



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

Servicio social – 16 de abril 2024 al 16 de octubre 2025

Proyecto de Servicio Social

Nombre del Proyecto:

Detección de β -galactosidasa por la técnica de Western Blot

Asesor Externo

Erika M. Carrillo
16.12.2025

MSc. Erika Margarita Carrillo Casas

Investigadora en Ciencias Médicas

Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad

Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

Asesor Interno

[Signature]
17.12.2025

M. en B. Gilberto Casillas Pétriz No. Económico: 24223

Departamento de Sistemas Biológicos

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Alumna:

Candelario Martínez Génesis Miroslava

Lugar de realización del proyecto:

**Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, Av. Calzada de Tlalpan 4800,
Col. Sección XVI, Tlalpan, C.P. 14080, CDMX.**

Introducción

La β -galactosidasa (β -gal) es una enzima que se encarga de proporcionar a los seres vivos energía y compuestos de carbono mediante la hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa. Su estructura es un homotetrámero de 464 kDa y un monómero de 116 kDa (Li *et al.*, 2024).

Algunos cultivos bacterianos pueden expresar de forma constitutiva la producción de β -gal como *Bacillus megaterium*, *B. coagulans*, *B. stearothermophilus*, *B. circulans*, *Thermus aquaticus*, *Streptococcus lactis*, *S. thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticus* y *L. thermophilus*. La expresión de la enzima en cada género bacteriano puede ser intracelular o extracelular como se indica en la tabla 1 (Kaur *et al.*, 2023).

Tabla 1. Ubicación de la enzima β -gal en algunos microorganismos bacterianos (Kaur *et al.*, 2023) ().

Fuente bacteriana	Ubicación de la enzima	Temperatura (°C)	pH
<i>Bifidobacterium longum</i>	Intracelular	50-55	7.0
<i>Lactobacillus crispatus</i>	Intracelular/Extracelular	45	6.5
<i>Bacillus circulans</i>	Intracelular	56	6.5
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	Intracelular	65	6.0
<i>Escherichia coli</i>	Intracelular	40	7.2
<i>Lactobacillus thermophilus</i>	Intracelular	55	6.2

En *E. coli*, la lactosa se emplea como inductor natural de β -gal (Sánchez y Hardisson 1979, Kaur *et al.*, 2023). El nivel de expresión de la β -gal puede analizarse por el ensayo enzimático de β -gal o emplearse de forma indirecta como indicador de expresión gracias a la detección de la enzima por la técnica de Western Blot (WB) con anticuerpos específicos. La técnica de WB es una herramienta de biología molecular, con alta sensibilidad y especificidad y se emplea en el diagnóstico de enfermedades causadas por bacterias como la enfermedad de Lyme o la sífilis (Fawcett *et al.*, 1998, Backhouse y Nesteroff, 2001). Otras aplicaciones que tiene la técnica de WB es la detección de interacciones entre proteínas, proteínas – ADN, modificaciones postraduccionales, la localización subcelular de las proteínas y el desarrollo de anticuerpos o mapeo de epítomos (Meftahi *et al.*, 2021).

Planteamiento del problema y justificación

La β -gal fue descrita por primera vez en 1889 por Martinus Willem Beijerinck, quien demostró la actividad de β -gal mediante quimioluminiscencia (Rouwenhorst *et al.*, 1989). La β -gal fue empleada como reportero de expresión por primera vez en el

año de 1961, cuando Jacob y Monod descubrieron el operón de lactosa de *E. coli*, y lograron demostrar la expresión del operón mediante la presencia de un gen represor que bloquea la transcripción del ADN en ausencia de lactosa, cuando la lactosa está presente se une al represor y permite la transcripción del ADN (Jacob y Monod, 1961). En este Servicio Social se plantea emplear La técnica de Western Blot para analizar la expresión de β -galactosidasa inducida en *E. coli* transformada con construcciones plasmídicas.

Objetivo general

Detectar el nivel de expresión de β -galactosidasa en *E. coli* transformadas con construcciones plasmídicas mediante la técnica de Western Blot.

Objetivos específicos

- Obtener el ADN plasmídico de las bacterias transformadas por lisis alcalina.
- Determinar el crecimiento bacteriano de *E. coli* transformada con plásmidos por selección de resistencia a antibióticos.
- Cuantificar la proteína total por la técnica de ácido bicinonínico.
- Analizar la expresión de β -gal por Western Blot.

Antecedentes

El físico Ferdinand Frederic Reuss de la Universidad Estatal de Moscú, en el año de 1807, descubrió que, al pasar electricidad a través de un tubo con arcilla y agua, las partículas se movían hacia un electrodo positivo. Oliver Smithies en 1955, al utilizar la electroforesis en gel de poliacrilamida, separó extractos de tejido humano, lo que permitió estimar la diversidad genómica a nivel de proteínas (Sule *et al.*, 2023).

La técnica de WB se deriva de dos publicaciones, la primera fue durante el año de 1979, cuando Renard y colegas, del grupo de George Stark utilizaron una membrana de diazobenciloximetilo y una mezcla de poliacrilamida/agarosa, como gel separador, así como la proteína A marcada con I^{125} para permitir la detección de proteínas. La segunda publicación, el mismo año, fue de Towbin y colegas quienes emplearon fuerzas electrostáticas para transferir las proteínas en SDS-PAGE, como gel separador, membrana de nitrocelulosa para la transferencia de proteínas, anticuerpo primario y anticuerpo secundario para la detección (Moritz, 2020).

