



Elaborado por:
Dr. Fernando Guzmán Chávez
Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM
PROYECTO DGAPA-PAPIME (PE202023)

PRÁCTICA EXPERIMENTAL

Síntesis *in vitro* de proteínas fluorescentes mediante la tecnología de Cell-Free

Objetivos

- Utilizar el sistema *in vitro* de síntesis proteínas (cell-free) mediante la producción de cuatro proteínas fluorescentes.
- Comparar el método tradicional de producción de proteínas recombinantes vs sistema cell-free
- Discutir pros y contras de cada una de las metodologías

Materiales

- Guantes
- Micropipetas (0.2-2 μ L, 2-20 μ L, 20-200 μ L)
- Puntas para micropipeta
- Microtubos de 1.5 mL o Microtubos para PCR
- Incubadora o *termoblock* a 29°C
- Mezclador tipo *Vortex*
- Transiluminador o fuente de luz azul
- Marcador permanente

Reactivos

- Agua libre de nucleasas (MQ)
- Extracto celular de *E. coli*.
- 4x Wizard Mix
- 40% PEG 8000 (almacénese a temperatura ambiente)
- 20 nM DNA circular (plásmidos)
 - sfGFP
 - eforRED
 - Aquamarine
 - dTomato

Metodología

A cada equipo se le hará la entrega de un kit de cell-free el cual contiene el extracto celular, el buffer wizard así como los 4 plásmidos que codifican para diferentes proteínas fluorescentes. Por separado se les proporcionará un tubo que contiene el PEG 8000.

1. Antes de usar, agite suavemente cada tubo proceda a centrifugar brevemente los tubos. Si se ve algún precipitado, pipetee suavemente la mezcla hacia arriba y hacia abajo hasta garantizar la homogeneidad. Evite la formación de espuma.

2. Etiquete 6 tubos vacíos de 1.5 mL como se indica a continuación:

- a) Control Reportero
- b) sfGFP
- c) eforRed
- d) Aquamarine
- e) dTomato
- f) Master Mix

3. En el tubo etiquetado como *Master Mix*, **prepare el equivalente a 6 reacciones** de cell-free de acuerdo a los volúmenes descritos en la siguiente tabla.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)	
	1 reacción	6 reacciones
4x Wizard Mix	3.0	18
H ₂ O	1.4	8.4
40% PEG8000	0.6	3.6
Extracto Celular	4.0	24
Volumen total	9	54

4. Del **Master Mix** que se preparó en el punto anterior, añada **9 μL de Master Mix** a cada uno de los 5 tubos restantes (previamente etiquetados).

5. A cada tubo agregue **3 μL del DNA plasmídico (20 nM)** respectivo (**un tubo por cada plásmido**) y al tubo etiquetado como control reportero agregue **3 μL del H₂O libre de nucleasas** (éste servirá como control negativo del experimento).

6. Agitar suavemente y centrifugar brevemente (un pulso) los tubos.

7. Incubar los tubos a 29 °C utilizando un “*termoblock*” o incubadora. Pasados 1-2 horas de incubación y utilizando un transiluminador o alguna fuente de luz azul verifique cada uno de los tubos. El plásmido que codifica para sfGFP ya debe presentar fluorescencia. Los tubos del resto de proteínas fluorescentes se pueden dejar incubar a 29°C o a temperatura ambiente toda la noche para observar fluorescencia.

NOTA: Los alumnos también se pueden llevar los tubos y con el paso del tiempo se puede observar las proteínas fluorescencia a simple vista

Referencias

Guzman-Chavez F, Arce A, Adhikari A, Vadhin S, Pedroza-Garcia JA, Gandini C, Ajioka JW, Molloy J, Sanchez-Nieto S, Varner JD, Federici F, Haseloff J. Constructing Cell-Free Expression Systems for Low-Cost Access. *ACS Synth Biol.* 2022 Mar 18;11(3):1114-1128. doi: 10.1021/acssynbio.1c00342. Epub 2022 Mar 8. PMID: 35259873; PMCID: PMC9098194.

Stark JC, Huang A, Hsu KJ, Dubner RS, Forbrook J, Marshalla S, Rodriguez F, Washington M, Rybnicky GA, Nguyen PQ, Hasselbacher B, Jabri R, Kamran R, Koralewski V, Wightkin W, Martinez T, Jewett MC. BioBits Health: Classroom Activities Exploring Engineering, Biology, and Human Health with Fluorescent Readouts. *ACS Synth Biol.* 2019 May 17;8(5):1001-1009. doi: 10.1021/acssynbio.8b00381. Epub 2019 May 7. PMID: 30925042.

Material Elaborado por: Dr. Fernando Guzmán Chávez y el Dr. José Antonio Pedroza García, los plásmidos fueron exclusivamente creados para esta práctica por el Dr. Fernando Guzmán Chávez. Se agradece el apoyo del **PROYECTO DGAPA-PAPIME (PE202023)** para el desarrollo de este material.