

## Producción Recombinante del Péptido Bioactivo Phe2 Identificado en el Perfil Proteómico de Nuez Pecanera *Carya illinoensis*

<sup>1</sup>Ramos-Del Villar I.N., <sup>1,2</sup>del Rincón-Castro M.C, <sup>1</sup>Gutiérrez-Vargas S., y <sup>1,2</sup>León-Galván M.F. \*

Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca (CIS), División de Ciencias de la Vida, <sup>1</sup>Posgrado en Biociencias, <sup>2</sup>Departamento de Alimentos. Ex-hacienda El Copal km. 9, carretera Irapuato-Silao; A.P. 311, C.P: 36500, Irapuato, Gto. México. \*[fabiola@ugto.mx](mailto:fabiola@ugto.mx)

### RESUMEN:

Actualmente las proteínas y péptidos con actividad biológica constituyen una de las categorías más importantes del sector de los alimentos funcionales. Las proteínas son componentes fundamentales de los alimentos, tanto nutricional como funcionalmente. Una alternativa para la obtención de biopéptidos es la nuez pecanera, sin embargo, para que estos péptidos puedan tener un efecto benéfico, deben ser consumidos en concentraciones que no son proveídas por la dieta diaria, por esto es necesario implementar estrategias de producción que cubran estas necesidades. En el presente estudio, se plantea la producción recombinante del péptido inhibidor de la ECA “phe2” en *Escherichia coli*. Como primera etapa, el gen que codifica el péptido phe2, fue diseñado y obtenido en ADN de cadena sencilla. El gen se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos específicos, a continuación se ligo en plásmido de conservación pCR4-TOPO y transformado en *E. coli* TOP 10. Después se clonó en el vector pCold I y se transformo en *E. coli* rosetta gami pLysS [DE3] en la cual se logró la inducción y expresión de una proteína de aproximadamente 10 kDa que coincide con el peso esperado del péptido phe2.

**Palabras clave:** Péptidos bioactivos, ECA y Nuez pecanera

### ABSTRACT:

Proteins and peptides with biological activity are currently one of the most important categories in the functional foods sector. Proteins are fundamental components of food, both nutritionally and functionally. An alternative for obtaining biopeptides is the pecan nut. However, for these peptides may have a beneficial effect, they should be consumed in concentrations that are not provided by the daily diet, so it is necessary to implement production strategies that meet these needs. In the present study, we propose the recombinant production of the peptide Phe2 in *Escherichia coli*. As a first step the gene encoding the peptide phe2, was designed and obtained in single-stranded DNA. The gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR), using specific oligonucleotides then ligated into the plasmid conservation PCR4-TOPO and transformed into *E. coli* TOP 10. After cloned the pCold I vector and transformed into *E. coli* rosetta gami [DE3] pLysS, in which the induction and expression of a protein of approximately 10 kDa that coincided with the weight expected of the peptide phe2.

**Keywords:** ACE, Bioactive Peptides and pecan nut.

## INTRODUCCIÓN

Los péptidos con actividad biológica producidos durante la digestión gastrointestinal o la elaboración de alimentos pueden ejercer un importante papel en la regulación y la modulación metabólica, que sugiere su uso potencial para promoción de la salud y la reducción del riesgo de enfermedad. En la última década se ha demostrado que estos tienen diferentes actividades biológicas, siendo un atractivo para la industria alimentaria, ya que podrían ser incluidos en diversos sistemas alimenticios y así lograr su efecto en el organismo del consumidor final. Una alternativa para la obtención de péptidos bioactivos es la nuez pecanera (*Carya illinoensis*), esta variedad tiene un contenido proteico aproximadamente del 9%, además es considerado un cultivo con gran potencial nutracéutico ya que brinda un equilibrado aporte de ácidos grasos mono y polisaturados. En los últimos años se han estudiado las diferentes actividades benéficas que los péptidos bioactivos pueden tener sobre el organismo, incluyendo su actividad antioxidante, antimicrobiana, inmunomoduladora y antihipertensiva (Vioque *et al.*, 2006; Torruco-Uco *et al.*, 2008). Diversos estudios han demostrado que la hidrólisis de proteínas de distintas fuentes pueden producir péptidos inhibidores de enzimas proteolíticas implicadas en enfermedades humanas. Los péptidos que poseen actividad antihipertensiva lo hacen por inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) (Baró *et al.*, 2001). La actividad de esta enzima está directamente relacionada con un incremento de la presión arterial, la cual a su vez está asociada con las enfermedades cardiovasculares, por lo tanto, la inhibición de la misma resulta de gran beneficio para el organismo por ser estos padecimientos causa de muerte en humanos a nivel mundial (Wang y González de Mejía, 2005). Sin embargo, para que estos péptidos puedan tener un efecto benéfico, deben ser consumidos en concentraciones que no son proveídas por la dieta diaria, por esto es necesario implementar estrategias de producción que cubran estas necesidades. Además de las fuentes convencionales de obtención de los péptidos bioactivos, las técnicas de ADN recombinante para la producción de péptidos representan una estrategia viable para la prevención y tratamiento de enfermedades. En el presente estudio, se identificaron péptidos bioactivos con potencial terapéutico y proponemos la producción recombinante de un péptido inhibidor de la ECA en *E. coli*. Se seleccionó el péptido phe2 con capacidad antihipertensiva, en base a este se diseñó el gen sintético el cual fue clonado en el plásmido pCold I.

