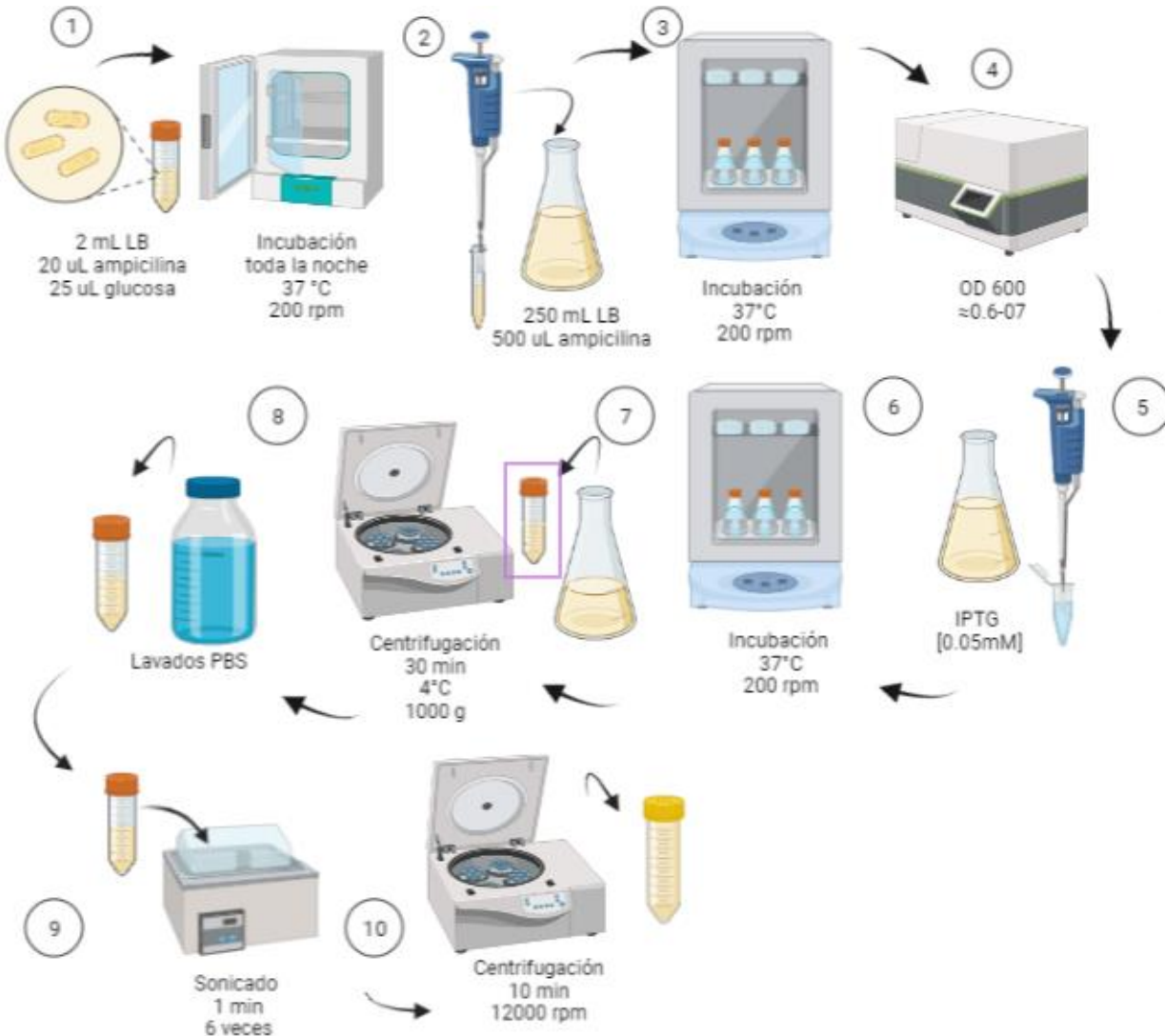
## Clonación



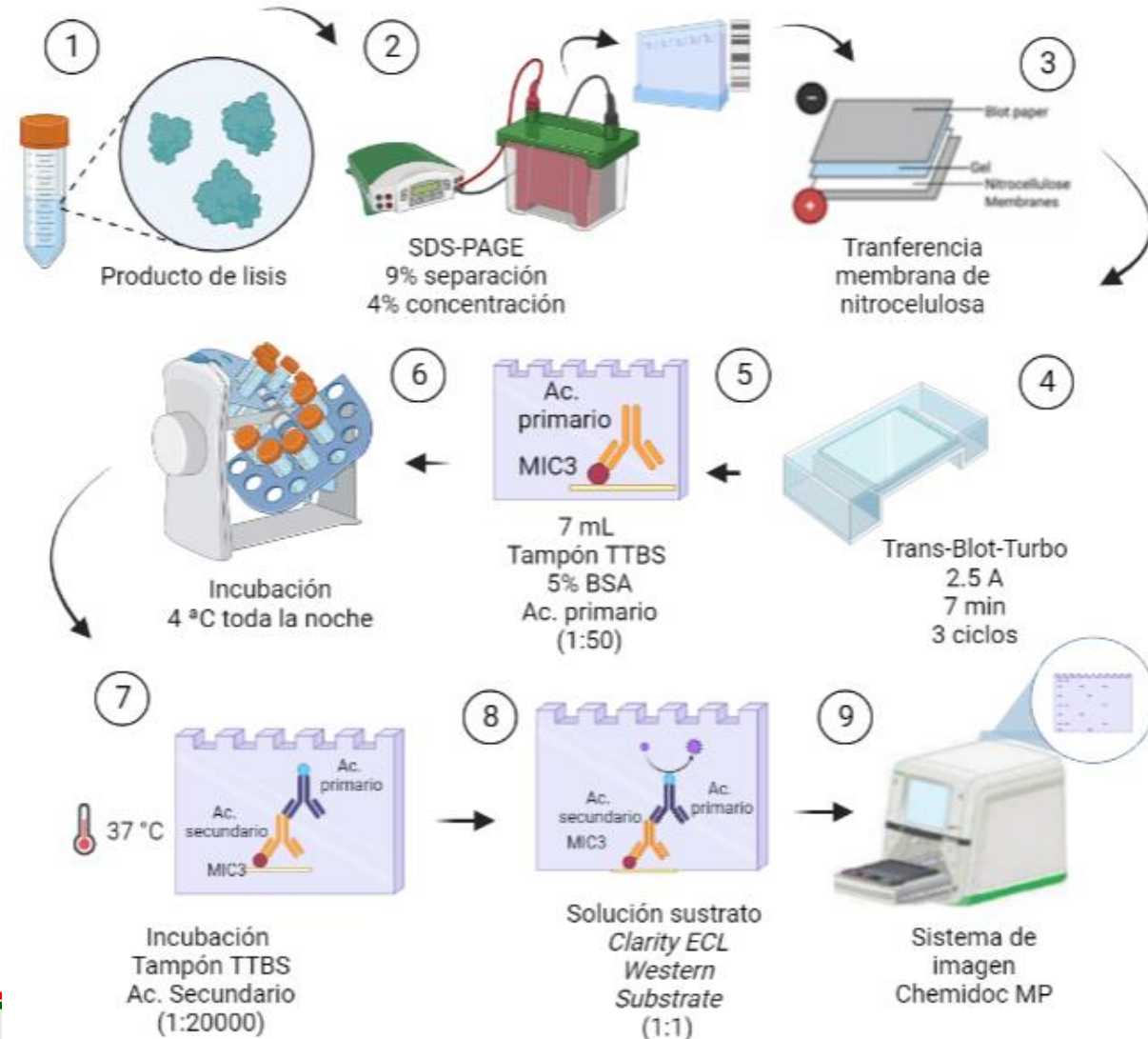
## Estandarización de [IPTG]



