



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología
Unidad Valle de las Palmas



**Diseño de un Vector de Expresión para la Proteína Neuraminidasa de
Influenza A (H7N9) en *Bacillus subtilis***

Tesis que para obtener el grado de

BIOINGENIERO

PRESENTA

SANDRA KAREN MEDINA BRAVO

Codirectores de Tesis

Dr. Antonio De León Rodríguez

Mtra. Adriana Álvarez Andrade

Tijuana, B.C.

Octubre de 2019

Créditos Institucionales

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Antonio De León Rodríguez y la supervisión del Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández en el laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) bajo el expediente No. 12374

Acta de Examen

Dedicatoria

Para Felicia

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. (IPICYT), por permitirme realizar este proyecto de investigación dentro de sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado.

A mi codirectora de tesis, la Maestra Adriana Álvarez Andrade por aceptar la dirección de este trabajo ante la Facultad de Ciencias de la Ingeniería y Tecnología de la Universidad Autónoma de Baja California, así como a mi comité tutorial conformado por el Doctor Luis Jesús Villareal Gómez, Doctor Juan Miguel Colores Vargas y a la Maestra Lizeth Pérez González por la ayuda a darle estructura y continuidad a mi trabajo.

A mi codirector de tesis, el Dr. Antonio de León Rodríguez, por permitirme participar en su proyecto, las facilidades prestadas para el desarrollo del mismo y hacerme parte de su equipo de trabajo.

Al Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández, por el apoyo técnico en la realización del proyecto y todos los compañeros de laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

Al M. en C. Cristhian Francisco Sáñez Robledo por todo el apoyo desde el inicio hasta el final de este trabajo y la terminación de mi carrera, gracias.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	XI
Resumen	1
Abstract.....	2
1. Introducción.	3
2. Antecedentes	4
2.1 Virus de la Influenza.....	4
2.2 Subtipos del virus.....	4
2.3 Estructura y mecanismo del virus de la Influenza.	5
2.4 Influenza aviar	7
2.4.1 Influenza aviar A (H7N9)Influenza aviar A (H7N9)	8
2.5 Desarrollo de vacunas para influenza.	9
2.6 Vectores plasmídicos como herramienta de ingeniería genética	9
2.6.1 Características de los vectores plasmídicos	9
2.7 Bacterias utilizadas como organismos de expresión.....	10
2.7.1 Bacterias utilizadas en la producción de proteínas recombinantes	11
2.8 <i>Bacillus subtilis</i> como modelo de expresión.....	11
2.8.1 2.8.1 Vías de secreción.....	12
2.8.2 2.8.2 Vías de secreción TAT	13
3. Objetivos	15
3.1 3.1Objetivos específicos	15
4. Metodología	15

4.1	Material biológico.....	15
4.1.1	Cepas	15
4.1.2	Proteínas utilizadas.....	16
4.1.3	Vectores de expresión y plásmidos.	17
4.1.4	Oligonucleótidos.....	17
4.2	Construcción de vector replicativo	18
4.3	Construcción de vectores de expresión para la producción de NA en <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i>	21
4.4	Métodos analíticos.	22
4.4.1	Cinéticas de producción en ensayos a nivel matraz.	22
4.4.2	Evaluación de inmunodetección de extractos celulares con anticuerpos específicos.	23
4.5	Resultados y Comprobación de la inserción de la proteína GFP en vector replicativo..	22
3	4.5.1 Comprobación de fluorescencia en el vector replicativo con GFP	24
4.6	Integración de la proteína NA en vector replicativo.....	226
4.7	Comprobación del vector replicativo con el inserto NA en cepas de <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i>	26
4.8	Cinéticas de crecimiento de cepas <i>B subtilis</i> y <i>E. coli</i> transformadas con los vectores pMK- GFP y pMK-NA	28
5.	Conclusiones	23
6.	Bibliografía.....	29
7.	ANEXOS	36

Lista de Figuras

Figura 2.1. Virión de la influenza (Recuperado de Horimoto y Kawaoka, 2005).	5
Figura 2.2. Acción inicial de NA en el tracto respiratorio (Recuperado de Wohlbold y Krammer, 2014).	7
Figura 2.3. Vías de secreción de proteínas (Recuperado de Broedel y Papciak, 2007).	13
Figura 2.4. Vías de secreción en <i>Bacillus subtilis</i> (Recuperado de Tjalsma et al, 2004).	14
Figura 4.1. Mapa Lineal plásmido pAKG (Recuperado de Gutiérrez- García, 2015).	18
Figura 4.2. Diseño de vectores de trabajo pMK-GFP y pMK-NA.....	19
Figura 4.3. Vector final pMK NA para la producción de Neuraminidasa.....	21
Figura 5.1. Comprobación del inserto GFP por PCR y corte con enzimas de restricción. ..	24
Figura 5.2. Comprobación de Fluorescencia en cepas Transformadas con vector pMK-GFP.	25
Figura 5.3. Integración del inserto de Neuraminidasa en el vector replicativo pMK-NA. ...	26
Figura 5.4. Comprobación del inserto NA por enzimas de restricción y amplificación por PCR.....	27
Figura 5.5. Cinéticas de crecimiento en cepas Trasformadas de <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i>	28
Figura 5.6. Inmunodetección de la proteína GFP en cepas Trasformadas de <i>B. subtilis</i>	29
Figura 8.1. Condiciones de termociclado de PCR para amplificación de inserto TET.	49
Figura 8.2. Condiciones de termociclado de PCR para amplificación de inserto GFP.	50
Figura 8.3. Condiciones de termociclado de PCR para amplificación de inserto NA.	51

Lista de Tablas

Tabla 2.1. Características de los vectores plasmídicos.....	10
Tabla 4.1. Características genotípicas de las cepas utilizadas en este estudio.	16
Tabla 4.2. Genes clonados en vectores de expresión.	16
Tabla 4.3. Plásmidos utilizados.	17
Tabla 4.4. Secuencia de oligonucleótidos.	17
Tabla 4.5. Antibióticos de selección para cepas y construcciones utilizadas para cinética de producción.	22
Tabla 4.6. Secuencia de Oligonucleótidos para inserto NA.	22
Tabla 8.1. Medio LB.	36
Tabla 8.2. Medio LBON.....	36
Tabla 8.3. Antibióticos de selección para cepas.....	36
Tabla 8.4. Antibióticos de selección para construcciones.....	37
Tabla 8.5. Concentración de Antibióticos en el medio.	38
Tabla 8.6. Soluciones para preparación Gel de Agarosa TAE 50X.	38
Tabla 8.7. Gel de Agarosa al 1%.	38
Tabla 8.8. Solución para preparación de células competentes – R1.....	39
Tabla 8.9. Solución para preparación de células competentes – R2.....	39
Tabla 8.10. Soluciones para Trasformación de cepas de B. subtilis - Medio A base 10X... 39	39
Tabla 8.11. Soluciones para Trasformación de cepas de B. subtilis - Medio Sales 10X.	40
Tabla 8.12. Soluciones para Trasformación de cepas de B. subtilis - Medio A.....	40
Tabla 8.13. Soluciones para Trasformación de cepas de B. subtilis - Medio B.....	40
Tabla 8.14. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de bacterias gram positivas - Solución de lisozima.....	40
Tabla 8.15. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de bacterias gram positivas - Solución Lisis I.	41
Tabla 8.16. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de bacterias gram positivas - Solución Lisis II.....	41
Tabla 8.17. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de bacterias gram positivas - Solución Lisis III*.	41

Tabla 8.18. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina para bacterias gram negativas - Solución I.	41
Tabla 8.19. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina para bacterias gram negativas - Solución II.	42
Tabla 8.20. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina para bacterias gram negativas - Solución III *.	42
Tabla 8.21. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Soluciones stock:	42
Tabla 8.22. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Buffer de transferencia:	42
Tabla 8.23. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Solución de fijación.	43
Tabla 8.24. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Solución de teñido.	43
Tabla 8.25. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Solución de desteñido.	43
Tabla 8.26. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Solución de bloqueo.	43
Tabla 8.27. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Buffer III.	43
Tabla 8.29. Solución para reacción de PCR	48

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Ampicilina
AMPr	Gen de resistencia a Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CDC	Centros para el control y prevención de enfermedades (Centers for Disease Control and Prevention por sus siglas en inglés)
CMR	Cloranfenicol
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GFP	Proteína verde fluorescente (Green fluorescent protein por sus siglas en inglés)
h	Horas
HA	Hemaglutinina
KAN	Kanamicina
KANr	Gen de resistencia a Kanamicina
L	Litro
LB	Luria Bertani
LBMB	Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular
M	Molar
M2	Proteína de matriz
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar

NA	Neuraminidasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
r.p.m.	Revoluciones por minuto
SEC	Vía de secreción SEC
SRP	Partícula de reconocimiento de la señal
SP-TAT	Vía de secreción doble de arginina
TET	Tetraciclina
TETr	Gen de resistencia a Tetraciclina
µg	Microgramo
µL	Microlitro

Resumen

El virus de la influenza provoca una enfermedad infecciosa que comúnmente afecta a aves y mamíferos. Actualmente se ha reportado una nueva cepa denominada “virus de la influenza A (H7N9)” que ha sido encontrada principalmente en aves silvestres, las cuales son capaces de transmitir el virus a aves domésticas y humanos. La influenza aviar forma parte de un subgrupo de virus de influenza normalmente encontrados en las aves; sin embargo, se ha reportado su contagio a humanos, lo cual puede desencadenar una nueva pandemia. Esto exige desarrollar nuevas alternativas para producir vacunas para la inmunización, así como para evitar el contagio en humanos y la replicación del virus. Estudios recientes muestran que la producción de proteínas recombinantes en vectores de expresión bacterianos es una estrategia viable para dicho propósito.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar y evaluar un sistema de expresión para la proteína recombinante Neuraminidasa (NA) del virus de influenza A (H7N9) en *Bacillus subtilis*. Este vector de expresión se encuentra bajo el control del promotor del fago T7; además, cuenta con un gen codificante para un péptido señal perteneciente a la vía de secreción TAT (SP-TAT). La funcionalidad del sistema de expresión se evaluó mediante microscopía de fluorescencia, utilizando el gen reportero de la proteína verde fluorescente, corroborando con amplificación de PCR la existencia del inserto de la proteína en el vector. Para evaluar la expresión y secreción de la proteína se realizó un análisis de Western blot.

Una vez comprobada la expresión correcta se insertó nuestra proteína de interés, NA, clonando el vector en células de *B. subtilis* y *E. coli*. Una vez comprobados los insertos y el vector integrativo en dichas cepas se realizaron cinéticas de crecimiento comprobando la funcionalidad del vector. Los datos obtenidos muestran que el crecimiento de las cepas transformadas con el vector de interés en *B. subtilis* tiene un rendimiento menor a las cepas transformadas de *E. coli*. Por lo que podría ser viable su uso para la expresión de las proteínas si se optimiza el vector utilizado y la cepa de interés cuenta con un tiempo de crecimiento estable al momento de la expresión, en comparación con *E. coli*. Posicionando a *B. subtilis* como un sistema de expresión secundario a *E. coli*.

Abstract

The influenza virus causes an infectious disease that commonly affects birds and mammals. Currently, there has been reported a new strain called “influenza virus A (H7N9)” that has been found mainly in wild birds, which are able to transmit the virus to domestic birds and humans. Avian influenza is part of a subgroup of influenza virus usually found in birds, however, it has been reported its spread to humans, which may trigger the next influenza pandemic. This requires developing new alternatives to produce vaccines for immunization, as well as to avoid human infection and virus replication. Recent studies show that the production of recombinant proteins in bacterial expression vectors is a viable strategy for that purpose.

The objective of this work is to develop and evaluate an expression system for recombinant protein neuraminidase (NA) of influenza A (H7N9) using the bacterium *Bacillus subtilis*, given that they have been few reports of its use as an expression vector. This bacterial vector has a replicative capacity under the control of phage T7, also has a codifying gene of signal peptide located in the TAT secretion pathway (SP-TAT). The functionality of the expression system was evaluated by fluorescence microscopy using the reporter green fluorescent protein (GFP) gene, corroborating with PCR amplification the existence of the insert in the vector. To evaluate the protein secretion analysis was made by Western blot method.

Once the correct expression was verified, our protein of interest, NA, was inserted, cloning in the vector into *B. subtilis* and *E. coli* cells. Once the inserts and the integrative vector were verified in these cells, the growth kinetics were performed, verifying the functionality of the vector. The data obtained show that the growth of the cells transformed with the vector of interest in *B. subtilis* has a lower performance than the transformed cells of *E. coli*. it might be to use for the expression of proteins could be viable if the vector used is optimized and the cells of interest has a stable growth time at the time of expression compared to *E. coli*. Positioning *B. subtilis* as a secondary expression system to *E. coli*

1. Introducción.

El virus de la influenza causa una de las principales enfermedades respiratorias presentes en el mundo. Al ser tan común, es altamente contagiosa debido a la fácil transmisión del virus entre mamíferos. Además, el virus de la influenza podría provocar pandemias debido a variaciones antigénicas. (Shao et al., 2017). El desarrollo de nuevos modelos de vacunas (OMS, 2019), y la producción adecuada de proteínas permite la producción en masa de productos de grado farmacéutico que son accesibles a la población en general (Palomares et al., 2004). Tradicionalmente las vacunas comerciales son producidas a partir de virus atenuados o inactivados por medio de procesos químicos o físicos (Dertzbaugh, 1998). Aunque estas técnicas son efectivas, pueden presentar desventajas o reacciones adversas como alergias, convulsiones, fiebre y otras afecciones (CDC, 2015).

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de un nuevo sistema de expresión de proteínas recombinantes del virus de influenza aviar A (H7N9) en bacterias Gram positivas, como *Bacillus subtilis*, ofreciendo así una nueva alternativa de producción a los sistemas ya realizados en el campo de la investigación de la generación de vacunas (Vinod, et al., 2015). El procedimiento básico de recombinación de genes consiste en extraer un fragmento de ADN de interés e insertarlo en pequeñas moléculas de ADN de replicación autónoma, tales como plásmidos bacterianos y sistemas de expresión. Éstos poseen la ventaja de requerir menor tiempo de crecimiento a bajo costo, comparado con otros sistemas utilizados (Wu et al., 1991).