Para realizar la técnica de WB es necesario hacer la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La electroforesis es el movimiento de las partículas cargadas, bajo la influencia de un campo eléctrico uniforme. La migración depende de la carga y el peso molecular (García, 2000). Esta técnica, se utiliza para la detección, separación y cuantificación de proteínas específicas en una mezcla compleja, su uso requiere de anticuerpos para detectar la proteína (Lapadula, 2018).

Metodología

Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

La pastilla bacteriana se resuspendió en 100 µl de la solución I (Anexo I. *Preparación de soluciones para la extracción de ADN*), posteriormente se transfirieron 200 µl de la solución II y se mezcló por inversión suave e inmediatamente se reposó en hielo por 5 min. Posteriormente, se transfirieron 150 µl de solución III y se mezcló por inversión suave seguido de un reposo en hielo por 5 min. Se centrifugó a 14 000 rpm, 5 min a 4 °C y se recuperaron 400 µl del sobrenadante. Se transfirieron 400 µl de fenol/cloroformo, se mezcló por agitación y nuevamente se centrifugó a 14 000 rpm, 3 min a 4 °C. Se recuperaron 380 µl del sobrenadante, se transfirieron 300 µl de etanol al 70 %, se mezcló por agitación suave y se centrifugó a 14 000 rpm, 5 min a 4 °C. Se decantó y se transfirió 1 ml de etanol al 70 %, se centrifugó a 14 000 rpm, 5 min a 4 °C. Se decantó y se dejó secar la pastilla de ADN. Finalmente, el ADN se resuspendió en 50 µl de agua destilada (Fanglian, 2011).

Técnica de Western Blot

La técnica de Western Blot incluye los pasos que se muestran en la figura 1:

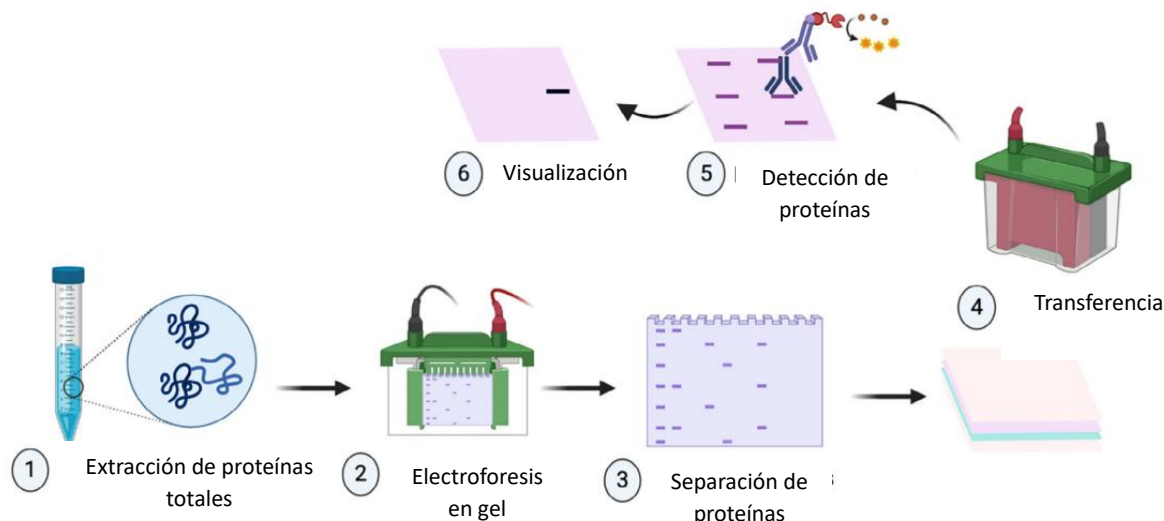


Figura 1. Método para realizar la técnica de Western Blot (Tomada y modificada de Sander et al., 2019).

1. Extracción de proteínas totales

Se cultivaron *E. coli* transformadas en medio de cultivo sólido LB con antibiótico a 37°C durante 24 h, posteriormente se tomó una colonia y se resembró en medio líquido con concentración de 100 mg/ml del antibiótico correspondiente (ampicilina,

kanamicina y estreptomicina), y se incubó a 37 °C, 120 rpm durante 18 h (Son y Taylor, 2012).

1.1 Obtención de la pastilla bacteriana

El medio de cultivo bacteriano se centrifugó a 3500 rpm durante 20 min, se desechó el sobrenadante y se dejó secar.

1.2 Lisis con amortiguador de ensayo de radioinmunoprecipitación RIPA 1X

La pastilla bacteriana se resuspendió con 500 µl de PBS 1X (Anexo 1). Se centrifugó a 1 500 rpm durante 5 min a 4°C, posteriormente el pellet se resuspendió con 200 µl de amortiguador RIPA (Anexo 1) y se centrifugó a 14 000 rpm durante 3 min (DeCaprio y Kohl, 2017).

1.3 Cuantificación de proteínas por el método de Ácido Bicinconínico (BCA)

Para la cuantificación de proteínas por BCA, se preparó el reactivo A con 1 g de bicinconinato de sodio, 2 g de Na₂CO₃, 0.16 g de tartrato de sodio, 0.4 g de NaOH y 0.95 g de NaHCO₃. Se aforó a 100 ml con agua destilada, el reactivo B se preparó con 0.4 g de CuSO₄, disueltos en 10 ml de agua, se conservó a temperatura ambiente, posteriormente para preparar la solución de trabajo se mezcló 100 volúmenes de reactivo A (que contiene 1 % de una solución acuosa de BCA-Na₂, 2 % de Na₂CO₃ H₂O, 0.16 % de Na₂, 0.4 % de NaOH y 0.95 % de NaHCO₃. Se ajustó el pH a 11.25 con NaOH 50 % o NaHCO₃) con 2 volúmenes de reactivo B (que contiene 4 % de CuSO₄ en agua destilada), se conservó a temperatura ambiente (Walker, 1994). Se agregaron 200 µl del reactivo de trabajo BCA a una placa de 96 pocillos con 25 µl de muestra, la placa se colocó a 60 °C por 30 min y se adquirió a 562 nm (Smith *et al.*, 1985, Noble y Bailey, 2009).