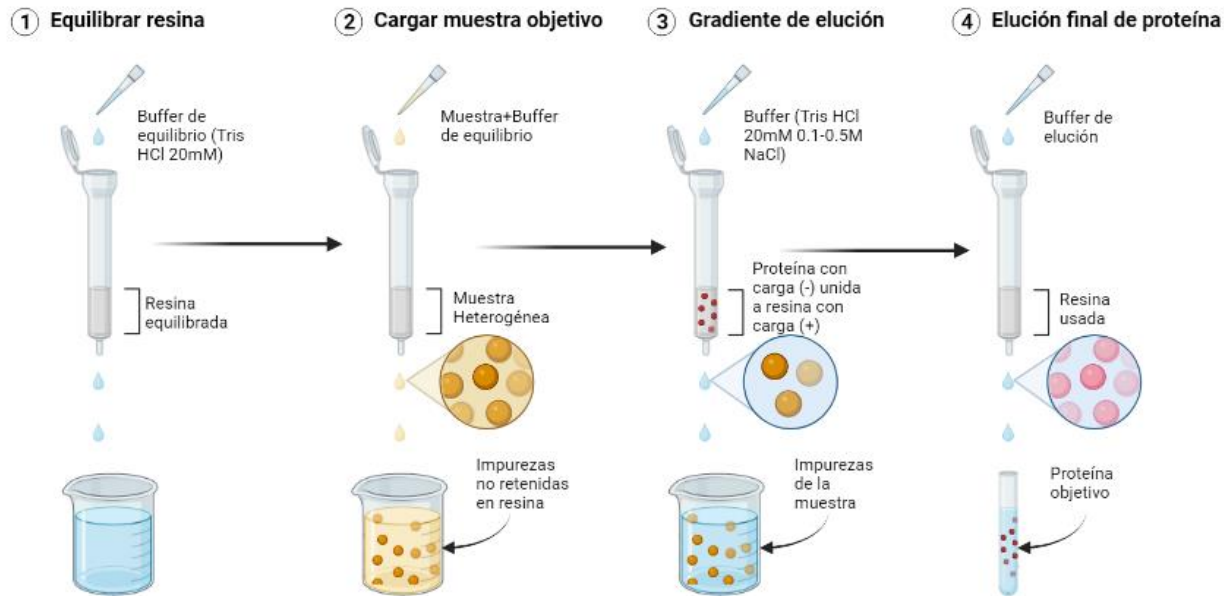
## Lisado



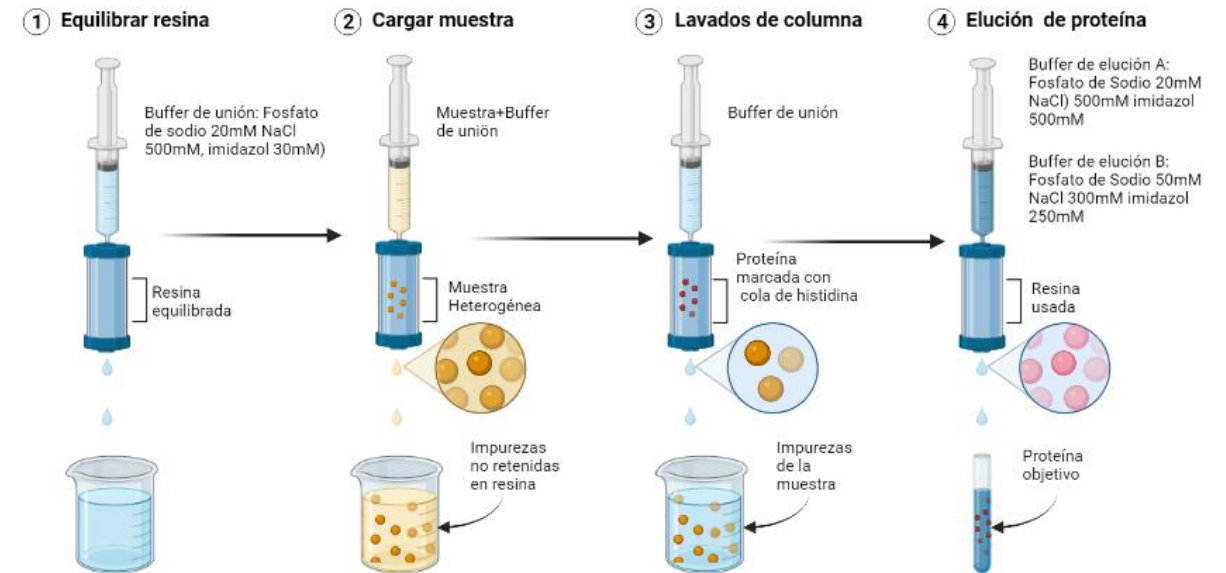
## Western Blot



## Cromatografía de intercambio iónico *Sefarosa Fast Flow*



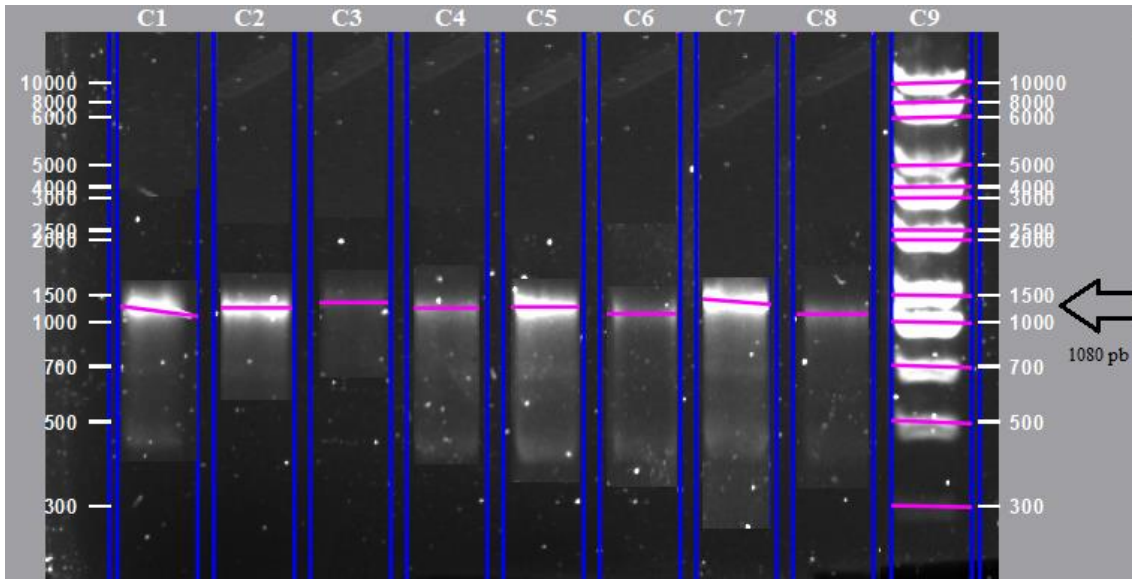
## Cromatografía de afinidad de níquel *HisTrap™ HP de 1mL*



# Verificación