En este trabajo, se utilizaron protocolos de biología molecular para la expresión de la proteína Neuraminidasa del virus de influenza aviar A (H7N9) desarrollando un sistema de expresión para bacterias *B. subtilis* y *E. coli*. Posteriormente se realizaron pruebas de funcionamiento del vector y expresión de proteínas identificados mediante ensayos de crecimiento bacteriano, ELISA, Western blot y fluorescencia. Los resultados obtenidos permiten asegurar una correcta expresión de la proteína de interés en el vector diseñado para las cepas de *B. subtilis*, determinando ser una opción viable para la producción vírica en grandes cantidades como la Neuraminidasa.

2. Antecedentes

2.1 Virus de la Influenza

La influenza es una enfermedad infecciosa común caracterizada por fiebre, dolores musculares, dolor de garganta, dolor de cabeza y fatiga. En algunos casos la influenza puede causar neumonía, otras complicaciones e incluso la muerte (CDC, 2019).

El virus se cataloga dentro de la familia *Orthomyxoviridae*, grupo de virus que se caracterizan por contener un genoma de ARN segmentado. De los tres subtipos del virus de influenza (A, B, y C), los dos primeros están relacionados con una morbilidad y mortalidad estacional significativa (OMS, 2016). La caracterización de los tres subtipos se basa en las variaciones antigénicas de la proteína de la matriz y la nucleoproteína del virus. El virus de la influenza A es comúnmente conocido en aves silvestres y en casos recientes se ha encontrado que puede tener la capacidad de infectar y causar enfermedad y muerte en aves de corral y mamíferos (Gao, R. et al., 2013). El virus de influenza B, identificado en 1940, solo afecta a humanos. Conforme avanza la infección, el huésped puede presentar infecciones respiratorias, náuseas, vómitos y convertirse en un riesgo de contagio poblacional. El cuidado de los síntomas y el tratamiento son pieza clave para no poner en riesgo la vida del huésped (Deraz et al., 2012 y Francis, T. 1940).

El virus de la influenza C, identificado en 1950, tiene un modo de infección poco común en la población humana, causando infección en el tracto respiratorio, pero sin poner en peligro al huésped (Katagiri, S. et al., 1983).

2.2 Subtipos del virus

La nomenclatura internacional aceptada para la clasificación del virus de la influenza utiliza los siguientes componentes: el tipo antigénico del virus: A, B, o C, el hospedero de origen (si el virus es de origen humano este se omite), el lugar de origen, el número de aislamiento, el año de aislamiento, y los subtipos de Neuraminidasa y Hemaglutinina presentes en el virus (OMS, 1980).

El genoma del virus de la influenza A y B se componen de ARN de cadena simple con polaridad negativa y de forma de esfera con un diámetro aproximado de 100 nm (Fujiyoshi, Inicial. et al., 1994). El ARN se encuentra en ocho piezas separadas, cada una con el código de una de las proteínas de virus. Las ocho piezas de ARN se empaquetan de una forma ordenada dentro de la partícula de virus (Fujii, Y. et al., 2003). El virus de la influenza A se divide en subtipos y se diferencian según la naturaleza antigénica y genética de sus glicoproteínas de superficie de las cuales han sido identificadas 18 hemagglutininas (HA) y 11 neuraminidasas (NA) (CHP, 2018).

2.3 Estructura y mecanismo del virus de la Influenza.

Las moléculas de ARN del virus de polaridad negativa se dividen en 8 segmentos asociados a varias proteínas, entre ellas una nucleoproteína y tres polimerasas (PA, PB1, y PB2) que constituyen el complejo enzimático viral y participan en la síntesis, replicación y transcripción del ARN. Este complejo de replicación está encerrado dentro de una membrana compuesta con una proteína de la matriz (M1) asociada a una bicapa lipídica, la cual a su vez contiene dos glicoproteínas virales: Hemagglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) (Fig. 2.1) (Horimoto, T. y Kawaoka, Y. 2005).

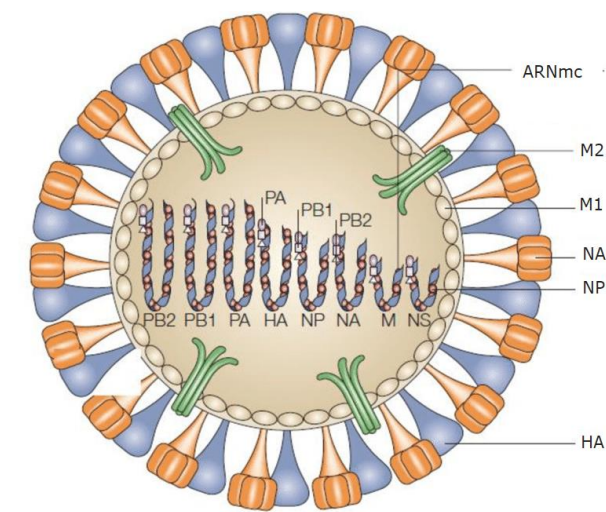


Figura 2.1. Virión de la influenza (Recuperado de Horimoto, T. y Kawaoka, Y. 2005).

Las dos principales glicoproteínas de la membrana del virus de la influenza son: Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA) los cuales reconocen a los receptores celulares que contienen α -2,6 o α -2-3- ácido siálico (SA) (Mitnaul et al., 1996). La Hemaglutinina (HA) es una glicoproteína transmembranal de tipo I, homotrímica, que posee la capacidad para aglutinar eritrocitos uniéndose a receptores específicos de ácido siálico. Esta proteína forma los picos o puntas que proporcionan el sitio de unión al receptor y provoca anticuerpos neutralizantes para así anclarse a la membrana celular del huésped y penetrar en la célula, tomar la maquinaria celular del huésped y empezar su reproducción desde el mismo (White et al., 1997). La proteína Neuraminidasa (NA) es una glicoproteína transmembranal que representa al 5% de las proteínas del virión, y está presente como un homotetrámero en la envoltura viral, con un orden de 200 moléculas. Su función es crítica para la liberación de las partículas de virus colaborando con la HA en el proceso de fusión y penetración celular, así como en la liberación y la propagación del virus (Da Silva, Inicial et al., 2013).

Estudios anteriores demuestran que la NA facilita la entrada del virus en las células ya que provoca la liberación del ácido N-acetilneuramínico, que es un constituyente de todas las mucinas de la superficie celular. Además de que la proteína NA ayuda en la infección temprana de las células (Matrosovich et al, 2004), juega un papel esencial en la liberación y la propagación de los viriones, siguiendo el ciclo de replicación viral intracelular. Durante la replicación del virus de influenza, como se muestra en la Figura 2.2, los viriones suelen ser atrapados al entrar en el tracto respiratorio por una capa protectora de mucina que contiene sitios receptores de ácido siálico. La NA se une a estos sitios y bloquea enzimáticamente a los receptores permitiendo que las partículas del virus penetren la capa de mucina para llegar al sistema respiratorio epitelial (Wohlbald, T. J. y Krammer, F. 2014).

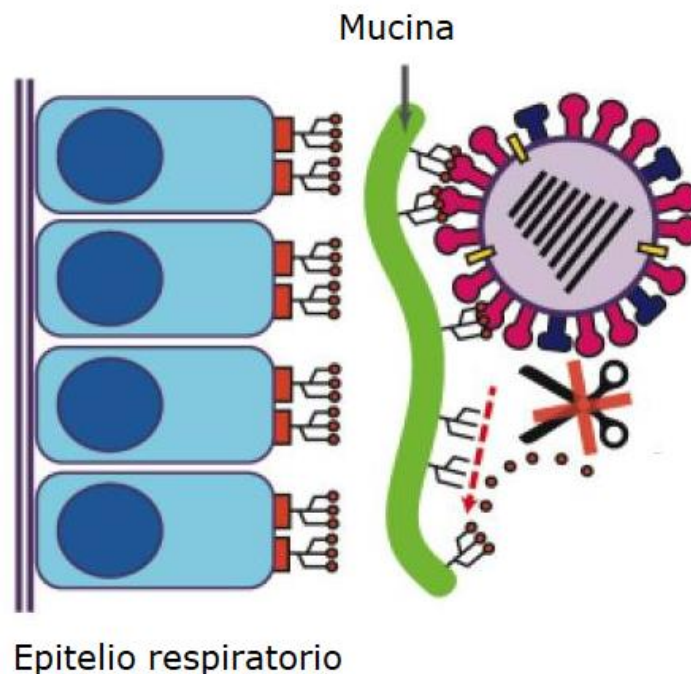


Figura 2.2. Acción inicial de NA en el tracto respiratorio (Recuperado de Wohlbold y Krammer, 2014).

Los viriones se replican y permanecen unidos a la célula infectada, mientras que los viriones vecinos permanecen unidos a la HA hasta que sean liberados por la NA que elimina el ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos celulares. Este proceso impide que el virus se ensamble a la superficie de la célula infectada y libera los viriones para infectar nuevas células y propagar la infección (Gamblin, S. J. y Skehel, J. J. 2010).

2.4 Influenza aviar

El virus de la influenza es muy dinámico y evoluciona continuamente, por ello existe una gran variedad de subtipos del virus que son transmisibles entre seres humanos y causan gripe común, muchos otros virus del tipo de influenza A son encontrados en aves y otras especies animales (OMS, 2013).

La influenza aviar es causada por los virus que afectan principalmente a aves silvestres y aves de corral, tales como pollos o patos. En años recientes se han reportado casos de humanos infectados por virus de influenza comúnmente encontrados en aves, debido a que

el virus ha adquirido la capacidad de saltar la barrera de la especie y propagarse fácilmente de persona a persona (Chen et al., 2013). Esto ha sido a través de la adaptación, mutación o adquisición de ciertos genes de virus humanos, lo que puede producir nuevas pandemias de Influenza (CDC, 2015).

Influenza aviar A (H7N9)

El virus de la influenza A (H7N9) forma parte de un subgrupo de virus de influenza que normalmente circulan entre las aves. Sin embargo, recientemente se ha reportado la aparición de graves epidemias humanas causadas por este virus, así como la aparición de brotes en el continente americano (Lee et al., 2017). Esto ha generado un esfuerzo en el desarrollo de nuevas alternativas para la producción de vacunas candidatas contra este virus. Los estudios más recientes muestran que la producción de proteínas recombinantes es una estrategia viable para dicho propósito (CDC, 2015).

El virus de influenza aviar A (H7N9) fue identificado por primera vez en marzo del 2013 en diferentes provincias de China (Chen et al., 2013). Desde marzo del 2013 a mayo 2016, las autoridades sanitarias de China han reportado más de 759 casos de infección en humanos de influenza aviar A (H7N9) (CPH, 2018). Se cree que la mayoría de los casos reportados de infecciones en humanos, han ocurrido después de la exposición a aves de corral infectadas o a ambientes contaminados.

La mayoría de los casos dan lugar a una infección clínica severa en la cual se puede presentar síntomas como: dificultades respiratorias, neumonía, tos, fiebre, shock séptico y fallo multiorgánico que derive en cuidados intensivos y ventilación mecánica (OMS, 2013).

Se han probado diferentes métodos de aislamiento del virus para pruebas de laboratorio con el fin de aislar las proteínas del virus A (H7N9) y obtener un método de vacunación capaz de inmunizar el virus directamente en humanos (Cheng et al., 2014).

2.5 Desarrollo de vacunas para influenza

Las vacunas generadas por ingeniería genética son producidas a partir de un patógeno que se modifica de forma selectiva con el fin de atenuar su replicación e infección, conservando su actividad inmunogénica. Para las vacunas de subunidades o subtipos, como la de la influenza, la secuencia del antígeno puede ser modificada o truncada para que no sea tóxica, conservando la mayor parte de los epítopes conformacionales necesarios para inducir anticuerpos neutralizantes (NIH, 2011).

2.6 Vectores plasmídicos como herramienta de ingeniería genética

Los plásmidos comúnmente utilizados se conocen como vectores y sirven como herramientas importantes en ingeniería genética y biotecnología (Lodish et al., 2000). Éstos son empleados para multiplicar o expresar genes de interés mediante la inserción de un gen en particular en un sitio de clonación múltiple (MCS), que es una región pequeña que cuenta con varios sitios de restricción y permiten la fácil inserción de fragmentos de ADN.

Las moléculas del vector con sus insertos se denominan ADN recombinante ya que consisten en nuevas combinaciones de ADN con genes de algún organismo. La mayoría de los sistemas de expresión se basan en un promotor inducible y la adición del inductor apropiado que conduce a la producción de una proteína heteróloga en la mayoría de los casos intracelularmente (Rosano y Ceccarelli, 2014). Los vectores se diseñan para una variedad de aplicaciones, incluyendo la clonación de ADN extraño y expresión de proteínas.

Características de los vectores plasmídicos

La combinación de características que integran un vector como su estructura, sitios de restricción, resistencia a antibióticos, capacidad de expresión y producción para proteínas de gran tamaño entre otras a menudo determinan su clasificación. A continuación, se presentan algunos tipos de vectores y sus características (Casali y Preston, 2003) (Tabla 1).

Tabla 2.1. Características de los vectores plasmídicos

Vectores plasmídicos	Características
Vectores de clonación	• Capacidad para clonar genes y secuencias de ADN. • Contiene genes de resistencia a antibióticos.
Vectores de expresión	• Expresa genes de interés en una célula diana. • Dirige la expresión en diversos tipos de células (mamífero, levadura, bacterias, etc.). • Contienen un promotor, una secuencia de terminación de la transcripción, y el gen de interés dentro de un sitio múltiple de clonación.
Vectores virales	• Utilizan la propiedad de replicación del virus para ayudar en la entrega de material genético en las células diana. • Crea partículas virales, como lentivirus, retrovirus o partículas adenovirales que pueden infectar células diana con alta eficiencia.

2.7 Bacterias utilizadas como organismos de expresión.

Históricamente los científicos obtenían proteínas de interés a partir de una fuente natural donde se encontraban. La producción de proteínas extrañas fue producida por primera vez en bacterias, pero el proceso era difícil y con baja obtención de proteínas de interés. Ahora con los avances de investigación es posible tomar el gen de cualquier proteína de interés, clonarlo en un vector de expresión, introducirlo a una bacteria para que esta la exprese, y pueda ser purificada y caracterizada (Rosano y Ceccarelli, 2014).

La producción de proteínas heterólogas en diferentes sistemas bacterianos ha revolucionado la biotecnología. Bacterias como *Escherichia coli* y otras como la familia de *Bacillus* son las células procariotas más utilizadas para la producción a nivel industrial de proteínas recombinantes. Estos organismos están por encima de otros sistemas debido al hecho de que su cultivo en sistemas de producción a gran escala es fácil y generalmente de bajo costo (Spizizen, 1958).