## MATERIALES Y MÉTODOS

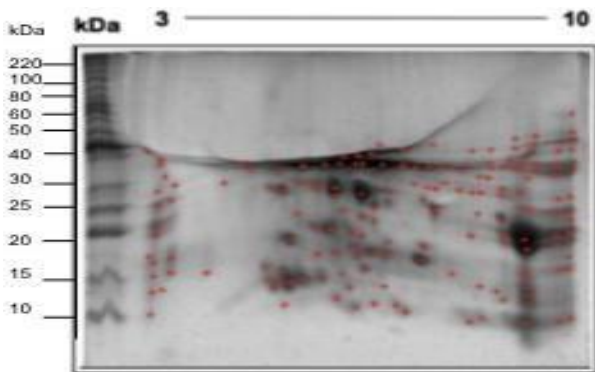
Como primer paso se realizó una extracción de proteína total de nuez pecanera mediante el método de extracción basado en precipitación con ácido tricloroacético y acetona (Saravanan and Rose 2004). Estas fueron separadas mediante electroforesis bidimensional y posteriormente se realizó una digestión en gel con tripsina para la extracción de péptidos. Los péptidos fueron separados mediante espectrometría de masas y estos fueron identificados bioinformáticamente. Se seleccionó un péptido con actividad antihipertensiva, en base al cual se diseñó y fueron sintetizados ADN molde y un par de oligonucleótidos específicos para su posterior amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, al fragmento resultante le fueron agregados sitios de restricción para la enzima *EcoRI* para su subsecuente clonación en el plásmido de conservación PCR4-TOPO y transformado en *E. coli* TOP 10. Después se clonó en el vector pET28a y se transformó en *E. coli* rosetta gami pLysS [DE3]. El péptido se expresara y se purificara mediante cromatografía de afinidad y finalmente se pondrá a prueba la actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

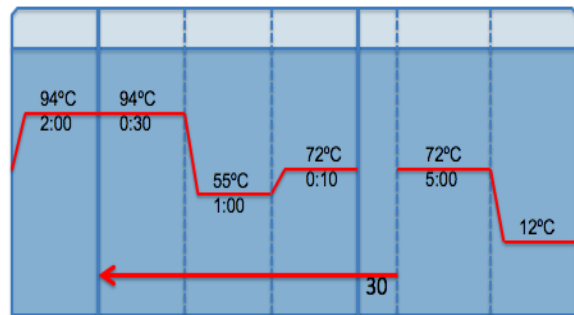
Mediante el software analizador de imágenes de geles de electroforesis bidimensional Melanie 7.0 (Melanie, 2012) se realizó una cuantificación de manchas, en el gel de electroforesis bidimensional de proteína total de nuez en un rango de pH de 3-10 se detectaron 163 manchas (Figura 1). Se lograron identificar 78 péptidos mediante el uso de MASCOT, (Matrix Sciences) y la identificación de los péptidos bioactivos se realizó haciendo una búsqueda en la base de datos para péptidos activos (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia>) encontrando diversas actividades biológicas dentro de las que destacan los péptidos, antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos e

inhibidores. Sobresaliendo en este último grupo los péptidos inhibidores de la ECA previamente reportados con esta actividad por Juillerat-Jeanneret y colaboradores. En base a esto se seleccionó el péptido phe2 y tomando como molde para su diseño la secuencia de aminoácidos reportada, la cual fue traducida a nucleótidos para la síntesis del DNA y oligonucleótidos específicos como se muestra en la tabla I. La PCR fue realizada utilizando las condiciones especificadas en la figura 2 y se logró obtener un amplicon de 75 pb que corresponde al peso esperado del *phe2* (figura 3), el cual fue clonado en pCR4-TOPO y transformado en *E. coli* TOP 10 (figura 4). Fue realizado un análisis de restricción para identificar las transformantes positivas, las cuales fueron comprobadas mediante PCR con oligonucleótidos específicos (figura 5 y 6), para culminar con esta etapa se subclonó en el vector pCold I y se transformó en *E. coli* rosetta gami pLysS [DE3]. Por lo cual vector y fragmento fueron digeridos con la enzima *EcoRI* (figura 7) para su posterior ligación y transformación. Nuevamente se realizó un análisis de restricción y se seleccionó una clona positiva mediante PCR con oligonucleótidos específicos del vector y fragmento (figura 8). Esta clona será utilizada para llevar a cabo la sobreexpresión del péptido phe2, como resultados preliminares de esta sección se muestra un gel SDS-PAGE en el que se compara el patrón de bandeado de *E. coli* rosetta gami pLysS [DE3]-pCold I-*phe2* no inducido y el de *E. coli* rosetta gami pLysS [DE3]-pCold I-*phe2* inducido con IPTG en el que se logró observar una banda diferencial de aproximadamente 10 kDa que coincide con el peso esperado del péptido phe2, sin embargo, es necesario optimizar las condiciones de sobreexpresión y purificación para lograr una concentración mayor del péptido para realizar la prueba de la actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina.