del plásmido

# Resultados y discusión

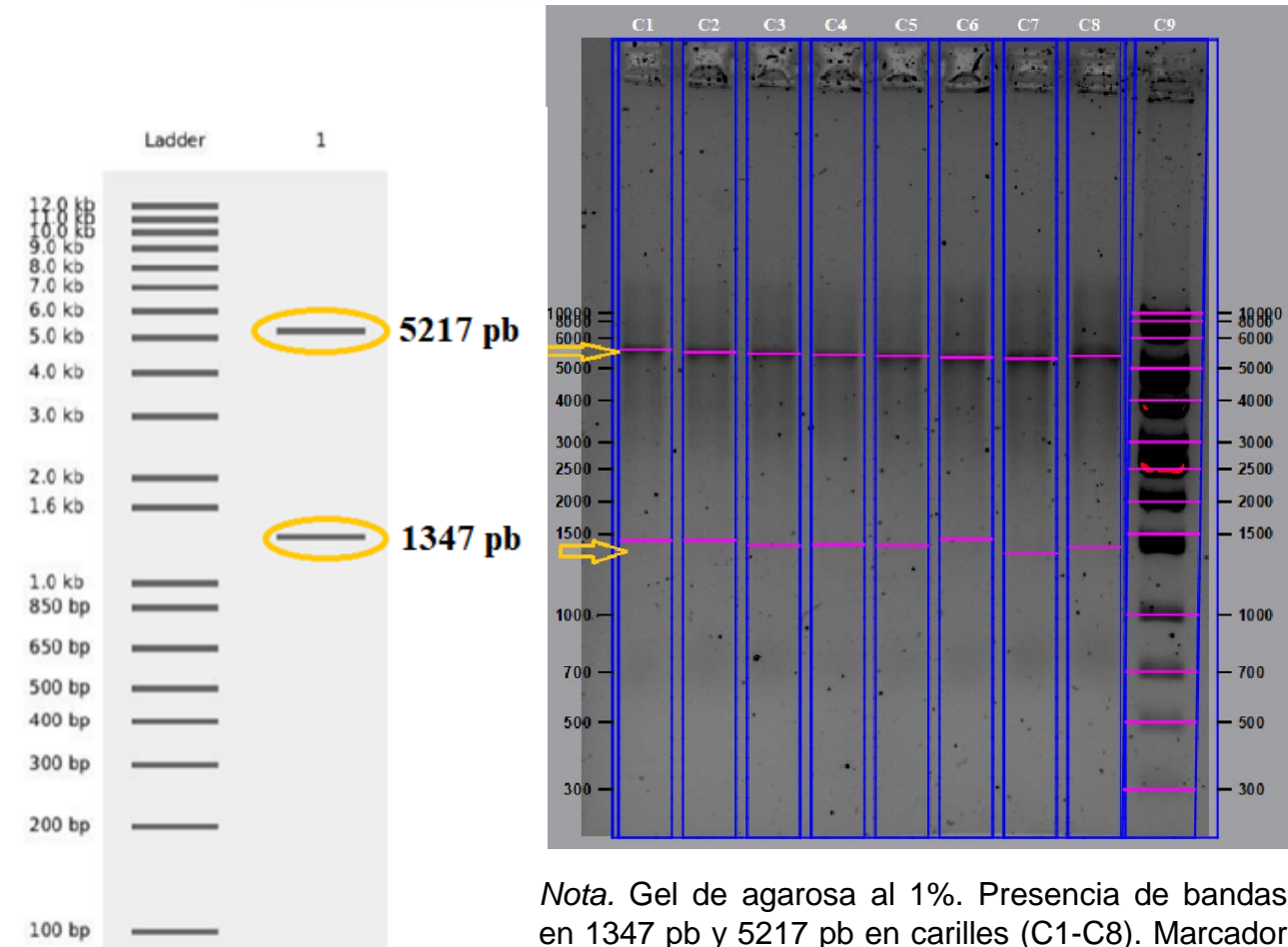
## Purificación del plásmido en *E. coli* JM109



Nota. Gel de agarosa al 1%. Presencia de bandas en 1080 pb (flecha). Control positivo de *E. coli* BL21(C+). Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder.