Bacterias utilizadas en la producción de proteínas recombinantes

Escherichia coli es el huésped bacteriano más ampliamente utilizado para sintetizar proteínas recombinantes para estudios bioquímicos y funcionales. Las células de *E. coli* son fáciles de cultivar dado que tienen un tiempo de duplicación muy corto en medios ricos en nutrientes y son fáciles de manipular genéticamente. Su principal desventaja es la baja expresión de algunos genes heterólogos, así como la insolubilidad y formación de cuerpos de inclusión de las proteínas recombinantes expresadas (Rosano y Ceccarelli, 2014).

Las bacterias Gram positivas como las del género *Bacillus* se caracterizan por tener propiedades de esporulación y metabolismo aerobio, poseen forma de bastoncillos y son encontradas comúnmente en la naturaleza (Slepecky y Hemphill, 2006). Entre las especies de la familia *Bacillus*, la especie de *Bacillus anthracis*, el agente del ántrax, es la única que se considera patógena, afectando a vertebrados. Por otra parte, las especies *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus popilliae*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus thuringiensis* son patógenos en grupos específicos de insectos. Un número de otras especies, en particular *Bacillus cereus*, son patógenos ocasionales de los seres humanos y el ganado, pero la gran mayoría de las especies de *Bacillus* son inofensivas. *Bacillus subtilis* se conoce por ser una bacteria Gram positiva, no patógena, aerobia y con interés en la industria alimenticia, médica y probiótica. Una de sus características particulares reportadas y de gran interés es su capacidad para producir y secretar gran cantidad de proteínas al medio de cultivo donde se encuentre; incrementando su potencial para la producción de péptidos y proteínas recombinantes.

2.8 *Bacillus subtilis* como modelo de expresión.

Dentro de la familia de bacterias *Bacillus* podemos encontrar a *Bacillus subtilis* la cual ha mostrado ser un organismo modelo manejable para la ingeniería genética, capaz de ser una opción para la expresión de proteínas heterólogas y estudios de laboratorio (Kunst et al., 1997). Las cepas comerciales de *B. subtilis* poseen sistemas de secreción eficientes que permiten que las proteínas se liberen en el medio de cultivo, lo cual facilita su purificación, además no presentan actividad patógena y son consideradas como organismos seguros (Westers et al., 2004). Se ha demostrado que las esporas de *B. subtilis* genéticamente modificadas pueden ser utilizadas como vehículos indestructibles para la administración de

antígenos de vacunación (Ferreira et al., 2005). El transporte de proteínas en *B. subtilis* parece ser un proceso relativamente simple, ya que su estructura celular es considerablemente menos complicada que la de las células eucariotas. La mayoría de las proteínas que son completamente transportadas a través de la membrana citoplasmática se sintetizan con un péptido señal amino-terminal. Como *B. subtilis*, carece de una membrana externa, muchas de estas proteínas son secretadas directamente en el medio de crecimiento (Tjalsma et al. 2000).

Estudios en *B. subtilis* han reportado la producción de grandes cantidades de proteasas las cuales han hecho que sea difícil purificar enzimas intracelulares de este organismo. Además, ha habido muchos intentos de producir proteínas extrañas mediante el uso de *B. subtilis* como sistema anfitrión (He et al. 1991). Una desventaja común en diversos estudios es la reducción de los niveles de expresión de proteínas heterólogas en *B. subtilis*, esto puede atribuirse a la expresión del gen inestable ya sea por la pérdida del plásmido recombinante o el reordenamiento del gen clonado que puede reducir la expresión de genes (Bron y Luxen. 1985, Bron et al. 1988), Por otra parte, la reducción de la inmunogenicidad de los antígenos expresados en cepas de *B. subtilis* puede deberse a la falta de epítomos conformacionales necesarios para la inducción de respuesta de los anticuerpos protectores perdidos durante los pasos de expresión o purificación (Nurminen et al., 1992).

2.8.1 Vías de secreción

Actualmente existe una amplia variedad de sistemas de expresión descritos para las especies de *Bacillus*, los cuales se combinan con secuencias que dirigen a las proteínas para ser secretadas. La translocación de proteínas a través de la membrana interna se lleva a cabo por vía de reconocimiento de señal (SRP) vía dependiente de SEC y la vía TAT.

La mayoría de las proteínas en *E. coli* se exportan al periplasma mediante el sistema de SEC (Natale et al., 2007), aunque de manera deficiente en cuanto a cantidad. Por lo tanto, la mayoría de las proteínas exportadas por esta vía permanecen en el periplasma, que es también el lugar donde se acumulan las proteínas recombinantes más secretadas. La vía SRP es Cotraduccional, mientras que SEC y TAT son vías de translocación (Broedel y Papciak, 2007) (Figura. 2.3).

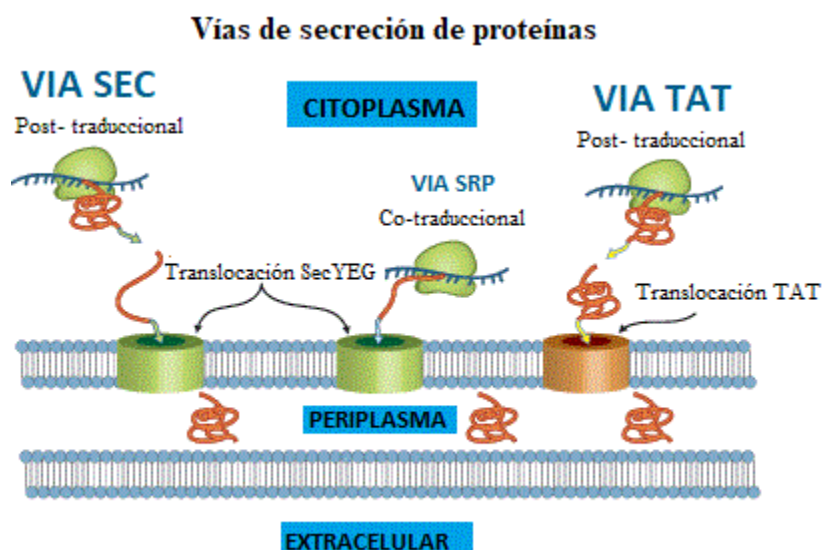


Figura 2.3. Vías de secreción de proteínas (Recuperado de Broedel y Papciak, 2007).

En contraste con la vía SEC que transporta las proteínas en una forma desplegada, la vía TAT sirve para trasladar activamente proteínas plegadas a través de una bicapa de la membrana lipídica. La translocasa TAT se encuentra en la membrana citoplasmática y sirve para exportar proteínas de la envoltura celular al espacio extracelular (Van Dijl y Hecker, 2013).

2.8.2 Vías de secreción TAT

La vía de translocación de doble arginina (TAT) es una vía de secreción de proteínas que se encuentra en plantas, bacterias y arqueas. Las proteínas sustrato se dirigen a un aparato de transporte unido a la membrana mediante péptidos señal de N-terminal que albergan una secuencia distintiva de doble arginina de aminoácidos y lo más notable, todas las proteínas sustrato se transportan en una conformación totalmente plegada (Jongbloed et al., 2004).

El hecho de que *B. subtilis* exporte proteínas al medio y no sean retenidas por una membrana exterior, como se ha observado en bacterias gram-negativas, hace que esta bacteria Gram positiva sea un organismo preferido para el análisis proteómico de la secreción de proteínas. Cuenta con cuatro vías diferentes de secreción de proteínas desde el citoplasma (Figura 2.4)

y además hace uso de mecanismos alternativos para liberar proteínas en el medio ambiente externo (Tjalsma et al., 2004).

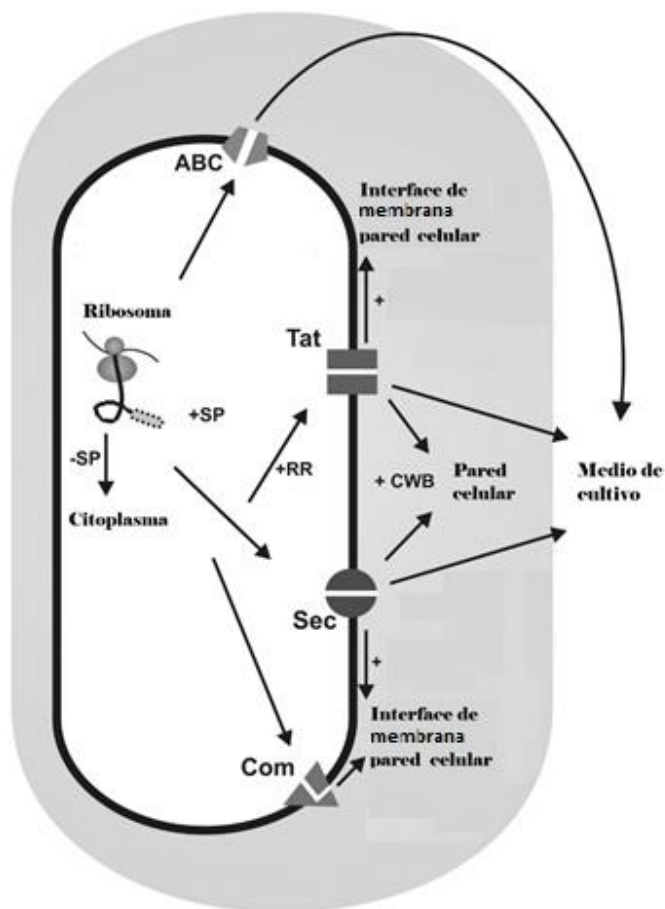


Figura 2.4. Vías de secreción en *Bacillus subtilis* (Recuperado de Tjalsma et al, 2004).

Las proteínas correspondientes a la vía de secreción TAT tienen el potencial de permanecer unidas a la membrana con un amino-terminal con dominio transmembranal. Por lo tanto, en *B. subtilis* estos dominios tienen en promedio una longitud de 14 residuos de aminoácidos y son dos veces más grandes de los dominios de señales de tipo SEC. Además, los sustratos de la vía TAT incluyen enzimas redox que se requieren para la inserción de un cofactor en el citoplasma, proteínas multiméricas que tienen que montar un complejo antes de la exportación y ciertas proteínas de membrana y proteínas cuyo plegado es incompatible con la vía SEC (Tjalsma et al., 2004).

3. Objetivos Generales

Evaluar la expresión de la proteína Neuraminidasa (NA) del virus de la Influenza A (H7N9) en *B. subtilis*.

3.1 Objetivos específicos

1. Clonar el gen de Neuraminidasa en un vector de expresión.
2. Transformar genéticamente *B. subtilis* y *E. coli* con el vector de expresión de NA.
3. Evaluar la expresión y secreción del sistema de expresión mediante el gen reportero GFP.

4. Metodología

La parte experimental de este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular, del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

4.1 Material biológico

4.1.1 Cepas

Se utilizaron las cepas (Tabla 2) *B. subtilis* 168 y WB600 (proporcionadas por el Dr. John H. Wong de la Universidad de Calgary, EU). *E. coli*: DH5 α (Invitrogen), *E. coli* BL21(DE3) pLyss (Promega). Todas las cepas fueron cultivadas y transformadas por los protocolos descritos posteriormente en este trabajo.

Tabla 4.1. Características genotípicas de las cepas utilizadas en este estudio.

Cepas	Genotipo	Fuente
<i>E. coli</i> DH5α	F-Φ80dlacZΔM15 <i>endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK-, mK-) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ(<i>lacZYA</i> -argF) U169	Invitrogen Life Technologies (USA)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB-, mB-), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ(DE3), pLysS, Cmr. Inducible por IPTG	Promega Corporation (USA)
<i>B. subtilis</i> 168 IPI	<i>ind⁻ tyr⁺ trpC2</i> Tiene integrado el gen de la polimerasa T7 en cromosoma bajo promotor p43, <i>Kan^r</i>	(Gutiérrez, 2015)
<i>B. subtilis</i> WB600 LBMB	<i>trpC2 nprE aprE epr bpr mpr nprB</i> ; Em ^r Tiene integrado el gen de la polimerasa T7 en cromosoma bajo promotor p43, <i>Kan^r</i>	(Gutiérrez, 2015)

4.1.2 Proteínas utilizadas.

La secuencia de la proteína NA del virus de la influenza A (H7N9) se obtuvo de la base de datos GISAID- EpiFlu™ (Tabla 3). Se realizó el análisis de codones del gen de la proteína NA del virus de influenza A (H7N9) con el programa MacVector 12.6 (MacVector Inc.) para su correcta expresión en *B. subtilis*. El gen sintético de la proteína NA se adquirió de GenScript® (USA). El gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) se obtuvo de la genoteca del LBMB.

Tabla 4.2. Genes clonados en vectores de expresión.

Gen	Nombre de la cepa
Neuraminidasa	A/Anhui/1/2013
Proteína Verde Fluorescente (GFP)	GFP

4.1.3 Vectores de expresión y plásmidos.

Para este trabajo se utilizaron vectores ya utilizados en el laboratorio de LBMB y con base en su construcción inicial se realizaron modificaciones para obtener el vector final (Tabla 4).

Tabla 4.3. Plásmidos utilizados.

Plásmidos	Propiedades	Fuente/Referencia
pKaVS	Plásmido que contiene el cassette de expresión, bajo el control del promotor T7. Amp ^r	(Gutiérrez, 2015)
pAKG	Plásmido que contiene el cassette de expresión con el péptido señal SEC (SP-Sec). Tet ^r	(Gutiérrez, 2015)
pMK _{TAT}	Plásmido que contiene el cassette de expresión con el SP-TAT. Amp ^r	Este estudio
pNAM2015	Plásmido que contiene el cassette con los genes sintéticos NA y M1. Amp ^r	Este estudio
pMK	Plásmido que contiene el cassette de expresión con el SP-TAT. Tet ^r	Este estudio
pMK-GFP	Plásmido que contiene el cassette de expresión para el gen de la GFP con el SP-TAT y. Tet ^r	Este estudio
pMK-NA	Plásmido que contiene el cassette de expresión para el gen NA con el SP-TAT y. Tet ^r	Este estudio

4.1.4 Oligonucleótidos

Tabla 4.4. Secuencia de oligonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencia
GFP-FW	5'-GTCGACATGTCTAAAGGTGAAGAA-3'
GFP-RV	5'-GAGATCTTTATTTGTACAATTCATCCATACC-3'
TET-FW	5'-GTCTAGAGTTTGACAGCTTATCATC-3'
TET-RV	5'-GCTCGAGATATGTTCTGCCA -3'
NA-FW	5'- GTCGACAATGAACCCAAACCA-3'

Oligonucleótido	Secuencia
NA-RV	5'- AGATCTCTGCAGTTAGTGGTGGTG-3'

4.2 Construcción de vector replicativo

Para la construcción funcional del vector de expresión se partió de un plásmido construido anteriormente para *B. subtilis*, el cual contiene un promotor T7 en conjunto con un vector integrativo que contiene un cassette de expresión para la T7 RNA polimerasa, seguido de un péptido señal perteneciente a la vía de secreción SEC con el sitio de corte para la peptidasa ('A), un marco abierto de lectura, una cola de histidinas para facilitar la purificación de los péptidos y el terminador de la RNA polimerasa T7 (Gutiérrez-García, 2015) (Fig.4.1).