2.- Electroforesis SDS-PAGE

El amortiguador de electroforesis de proteínas se clasifica en dos, en amortiguadores continuos y discontinuos. Las soluciones amortiguadoras continuas mantienen un pH constante y una baja fuerza iónica, en este sistema intervienen los geles nativos, la muestra de proteínas se carga directamente en el gel de separación y la separación se llevará a cabo de acuerdo con su diferencia de movilidad en el campo eléctrico (Pérez *et al.*, 2015).

Los geles desnaturizantes están conformados por un gel de apilamiento y un gel concentrador. Ambos requieren un tiempo de polimerización de 30 min a 1 h, bajo condiciones óptimas de temperatura que puede variar de 20 a 25 °C (Pérez *et al.*, 2015). La muestra pasa primero por el gel de apilamiento, donde el tamaño del poro es más grande y tiene un pH más bajo (pH 6.8) a comparación del gel concentrador (pH 8.8). El amortiguador discontinuo contiene iones cloruro (iones conductores) con una movilidad electroforética mayor que la movilidad de las proteínas de la muestra, y esto genera una baja conductividad (García, 2000). Los iones glicinato (iones rezagados) proporcionan un tope de alta intensidad de campo eléctrico, lo

que obliga a las proteínas a permanecer en la zona entre los iones rezagados y los iones conductores (García, 2000). La conductividad es inversamente proporcional a la fuerza del campo eléctrico, por lo que se forma un gradiente de voltaje en esta región que acelera el movimiento de los iones rezagados, lo que permite la migración de ambos iones en la misma velocidad (Pérez *et al.*, 2015).

La temperatura es un parámetro crucial durante el proceso de electroforesis, el amortiguador se debe mantener frío. La alta temperatura provoca la desnaturalización de las proteínas y el ensanchamiento del gel, así como la ruptura de los enlaces que se unieron durante la polimerización, lo que provoca resultados erróneos, como “bandas sonrientes” (Pothur, 2012). La temperatura de 80 °C durante el proceso de electroforesis provoca la formación de burbujas entre el molde y el gel, lo que ocasiona una dispersión en las bandas de las proteínas de bajo peso molecular.

Los geles de poliacrilamida están constituidos de monómeros de acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ que se unen mediante enlaces covalentes y su entrecruzamiento con el monómero N, N'-metilen-bis-acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La polimerización es catalizada por el tetrametilendiamina (TEMED) y es iniciada por el persulfato de amonio (PSA) a temperatura ambiente (García, 2000) como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Polimerización de la acrilamida (Basado en Montalvo y Lugo, 2016).

El gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se preparó al 10 % de acuerdo con el peso molecular del monómero de β -gal de 116 kDa. Las soluciones se mezclaron de acuerdo con la tabla 2, se dejó polimerizar por 15 min antes de vaciar el gel de apilamiento.

Tabla 2. Soluciones para preparar el gel separador (Manss, 2011).

Soluciones	10 %
Acrilamida 40 %	3.4 ml
1.5 M Tris-Cl, pH 8.8	2.5 ml
H ₂ O	4.0 ml
SDS 10 %	100 μ l
Persulfato de amonio (PSA) al 10 %	30 μ l
TEMED	10 μ l
Volumen final	10 ml

Se preparó el gel de apilamiento de acuerdo con la tabla 3 y se dejó polimerizar por 15 min.

Tabla 3. Soluciones para preparar el gel de apilamiento (Manss, 2011).

Soluciones	5 ml
Acrilamida 40 %	630 μ l
1.0 M Tris-Cl, pH 6.8	630 μ l
H ₂ O	3.64 ml
10 % SDS	50 μ l
10 % Persulfato de amonio (PSA) al 10%	50 μ l
TEMED	5 μ l

2. 1 Preparación de la muestra de proteínas para electroforesis SDS-PAGE

Se utilizó el marcador de peso molecular SeeBlue™Plus y como control del proceso se empleó albúmina sérica bovina (BSA). Para preparar la muestra se tomaron 10 µl de amortiguador Laemmli 6X y 50 µl de muestra, el marcador de peso molecular (MPM) se preparó con 8.5 µl de amortiguador Laemmli 6X (equivalente a 4.25 µg de proteína), 10 µl de MPM y 30 µl de agua destilada, se colocó 1 µl de BSA (2 mg/ml), 8.5 µl de amortiguador Laemmli 6X y 40.5 µl de agua destilada. Se cargó 25 µl de cada muestra, el MPM y BSA.

3. Separación de proteínas

El SDS es un detergente aniónico, su estructura química compuesta por una cadena hidrofílica sulfato polar y una cabeza hidrofóbica compuesta por 12 carbonos, el grupo alquilo de un extremo de la cadena se une a los residuos de aminoácidos de la proteína de carga positiva y los grupos sulfatos se unen a sus residuos hidrofóbicos, en la figura 3 se observa su estructura (Jafari *et al.*, 2018). La carga iónica rompe las interacciones proteína-proteína, los complejos SDS-proteína permite la repulsión electrostática entre proteínas. El SDS provoca la desnaturalización de estructuras terciarias y la reducción de moléculas plegadas a moléculas lineales, además de conferirles una carga negativa, por lo que la separación en la electroforesis SDS-PAGE se realiza por su tamaño. El SDS se une aproximadamente 1.4 g por g de proteína (Rabilloud, 1996; Kumar, 2018).

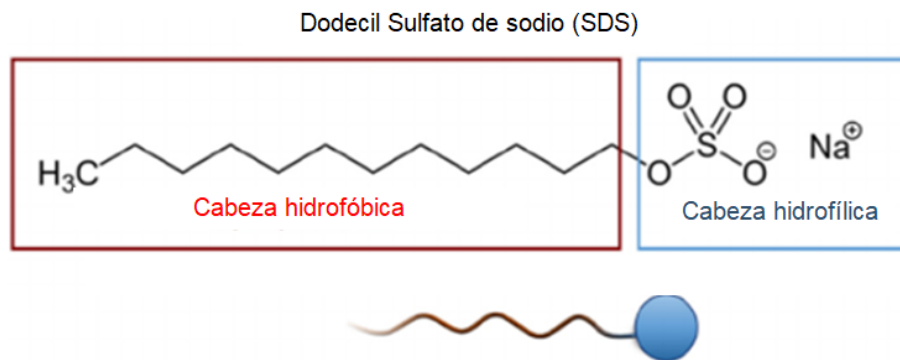


Figura 3. Estructura química del SDS (Basado en Wolowicz y Staszak, 2019).

Para la separación de proteínas se aplicó una corriente constante de 120 V hasta que el colorante azul de bromofenol corre al fondo del gel (Gallagher, 2012).

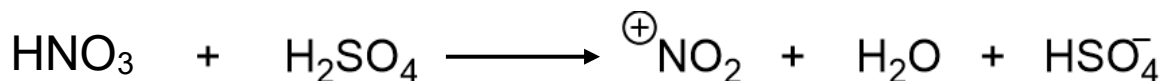
4. Transferencia

Para la transferencia de proteínas se utilizan dos tipos de membrana, cada una con características diferentes que proporcionan una transferencia eficiente.

Membrana de nitrocelulosa

La membrana de nitrocelulosa está conformada por residuos de glucosa unidos mediante un enlace glicosídico β -1,4 (Mattar *et al.*, 2020).

Su estructura compuesta principalmente de celulosa pasará por un proceso llamado nitración. Al reaccionar las moléculas de HNO_3 y H_2SO_4 darán como producto final, ion nitronio, agua y sulfato de hidrógeno (Morris *et al.*, 2023), como se muestra en la siguiente ecuación:



El ion nitronio se unirá mediante el proceso de nitración. Las moléculas del ion nitronio se unirán a los carbonos 2, 3 y 6 de la celulosa para formar la nitrocelulosa (Morris *et al.*, 2023), como se muestra en la figura 4:

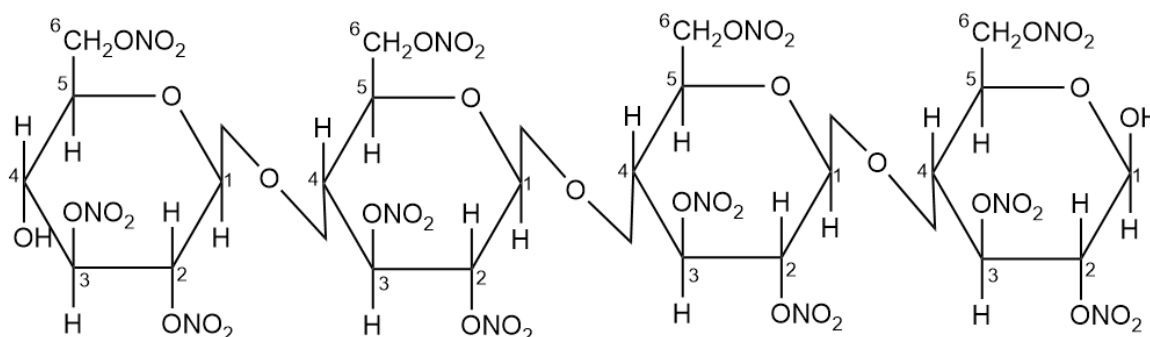


Figura 4: Estructura de la celulosa y nitrocelulosa, unida mediante un enlace β (1,4) (Tomado de Mattar *et al.*, 2020).

La unión a la membrana de nitrocelulosa se debe principalmente a interacciones hidrofóbicas de las proteínas a la membrana (Abeyrathne y Lam, 2007).

Membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF)

La membrana de fluoruro de polivinilideno pertenece a la familia de los fluoropolímeros, conocido también como poli(1,1-difluoroetileno), con estructura química repetitiva $\text{CH}_2\text{-CF}_2$ (Figura 5). Es altamente no reactiva, químicamente estable, resistente a solventes y detergentes, por lo que se utiliza en biología molecular para la transferencia de proteínas (Saxena y Shukla, 2021). La unión de proteínas durante la transferencia se realiza mediante interacciones hidrofóbicas, al igual que la membrana de nitrocelulosa.

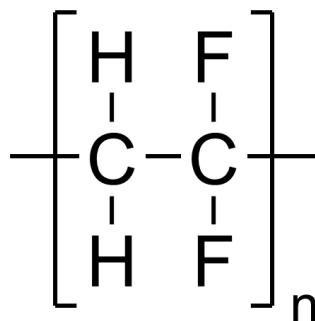


Figura 5. Estructura de la membrana de fluoruro de polivinilideno PVDF (Tomado de Saxena y Shukla, 2021).

Se equilibra el gel SDS-PAGE durante 1 h con amortiguador de transferencia. La membrana de fluoruro de polivinilideno se incuba con metanol por 2 min y con amortiguador de transferencia junto con el papel filtro que se utiliza durante la transferencia y se coloca en el equipo.

Se coloca en el equipo Semi-Dry Trans-blot (BIORAD) el papel filtro, la membrana y el gel siguiendo el orden de la figura 6.

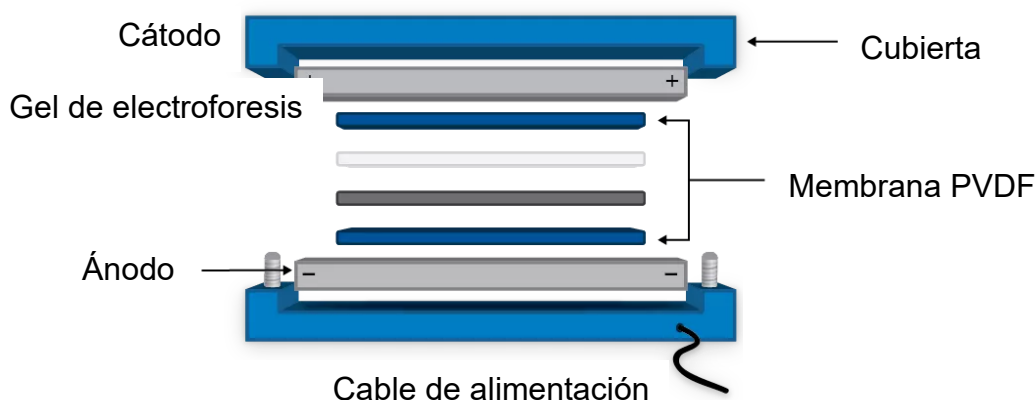


Figura 6. Sándwich para transferencia Western Blot semiseco (Tamara, 2024).

El gel se incuba con Azul de Coomassie durante toda la noche para comprobar si las proteínas se transfirieron correctamente a la membrana durante toda la noche.

5. Detección de proteínas

Para visualizar las proteínas, se colocó la membrana en Rojo de Ponceau durante 10 min con movimiento y se lavó con agua destilada, después se incubó con solución de bloqueo (Anexo 1) durante 1 h y posteriormente se incubó a 4 °C con anticuerpo primario anti-β-gal durante toda la noche. Se realizan 3 lavados de solución salina fosfatada (PBS) al 1 % (Anexo 1) y se incuba con anticuerpo secundario HRP-anti-ratón por 1 h y se lava con PBS 1X (Gallagher *et al.*, 2008).

6. Visualización

Para la documentación de la expresión de β -gal, la membrana se expuso a una placa radiográfica, para ello primero se incubó en solución de revelado por 5 min seguido de una incubación en solución de fijado por 1 min, se enjuagó y dejó secar al aire (Gallagher *et al.*, 2008).

Resultados

En las figuras 6, 7, 8 y 9, se muestran las bandas de ADN plasmídico de las bacterias *E. coli*, el cual se obtuvo con extracción por lisis alcalina de 6 colonias bacterias transformadas con los plásmidos pQFj15, pQF50, AL140 y AL151. Las bacterias que mostraron mayor abundancia se resaltan en negro, estas bacterias se conservaron en glicerol al 20 % a -70 °C para su posterior análisis.

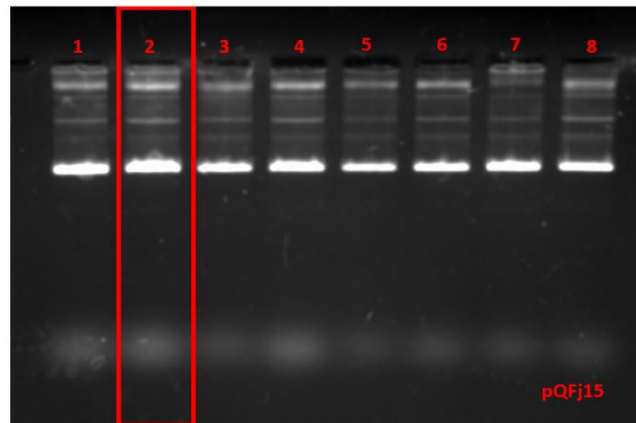


Figura 6. Plásmido pQFj15. Gel de agarosa al 1 %. Se prepararon 15 μ l de la extracción de plásmido con 5 μ l de amortiguador de carga en cada pozo. Se aplicó un voltaje de 60 V durante 60 min.

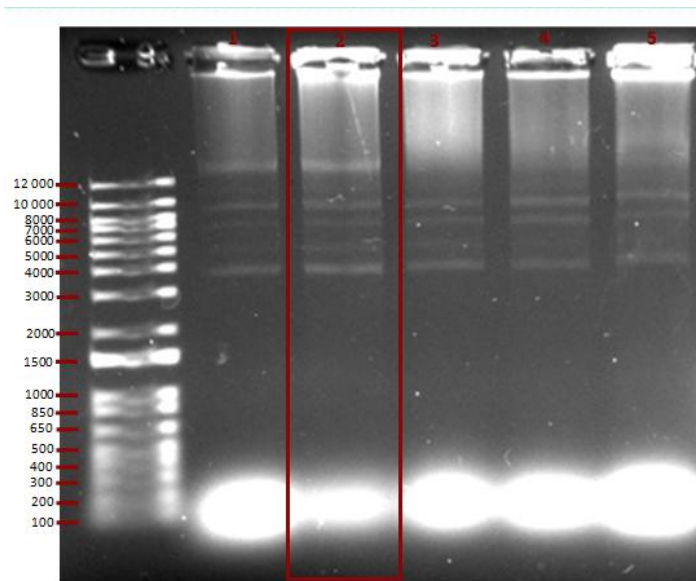


Figura 7. Plásmido AL140. Gel de agarosa al 1 %. Se prepararon 15 μ l de la extracción de plásmido con 5 μ l de amortiguador de carga en cada pozo. Se aplicó un voltaje de 60 V durante 60 min.

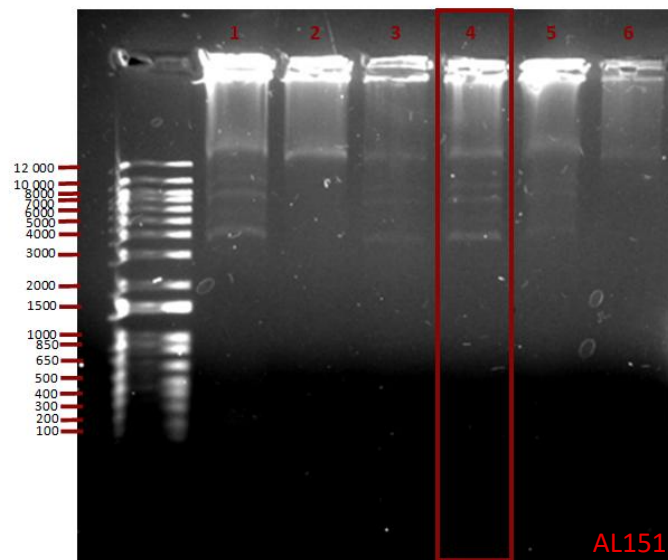


Figura 8. Plásmido AL151. Gel de agarosa al 0.6 %, Se prepararon 15 μ l de la extracción de plásmido con 5 μ l de amortiguador de carga en cada pozo. Se aplicó un voltaje de 60 V durante 60 min.

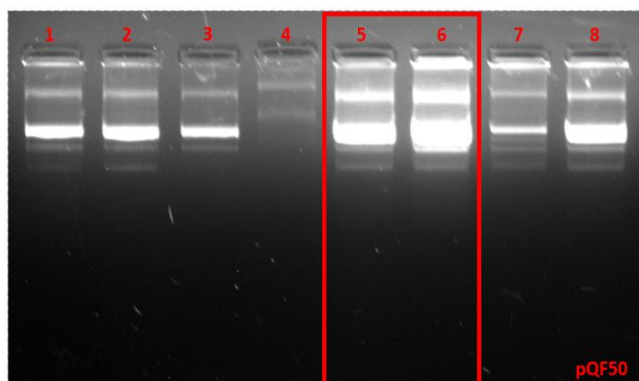


Figura 9. Plásmido pQF50. Gel de agarosa al 0.6 %. Se prepararon 15 μ l de la extracción de plásmido con 5 μ l de amortiguador de carga en cada pozo. Se aplicó un voltaje de 60 V durante 60 min.

Resultados de la electroforesis SDS-PAGE

Tras la extracción de proteínas de cada cepa bacteriana se realizó la separación de proteínas en SDS-PAGE como se muestra en la Figura 10.

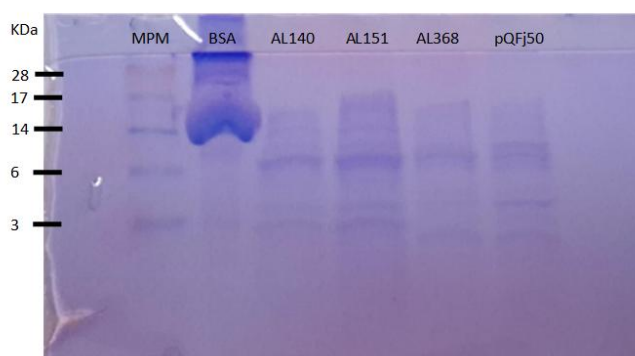


Figura 10. Gel SDS-PAGE al 10 % teñido con azul de Coomassie. Línea 1.- Marcador de peso molecular (MPM) equivalente a 4.25 μ g de proteína. Línea 2. BSA 2 mg. Líneas 3 – 6. 25 μ l de cada extracción de cepas AL140, AL151, AL368, y *E coli*_pQF50. La electroforesis se realizó durante la noche a 25 V.

Análisis de resultados

Las bacterias *E. coli* resistentes al antibiótico registraron crecimiento abundante en una concentración media de antibiótico. Se recuperaron las cepas con plásmidos, AL140 y AL151 y se conservaron a -70 °C.

Las proteínas se separaron de manera adecuada durante la electroforesis y se visualizaron correctamente con azul de Coomassie.

Conclusiones

El cultivo de las bacterias transformadas y seleccionadas por resistencia a antibióticos permitió identificar aquellas bacterias que expresan la resistencia a los antibióticos en concentraciones ascendentes. Se recuperó el ADN plasmídico de las bacterias transformadas AL140, AL151 y los plásmidos pQFj15 y pQF50, que serán empleados para evaluar la producción de β -gal por inducción por estos plásmidos por la técnica de Western Blot.

A pesar de obtener una buena resolución de las proteínas, puede haber factores que permitan que las proteínas no se separen adecuadamente durante la electroforesis, por lo tanto, se continuará la evaluación de las proteínas expresadas con la técnica de Western Blot.

Bibliografía

1. Backhouse, J. L., & Nesteroff, S. I. (2001). *Treponema pallidum* western blot: comparison with the FTA-ABS test as a confirmatory test for syphilis. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 39(1), 9–14.
2. Abeyrathne P.D., & Lam J.S. (2007). Conditions that allow for effective transfer of membrane proteins onto nitrocellulose membrane in Western blots. *NRC Canadá*. 53;526-532.
3. DeCaprio, J., & Kohl, T. O. (2017). *Detergent Lysis of Tissue Culture Cells for Immunoprecipitation*. *Cold Spring Harbor protocols*, 2017(12).
4. Fanglian H. (2011). *Plasmid DNA extraction from E. coli* using the alkaline lysis method. *Bio-protocol*. 1, 1-3.
5. Fawcett, P. T., Rosé, C. D., Gibney, K. M., & Doughty, R. A. (1998). Comparison of immunodot and western blot assays for diagnosing Lyme borreliosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5(4), 503–506.
6. García, H. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *UNIV DIAG*. 1(2), 31-41.
7. Gallagher, S.R. (2012). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 6, 7.3.1-7.3.28.
8. Jacob, F., & Monod, J. (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*, 3, 318–356.
9. Jafari, M., Mehrnejad, F., Rahimi, F., & Asghari, S. M. (2018). The Molecular Basis of the Sodium Dodecyl Sulfate Effect on Human Ubiquitin Structure: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Scientific reports*, 8(1), 2150.
10. Kaur, M., Sood, A., Chauhan, G., & Reena, G. (2023). β -galactosidase: A Potential Biotechnological Enzyme. *Trends in Carbohydrate Research* 14, 26-39.
11. Kumar G. (2018). Principle and Method of Silver Staining of Proteins Separated by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods in molecular biology*, 1853, 231–236.
12. Li, L., Jia, F., Li, Y., & Peng, Y. (2024). Design strategies and biological applications of β -galactosidase fluorescent sensor in ovarian cancer research and beyond. *RSC advances*, 14(5), 3010–3023.
13. Lapadula, E. (2018). The use of Western Blot techniques to detect β -galactosidase protein from two different strains of *Escherichia coli*. Tesis de Maestría, Ryerson University.
14. Manns, J. (2011). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins. *Current Protocols in Microbiology*, 22(1), A.3M.1-A.3M.13.
15. Mattar H., Baz Z., Saleh A., Shalaby A.S.A., Elsayed-Azzazy. A., Salah H., & Ismail I. (2020). Nitrocellulose: Structure, Synthesis, Characterization, and Applications. *Water, Energy, Food and Environment Journal*, (15);1-15.

16. Meftahi, G., Bahari, Z., Zarei M., Iman, M., & Jangravi, Z. (2021). Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochemistry and molecular biology education*, 49(4), 509–517.
17. Montalvo-Navarro, C. A., & Lugo-Flores, M. A. (2019). Electroforesis: fundamentos, avances y aplicaciones. *EPISTEMUS*, 13(26), 48–54.
18. Morris E., Pulham C.R., & Morrison C. A. (2023). Structure and properties of nitrocellulose: approaching 200 years of research. *RSC Advances*, 13, 32321-32333.
19. Moritz, C. (2020). 40 years Western blotting: A scientific birthday toast. *Journal of proteomics*, 212, 103575.
20. Noble, J., & Bailey M. (2009). Quantification of protein. *Methods in enzymology*, 463, 73-95.
21. Pérez, M., Soriano, J., Ponce, E., & Díaz L. (2015). Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Revisión. *NACAMEH*, 9(2), 77-96.
22. Pothur, R. (2012). Introduction to protein electrophoresis. En B. T. Kurien & R. H. Scofield (Eds.), *Protein gel detection and Imaging: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 1853, (pp. 231-236). Springer.
23. Rabilloud, T. (1996). Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. *Electrophoresis*, 17(5), 813–829.
24. Rouwenhorst, R. J., Pronk, J. T., & van Dijken, J. P. (1989). The discovery of beta-galactosidase. *Trends in biochemical sciences* 14(10), 416–418.
25. Sanchez, J., & Hardisson, C. (1979). *Induction of beta-galactosidase in Streptomyces violaceus*. *Canadian Journal of Microbiology*, 25(7), 833–840.
26. Sander, H., Wallace, S., Plouse, R., Tiwari, S., & Gomes, A. V. (2019). Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization. *Analytical Biochemistry*, 575, 44–53.
27. Saxena, P., & Shukla, P. (2021). A comprehensive review on fundamental properties and applications of poly(vinylidene fluoride) (PVDF). *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 4, 8-26.
28. Sule, R., Rivera, G., & Gomes, A. V. (2023). Western blotting (immunoblotting): History, theory, uses, protocol and problems. *BioTechniques*, 75(3), 99–114.
29. Son, M.S., & Taylor, R.K. (2012). Growth and maintenance of *Escherichia coli* laboratory strains. En *Current protocols in microbiology*, Capítulo 5, 5A.4.1-5A.4.9. John Wiley & Sons, Inc.
30. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*, 150(1), 76–85.

31. Tamara. (2024). *When to use Wet, semi-dry and dry transfer for Western blots*. *ASU Research*. <https://azurebiosystems.com/blog/western-blot-transfer-methods/>
32. Walker, J.M. (1994). The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation. En *Methods in Molecular Biology*, (Vol.32, pp. 5-8). Humana Press.
33. Wolowicz, A., & Staszak, K. (2019). Study of surface properties of aqueous solutions of sodium dodecyl sulfate in the presence of hydrochloric acid and heavy metal ions. *Journal of Molecular Liquids*, 299, 112-170.

Anexo 1. Preparación de Soluciones y Reactivos

Preparación del antibiótico kanamicina, estreptomicina y ampicilina a una concentración de 100 mg/ml

- 1.- Pesar 1 g de antibiótico
- 2.- Disolver en 5 ml de agua destilada
- 3.- Aforar a 10 ml
- 4.- Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C

Soluciones para la extracción de ADN plasmídico

Solución I.

- 1.- Disolver 0.45039 g de glucosa en 10 ml de agua destilada
- 2.- Agregar 1.25 ml de Tris 1 M
- 3.- Agregar 1 ml de EDTA 0.5 M
- 4.- Aforar a 50 ml

Solución II.

- 1.- Agregar 1 ml de NaOH 0.4 N
- 2.- Agregar 100 µl de SDS al 20 %
- 3.- Aforar a 2 ml con agua destilada

Solución III.

- 1.- Agregar 30 ml de acetato de potasio
- 2.- Agregar 5.75 ml de ácido acético
- 3.- Aforar a 50 ml

Gel de agarosa al 1 %

- 1.- Pesar 0.45 g de agarosa y disolver en 45 ml de TAE 1X
- 2.- Calentar en intervalos de 15 s en microondas hasta disolver por completo
- 3.- Agregar 4.5 µl de EtBr
- 4.- Verter en el molde para geles de la cámara de electroforesis y esperar 30 min a que gelifique.

Solución de Rojo de Ponceau

- 1.- Disolver 0.5 g de Rojo de Ponceau en 50 ml de agua destilada
- 2.- Agregar 1 % de ácido acético
- 3.- Agregar 5 % de ácido tricloroacético
- 4.- Aforar a 100 ml

Solución de Azul de Coomassie

- 1.- Disolver 0.25 g de Azul brillante G-250 en 50 ml de metanol
- 2.- Agregar 10 ml de ácido acético
- 3.- Aforar a 100 ml con agua destilada.

Amortiguador Laemmli 5X

- 1.- Agregar 1 ml de azul de bromofenol al 1%
- 2.- Agregar 4 ml de Tris-Cl (1.5 M, pH 6.8)
- 3.- Agregar 10 ml de glicerol
- 4.- Agregar 2 g de SDS
- 5.- Mantener a temperatura ambiente.

Azul de bromofenol al 1 %

- 1.- Disolver 100 mg de azul de bromofenol en 7 ml de agua destilada
- 2.- Aforar a 10 ml
- 3.- Almacenar a temperatura ambiente

PBS 1X pH 7.4

- 1.- En 300 ml de agua destilada disolver 8 g de NaCl
- 2.- Agregar 0.2 g de KCl
- 3.- Agregar 0.24 g de KH_2PO_4
- 4.- Agregar 1.44 g de Na_2HPO_4
- 5.- Ajustará el pH a 7.4
- 6.- Aforar a 1 L
- 7.- Esterilizar por vapor húmedo a 15 psi. 15 min.

RIPA 1X

50 mM de Tris-HCl 1 M, 150 mM de NaCl 5 M, 1% Tritón X-100 y 10 mM de EDTA 500 mM. Aforar a 10 ml con agua destilada.

Amortiguador de electroforesis SDS-PAGE 10X

- 1.- Disolver 30 g de Tris, 144 g de glicina y 10 g de SDS en 800 ml de agua destilada.
- 2.-Aforar a 1 l.

Amortiguador de electroforesis SDS-PAGE 1X

En 800 ml de agua destilada disolver 100 ml de amortiguador para electroforesis SDS-PAGE 10X

- 2.- Ajustar pH 8.3
- 3.- Aforar a 1 l.

Acrilamida/bisacrilamida 40%

- 1.- En 70 ml de agua destilada disolver 40 g de acrilamida
- 2.- Agregar 1.067 g de N,N'-metilenbisacrilamida.
- 3.- Aforar a 100 ml
- 4.- Almacenar a 4 °C en frasco ámbar.

Solución de persulfato de amonio

- 1.- En 5 ml de agua destilada disolver 1 g de persulfato de amonio
- 2.- Aforar a 10 ml
- 3.- Almacenar en tubos de 1.5 ml a 4 °C.

Amortiguador de transferencia (1 l)

- 1.- En 400 ml de agua destilada agregar 3.03 g de Tris
- 2.- Agregar 14.4 g de glicina
- 3.- Agregar 30 ml de metanol
- 4.- Aforar a 1 l.

Solución de lavado (1 l)

- 1.- En 450 ml de agua destilada agregar 100 ml de ácido acético
- 2.- Agregar 450 ml de metano

Solución fijadora (1 l)

- 1.- Agregar 100 ml de ácido acético
- 2.- Agregar 400 ml de metanol
- 3.- Agregar 500 μ L de formaldehído 37 %
- 4.- Aforar con agua destilada a 1 l

Solución de bloqueo

En 50 ml de PBS disolver 2.5 g de leche descremada (5 %)

Solución de bloqueo con anticuerpo primario anti- β -galactosidasa.

En 1 ml de solución de bloqueo agregar 1 μ l de anticuerpo primario.

Solución de bloqueo con anticuerpo secundario HRP-anti-ratón

En 1 ml de solución de bloqueo agregar 1 μ l de anticuerpo secundario.

.

Anexo 2. Cronograma de actividades

Actividad	Mes 1	Mes 2	Mes 3	Mes 4	Mes 5	Mes 6
Búsqueda bibliográfica y diseño del protocolo.	x					
Preparación del medio de cultivo.	x					
Cultivo de <i>E. coli</i> transformada.	x	X	x			
Verificación de construcciones plasmídicas.		x	X	X	X	
		x	x	x	X	
Analizar la expresión de β -gal con la técnica de Western Blot.					X	x
Interpretación de resultados					X	x
Redacción y corrección del proyecto.					X	x
Entrega del proyecto.						x