Compuesto	1X (µl)	9X (µl)
Tampón de enzima EcoRV (10x)	2	18
Enzima EcoRV	0.5	4.5
Plásmido (1 µg/mL)	5	45
BSA acetilado (10 µg/mL)	0.2	1.8
Agua DEPC	12.3	110.7
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>180</b>

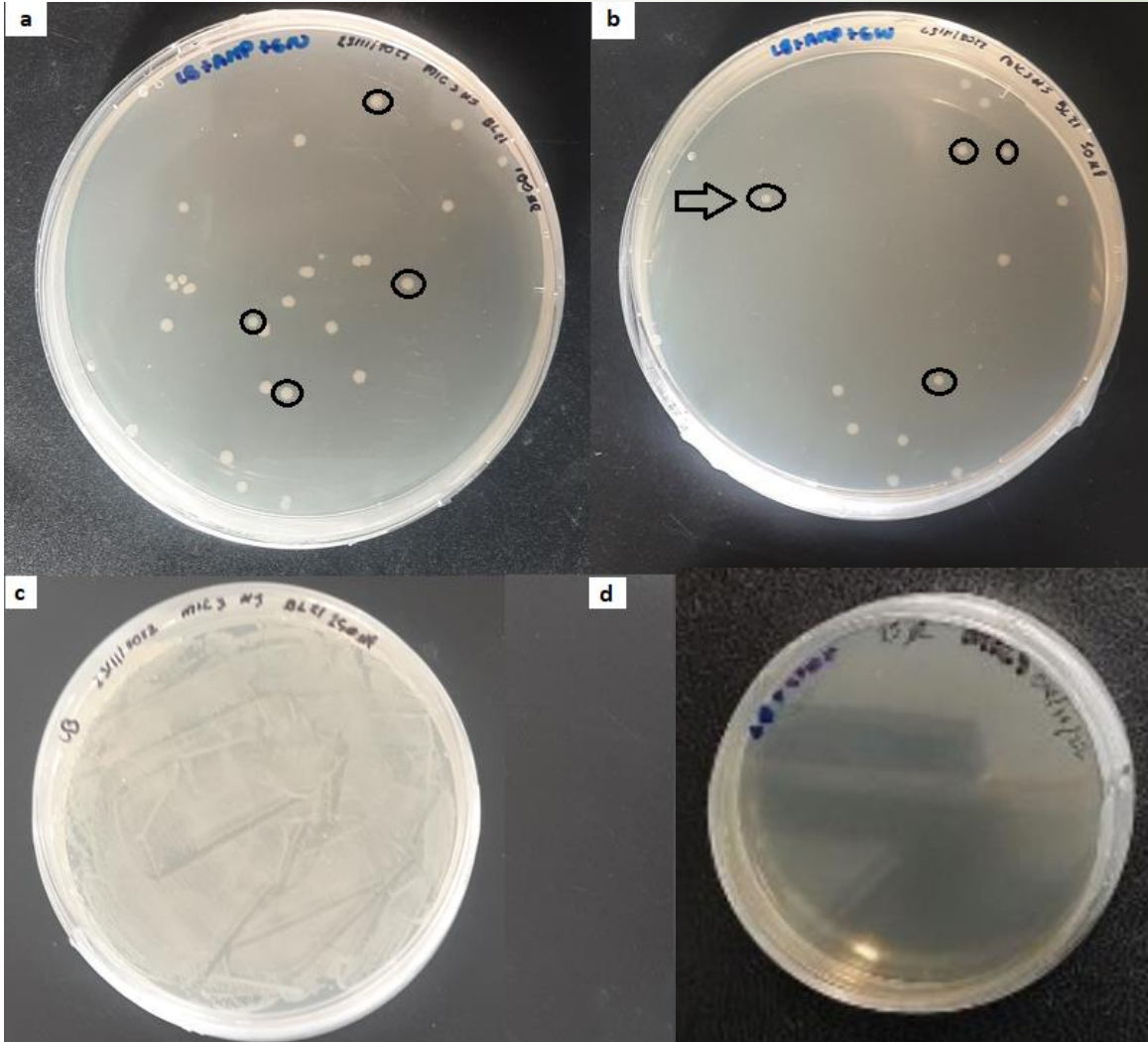
## Verificación con enzima de restricción EcoRV



Nota. Gel de agarosa al 1%. Presencia de bandas en 1347 pb y 5217 pb en carilles (C1-C8). Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder



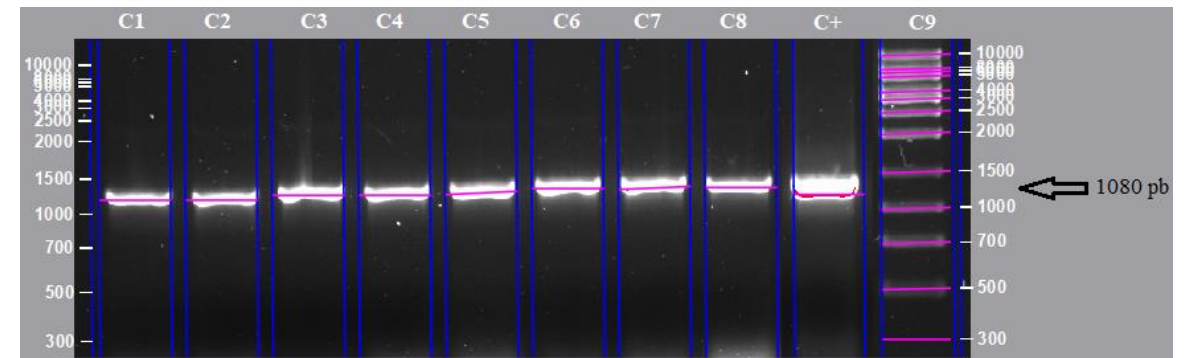
**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Nota. 100  $\mu$ L del producto de clonación (a). 50  $\mu$ L (b). Control (+) medio LB (c). Control (-) Cloranfenicol (d).