Figura 4.1. Mapa Lineal plásmido pAKG (Recuperado de Gutiérrez- García, 2015).

Se diseñó una estrategia de corte con los sitios de restricción existentes en el vector para facilitar la inserción y clonación de los insertos de los genes de interés y así obtener un vector inicial (Figura 4.2). Se revisaron los sitios de restricción y los elementos de interés con los que cuenta el vector: promotor T7 constitutivo, péptido señal TAT (SP-TAT), terminador T7, gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección (AmpR), cuenta además con una etiqueta 6xHis (HIS TAG), un sitio de origen de replicación repU (para *B. subtilis*) y un origen de replicación Col E1 (para *E. coli*).

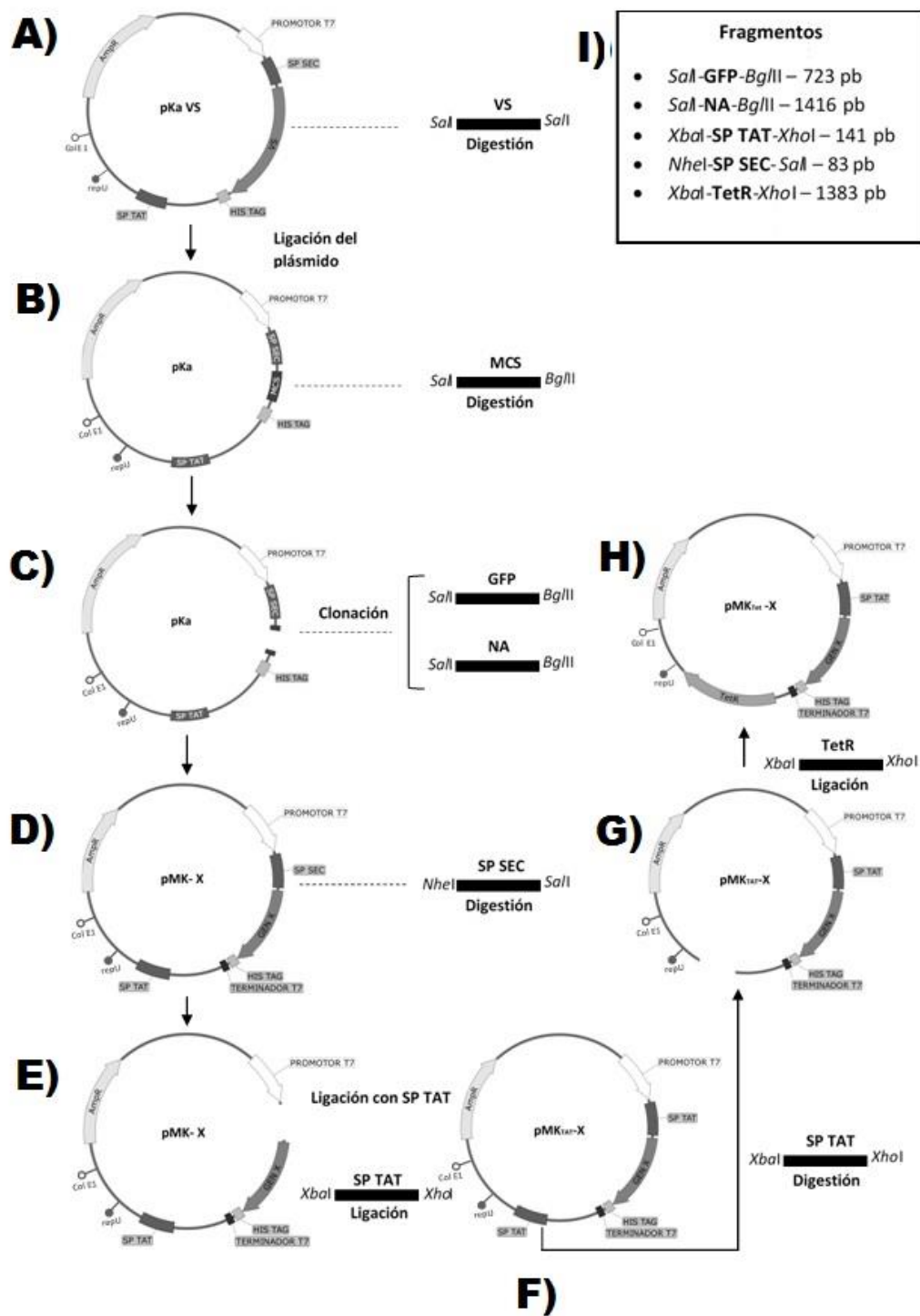


Figura 4.2. Diseño de vectores de trabajo pMK-GFP y pMK-NA.

Para la construcción del vector se realizaron digestiones con enzimas de restricción y ligaciones utilizando la ligasa mostradas en la Figura 6 A) Plásmido pKa usado como base para construir el vector de interés, comenzando con la escisión del péptido VS, seguido de la religación del vector pKa. En las figuras B) y C) se aprecia la digestión del vector pKa con las enzimas de restricción *SalI* y *BglII* seguido de la clonación de los genes de interés (GFP y NA). Los incisos D y E muestra el cambio del péptido señal SEC por el péptido señal TAT en su posición correcta dentro del vector replicativo. Para la finalización de la construcción en los incisos F G y H se aprecia la escisión del péptido señal TAT (*XbaI-XhoI*) que se encuentran en una posición del vector para ser sustituido por el marcador de selección TetR.

Los elementos que constituyen los vectores finales son: Un promotor T7 constitutivo, un sitio de unión a ribosoma (RBS), péptido señal TAT (SP-TAT), sitio múltiple de clonación (MCS), genes de interés (Inserto NA), terminador de la T7, gen de resistencia a tetraciclina (TetR), gen de resistencia a ampicilina (AmpR), etiqueta 6xHis (HIS TAG), repU (origen de replicación para *B. subtilis*) y Col E1 (origen de replicación para *E. coli*).

Para comprobar la funcionalidad del vector final con la proteína GFP se transformaron cepas de *B. subtilis* B168 IPI, *B. subtilis* WB600 LBMB y *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Anexo B). Las transformantes se crecieron en medio LB (Anexo A1) con ampicilina a 37°C durante 32 h. Se comprobó la correcta expresión de la proteína GFP mediante el muestreo del cultivo celular para observarse por microscopia de fluorescencia (Microscopio óptico Zeiss acoplado a ApoTome) utilizando los campos para la visualización de la GFP tanto en las cepas de *B. subtilis* como *E. coli*. Posteriormente se realizó la extracción de ADN plasmídico (anexo B) y se confirmó la clonación del gen GFP mediante PCR (anexo B) utilizando los oligonucleótidos de reconocimiento específicos.

Los productos de PCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (anexo A), una vez demostrada la funcionalidad del sistema, el siguiente paso fue clonar el gen de la proteína NA del virus de influenza A (H7N9) en el vector comprobado.

4.3 Construcción de vectores de expresión para la producción de NA en *B. subtilis* y *E. coli*.

Una vez comprobada la correcta expresión de proteínas por el vector final, se removió el gen de GFP con ayuda de las enzimas de restricción *SalI* y *BglII*, y posteriormente se ligó la proteína sintética NA para obtener el vector final pMK NA. La reacción de ligación se incubó a 16°C durante toda la noche (Figura 4.3).

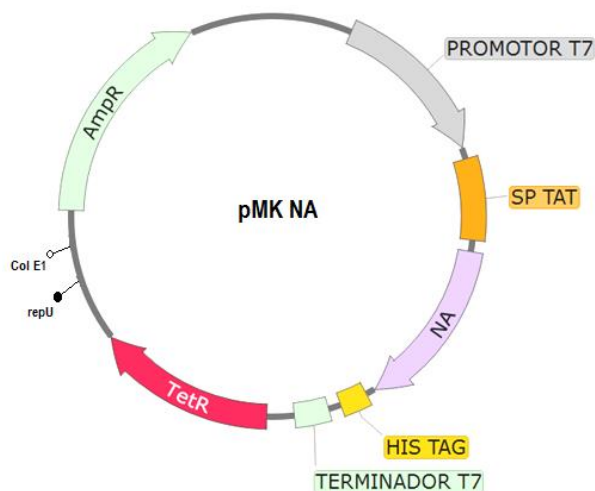


Figura 4.3. Vector final pMK NA para la producción de Neuraminidasa.

Posteriormente con el producto de ligación se realizó la transformación de *B. subtilis* (anexo B) y *E. coli*. Se sembraron las células en cajas Petri con medio LB con antibiótico y se incubaron durante 16 h a 37°C para la selección de colonias (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Antibióticos de selección para cepas y construcciones utilizadas para cinética de producción.

Construcción	Antibiótico	Concentración
WB600 pMK TET-GFP	Tetraciclina	15µg/mL
B168 pMK TET-GFP	Tetraciclina	15µg/mL
BL21 pLysS TET-GFP	Tetraciclina	15µg/mL
WB600 pMK NA	Tetraciclina	15µg/mL
B168 pMK NA	Tetraciclina	15µg/mL
BL21 pLysS pMK NA	Tetraciclina	15µg/mL
<i>B. subtilis</i> WB600 LBMB	Kanamicina	25µg/mL
<i>B. subtilis</i> 168 IPI	Kanamicina	25µg/mL
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	Cloranfenicol	10µg/mL

Se realizó la extracción de pADN de las colonias positivas y se realizó PCR de colonia con los oligonucleótidos para el inserto de NA (Tabla 4.6). Posteriormente los productos de PCR se corrieron en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Anexo B), para comprobar la existencia del inserto de NA en el vector.

Tabla 4.6. Secuencia de Oligonucleótidos para inserto NA.

Oligonucleótido	Secuencia
NA-FW	5'- GTCGACAATGAACCCAAACCA-3'
NA-RV	5'- AGATCTCTGCAGTTAGTGGTGGTG-3'

4.4 Métodos analíticos.

4.4.1 Cinéticas de producción en ensayos a nivel matraz.

Al inicio de las cinéticas se tomó 1 mL de muestra de cada preinoculo incubado por 16 h para medir su densidad óptica a 600 nm. Se llevaron a agitación hasta llegar una densidad óptica de 0.05 abs, se tomó una muestra para llevar la densidad de 0.05 para un volumen de 50 ml

en matraz con capacidad máxima de 250 mL. Se tomaron muestras de 1 mL cada 2 h hasta tener un muestreo de 24 h consecutivas.

4.4.2 Evaluación de inmunodetección de extractos celulares con anticuerpos específicos.

En la mayoría de los trabajos experimentales se propone la expresión de proteínas en extractos celulares para después compararla con la misma proteína purificada en un sistema generalmente de *E. coli* como control positivo. Se utilizaron células para lisis como resultados de los nuestros de cinéticas y así utilizarlas Western blot (Anexo B).

4.5 Resultados y Comprobación de la inserción de la proteína GFP en vector replicativo.

Se realizó una reacción de digestión utilizando ADN del plásmido pMK GFP con enzimas de restricción *SalI* y *BglII* posteriormente el producto de digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% para identificar que el inserto de GFP estuviera presente en el vector. El tamaño del fragmento consta de 729 pb (Figura 5.1).

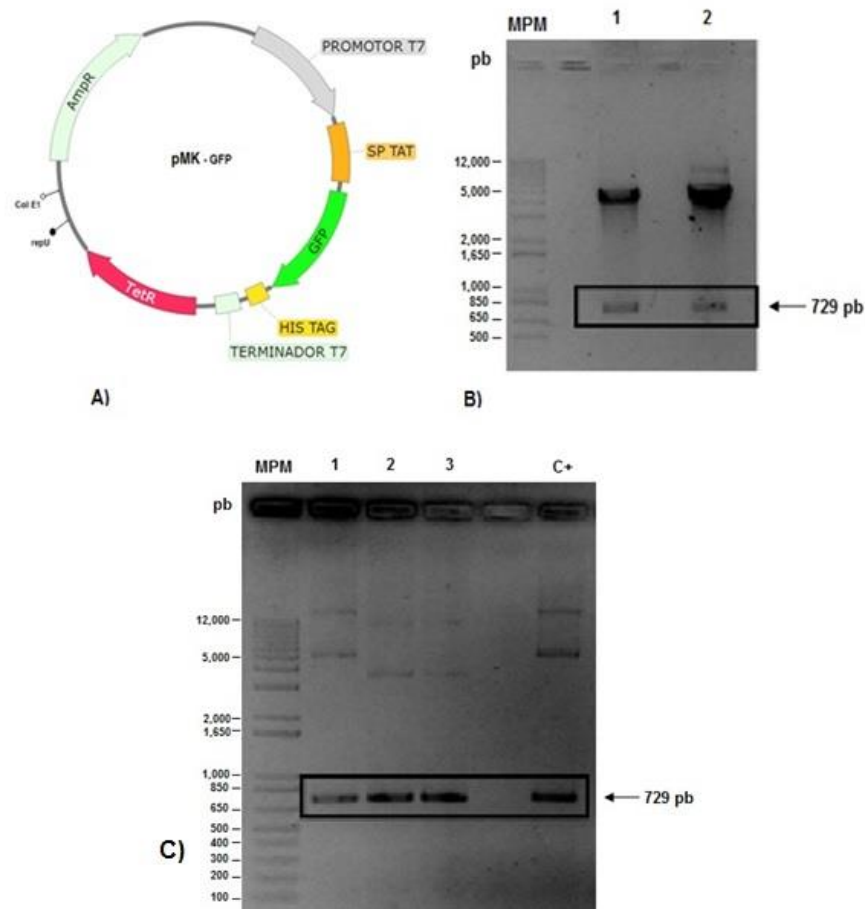


Figura 4.4. Comprobación del inserto GFP por PCR y corte con enzimas de restricción.

A) Esquema de la construcción pMK- **B)** Comprobación de la construcción por corte con enzimas de restricción con SalI y BglII para el inserto GFP en el vector pMKGFP. **C)** Carril 1 amplificación de inserto GFP por PCR en el plásmido del vector pMK-GFP transformado en de cepa *B. subtilis* 168. Carril 2 y 3 amplificación de inserto GFP en plásmido del vector pMK -GFP transformado en cepa *B. subtilis* WB600. Además de agregar como control negativo el vector sin inserto de GFP y como control positivo el inserto de GFP (+C).