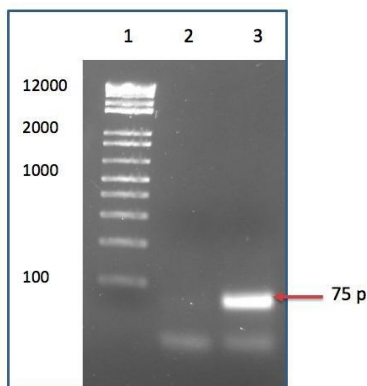
**Figuras.**



**Figura 1** Cuantificación de manchas en gel bidimensional en un rango de pH de 3 a 10



**Figura 2** Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa



**Figura 3** (1) 1 kb plusladder, (2) control negativo (3) Amplificación phe2



**Figura 4** Transformantes *E. coli* TOP 10

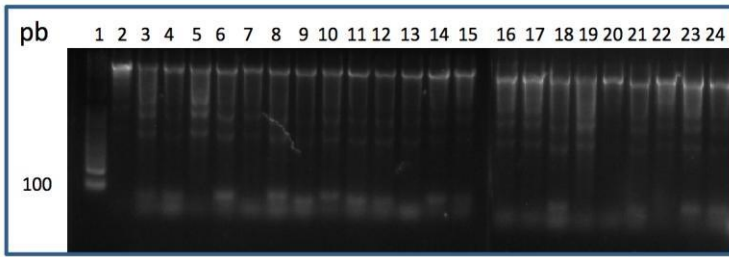


Figura 5 Transformantes *E. coli* TOP 10

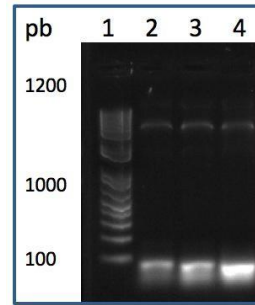


Figura 6 (1) 1 kb plusladder, (2-4) PCR with specific oligonucleotides

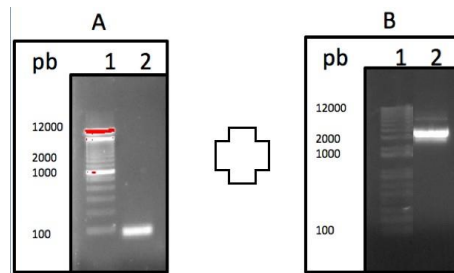


Figura 7 (1) 1 kb plus ladder. A(2) phe2, B(2) pCold I

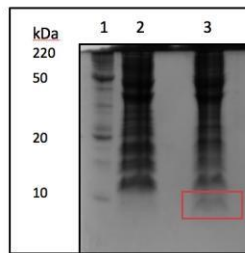


Figura 8 SDS-PAGE (1) No inducida, (2) Inducida

Tablas.

Tabla I Secuencias phe2	
	Secuencia
Aminoácidos	ENLLRFFVAPFPEVFG
Nucleótidos (cadena molde)	GAATTCGAAAACCTGCTGCGCTTTTTGTGGCGCCGTTT CCGGAAGTGTGGCGAATTC
Oligonucleótido Fw	GGAATTCGAGCGCTGAAAACCTGCTGCGC
Oligonucleótido Rv	GGAATTCGCATGCGCCAAACACTTCCGG
Amplicon	GGAATTCGAGCGCTGAAAACCTGCTGCGCTTTTTGTG GCGCCGTTCCGGAAGTGTGGCGCATGCGAATTCC

## BIBLIOGRAFÍA

- Baró, L., J. Jiménez, A. Martínez-Férez, and J. J. Bouza. 2001. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. *Ars. Pharmaceutica*. 42(3-4):135-145.
- Juillerat-Jeanneret, L., Robert, M.C., and M.A. Juillerat. (2011). Peptides from *Lactobacillus* hydrolysates of bovine milk caseins inhibit prolyl-peptidases of human colon cells. *J. Agric. Food Chem.*, 59, 370-377.
- Melanie. (2012). Version 7.0.6. Switzerland. Geneva Bioinformatics (GeneBio). Swiss Institute of Bioinformatics.
- Saravanan, RS, and Rose JKC. (2004). *Proteomics*. *Ago*. 4(9): 2522-2532.
- Torruco-Uco, JG, Domínguez-Magaña, MA, Dávila-Ortíz, G, Martínez-Ayala, A, Chel-Guerrero, LA and Betancur, DA. (2008). *Cienc.tecnol.aliment*. 6 (2): 158-168.
- Vioque, JJ, Pedroche, MM, Yust, H, Lqari, C, Megías, J, Girón-Calle, M and Millán F. (2006). *Braz. J. Food Technol.* III JIPCA: 99-102.
- Wang, W. and E. González de Mejía. 2005. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food. Science and Food Safety*. 4: 63-78.