Compuesto		1X ( $\mu$ l)	9X ( $\mu$ l)
Tampón PCR (10x)		2.5	22.5
dNTPs (10 mM)		0.5	4.5
MgCl <sub>2</sub>		1.5	13.5
Primer Forward		0.5	4.5
Primer reverse		0.5	4.5
Platinum Taq	( <i>Thermus aquaticus</i> )	0.2	1.8
Agua DEPC		18.3	164.7
<i>E. coli</i> BL21		1	9
Total		25	225

## Verificación con Colony PCR

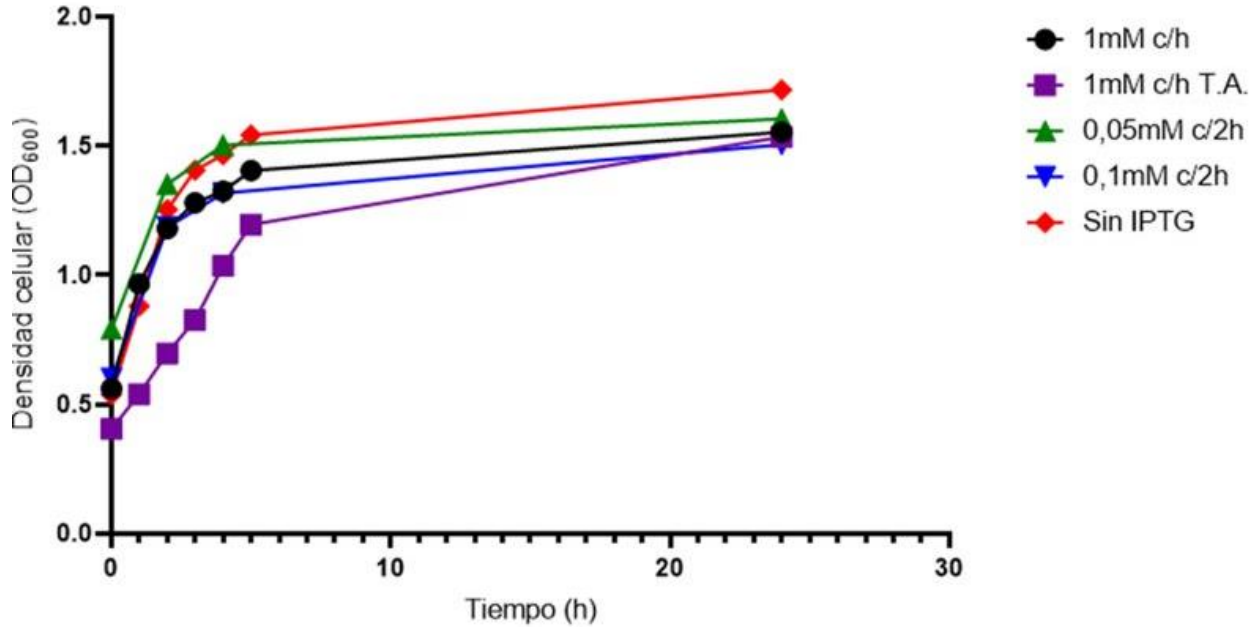


Nota. Gel de agarosa al 1%. Presencia de bandas en 1080 pb (flecha). Cepas seleccionadas de la clonación en *E. coli* BL21(C1-C8). Control positivo de *E. coli* BL21(C+). Marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder



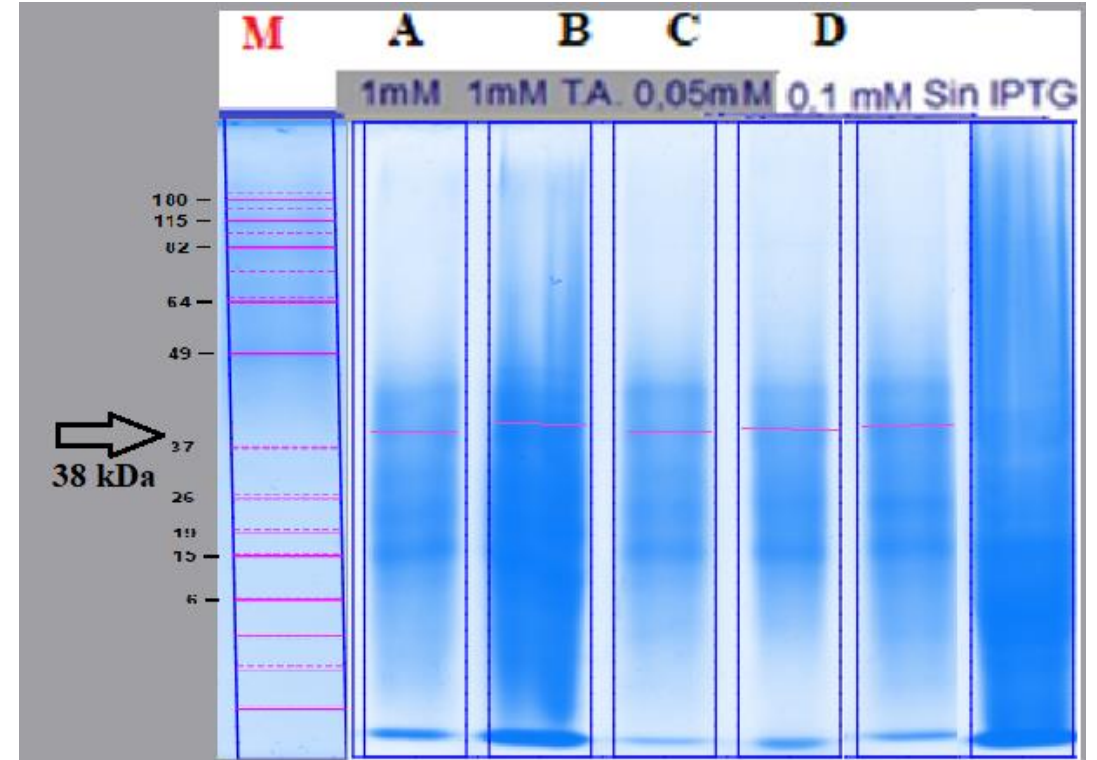
## Estandarización de [IPTG]