4.5.1 Comprobación de fluorescencia en el vector replicativo con GFP

El sistema de expresión mostró funcionalidad tanto en las cepas de *B. subtilis*, así como en cepas de *E. coli* transformadas con el vector pMK-GFP. Esto se concluyó con la fluorescencia observada en las cepas de estudio (Figura 5.2).

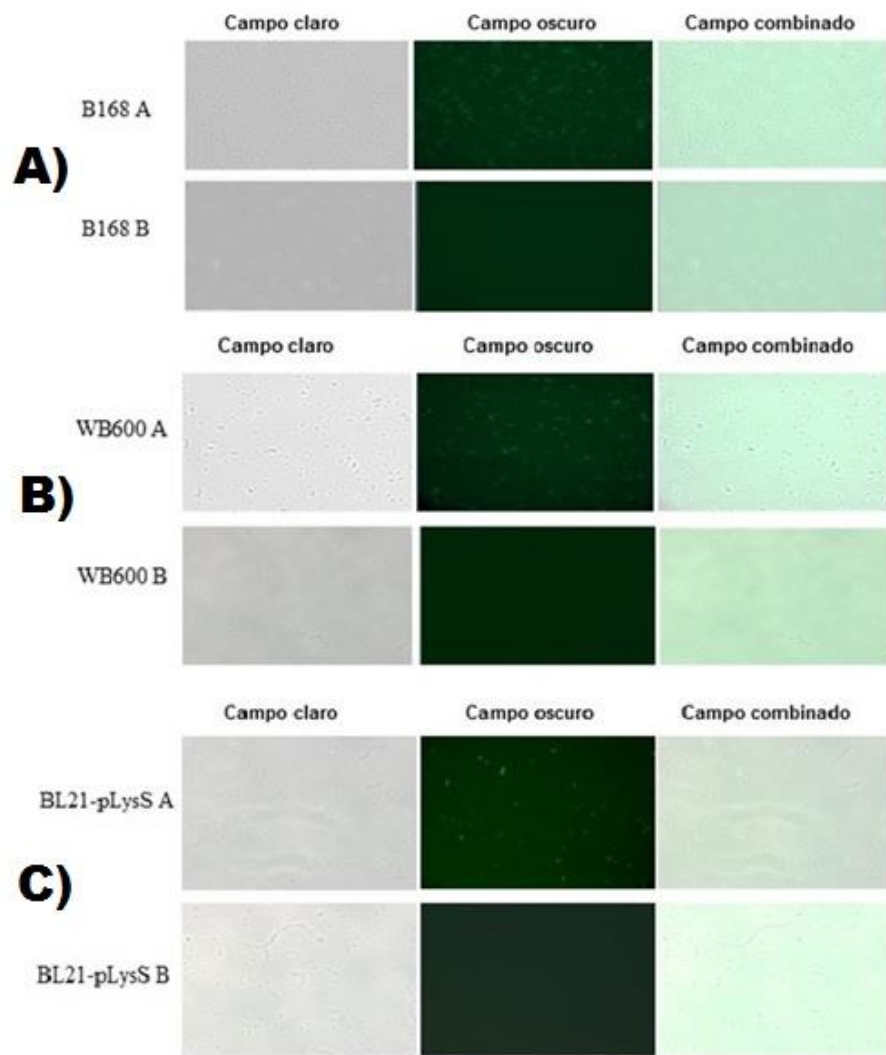


Figura 4.5. Comprobación de Fluorescencia en cepas Transformadas con vector pMK-GFP.

A) cepa B168 A transformada con pMK -GFP y cepa B168 B sin transformar. B) cepa WB600 A transformada con pMK-GFP y cepa W600 B sin transformar. C) cepa BL21-pLysS A transformada con pMK TET-GFP y cepa BL21-pLysS B sin transformar.

4.6 Integración de la proteína NA en vector replicativo.

Una vez comprobada la correcta expresión de GFP por el vector pMK-TET-GFP, el gen de la proteína NA fue digerido por enzimas de restricción con los sitios *SalI* y *BglII* del plásmido sintético pNaM2015. El producto digerido fue clonado en el plásmido pGEMT-easy Vector (Promega) y removido por una reacción de digestión de 25µL con las enzimas *SalI* y *BglII*. El resultado de la digestión con las enzimas fue clonado en el plásmido pMK TET, obteniendo el vector replicativo denominado pMK-NA (Figura10).

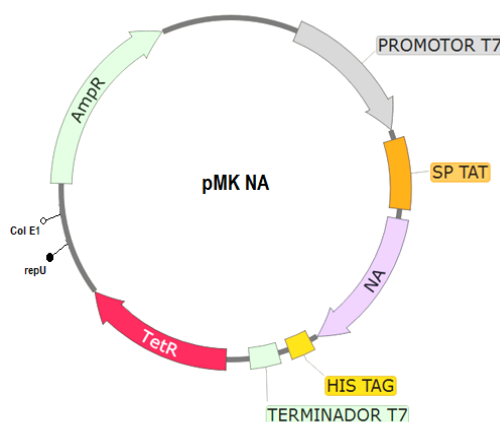


Figura 4.6.Integración del inserto de Neuraminidasa en el vector replicativo pMK-NA.

4.7 Comprobación del vector replicativo con el inserto NA en cepas de *B. subtilis* y *E. coli*

Para la comprobación del inserto NA en el vector de expresión se realizó una digestión de DNA del plásmido pMK NA con las enzimas de restricción *SalI* y *BglII* posteriormente el producto de digestión se corrió en un gel de agarosa al 1% para identificar que el inserto de GFP estuviera presente en el vector (Figura. 11).

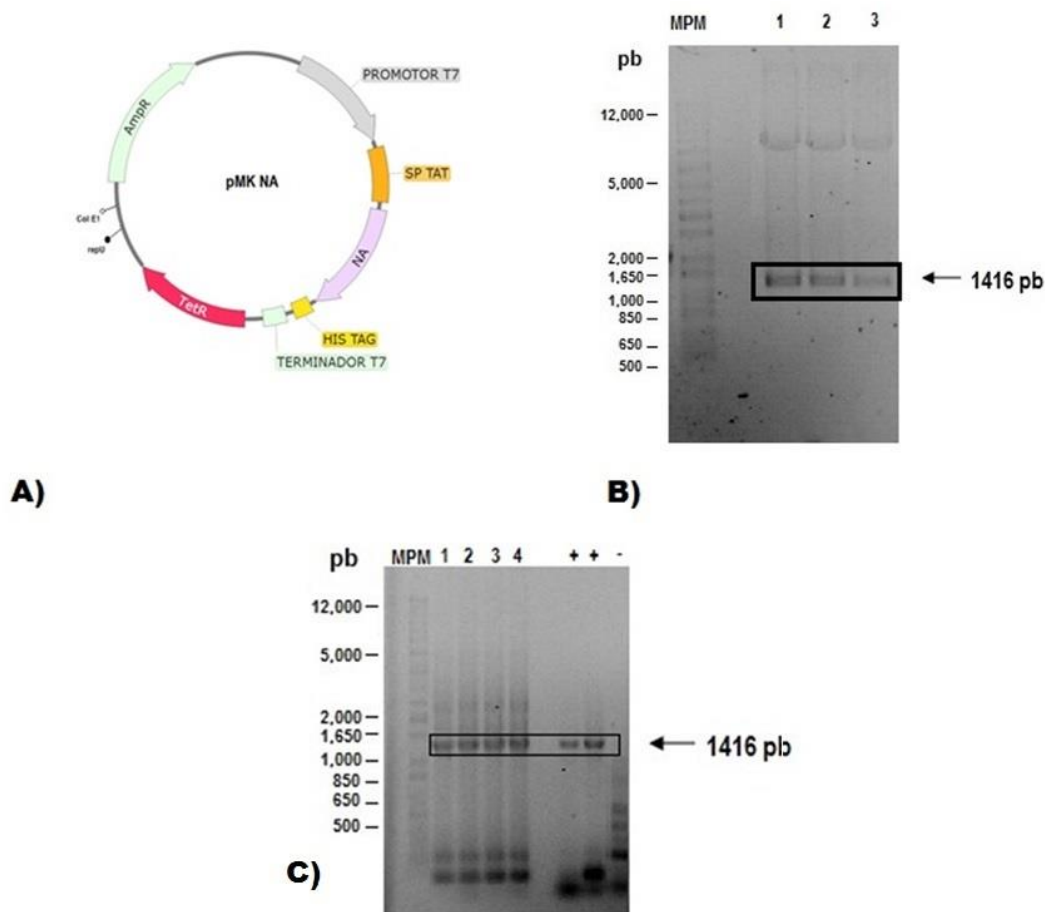


Figura 4.7. Comprobación inserto NA por enzimas de restricción y amplificación por PCR.

A) Esquema de la construcción pMK NA en el cual se muestran los elementos con los que cuenta el vector iniciando por un promotor T7 constitutivo, péptido señal TAT (SP-TAT), integración del inserto de NA, etiqueta 6xHis (HIS TAG), terminador del promotor T7, gen de resistencia a tetraciclina como marcador de selección, repU (como origen de replicación para *B. subtilis*) y Col E1 (como origen de replicación para *E. coli*) además del gen de resistencia a ampicilina incluido como segundo marcador de selección.

B) Comprobación de la construcción por corte con enzimas de restricción con Sall y BglII para el inserto NA en el vector pMK NA. Dicha digestión presentó el tamaño esperado del inserto de GFP de 1416 bp.

C) Carril 1 amplificación de inserto NA del plásmido del vector pMK NA transformado en cepa *B. subtilis* WB600. Carril 2 amplificación de inserto NA del plásmido del vector pMK NA transformado en cepa *B. subtilis* B168. Carril 3 amplificación de inserto NA del plásmido del vector pMK NA transformado en cepa *E. coli* BL21 *pLysS*. Carril 4 amplificación de inserto NA del plásmido del vector pMK NA transformado en cepa *E. coli* BL21- *SI*. Como controles positivos se utilizó inserto de NA (+) y como control negativo plásmido pMK TET (-). La comprobación demuestra que el inserto de NA se encuentra en el vector, dicho inserto tiene un tamaño de 1416 pb. Para la corroboración final se mandó a realizar una secuenciación de muestras de DNA de dichos vectores donde nos mostraba la correcta inserción de elementos en el vector.

4.8 Cinéticas de crecimiento de cepas *B. subtilis* y *E. coli* transformadas con los vectores pMK- GFP y pMK-NA

Este ensayo se realizó por medio del método de cinética de matraces por triplicado con la finalidad de evaluar el crecimiento bacteriano de las cepas transformadas tanto con el vector de expresión pMK-GFP y pMK-NA en un periodo de 48 horas, tomando muestras de densidad óptica a 600nm. Se observó que el crecimiento bacteriano con la integración de los vectores en las cepas presenta un crecimiento similar a las cepas transformadas con el vector pMK: (WB600, B168 Y BL21- pLysS). (Figura 12).

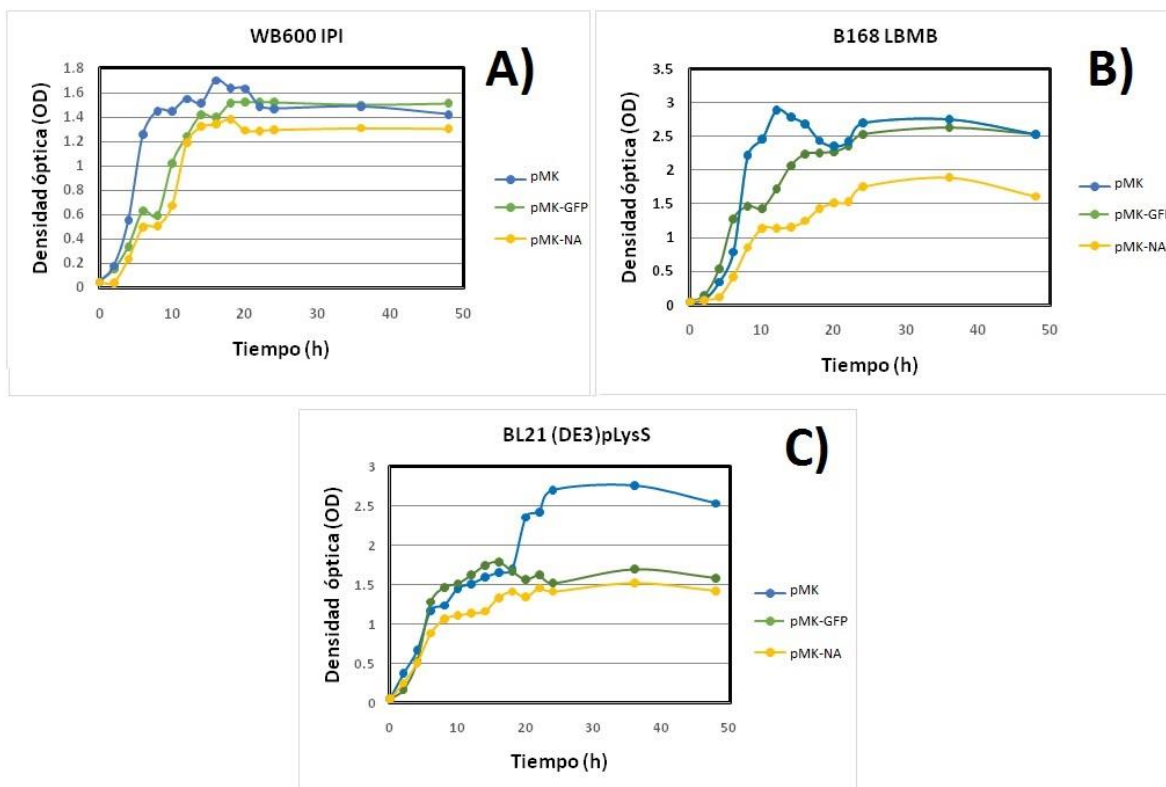


Figura 4.8. Cinéticas de crecimiento en cepas Trasformadas de *B. subtilis* y *E. coli*.

A) Crecimiento de cepas *B. subtilis* WB600 con los vectores: pMK, pMK-GFP y pMK NA

B) Crecimiento de cepas *B. subtilis* B168 con los vectores: pMK, pMK-GFP y pMK NA.

C) Crecimiento de cepas *E. coli* BL21pLysS con los vectores: pMK, pMK-GFP y pMK NA.

4.9 Evaluación de secreción de la proteína GFP por método de Western blot

Para evaluar por medio de Western blot la inmunodetección de la proteína GFP obtenida de extractos celulares de las cinéticas realizadas de cepas *B. subtilis* y *E. coli*. (Figura 13).

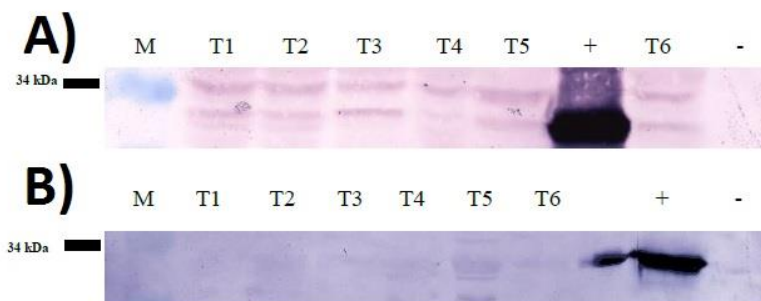


Figura 4.9. Inmunodetección de la proteína GFP en cepas Trasformadas de *B. subtilis*.

A) Detección de la proteína GFP en la fracción intracelular.

B) Detección de la proteína GFP en la fracción extracelular en cepas: T1 (WB600 pMK-GFP), T2 (B168 pMK-GFP), T3 y T4 (BL21-pLysS pMK-GFP), T5 (WB600-pMK-GFP), T6 (B168 pMK-GFP). + Control positivo de una cepa que expresa GFP, - Control negativo de una cepa con el vector vacío.

De acuerdo con el tamaño de la proteína (34 kD para la proteína GFP) se pudieron observar bandas de tamaño similar al esperado entre el peso molecular correspondiente a la proteína purificada. Esto se puede tomar como una prueba fiable de la expresión de la proteína GFP en las cepas.

5. Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo contemplan que la construcción y transformación de células con el vector diseñado fue exitosa tanto para cepas de *B. subtilis* y *E. coli*. Esto promete ser una nueva alternativa para la secreción de proteínas víricas como Neuraminidasa usando vectores de expresión en bacterias Gram positivas como *B. subtilis*.

La comprobación del vector con la proteína GFP en la cual las células presentan fluorescencia y el vector con el inserto de NA donde parece conservar el gen sintético en su estructura según los resultados de secuenciación, pueden ser usados para la inserción de otras proteínas víricas de interés.

Concluyendo con base a las cinéticas de crecimiento, el sistema de expresión con promotor T7 constitutivo y el inserto de la proteína disminuyen el crecimiento de las bacterias en comparación con las cepas sin el inserto. Los resultados nos muestran que las cepas *B. subtilis* y *E. coli*. Con el inserto de NA muestran un menor crecimiento en comparación con el vector donde en su región tiene el inserto del gen GFP. Se conoce que las proteínas de NA virales pueden volverse inestables al separarse de la membrana (McKimm-Breschkin et al., 1998), por lo que el vector puede cesar su actividad con el paso de las horas, lo que llega a impedir el análisis de las muestras para la cuantificación correcta de la proteína (McKimm-Breschkin, 2012).

La proteína de NA pudo ser integrada en este vector tanto en cepas de *B. subtilis* WB600 y *B. subtilis* B168. Tomando en cuenta las cinéticas de crecimiento de las cepas de *B. subtilis* con el inserto de NA, estas muestran un menor crecimiento en comparación con las cepas de *E. coli* BL21pLysS, además de presentar un estado de crecimiento estable a partir de las 20 horas de muestreo. En comparación con trabajos recientes donde se muestran el uso de bacterias *E. coli* como organismos de producción por excelencia para la expresión de estas proteínas de interés (González y Fillat, 2018). El rendimiento de las cepas de *B. subtilis* puede ser capaz de expresar proteínas recombinantes, pero sin llegar al nivel de expresión y producción de *E. coli*, esto comprobando las teorías de trabajos similares en la búsqueda de expresión de proteínas (Espinoza-Villalva, 2014 y Sotelo-Barrera, 2018).

B. subtilis puede posicionarse como sistema modelo si consigue optimiza el vector de expresión utilizado y modificar las condiciones de crecimiento utilizadas en las cepas transformadas. Una propuesta para la continuación del proyecto sería considerar la construcción de un vector de expresión para bacterias Gram negativas como contraparte a las usadas en este trabajo, con el fin de evaluar si el crecimiento de la células y expresión de la proteína pueda dar mejores resultados consiguiendo aumentar las horas de crecimiento en matraz para ampliar el tiempo de crecimiento de bacterias y muestrear la secreción de las proteínas en un periodo de tiempo extendido. Estudios recientes demuestran que el uso de células ACP humanas para inducir en Salmonela pueden ayudar a la expresión de proteínas recombinantes para obtener antígenos de vacunas e incluso propiciar una inmunidad adaptativa específica de antígenos heterólogos (Kim et al., 2019).

6. Bibliografía

- Broedel S.E., y Papciak S. M. (2007). ACES™ Promoter Selection Vector Technical Brief. Obtenido el día 15 de noviembre del 2015 de: http://www.athenaes.com/tech_brief_ACESpromoter.php
- Bron S., Luxen E., y Swart P. (1988). Instability of Recombinant pUB110 Plasmids in *Bacillus subtilis*: Plasmid-Encoded Stability Function and Effects of DNA Inserts. *Plasmid*, 19(3):231-41.
- Bron S., y Luxen E. (1985). Segregational instability of pUB110-derived recombinant plasmids in *Bacillus subtilis*. *Plasmid*, 14 (3):235-44.
- Casali N., y Preston A. (2003). Choosing a Cloning Vector, *Methods in Molecular Biology*, 235, 19-26.
- Centro para la protección de la Salud (CHP, Por sus siglas en Ingles) 2018, Avian Influenza obtenido el día 20 de marzo del 2019 de: <https://www.chp.gov.hk/en/healthtopics/content/24/13.html>
- Chen, J, y Deng, Y.M. (2009). Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. *Virology Journal*, 6(1), 30.
- Chen Y., Liang W., Yang S., Wu N., Gao H. y Sheng J. (2013). Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterization of viral genome, *Lancet*, 381, pp. 1916-1925.
- Cox N. J. y Subbarao K. (2000). Global epidemiology of influenza: Past and Present. *Annu Rev Med*, 51, 407-21.
- Da Silva D.V., Nordholm J., Madjo U., Pfeiffer A., y Daniels R. (2013). Assembly of Subtype 1 Influenza Neuraminidase Is Driven by Both the Transmembrane and Head Domains. *JBC*, 288: 644-653
- Deraz T.E, Mansoura M.G, Albendaryb S.y Abdelwahaba A.M., (2012) Simultaneous detection of respiratory syncytial virus types A and B and influenza virus types A and B in community-acquired pneumonia by reverse transcription-multiplex PCR. *Ejmhg* 13 (2),155–159.
- Dertzbaugh M T., (1998). Genetically Engineered Vaccines: An Overview. *Plasmid* 39, 100–113.
- Espinoza-Villalva A.K (2014). Generación de una cepa de *Bacillus subtilis* como modelo de expresión de ARN de proteínas virales para el control del virus de la mancha blanca (Tesis de maestría Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California.
- Francis T. Jr. (1940). A new type of virus epidemic influenza. *Science*. 92(2392): 405-408.

- Francis T. Jr., Quilligan JJ Jr y Minuse E. (1950) Identification of another epidemic respiratory disease. *Science*. 27; 112(2913):495-7.
- Fujii Y., Goto H., Watanabe T., Yoshida T. y Kawaoka Y. (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2002–2007.
- Fujiyoshi Y, Kume N P, Sakata K, y Sato S B, (1994). Fine structure of influenza A virus observed by electron cryo-microscopy. *The EMBO journal* 13 (2): 318–326.
- Gamblin S. J.y Skehel J.J., (2010). Influenza Hemagglutinin and Neuraminidase Membrane Glycoproteins. *JBC* 285 (37): 28403-28409.
- Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, M.D., Jie Z, Qiu H, Xu K, Xu X, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. (2013). *N. Engl. J. Med.* 368: 1888–1897
- González, Andrés y Fillat M.F, (2018). Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de educación Bioquímica* 37(1):14-27.
- Gutiérrez-García A.K. (2015). Diseño de un sistema de expresión de proteínas heterólogas en *Bacillus subtilis* (Tesis de maestría). Instituto potosino de investigación científica y tecnológica, A.C. México.
- He X.S, Brückner R, y Doi R.H. (1991). The protease genes of *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol.*142(7-8):797-803.
- Horimoto, T. y Kawaoka, Y. (2005). Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents, *Nature Reviews Microbiology* 3, 591–600.
- Jongbloed J., Grieger U., Antelmann H., Hecker M., Nijland R., Bron S. y Van Dijk J.M., (2004). Two minimal Tat translocases in *Bacillus*, *Molecular Biology* 54 (5): 1319–1325.
- Katagiri, S., Ohizumi, A. y Homma, M. (1983). An Outbreak of Type C Influenza in a Children's Home. *Journal of Infectious Diseases*, 148(1), 51–56.
- Kim J., Hajam I. A., y Lee J.H., (2019). Human antigen presenting cells stimulated with Salmonella delivered influenza antigens induce cytokine production and proliferation of human CD4+ T cells in vitro. *Journal of Immunological Methods*, April 2019.
- Kunst F., Ogasawara N. y Moszer I., (1997). The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *NATURE* 390, 249-256.
- Lee D.H., Torchetti M.K., Killian M. L., Berhane Y. y Swayne D.E., (2017). Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus, Tennessee, USA, March 2017. *Emerg Infect Dis.* 2017 Nov; 23(11): 1860–1863.

- Matrosovich M.N., Matrosovich T. Y., Gray T. Roberts N. A., y Klenk HD., (2004). Neuraminidase Is Important for the Initiation of Influenza Virus Infection in Human Airway Epithelium. *JVI*, 78: 22, 12665–12667.
- McKimm-Breschkin J.L., Sahasrabudhe A., Blick T.J., McDonald M., Colman P.M., Hart G.J., Bethell R.C. y Varghese J.N. (1998). *J Virol.* 1998 Mar; 72(3): 2456–2462.
- Mitnaul, L.J., Castrucci M.R., Murti K.G, y Kawaoka Y. (1996) The Cytoplasmic Tail of Influenza A Virus Neuraminidase (NA) Affects NA Incorporation into Virions, Virion Morphology, and Virulence in Mice but Is Not Essential for Virus Replication. *J Virol.* 70:2, 873–879.
- Natale P., Brüser T., y Driessen A.J.M. (2007). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane distinct translocases and mechanisms. *BBA – Biomembranes* 1778(9):1735–1756.
- Nurminen M., Butcher S., Idänpään-Heikkilä I., Wahlström E., Mutttilainen S., Runeberg-Nyman K., Sarvas M., y Mäkelä PH. (1992) The class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* produced in *Bacillus subtilis* can give rise to protective immunity. *Mol Microbiol.* 6(17):2499-506.
- Organización Mundial de la Salud (OMS) 2013, obtenido el día 7 de octubre del 2015 de: <http://www.who.int/biologicals/vaccines/influenza/en/#>
- Organización Mundial de la Salud (OMS) 2019, obtenido el día 28 de marzo del 2019 de: https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/201902_zoonotic_vaccinevirusupdate.pdf?ua=1
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, y Ramírez OT. (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol*, 267, 15-51.
- Rosano GL y Ceccarelli EA. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(172).
- Rosano GL y Ceccarelli EA. (2014). Recombinant protein expression in microbial systems. *Frontiers in Microbiology*, 5(341).
- Shao W., Li X., Ullah M. G., Song W., Y Chen J. (2017). Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *International Journal ofMolecular Sciences.* 2017 Aug; 18(8): 1650.
- Slepecky R. A. y Hemphill H. E, (2006). The Genus *Bacillus*- Nonmedical. *Prokaryotes* 4, 530–562.
- Smith W., Andrewes C. H., y Laidlaw P. P. (1933). A virus obtained from influenza patients. *Lancet* 222, 66–68.

- Sotelo Barrera E.L, (2018). Sistema eficiente para la expresión heteróloga de proteínas para la producción de VLPs (Tesis de maestría) Centro de investigación científica y de educación superior de ensenada, Baja California.
- Spizizen J. (1958). Transformation of Biochemically deficient strains of *Bacillus Subtilis* by Deoxyribonucleate. *Proc Natl Acad Sci USA*. 44(10), 1072–1078.
- Stevens R.C. (2000). Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure*. 15;8(9):R177-85.
- Subbarao K. y Joseph T. (2007). Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses. *Nature Reviews Immunology* 7, 267-278
- Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois JY, Westers H, Zanen G, Quax WJ, Kuipers OP, Bron S, Hecker M, y van Dijl JM. (2004). Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the "secrets" of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2), 207–233.
- Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed J.D, Bron S. y Van Dijl J.M. (2000). Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000 Sep; 64(3):515-47.
- Van Dijl J.M., y Hecker M. (2013). *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb Cell Fact*. 2013 Jan 14;12:3.
- Vinod N, Oh S, Park H. J, Koo J.M, Choi C. W, Kim S.C, (2015). Generation of a Novel *Staphylococcus aureus* Ghost Vaccine and Examination of Its Immunogenicity against Virulent Challenge in Rats. *Infection and Immunity*, 83 (7): 2957-2965.
- Webby RJ., y Webster R G., 2004. Are we ready for pandemic influenza? Washington (DC): *National Academies Press (US)*.
- Westers L, Westers H., y Quax WJ, (2004). *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. *Biochim Biophys Acta*, 1694. 299–310.
- White J.M, Hoffman L.R, Arevalo J.H, y Wilson I.A. (1997). Attachment and entry of influenza virus into host cells. Pivotal roles of hemagglutinin. *Structural Biology of Viruses*, *Oxford University Press*, NY. 80–104.
- Wohlbold T. J., y Krammer F. (2014). In the Shadow of Hemagglutinin: A Growing Interest in Influenza Viral Neuraminidase and Its Role as a Vaccine Antigen. *Viruses* 6:2465–2494.
- Wu, X.-C., Lee, W., Tran, L., y Wong, S. (1991). Engineering a *Bacillus subtilis* expression-secretion system with a strain deficient in six extracellular proteases. *Journal of bacteriology*, 173(16), 4952-4958.

Zheng, H., Xinhua, O., Rusheng, Z., Dong, Y., Lingzhi, L., Ruchun, y L Sun Biancheng.
Evolved avian influenza virus (H7N9) isolated from human cases in a middle Yangtze
River city in China, from February to April 2017. *Heliyon* 5 (2019) e01253.

7. ANEXOS

ANEXO A. MEDIOS, ANTIBIÓTICOS Y SOLUCIONES

A1 Medios de Cultivo

Tabla 7.1. Medio LB.

Reactivos	Cantidad
Bacto triptona	10g
Extracto de levadura	5g
NaCl	5g

Tabla 7.2. Medio LBON.

Reactivos	Cantidad
Bacto triptona	10g
Extracto de levadura	5g

Posteriormente hacer uso de la solución deseada exclusivamente en campana de flujo laminar para evitar contaminación del medio.

Tabla 7.3. Antibióticos de selección para cepas.

Cepas	Antibiótico
<i>B. subtilis</i> WB600 LBMB	Kanamicina
<i>B. subtilis</i> 168 IPI	Kanamicina
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	Cloranfenicol

Tabla 7.4. Antibióticos de selección para construcciones.

Construcciones	Antibiótico
pKaVS	Ampicilina
pAKG	Ampicilina
pMKTat	Ampicilina
pNAM2015	Ampicilina
pMKTet	Tetraciclina
pMK-GFP	Tetraciclina
pMK-NA	Tetraciclina

A2 Preparación de antibióticos de selección

Preparación para Ampicilina (200 mg/mL).

Pesar 500 mg de Ampicilina y disolver en 2.5 mL de agua miliQ estéril, agitar y almacenar a -20 °C.

Preparación para Cloranfenicol (25 mg/mL).

Pesar 25 mg de Cloranfenicol y disolver en 1 mL de Etanol absoluto, agitar y almacenar a -20 °C.

Preparación para Kanamicina (50mg/ml).

Pesar 100 mg de Kanamicina y disolver en 2 mL de agua milli-Q estéril, agitar y almacenar a -4 °C.

Preparación para Tetraciclina (10 mg/mL).

Pesar 10mg de Tetraciclina y disolver en 1 mL de metanol, agitar, cubrir de la luz y almacenar a -20°C.

Tabla 7.5. Concentración de Antibióticos en el medio.

Antibiótico	Concentración
Ampicilina	100µg/ml
Cloranfenicol	10µg/ml
Kanamicina	25µg/ml
Tetraciclina	15µg/ml

A3 Soluciones

Tabla 7.6. Soluciones para preparación Gel de Agarosa TAE 50X.

Reactivos	Cantidad
TRIS base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA (0.5 Mm, pH 8)	100 mL

Ajustar la solución a 1L con agua destilada y esterilizar la solución a 121°C por 15 min.

Tabla 7.7. Gel de Agarosa al 1%.

Reactivos	Cantidad
TAE 1X	40 mL
Agarosa	0.4 g

Calentar la solución hasta disolver completamente la agarosa.

Tabla 7.8. Solución para preparación de células competentes – R1.

Reactivos	Concentración	Cantidad
RbCl	100mM	2.4g
MnCl ₂ • 4H ₂ O	45mM	1.98g
CaCl ₂	10mM	0.30 g
Glicerol	15%	30mL

Ajustar la solución a un volumen de 200 mL con agua destilada, esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Una vez estéril agregar 6 mL de KAc 1M pH 7.5 estéril.

Tabla 7.9. Solución para preparación de células competentes – R2.

Reactivos	Concentración	Cantidad
RbCl	10 mM	0.24 g
CaCl ₂	75 Mm	2.2 g
Glicerol	15 %	30 mL

Ajustar a 200 mL con agua destilada, esterilizar en autoclave y posteriormente agregar 4 mL de MOPS 0.5 M pH 6.8 estéril.

Tabla 7.10. Soluciones para Trasformación de cepas de *B. subtilis* - Medio A base 10X.

Reactivos	Cantidad
Extracto de levadura	10 g
Bacto triptona	2 g
Glucosa al 50% (esteril)	100 mL

Se debe disolver el extracto de levadura y Bacto triptona en 900 mL de agua destilada, esterilizar 121 °C durante 15 min. Posteriormente agregar la glucosa al 50 % y mezclar vigorosamente.

Tabla 7.11. Soluciones para Trasformación de cepas de *B. subtilis* - Medio Sales 10X.

Reactivos	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g
K ₂ HPO ₄ • 3H ₂ O	183 g
KH ₂ PO ₄	60 g
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	10 g
MgSO ₄ •7H ₂ O	2 g

Se disolverán todas las sales en un volumen de 1 litro de agua destilada. Posteriormente se esterilizará en autoclave a 121°C durante 15 min.

Tabla 7.12. Soluciones para Trasformación de cepas de *B. subtilis* - Medio A.

Reactivos	Cantidad
Medio A base 10X	10 mL
Medio Sales 10X	9 mL
Agua estéril	81 mL

Tabla7.13. Soluciones para Trasformación de cepas de *B. subtilis* - Medio B.

Reactivos	Cantidad
Medio A	4.8 mL
CaCl ₂ • 2H ₂ O (50 mM)	0.05 mL
MgCl ₂ • 6H ₂ O (250 mM)	0.05 mL

Tabla 7.14. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de bacterias gram positivas - Solución de lisozima.

Reactivos	Concentración
Lisozima en polvo	10mg/mL
Tris	10 mM, pH 8

Tabla 7.15. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de bacterias gram positivas - Solución Lisis I.

Reactivos	Concentración
Tritón X-100	2.4 %
Tris -HCl	25 mM, pH 8
EDTA	10 mM, pH 8

Tabla 7.16. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de bacterias gram positivas - Solución Lisis II.

Reactivos	Concentración
NaOH	0.2 N
SDS	1 %

Se prepara solo el volumen para las muestras necesarias.

Tabla 7.17. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina de bacterias gram positivas - Solución Lisis III*.

Reactivos	Concentración
Acetato de Potasio	5 M

* Ajustar a pH 4.8 de la solución con ácido acético glacial.

Tabla 7.18. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina para bacterias gram negativas - Solución I.

Reactivos	Concentración
Glucosa	50 mM
Tris - HCl	25 mM, pH 8
EDTA	10 mM, pH 8

Tabla 7.19. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina para bacterias gram negativas - Solución II.

Reactivos	Concentración
NaOH	0.2 N
SDS	1 %

Tabla 7.20. Soluciones para extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina para bacterias gram negativas - Solución III *.

Reactivos	Concentración
Acetato de Potasio	5 M

* Ajustar a pH 4.8 de la solución con ácido acético glacial.

Tabla 7.21. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Soluciones stock:

Reactivos	Concentración
Acrilamida	30 %
Buffer de separación	1.5 M Tris pH 8.8
Buffer de Empaquetamiento	0.5 M Tris pH 6.8
Buffer de reservorios	10X: 248 mM
Tris	1.92 M
Glicina	20 mM
EDTA	1 %

Ajustar el pH a 8.8 antes de añadir el SDS.

Tabla 7.22. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Buffer de transferencia:

Reactivos	Concentración
Glicina	192 mM
Tris - HCl	25 mM, pH 8
Metanol	20 %, pH 8

Tabla 7.23. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Solución de fijación.

Reactivos	Concentración
Ácido sulfosalicílico	4 %
Ácido acético.	10 %

Tabla 7.24. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Solución de tñido.

Reactivos	Concentración
Azul brillante	0.25 %
Metanol	45 %
Ácido acético	10 %

Tabla 7.25. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Solución de desteñido.

Reactivos	Concentración
Metanol	5.0 %
Ácido acético	7.5 %

Tabla 7.26. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Solución de bloqueo.

Reactivos	Concentración
Tris	10 mM, pH 8.8
NaCl	0.15 M, 0.05 %
Tween 20	
Leche desnatada	5 %

** Solución para cada 100 cm² de membrana

Tabla 7.27. Soluciones para SDS-PAGE y Western Blot - Buffer III.

Reactivos	Concentración
Tris	100 mM, pH 9.5
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

ANEXO B. MÉTODOS

B1 Preparación de células competentes de E coli.

1. Inocular una colonia en 5 mL de medio LB (Anexo A1) e incubar a 37 °C en agitación a 250 rpm durante 16 h. Tomar 1 mL del preinóculo y agregar a 200 mL de medio de cultivo LB fresco.
2. Incubar en agitación en un matraz de 250 mL a 37°C siguiendo el crecimiento hasta alcanzar una OD_{550nm}= 0.50-0.55.
3. Transferir el cultivo a tubos Eppendorf de 50 mL estériles previamente enfriados en hielo.
Centrifugar los tubos a 3000 rpm durante 10 min a 4°C.
4. Decantar sobrenadante y resuspender suavemente el pellet celular en 5 ml de la solución R1 (Anexo A3.2) y dejar 20 min en hielo.
5. Centrifugar nuevamente a 3000 rpm durante 10 min a 4°C.
6. Decantar sobrenadante y resuspender suavemente el pellet celular en 2 mL de la solución R2 (Anexo A3.2).
7. Preparar tubos Eppendorf previamente congelados y agregar volúmenes de 200 µL de solución final poniéndolos inmediatamente en hielo.
8. Conservar las alícuotas a -70 °C hasta por 6 meses.

B2 Transformación de células competentes de E. coli por choque térmico

1. Descongelar en hielo un tubo Eppendorf con las células competentes.
2. Añadir 1 ng de DNA plasmídico o el total del ADN proveniente de una reacción de ligación.
3. Mezclar suavemente y dejar reposar en hielo durante 30 min
4. Aplique un shock térmico al incubar los tubos a 42 °C por 30-60 segundos e inmediatamente volver a reposar el tubo en hielo por 2 min. Añadir 1 mL de medio LB (Anexo A1) precalentado a 37 °C mezclando gentilmente e incubar las células durante 1 h a 37 °C siendo así 20 min estables y 40 min en agitación de 200 a 350 rpm.

5. Centrifugar la muestra por 30 segundos a 13,000 rpm.
6. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 100 μ L de medio LB estéril.
7. Sembrar la solución final en cajas Petri con medio LB y antibiótico¹.
8. Dejar incubar las placas a 37 °C por 16h para el crecimiento de colonias.

B3 Transformación de células de *Bacillus subtilis*.

1. Inocular una colina fresca directamente de placa en un tubo con 20 mL de medio A estéril (Anexo A3.3) con antibiótico e incubar durante 16 hrs a 27 °C estable.
2. Transferir el cultivo a un matraz de 250 mL e incubar a 37 °C en agitación a 250 rpm.
3. Tomar muestras de 1 mL para realizar y comprobar la cinética de crecimiento a una OD600 (se registran los valores hasta localizar el tiempo cero (t0), es el punto de intersección entre la línea de crecimiento exponencial (log) y el inicio de la fase estacionaria)
4. Se continúa la incubación durante 90 min después de haber cesado la fase logarítmica de crecimiento (t90).
5. Se tomarán 50 μ L de cultivo en 450 μ L de medio B (Anexo A3.3) en un tubo de vidrio estéril.
6. Se incubará en agitación vigorosa a 250 rpm durante 90 min más. En este punto las células son altamente competentes para su transformación.
7. Para transformar tomar 500 μ L de células competentes y adicionar 1 μ g de ADN plasmídico o el total de reacción de ligación.
8. Incubar los tubos Eppendorf durante 30 min a 37°C en agitación.
9. Sembrar la solución final en cajas Petri de medio solido LB con antibiótico².
10. Dejar incubar las placas a 37 °C por 2 días para el crecimiento de colonias.

¹ La concentración del antibiótico a utilizar dependerá del gen de resistencia revisto en la construcción. Revisar Anexo A3 para la cantidad de antibiótico a utilizar.

² La concentración del antibiótico a utilizar dependerá del gen de resistencia revisto en la construcción. Revisar Anexo A3 para la cantidad de antibiótico a utilizar.

B4 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina para bacterias Gram positivas.

Los siguientes pasos serán realizados dentro de una campana de flujo laminar totalmente limpia y estéril.

* Para bacterias Gram positivas se deberán tratar previamente las células con una solución de lisozima una concentración de 10 mg/mL.

1. Inocular colonias resultado de transformación o partir de un stock de 5 mL de medio LB (Anexo A1) e incubar 16 horas a 37 °C en agitación de 250 rpm.
2. Resuspender en 500 µL de EDTA a 50mM y agregar 100 µL de solución de lisozima (Anexo A3.4) e incubar por 60 min a 37°C
3. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min, desechar sobrenadante y resuspender en 500 µL de EDTA a 50mM.
4. Agregar proteinasa K a una concentración de 0.8 mg/mL e incubar 60 min a 37°C.
5. Descartar sobrenadante y dejar el pellet tan seco como sea posible.
6. Poner en Hielo el tubo con pellet y añadir 100 µL de solución de lisis I (Anexo A3.4)
7. Mezclar en vortex hasta resuspender la pastilla y dejar reposar en hielo.
8. Poner la muestra nuevamente en hielo y agregar 200 µL de solución de lisis II (Anexo A7) recién preparada y mezclar por inversión de 4-6 veces
9. Dejar la muestra en hielo y Adicionar 150 µL de solución de lisis III (Anexo A3.4) y mezclar por inversión
10. Dejar reposar la muestra en hielo por 5 minutos y centrifugar la muestra a 13,000rpm por 10 min a 4 °C y transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf estéril.
11. Añadir al tubo un volumen de 450 µL de fenol, mezclar en vortex y centrifugar a 13,000 rpm por 2 min a 4 °C.
12. Transferir la fase acuosa de la muestra a un tubo limpio y Precipitar el DNA plasmídico con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C.
13. Mezclar y dejar reposar 30 min.
14. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C.
15. Remover el sobrenadante por aspiración por pipeteo y colocar el tubo en posición invertida sobre un papel para remover el etanol.

16. Realizar 2 lavados a la muestra con etanol al 70 % en frío e Invertir el tubo dejando secar por evaporación a temperatura ambiente.
17. Resuspender el ADN plasmídico en 30µL de agua Milli-Q estéril.
18. Añadir 2 µL de RNAsa 20 µg/mL, incubar a 37°C durante 1 h.

B5 Extracción de DNA plasmídico por lisis alcalina para bacterias gram negativas

Los siguientes pasos serán realizados dentro de una campana de flujo laminar totalmente limpia y estéril.

1. Inocular colonia resultado de transformación o partir de un stock de 5 mL de medio LB (Anexo A1) e incubar 16 horas a 37 °C en agitación de 250 rpm.
2. Tomar un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL y agregar 1 mL de inóculo.
3. Centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm.
4. Desechar sobrenadante y repetir el paso anterior hasta obtener un pellet de células
5. Descartar sobrenadante y dejar el pellet tan seco como sea posible.
6. Poner en Hielo el tubo con pellet y añadir 100 µL de solución de lisis I (Anexo A3.5)
7. Mezclar en vortex hasta resuspender la pastilla y dejar reposar en hielo.
8. Poner la muestra nuevamente en hielo y agregar 200 µL de solución de lisis II (Anexo A3.5) recién preparada y mezclar por inversión de 4-6 veces
9. Dejar la muestra en hielo y Adicionar 150 µL de solución de lisis III (Anexo A3.5) y mezclar por inversión
10. Dejar reposar la muestra en hielo por 5 minutos.
11. Centrifugar la muestra a 13,000 rpm por 10 min a 4°C y transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf estéril.
12. Añadir al tubo un volumen de 450 µL de fenol, mezclar en vortex y centrifugar a 13,000 rpm por 2 min a 4 °C.
13. Transferir la fase acuosa de la muestra a un tubo limpio y Precipitar el DNA plasmídico con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20 °C.
14. Mezclar y dejar reposar 30 min.
15. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min a 4 °C.

16. Remover el sobrenadante por aspiración por pipeteo y colocar el tubo en posición invertida sobre un papel para remover el etanol.
17. Realizar 2 lavados a la muestra con etanol al 70 % en frío e invertir el tubo dejando secar por evaporación a temperatura ambiente.
18. Resuspender el ADN plasmídico en 30 μL de agua MilliQ estéril.
19. Añadir 2 μL de RNAsa 20 $\mu\text{g/mL}$, incubar a 37 °C durante 1 h.

B6 Amplificación de insertos utilizados por PCR

1. Colocar en un tubo Eppendorf de 200 μL la cantidad de 1 μL de ADN o muestra de colonia a corroborar.
2. Realizar una mezcla de reacción para cada muestra a un volumen final de 14 μL :

Tabla 7.28. Solución para reacción de PCR

Reactivo	Cantidad
Buffer 10X	1.5 μL
dNTP's mix 10Mm	1.5 μL
Oligonucleótido sentido (Fwd) 10 μM	0.6 μL
Oligonucleótido anti sentido (Rev) 10 μM	0.6 μL
H ₂ O libre de Nucleasas	10.5 μL
Taq Polimerasa	0.2 μL

*Agregar la Taq polimerasa justo antes de mezclar la reacción.

NOTA: Si se necesita preparar más de una reacción, preparar la mezcla de reacción multiplicada por el número de reacciones que se vayan a realizar.

3. Agregar la mezcla al tubo con DNA y dar un pulso en la centrifuga.

- Colocar en el tubo con la muestra dentro del termociclador y correr el programa con las condiciones correspondientes para el inserto.

B6.1 Condiciones de programa para termociclado de PCR

A continuación, se muestran las condiciones de termociclado de PCR para amplificación de inserto TET.

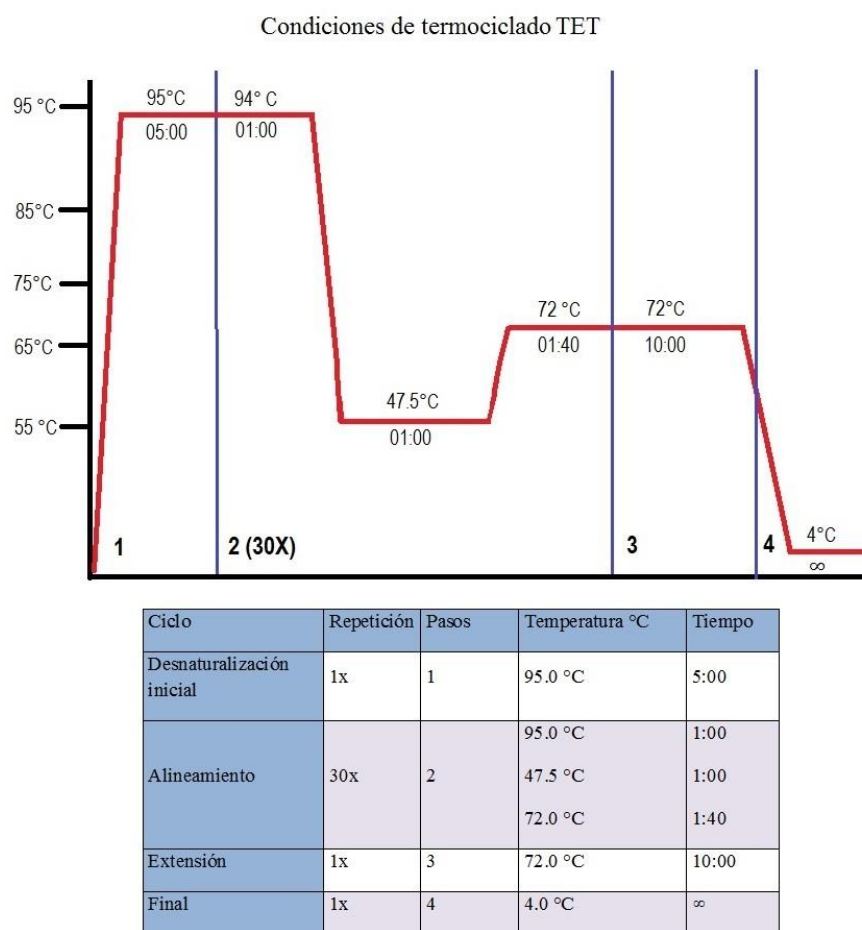
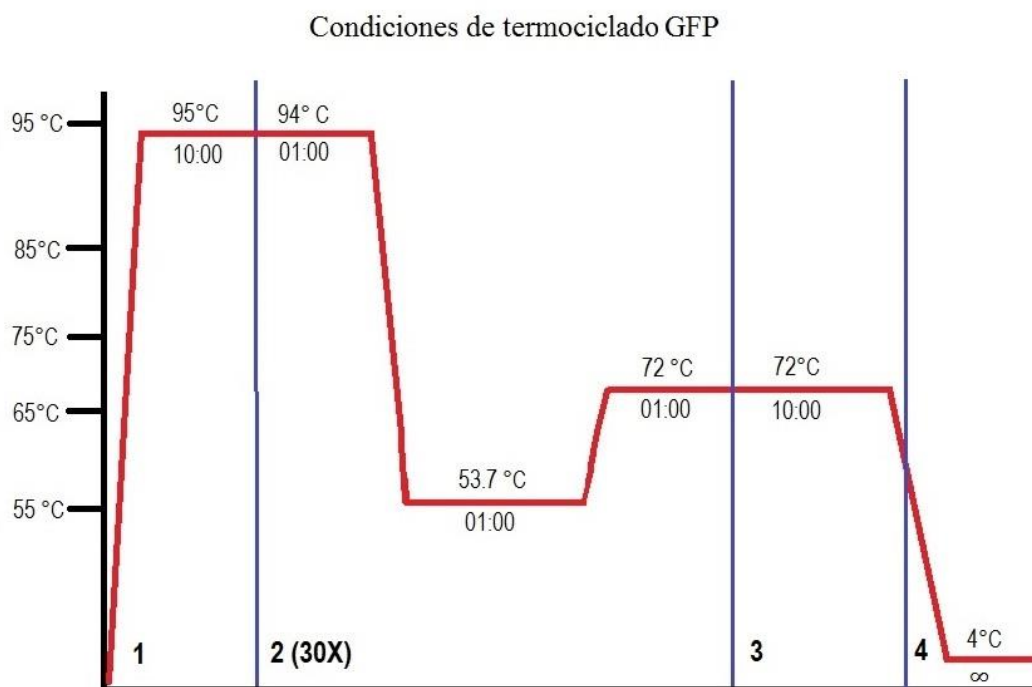


Figura 7.1. Condiciones de termociclado de PCR para amplificación de inserto TET.

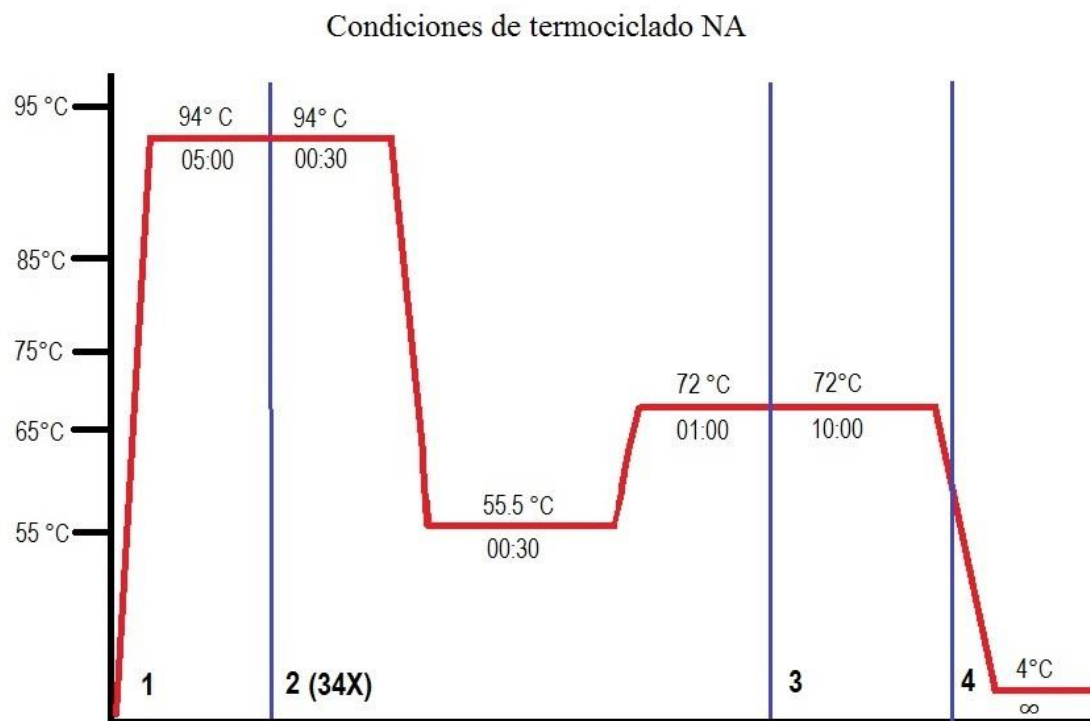
En la siguiente figura se ilustran las condiciones de termociclado de PCR para amplificación de inserto GFP.



Ciclo	Repetición	Pasos	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	1x	1	95.0 °C	10:00
Alineamiento	30x	2	94.0 °C	1:00
			53.7 °C	1:00
			72.0 °C	1:00
Extensión	1x	3	72.0 °C	10:00
Final	1x	4	4.0 °C	∞

Figura 7.2. Condiciones de termociclado de PCR para amplificación de inserto GFP.

En la figura 17, se muestran las condiciones de termociclado de PCR para amplificación de inserto NA.



Ciclo	Repetición	Pasos	Temperatura °C	Tiempo
Desnaturalización inicial	1x	1	94.0 °C	05:00
Alineamiento	34x	2	94.0 °C	00:30
			55.5 °C	0:30
			72.0 °C	1:00
Extensión	1x	3	72.0 °C	10:00
Final	1x	4	4.0 °C	∞

Figura 7.3. Condiciones de termociclado de PCR para amplificación de inserto NA.

B7 Protocolos

B7.1 Protocolo PAGE-SDS y Western Blot.

1. Preparar la solución del monómero para un gel de 7.5%. (Anexo A3.6)
2. Combine todos los reactivos excepto el TEMED.
3. Instalar el sistema y el TEMED al monómero mezclando suavemente.
4. Vacíe el gel al sistema evitando la formación de burbujas.
5. Dejar polimerizar de 10 a 20 min.
6. Si el gel es discontinuo retire el metanol y preparar la segunda solución del monómero
7. Coloque el peine y vacíe el gel hasta llenar los espacios vacíos entre los dientes.
8. Deje polimerizar de 30 a 45 min.
9. Enjuague los pocillos con agua destilada y monte los geles en la cámara de electroforesis.
10. Llenar las cámaras con buffer (1X)
11. Coloque las muestras pre-desnaturalizadas a 3/4 de muestra + 1/4 de buffer de disociación en ebullición 10 min. en los pocillos correspondientes.
12. Cerrar la cámara de electroforesis y conectarla a la fuente de poder ajustando el voltaje a 100v.
13. Detener el voltaje hasta que el azul del buffer de disociación salga del gel.
14. Retire el gel de la cámara y desmóntelo.
15. 16. Si se va a transferir a membrana seguir con el protocolo correspondiente, de lo contrario para teñir, fijar con la solución de fijación por 1 h a temperatura ambiente y en agitación.
16. Para desteñir enjuague el gel con agua destilada y sumerja el gel en solución de desteñido hasta visualizar las bandas.
17. Para preservar los geles ponerlos en bolsas plásticas selladas con calor o deshidrate.

B7.2 Para transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.

1. Preparar buffer de transferencia (Anexo A3.6) y almacenar previamente a 4 °C
2. Después de la electroforesis, enjuagar el gel con buffer de transferencia para eliminar las sales y detergentes del buffer de electroforesis.
3. Corte la membrana del mismo tamaño del gel
4. Poner la membrana en buffer de transferencia durante 10 a 15 min.
5. Cortar papel de 3 milímetros del mismo tamaño que el gel y saturarlo en el buffer de transferencia, así como los soportes de la fibra evitando la formación de burbujas.
6. Instale el electrodo del aparato en la cámara de electroforesis y llene el tanque con el buffer de transferencia.
7. En el casete de transferencia coloque la fibra del lado oscuro.
8. Coloque cuatro papeles 3 mm en buffer de transferencia evitando la formación de burbujas.
9. Coloque el gel sobre el papel y humedezca el gel con buffer de transferencia
10. Coloque la membrana sin atrapar burbujas y deslice las burbujas con la ayuda de un tubo de vidrio.
11. Cierre la cámara de electroforesis y ajuste el voltaje a 100 V, 250 mA para tiempo de 1h.

B7.3 Protocolo para visualización inmunológica.

1. Colocar la membrana en un recipiente pequeño adicionando 25 mL de solución de bloqueo (Anexo A3.6).
2. Incubar 1 h a temperatura ambiente en agitación.
3. Lavar la membrana y diluir el primer anticuerpo
4. Introducir la membrana e incubar 1 h a 37 °C o 2 h temperatura ambiente
5. con agitación suave.
6. Lavar la membrana con buffer.
7. Diluir el segundo anticuerpo.
8. Introducir la membrana e incubar 1 h a 37 °C o 2 h a temperatura ambiente en agitación.
9. Lavar la membrana con el mismo volumen de buffer III (Anexo A3.6).
10. Incube a temperatura ambiente y en oscuridad hasta el desarrollo del color.

11. Para detener la reacción enjuague con agua destilada.