# Resultados y discusión

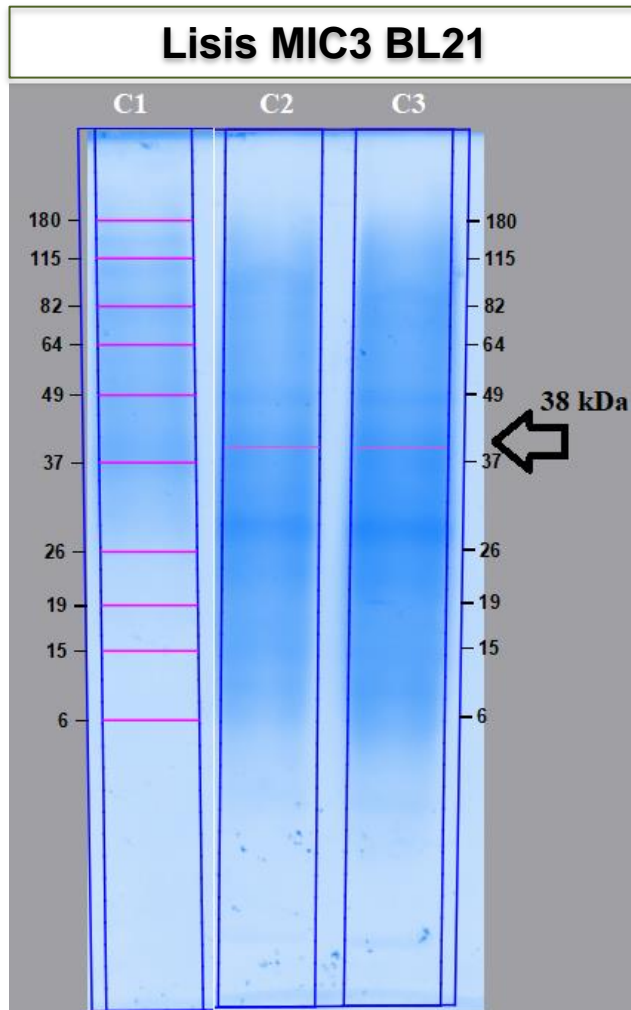


Nota. OD600, GraphPad Prism 8. Mejor concentración [IPTG] 0.05mM

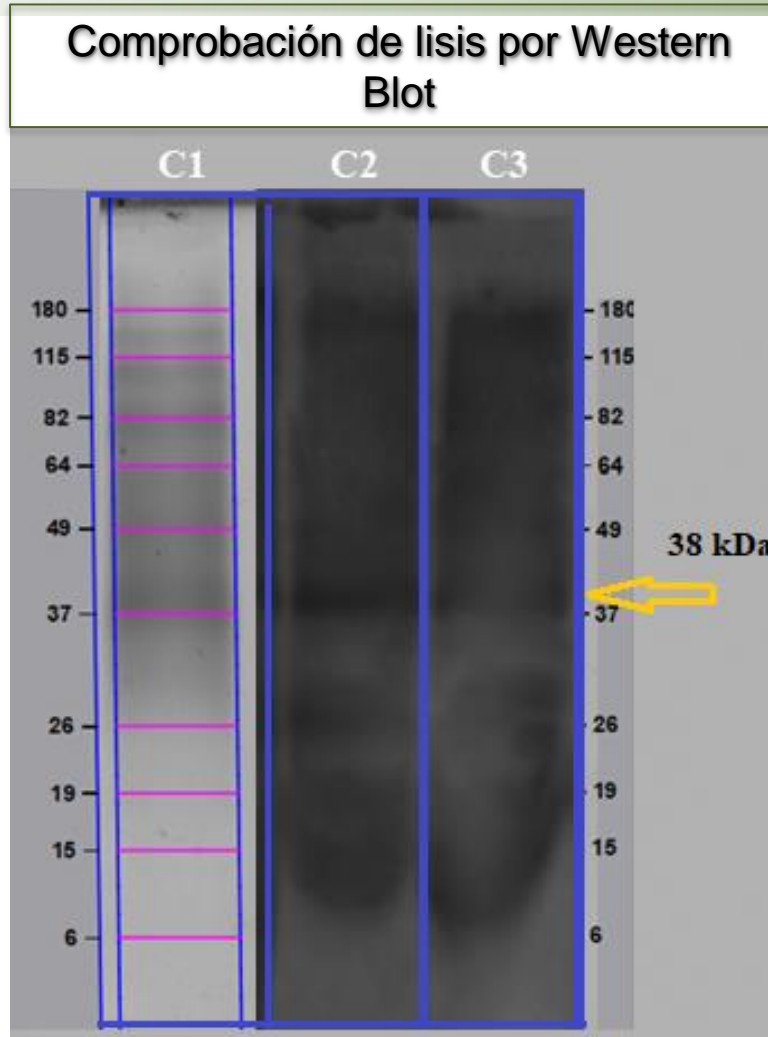
Ensayo	[IPTG]	Temperatura ° C	rpm	Horas
A	1 mM	37	200	1,2,3,4,5 y 24
B	1 mM	Ambiente	300	1,2,3,4,5 y 24
C	0,05 mM	37	200	2,4 y 24
D	0,1 mM	37	200	2,4 y 24
E	-	37	200	1,2,3,4,5 y 24



Nota. Gel de poliacrilamida al 9% de separación y 4% de concentración.



Nota: 10 µl de marcador de peso molecular (C1). 38 kDa (flecha). Para C2 (10.513 mg/mL) y C3 (9.381 mg/mL). *ImageLab*.



Nota: 10 µl de marcador de peso molecular (C1). 38 kDa (flecha). Para C2 (1.0513 mg/µl) y C3 (0.9381ng/µl). *ImageLab*.

<b>Anticuerpo primario</b>	Suero humano positivo para (IgG) verificado <i>Toxoplasma gondii</i> 1:50
<b>Anticuerpo secundario</b>	GAM-HRP S1410 Anti-Human, 1:20000;

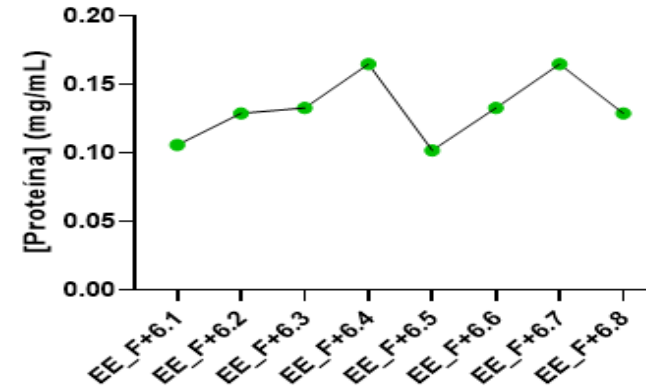
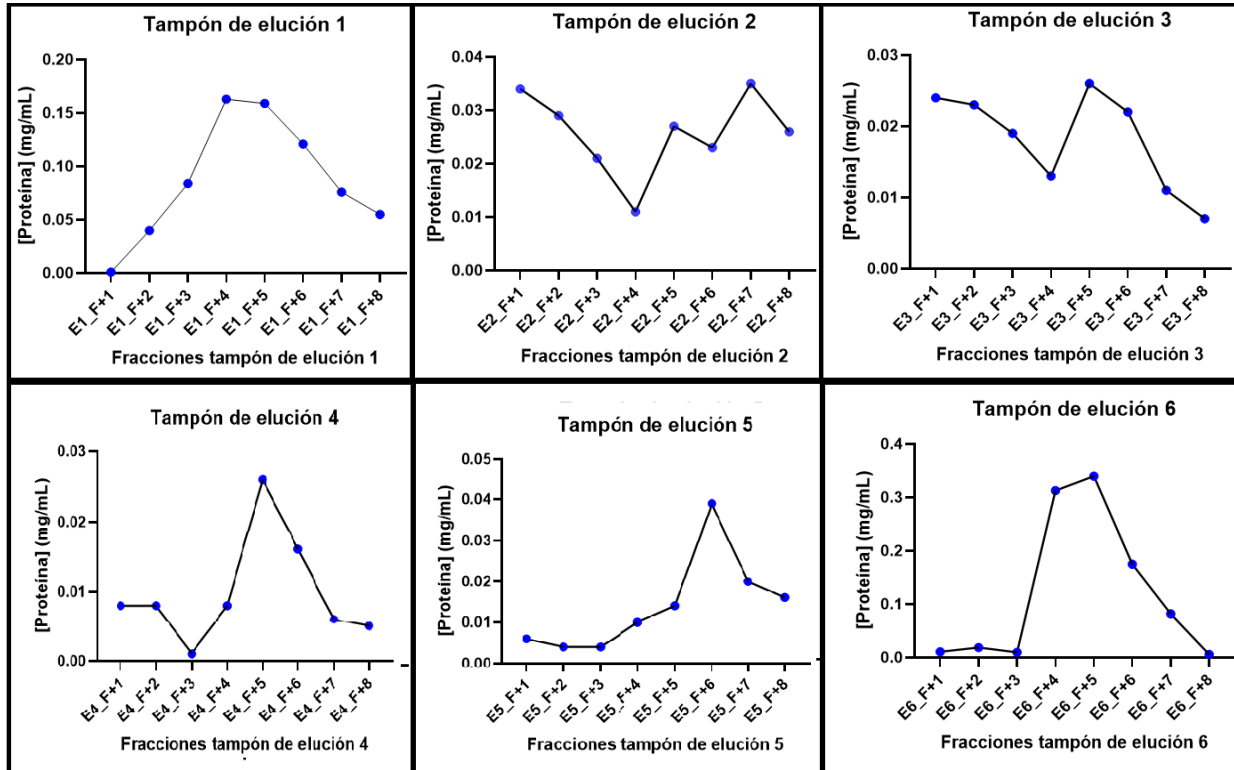


# Purificación de la proteína MIC3 por cromatografía

# Resultados y Discusión

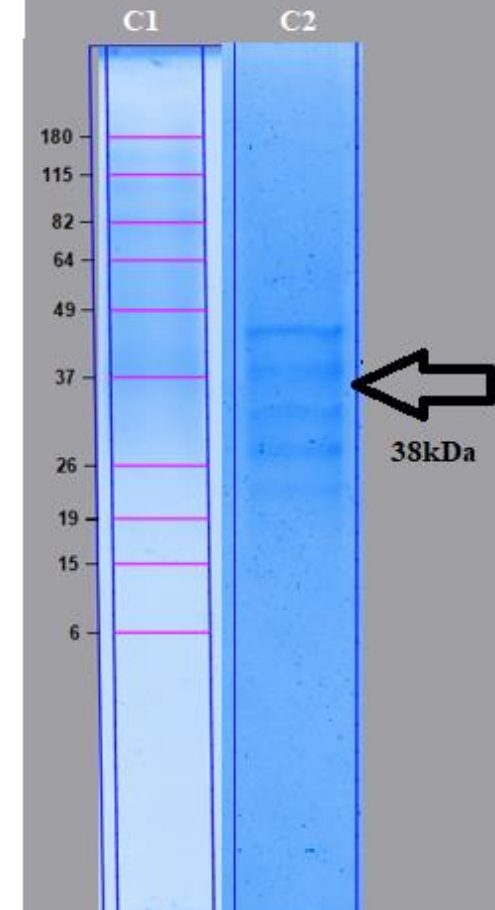
## Cromatografía de intercambio iónico *Sefarosa Fast Flow*

## Cromatografía de afinidad de níquel *HisTrap™ HP*



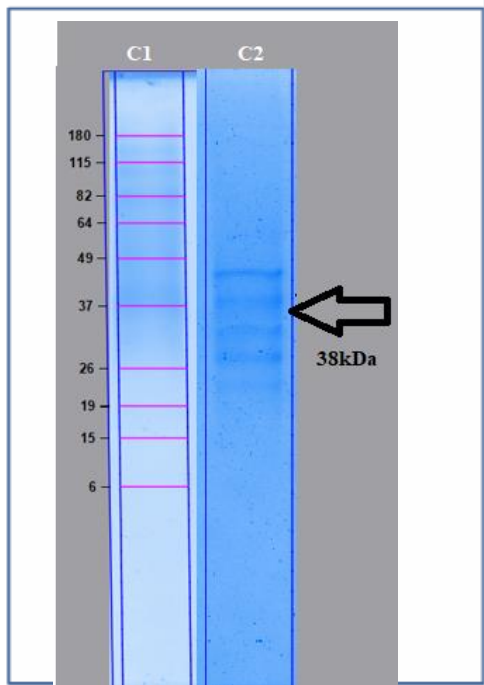
8.190 mg/mL

## SDS-PAGE



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

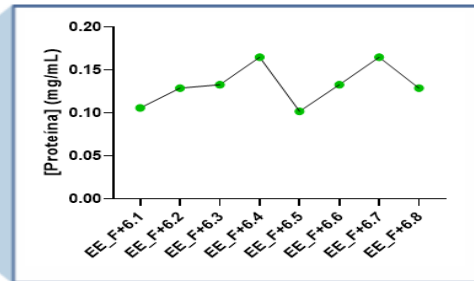
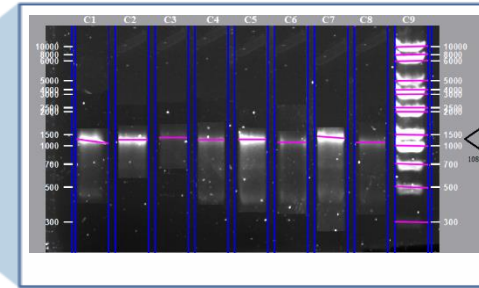
# CONCLUSIONES



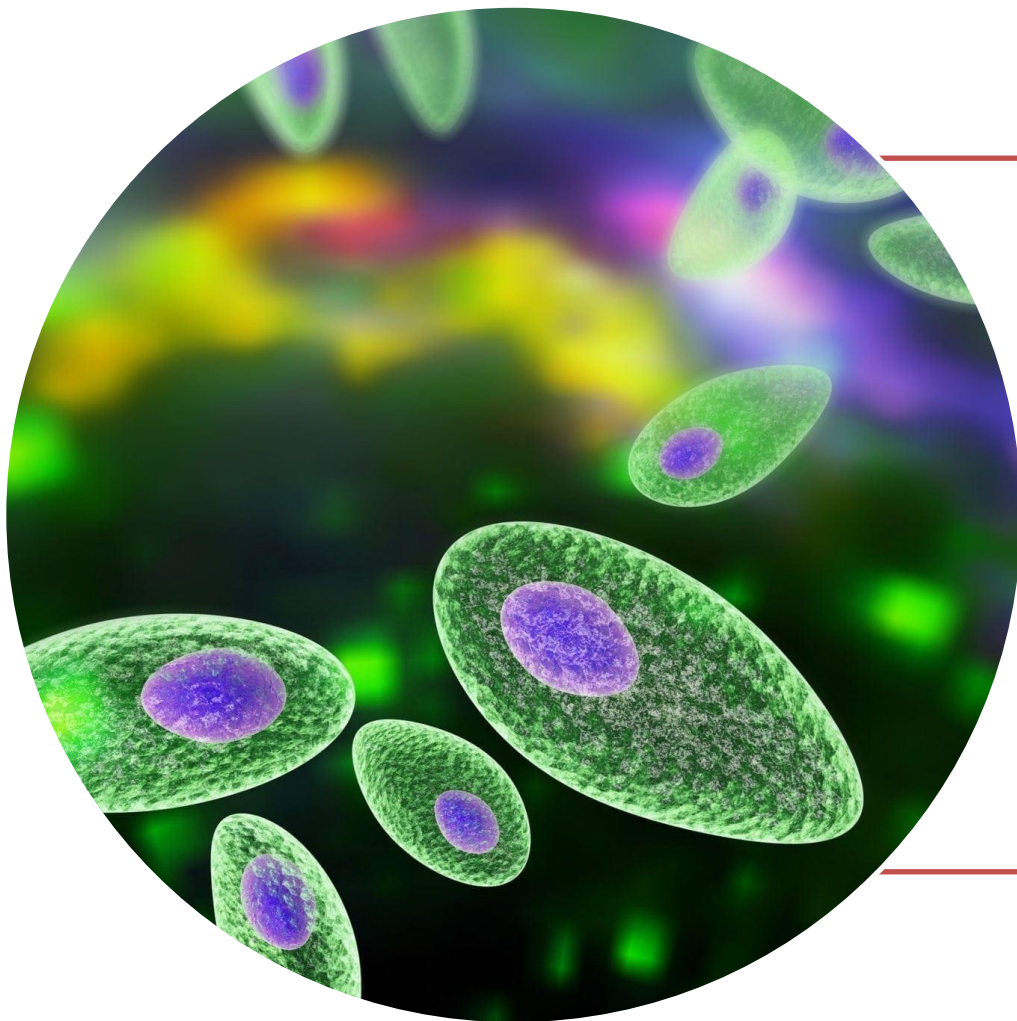
1080 pb

38kDa

≈0.100-  
0.170  
mg/mL.



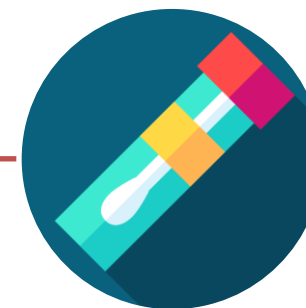
# RECOMENDACIONES



Estudios  
sobre  
reactivos  
de  
diagnóstico



Desarrollo del  
método PCR-  
RFLP anidado  
multiplex  
multilocus (Mn-  
PCR-RFLP)



Tecnologías  
genómicas,  
transcriptómicas  
y proteómicas



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



**“Obtención y purificación de la proteína  
MIC3 de *Toxoplasma gondii*”**

**Familia y Amigos**

## AGRADECIMIENTOS



**Marbel Torres Ph.D.  
Ing. Andrea Aluisa  
Ing. Fernanda Toscano**



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA