



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño

Campus Ensenada



TESIS:

**“Expresión y purificación de la proteína de cápside
del virus del mosaico del bromo”**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOINGENIERA

Por:

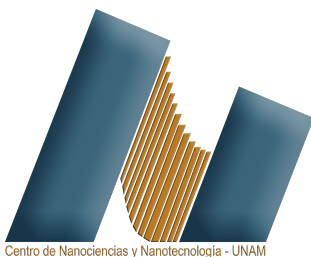
Ilse Vidriales Saucedo

Director de tesis:

Dr. Andres Zarate Romero

Codirector de tesis:

Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo



Ensenada, Baja California a noviembre de 2022


Expresión y purificación de la proteína de cápside del virus del mosaico del bromo


TESIS


PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIOINGENIERO

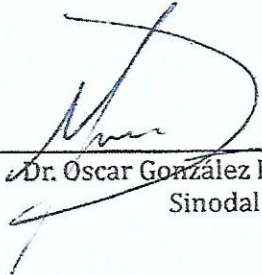
PRESENTA:
ILSE VIDRIALES SAUCEDO


Aprobada por:


Dr. Andrés Zárate Romero
Director


Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo
Codirector


Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Sinodal


Dr. Oscar González Davis
Sinodal


Dr. Gerardo Salvador Romo Cárdenas
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

A MI MADRE Y HERMANAS

En primer lugar les agradezco a mi madre Esther Saucedo y a mis hermanas, Itzel e Isela, quienes a lo largo de mi vida siempre me han brindado su cariño y apoyo para poder cumplir mis objetivos personales y académicos respetando mis ideas y decisiones. También por haberme brindado el soporte material y económico para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos.

A MI DIRECTOR Y CODIRECTOR DE TESIS

A mi director de tesis, el Dr. Andres Zarate Romero, y mi codirector, el Dr. Dante Alberto Magdaleno Moncayo, por su dedicación y paciencia, quienes a lo largo todo el tiempo de conocernos han puesto a prueba mis capacidades y conocimientos, apoyándome en mi formación académica, muchas gracias por su guía y consejos, los cuales llevaré grabados para siempre en mi memoria.

A mis sinodales, la Dra. Claudia Gomez Gutierrez, el Dr. Gerardo Salvador Romo Cárdenas y Dr. Oscar González Davis, por su tiempo y valiosos comentarios, así como también por formar parte de mi desarrollo profesional compartiendo sus conocimientos y consejos.

A mis profesores, a todos los docentes que han sido parte de mi camino universitario, muchas gracias por transmitirme sus conocimientos y consejos, instruyéndome en áreas tan diversas e interesantes, gracias a ustedes pude comprender conceptos muy importantes para mi desarrollo profesional.

Gracias a mi Universidad, UABC, que me ha permitido aprender y crecer como persona, así como a cada directivo por su trabajo y por su gestión.

Al Centro de Nanociencias y Nanotecnología de la UNAM, por facilitarme sus instalaciones durante la realización de este proyecto de tesis.

Al Departamento de Bionanotecnología del CNyN, a cada uno de los compañeros que estuvieron presentes durante la realización de mi proyecto, por apoyarme y enseñarme.

A Itandehui Betanzo, por su apoyo como técnico de laboratorio.

A la Dra. Maria Veronica Villagrana Escareño por su apoyo y orientación durante la caracterización de las VLPs por TEM.

A mis amigas, Carolina Flores, Hilda Navarrete, Yessica Vargas y Dacia Manriquez, ustedes hicieron que el ambiente en la universidad fuera relajado, familiar y más divertido, gracias por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas.

A mis compañeros de generación, por su amistad.

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN	5
SUMMARY	6
INTRODUCCIÓN	7
I. ANTECEDENTES	8
II. JUSTIFICACIÓN	13
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS DE LA TESIS	14
1. Objetivo general	14
2. Objetivos específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	14
I. Materiales	14
1. Cepas	14
2. Vectores	14
3. Reactivos	14
4. Medios de cultivo	16
II. Métodos	16
1. Extracción de plásmido	16
2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	17
3. Purificación de PCR	18
4. Ligación del gen en plásmido	18
5. Secuenciación	18
6. Preparación de células competentes y transformación de cepas	19
7. Electroforesis en gel de Agarosa (1%)	20
8. Expresión de BMV en <i>P. pastoris</i>	20
9. Purificación de BMV	20
10. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford	21
11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE)	22
12. Encapsidación	23
13. Caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS)	23
14. Microscopía Electrónica de Transmisión	23

<u>RESULTADOS</u>	<u>23</u>
<u>1. Obtención y amplificación del gen de la proteína BMV</u>	<u>23</u>
<u>2. Ligación del gen BMV a los plásmidos y transformación en XLI-Blue</u>	<u>24</u>
<u>3. Extracción de plásmido y transformación en X-33</u>	<u>26</u>
<u>4. Expresión y purificación de la proteína BMV</u>	<u>28</u>
<u>5. Formación de nanopartículas tipo virus</u>	<u>35</u>
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>37</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>43</u>
<u>CITAS Y REFERENCIAS</u>	<u>44</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>50</u>

RESUMEN

Las partículas tipo virus (VLPs por sus siglas en inglés) son estructuras proteicas que se han utilizado en las últimas décadas para el ensamblaje de nanoreactores y como nanovehículos para la entrega de diversas moléculas como fármacos, vacunas y material genético. Las nanopartículas basadas en el virus del mosaico del bromo se autoensamblan a partir de las proteínas de la cápside bajo ciertas condiciones de pH y fuerza iónica, siempre que el cargo tenga una carga superficial negativa. Esta proteína tiene gran versatilidad de reensamblarse; se ha probado su capacidad para la carga de fármacos hidrofóbicos, diversos ARNs, enzimas y otras nanopartículas como oro, plata, etc. La cápside provee protección a su cargamento ante la degradación por proteasas y tiene además la ventaja de ser poco inmunogénica lo que permite la administración de distintas moléculas en células animales sin generar una respuesta inmune en el organismo. Dichas propiedades hacen que la cápside de BMV sea una herramienta con múltiples aplicaciones. El BMV es un virus que infecta plantas, por ende, su obtención se realiza mediante la purificación a partir de hojas de cebada infectadas, además de que se han logrado generar mutantes mediante la transformación de plantas con *Agrobacterium tumefaciens*. Ambos métodos requieren la producción del virus en las plantas y su posterior purificación, lo que implica períodos relativamente largos para el crecimiento de las plantas y la necesidad de un invernadero.

En este trabajo, se expresó la proteína de cápside de BMV en *Pichia pastoris* X-33, una levadura utilizada ampliamente como modelo para la expresión de distintas proteínas, incluyendo algunas virales. Mediante la inducción de la expresión con metanol y el uso de técnicas cromatográficas se logró purificar la proteína y se demostró su capacidad para el ensamblaje de viriones utilizando el RNA del virus nativo. A pesar de que aún se deben optimizar los protocolos de expresión para mejorar el rendimiento, este proyecto representa una oportunidad al demostrar que *P. pastoris* puede usarse como un sistema de expresión adecuado para la producción de la proteína de cápside del BMV, lo que puede facilitar además la producción de mutantes para incrementar las aplicaciones biotecnológicas de las VLP basadas en BMV.

Palabras clave: *Virus del mosaico del bromo (BMV)*, *VLPs*, *cápside viral*, *proteínas recombinantes*, *Pichia pastoris*, *encapsidación*.

SUMMARY

Virus-like particles (VLPs) are protein structures that have been used in recent decades for the assembly of nanoreactors and as nanovehicles for the delivery of various molecules such as drugs, vaccines, and genetic material. Brome mosaic virus-based nanoparticles self-assemble from capsid proteins under certain pH and ionic strength conditions, provided the cargo has a negative surface charge. This protein has great versatility to reassemble, it has been tested for its ability to load hydrophobic drugs, various RNAs, enzymes, as well as other nanoparticles such as gold, silver, etc. The capsid provides protection to its cargo from degradation by proteases and has the advantage of not being very immunogenic, which allows the administration of different molecules in animal cells without generating an immune response in the organism. These properties make the BMV capsid a tool with multiple applications. BMV is a plant-infecting virus, so it can be obtained by purification from infected barley leaves and mutants have been generated by transforming plants with *Agrobacterium tumefaciens*. Both methods require the production of the virus in plants and its subsequent purification, which implies relatively long periods for plant growth and the need for a greenhouse.

In this work, the BMV capsid protein was expressed in *Pichia pastoris* X-33 a yeast widely used as a model for the expression of different proteins, including some viral ones. By inducing expression with methanol and using chromatographic techniques, the protein was purified and its ability to assemble virions using native virus RNA was demonstrated. Although expression protocols still need to be optimized to improve yield, this project represents an opportunity by demonstrating that *P. pastoris* can be used as a suitable expression system for the production of BMV capsid protein, which can also facilitate the production of mutants to increase the biotechnological applications of BMV-based VLPs.

Keywords: *Brome Mosaic Virus (BMV)*, *VLPs*, *viral capsid*, *recombinant proteins*, *Pichia pastoris*, *encapsidation*.

INTRODUCCIÓN

El término nanotecnología se utiliza para describir la ciencia e ingeniería implicadas en el diseño, síntesis, caracterización y aplicación de materiales y dispositivos cuyo desarrollo se lleva a cabo en dimensiones de aproximadamente 1 a 100 nm, para crear materiales con un enorme potencial de aplicación en varias áreas, que van desde la médica hasta la electrónica. En medicina, promete revolucionar la administración de fármacos, la terapia génica, el diagnóstico y muchas áreas de investigación, desarrollo y aplicación clínica (Pavlovic, Mayfield y Balint, 2013; Saini, Saini y Sharma, 2010).

La administración dirigida de fármacos se refiere a la acumulación selectiva y cuantitativa de medicamentos en cierta zona del cuerpo, este concepto implica un comportamiento coordinado de tres componentes: el fármaco, una estructura diana y el vehículo farmacéutico (Torchilin, 2000).

Los nanovehículos son moléculas artificiales que encapsulan los fármacos o por los que circula el medicamento; estos tienen la capacidad de atravesar capilares, poros y membranas celulares sirviendo como escudos para proteger los medicamentos de degradación o de interacciones desnaturalizantes que pudieran darse en el ambiente biológico. En ellos se cargan las moléculas que pueden ser azúcares, péptidos, proteínas o genes, para que sean reconocidos específicamente por células, tejidos u órganos enfermos (Salgado, 2016).

Algunos de los nanovehículos desarrollados para el suministro intracelular de proteínas son los liposomas, polímeros, nanotubos de carbono, nanopartículas de oro, nanopartículas de sílice y puntos cuánticos, y las nanopartículas proteicas tipo virus como una alternativa para la administración de fármacos (Gu et al., 2011; Sánchez et al., 2015).

Las partículas tipo virus (VLPs) son un subconjunto de nanopartículas virales (VNP) que carecen de material genético viral y se ensamblan espontáneamente a partir de proteínas estructurales del virus las cuales tienen varias características peculiares como dimensiones adecuadas para aplicaciones a nanoescala, capacidad de autoensamblaje, homogeneidad de tamaño, robustez intrínseca, gran relación superficie/masa y una organización macromolecular definida, repetitiva y simétrica, estas proteínas se pueden obtener ya sea a partir de infecciones de los virus en sus huéspedes o por sistemas de expresión heterólogos como *Escherichia coli*, levaduras, plantas y células de mamíferos o insectos (Hema et al., 2016).

Las VLPs, de manera general, se utilizan en diversas aplicaciones biomédicas como la administración dirigida de medicamentos, la imagenología médica, producción de vacunas y biosensores. Desde su descubrimiento, se han usado para la administración de enzimas, la administración de antígenos y como suplementos

proteicos. También se han utilizado como nanovehículo para la activación enzimática de tamoxifeno en células tumorales, las enzimas encapsuladas en cápsides virales han tenido resultados relevantes en el tratamiento de la deficiencia enzimática y para la administración a un sitio objetivo. Asimismo, también se han encapsulado antígenos y anticuerpos para su entrega dirigida y controlada (Jeevanandam, Pal y Danquah, 2018; Sánchez et al., 2015).

En los últimos años, se han explorado cada vez más las aplicaciones de las VLPs a base de virus vegetales, denominadas PVN, como las basadas en el virus del mosaico del bromo (BMV), el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), el virus del mosaico del caupí (CPMV), el virus del mosaico del tabaco (TMV) y el virus de la papa X (PVX), sobre todo para su uso en biomedicina, debido a cuestiones de bioseguridad y producción, por su naturaleza no infecciosa, biocompatible y biodegradable, tanto en humanos como en otros mamíferos, además del gran intervalo de tamaños, alto grado de simetría, polivalencia, estabilidad en un amplio intervalo de pH y temperatura, así como su eficiente producción y escalabilidad (Hema et al., 2019).

El trabajo realizado en esta tesis está enfocado en la expresión, purificación y ensamblaje de la proteína de cápside del BMV en la cepa X-33 de *P. pastoris*.

I. ANTECEDENTES

1. BMV

El BMV es miembro de la familia *bromoviridae* y del género *bromovirus*, el cual infecta a muchas especies de gramíneas y puede transmitirse mecánicamente o por varios vectores. Consiste en un genoma tripartito de ssRNA y la proteína de cápside (CP por sus siglas en inglés) separadas en partículas icosaédricas con simetría T=3, compuesta por 180 subunidades de 189 residuos (19.4 kDa) que forman un virión de aproximadamente 28 nm de diámetro (Lucas, Larson y McPherson, 2002; Choi et al., 2000; Kao et al, 2011).

El genoma de BMV consta de tres ARN genómicos: ARN1 (3.2 kb), que codifica una proteína con las funciones de cobertura y de tipo helicasa necesarias para la replicación del ARN, ARN2 (2.8 kb), que codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN, y ARN3 (2.1 kb) que codifica la proteína de movimiento requerida para la propagación célula a célula y la proteína de cápside, así como un ARN subgenómico 4 (0.8 kb) transcrito del ARN3 de cadena negativa y el cual se traduce a la proteína de cápside. Los ARNs 1 y 2 se encuentran de forma individual en los viriones, mientras que los ARNs 3 y 4 se encuentran empaquetados juntos.

La proteína de cápside se organiza en tres subunidades que asumen un número igual de conformaciones distintas A, B o C (**Figura 1**), cada subunidad contiene un brazo N-terminal largo rico en residuos básicos (altamente cargado positivamente) y

un dominio globular que permite que las subunidades se interdigiten a través de sus extremos C-terminales (**Figura 1**). Se ha reconocido que la interacción entre estos extremos es esencial para la formación de dímeros de CP (Calhoun et al., 2007; Lucas, Larson y McPherson, 2002; Kao et al., 2011).

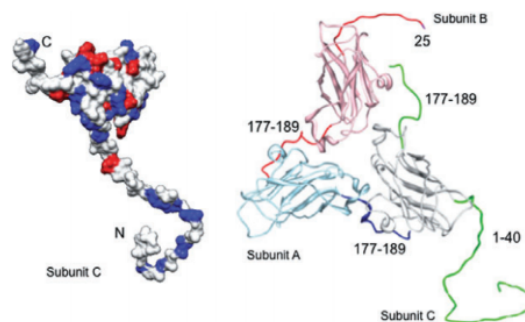


Figura 1. Estructuras del monómero y el trímero asimétrico de la proteína cápside del BMV.

El monómero muestra una representación de superficie en la que los residuos cargados positivamente están en azul y los residuos cargados negativamente están en rojo. El trímero con los tres conformadores A, B y C ilustra las ubicaciones de los extremos N y C que forman la cápside (Kao et al., 2011; Lucas et al., 2002).

Esta flexibilidad del brazo N-terminal es de gran importancia ya que proporciona un mecanismo para mejorar la probabilidad de interacción entre proteína y ARN (Choi et al., 2000). El gran número de residuos básicos dentro de los primeros 25 aminoácidos N-terminales (N-ARM), 7 argininas y 1 lisina, sugiere que la interacción entre los grupos fosfato negativos en el ARN y los aminoácidos básicos positivos son importantes en el reconocimiento de ARN durante la encapsidación *in vivo*. Los residuos básicos en el N-ARM han demostrado claramente que son esenciales para el ensamblaje del virión, para la integridad del virión y una serie de otras propiedades estructurales y fisiológicas, sin embargo estos no son visibles en el mapa de densidad electrónica determinado por criomicroscopía ya que son internos e interactúan con el ARN (Choi et al., 2000; Calhoun et al., 2007; Janda y Ahlquist, 1993).

La mayoría de la evidencia fisicoquímica sugiere que solo hay interacciones débiles en la cápside entre subunidades de proteínas individuales y entre grupos de subunidades capsoméricas. El mecanismo para el ensamblaje de BMV se basa en las interacciones cápside-ARN, donde el ARN se pliega de manera independiente en una estructura central más o menos esférica, como consecuencia de interacciones de ácido nucleico y la cubierta de proteína se forma a su alrededor utilizando interacciones electrostáticas no específicas para impulsar el ensamblaje, las cuales involucran los polipéptidos amino terminales cargados positivamente y las masas preformadas de ARN cargado negativamente (Berena et al., 2020; Janda y Ahlquist, 1993; Lucas, Larson y McPherson, 2002).

El BMV tiene un diámetro de aproximadamente 28 nm en estado nativo a pH bajo (<6.0), pero experimenta una transición estructural profunda a medida que el pH se acerca a la neutralidad, la cual puede ser reversible. El ion Mg^{2+} ayuda a estabilizar

el virión nativo a un pH mayor a 6, pero no evita la transición. En condiciones de alta sal y pH neutro, el virión pierde su ARN y se disocia en productos proteicos; existe evidencia de que las cápsides disociadas finalmente producen dímeros en solución. Se ha visto de manera práctica que las interacciones proteína-proteína a través de los ejes de la diada icosaédrica también son extensas. Además, la proteína se puede reensamblar bajo condiciones definidas en una variedad de formas, que incluyen icosaedros T=3 y T=1 vacíos (Lucas, Larson y McPherson, 2002).

El virión BMV también puede formar una partícula pseudo T=2 cuando el ARN de BMV está ausente, lo que sugiere que tienen un mecanismo para formar partículas inmaduras premontadas hasta que el ARN pueda encapsidarse (Sullivan y Ahlquist, 1999).

Los viriones de BMV y CCMV estuvieron entre los primeros virus esféricos que se reconstituyeron *in vitro*. El ensamblaje *in vitro* generalmente se lleva a cabo mediante diálisis de una mezcla de CPs disociadas y ARN (o algún material central), comenzando desde un tampón con alto contenido de sal a un tampón con bajo contenido de sal a pH neutro. Las CPs de BMV disociadas *in vitro* pueden reensamblarse alrededor de los ARN de virus no relacionados, ARN homopoliméricos sintéticos e incluso polianiones de ácido no nucleico (Berena et al., 2020; Kao et al., 2011).

Se pueden agregar materiales extraños al exterior de la cápside o a la cámara interna de la cubierta de la cápside, reemplazando el ARN genómico viral con material extraño. La capacidad de BMV CP para autoensamblarse alrededor de materiales extraños tiene el potencial de aplicaciones en nanotecnología y biomedicina (Kao et al., 2011).

2. Uso del BMV como nanovehículos

Debido a su fácil producción, manejo y estructura simple, los virus vegetales son atractivos para algunas aplicaciones biomédicas. Las VLPs de BMV se han propuesto como plataformas para la administración de fármacos en diferentes terapias, como agentes de diagnóstico para el cáncer, como agentes de contraste de resonancia magnética *in vivo*, para el desarrollo de sondas luminiscentes de alto rendimiento y biosensores (Hema et al., 2019; Kao et al., 2011; Nuñez et al., 2020).

Bajo ciertas condiciones de temperatura, fuerza iónica y pH, la proteína es capaz de encapsidar moléculas aniónicas, como ARNs heterólogos (Nuñez et al., 2020), enzimas, fármacos o nanopartículas de oro funcionalizadas (Chen et al., 2006). Se ha demostrado su uso como nanoportador para transportar y administrar siRNA (ARN interferente pequeño), el cual es una molécula terapéutica prometedora para abordar la sobreexpresión o mutaciones genéticas para varias afecciones patológicas como infecciones virales, cáncer, trastornos genéticos y trastornos autoinmunes (Nuñez et al., 2020).

Debido a la presencia de nueve motivos hidrofóbicos en la cápside viral del BMV, se ha demostrado que son un buen sistema para ser utilizadas como nanovehículos de moléculas hidrofóbicas de interés terapéutico, como el tamoxifeno (Pérez-Sánchez, 2017).

Además de su capacidad de encapsidación, las características que se han reportado sobre los virus de plantas, como la incapacidad de infectar huéspedes humanos o animales, hacen que sea una alternativa con un mayor nivel de bioseguridad para su aplicación en biomedicina. La toxicidad de las cápsides de BMV ha sido evaluada en células tumorales de mama, así como la respuesta inmune potencial *in vitro* en la línea celular RAW 264.7-blue de macrófagos, en donde, incluso a altas concentraciones de virus, no se provocó ningún efecto citotóxico en las células y casi no mostraron respuesta inmunogénica (Nuñez et al., 2020).

Estudios preclínicos han demostrado que las VLP obtenidas de la planta se pueden administrar a dosis de hasta 100 mg (1016 VLP) por kg de peso corporal sin toxicidad clínica, lo que hace que los virus sean excelentes y biocompatibles candidatos a nanoportadores. Con todos estos ejemplos se muestra cómo las nanopartículas virales vegetales ofrecen una multitud de aplicaciones biotecnológicas, apareciendo opciones novedosas cada año gracias al constante desarrollo de esta tecnología (Yildiz, et al., 2012).

3. **Sistemas de expresión utilizados para la obtención de BMV**

Entre los sistemas de expresión que se han descrito hasta ahora, para la producción de VLPs basadas en BMV, se encuentran la cebada (*Hordeum vulgare*, su anfitrión natural), varios *Chenopodium spp*, variedades púrpuras y verdes de *C. hybridum*, trigo y *Nicotiana benthamiana* (Beren et al., 2020; Chaturvedi y Rao, 2018; Yildiz et al., 2012).

El mecanismo general para la producción de las VLPs de BMV es a través de la agroinfiltración. Para agroinfiltrar *N. benthamiana* se inocula la cepa de *Agrobacterium* que contiene el transformante deseado y se incuba hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 1.0, las bacterias se centrifugan, el sedimento se resuspende y se infiltra luego en la superficie abaxial (posterior) de una hoja de la planta *Nicotiana benthamiana* de cuatro semanas de edad. La expresión del gen de interés puede analizarse de 2 a 6 días después de la filtración, las hojas se cosechan y se purifican (Annamalai y Rao, 2006; Calhoun, Speir y Rao, 2007).

En un estudio realizado por Yildiz et al. (2012) para la producción de BMV se obtuvieron rendimientos típicos de 0.5 mg de cBMV por gramo de hoja infectada de *N. benthamiana* después de 10 días de crecimiento (Yildiz et al., 2012).

Además del sistema de expresión basado en plantas, *E. coli* y la expresión heteróloga basada en baculovirus son los sistemas más utilizados para la producción de VLPs de otros virus, sin embargo, estos tienen limitaciones. Algunas desventajas de la expresión basada en plantas son que la generación de plantas transgénicas lleva mucho tiempo, requiere experiencia especial y los niveles de expresión tienden a ser bajos; la expresión basada en *E. coli* a menudo da como resultado proteínas que no se autoensamblan o que son insolubles y la expresión basada en baculovirus es laboriosa y costosa (Brumfield et al., 2004; Schneemann y Young, 2003; Strugala et al., 2021).

El sistema *P. pastoris* ofrece una alternativa atractiva para la expresión de VLP, se basa en una célula eucariota, es fácil de manipular y expresa altos niveles de proteína. Se ha investigado la capacidad de este sistema para la producción de diversas proteínas virales, entre ellas el CCMV (Brumfield et al., 2004).

4. Expresión de proteínas en *P. pastoris*

Pichia pastoris es una levadura muy utilizada actualmente como sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes debido a su fácil manipulación genética, a los altos niveles de producción de la proteína de interés tanto intra como extracelular y por su habilidad para realizar modificaciones postraduccionales similares a las de los organismos eucariontes superiores (glicosilación, puentes disulfuro y procesado proteolítico). Se ha utilizado para la producción de una amplia variedad de enzimas y proteínas importantes, algunas de las cuales han obtenido la aprobación para uso humano de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para su uso terapéutico y en biofarmacéutica (Juturu y Wu, 2017; Viader-Salvadó y Guerrero-Olazarán, 2011).

P. pastoris se ha utilizado como sistema heterólogo para la producción de la proteína del virus del papiloma humano HPV16 L1 (Mariz et al., 2015), también se demostró su viabilidad para la expresión del gen L1 de tipo silvestre de diferentes tipos de virus del papiloma humano (tipos 16, 18 y 33) (Coimbra et al., 2011). En otro estudio se logró la producción de una proteína quimérica L1/L2 del virus del papiloma humano 16 para la producción de una vacuna recombinante, los resultados de ELISA para la detección del anticuerpo L1-HPV-16 y el anticuerpo L2-HPV-16 mostraron una reacción positiva que mostró una sensibilidad similar con el kit de prueba comercial (Sanchooli et al., 2018).

Se ha logrado la expresión secretada de la proteína de la cápside truncada del circovirus porcino tipo 2 (PCV2) en la cepa de *P. pastoris* GS115, con una producción máxima de 250 µg/mL. La prueba de anticuerpos en suero demostró que la tCap que ayuda a los adyuvantes indujo un aumento significativo del anticuerpo PCV2-Cap específico con el tiempo en ratones y un nivel de anticuerpos similar en cerdos en comparación con una vacuna comercial de subunidad basada en Cap (Chen et al., 2016). En otro estudio se logró obtener la producción secretora de esta

misma proteína y se evaluó su actividad funcional con respecto a sus propiedades antigénicas, en este caso, la cuantificación total de proteínas obtenidas en el sobrenadante fue de 140 g/mL (Silva et al., 2014).

Se demostró la producción e inmunogenicidad en ratones de la Proteína viral 2 (VP2) del parvovirus porcino (PPV), como candidata para su uso como vacuna subunitaria para la prevención y control de la enfermedad asociada con la infección por PPV en cerdos, alcanzando niveles de expresión altos (hasta 595,76 mg/L) (Guo, Zhong y Huang, 2014).

Se logró la clonación y expresión de la proteína de la cápside VP60 del virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV), el producto recombinante era antigénicamente similar a la proteína de la cápside nativa, con un nivel de expresión de aproximadamente 1.5 g/L (Farnós et al., 2005). También se clonó el gen VP60 sin señal de secreción bajo el control transcripcional del promotor de levadura AOX1, el antígeno se obtuvo de manera intracelular y soluble a aproximadamente 480 mg/L, con un perfil similar al de viriones auténticos, convirtiéndose en un candidato valioso para la implementación racional de una vacuna subunitaria escalable de bajo costo contra el RHDV (Farnós et al., 2009).

Por otra parte, se ha logrado la expresión de la proteína de recubrimiento del virus CCMV, la cual se había producido anteriormente en *E. coli* obteniéndose de manera insoluble y no ensamblada (Zhao et al., 1995). En este caso la expresión basada en fermentación de *P. pastoris* se realizó de forma silvestre y mutantes bajo el control de un promotor inducible por metanol, resultando en la expresión de proteína de recubrimiento soluble y el ensamblaje de VLP, con rendimientos variados de 0.05 a 0.5 mg/g de masa celular húmeda (Brumfield et al., 2004). En otro estudio se logró la producción de la CP de CCMV a partir del cultivo de una cepa recombinante de *P. pastoris* inducida con metanol, así como el autoensamblaje *in vitro* de las CPs para encapsular nanopartículas de rutenio (Ru), obteniendo en este caso un rendimiento mayor de 95 mg/L de PC activas en el sobrenadante con una pureza superior al 90% (Zhu et al., 2020).

II. JUSTIFICACIÓN

Las nanopartículas tipo virus derivadas de virus de plantas están ganando cada vez más importancia en el ámbito de la biomedicina, debido a su naturaleza no infecciosa y biocompatibilidad con humanos y otros mamíferos, al mismo tiempo que muestran un gran potencial para su aplicación como nanovehículos para la administración dirigida de fármacos.

La producción de la proteína de capa de BMV, a través del uso de *P. pastoris* como sistema de producción heterólogo, sería útil como un método alternativo de producción para la cápside viral con un gran potencial debido a la alta tasa de

crecimiento y a los altos niveles de expresión en la cepa elegida, lo que permitiría optimizar los tiempos de producción de VLPs de BMV.

III. HIPÓTESIS

La cepa X-33 de *P. pastoris* funcionará como un sistema de expresión eficiente para la obtención de la proteína de cápside viral de BMV.

IV. OBJETIVOS DE LA TESIS

1. Objetivo general

Ensamblar nanopartículas tipo virus utilizando la proteína de cápside del virus del mosaico de Bromo expresada en la cepa X-33 de *P. pastoris*.

2. Objetivos específicos

1. Amplificar el gen que codifica para la proteína de capa de BMV y clonarlo en el vector de expresión pPICZ α A.
2. Transformar la cepa X-33 de *P. pastoris* con las construcciones obtenidas.
3. Realizar ensayos de expresión en las transformantes obtenidas.
4. Establecer un protocolo de purificación para la proteína de cápside del BMV.
5. Evaluar la capacidad de la proteína purificada para ensamblar VLPs.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Materiales

1. Cepas

Para los experimentos de transformación y extracción de plásmido, tanto con pJET como en pPICZ α A, se utilizó la cepa de *E. coli* XL1-Blue, mientras que para la transformación final con pPICZ α A se utilizó la cepa X-33 de *P. pastoris*.

La cepa de *E. coli* XL1-Blue se cultivó en medio Luria-Bertani (LB) a 37°C. La cepa *P. pastoris* X-33 se cultivó a 30°C en medio Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD).

2. Vectores

El vector pJET 1.2 (ThermoFisher Scientific), se utilizó para la clonación directa de los productos de PCR del gen de interés, este vector posee un tamaño de ~3000 pb y codifica un gen que confiere resistencia a ampicilina.

El vector pPICZ α A (ThermoFisher Scientific) se utilizó para la clonación final del gen y para la inserción en el genoma de *P. pastoris*, este vector posee un tamaño de aproximadamente 3600 pb y codifica además para un gen que confiere resistencia a zeocina.

3. Reactivos

La Q5 ADN polimerasa y las enzimas de restricción utilizadas para la digestión de DNA plasmídico (*Bam*HI, *Not*I HF, *Eco*RI HF, *Xho*I y *Xba*I) fueron adquiridas de New England BioLabs. La enzima de restricción *Bg*II, así como la T4 ADN Ligasa, PCR Master Mix (2X), dNTP Mix y Albúmina de Suero Bovino (BSA) fueron adquiridas de Thermo Fisher Scientific. Las condiciones utilizadas para las reacciones con las enzimas de restricción se encuentran en la Tabla 1.

Se utilizó el marcador Blue/Orange Loading Dye 6X de Promega para cargar las muestras de ADN en los geles de agarosa para electroforesis.

Para monitorear el peso molecular de proteínas se utilizó ColorPlus Prestained Protein Marker con tamaños de 7-175 kDa (contiene proteínas de 7, 17, 23, 30, 46, 58, 80 y 175 kDa) de New England BioLabs.

Los oligonucleótidos utilizados en la tesis se mandaron sintetizar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM y se muestran en la Tabla 2.

Se utilizó ampicilina (Científica Senna), zeocina (Invitrogen), YNB (Takara bio), biotina (Thermo Scientific), glicerol (Fermont) y el resto de las sales, ácidos, bases y compuestos orgánicos procedían de Sigma Co., SIGMA-ALDRICH o de Merck.

Los reactivos para medios de cultivo, triptona, extracto de levadura, peptona y agar, así como la agarosa procedían de Difco Laboratories.

Tabla 1. Enzimas de restricción

Nombre	T° de digestión	Tiempo de digestión	T° de inactivación	Tiempo de inactivación	Proveedor
<i>Bam</i> HI	37 °C	30 min	65 °C	20 min	NEB
<i>Not</i> I HF	37 °C	Toda la noche	65 °C	20 min	NEB
<i>Eco</i> RI HF	37 °C	Toda la noche	65 °C	20 min	NEB
<i>Xho</i> I	37 °C	30 min	65 °C	20 min	NEB
<i>Xba</i> I	37 °C	30 min	65 °C	20 min	NEB
<i>Bgl</i> II	37 °C	Toda la noche	65 °C	20 min	Thermo Scientific

NEB: New England BioLabs.

Tabla 2. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la tesis

Nombre	Secuencia (5'-3')
AOX1 Fw	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC
BMV Fw1	AGGTAGGAATTCATGTCGACTTCAGGAACT
BMV Fw2	AGGTAGGAATTCATCATCATCATCATATGTCGACTTCAGGAACT
BMV Rv	TATCAAGCGGCCGCTACCTATAAACCGGGGT

Los oligonucleótidos se utilizaron en pares, BMV Fw1 con BMV Rv y BMV Fw2 con BMV Rv, tanto para la amplificación inicial del gen, como para la confirmación de las colonias positivas por PCR, para añadir, respectivamente, en color azul se muestra la secuencia de nucleótidos reconocida por la enzima de restricción *Eco*RI, en

naranja se encuentra una etiqueta de 6 histidinas y en rojo el sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *NofI*. También se utilizaron los pares AOX1 Fw y BMV Rv para la confirmación de las clonas positivas.

4. Medios de cultivo

Medio Luria-Bertani (LB): 1% de triptona, 1% NaCl, 0.5% extracto de levadura. En caso de medio sólido se agregó 1.5% de agar; para el medio LB bajo en sales se agregó solamente 0.5% de NaCl. Una vez esterilizado y enfriado a aproximadamente 50°C se añadieron los antibióticos de selección, los cuales fueron ampicilina (100 µg/mL para el plásmido pJET) y zeocina (25 µg/mL para el plásmido pPICZαA).

Medio Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD): 1% de extracto de levadura, 2% peptona y 2% dextrosa. En caso de medio sólido se agregó 2% de agar y para medio YPDS se agregó 1 M de sorbitol a la composición previamente descrita. Una vez esterilizado y enfriado a aproximadamente 50°C se añadió zeocina como antibiótico de selección a una concentración final de 100 µg/mL.

Todos los medios se esterilizaron a 121°C durante 30 minutos. El medio sólido fundido se vació en cajas Petri desechables, se dejó solidificar y se conservó a 4 °C hasta su uso por un tiempo no mayor a 2 meses. En el caso del medio líquido, este se almacenó a temperatura ambiente (20 a 25 °C).

Medio BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium): 1% de extracto de levadura, 2% peptona, buffer de fosfatos (K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , 100 mM pH 6.0), 1.34 % de YNB (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos con $(NH_4)_2SO_4$), 4×10^{-5} % de biotina, 1% de glicerol.

Medio BMMY (Buffered Methanol-complex Medium): se preparó con las mismas soluciones y cantidades que el medio BMGY excepto el glicerol que fue sustituido por 1% de metanol.

II. Métodos

1. Extracción de plásmido

Para la extracción de plásmido a partir de las clonas recombinantes de *E. coli* se utilizaron 2 métodos, uno de ellos fue por medio del kit GeneJET plasmid Miniprep kit (ThermoFisher), siguiendo las instrucciones del proveedor. El proceso se basa en separar el plásmido de un extracto de células por cromatografía de absorción, donde los ácidos nucleicos se unen a la membrana de sílica de las columnas, el resto de los componentes se eliminan con solución de lavado y finalmente se eluyen los ácidos nucleicos con agua liberándose de la membrana.

El otro método fue por lisis alcalina, el cual se utilizó para obtener una mayor cantidad de plásmido a partir de las clonas positivas. Se inoculó un cultivo de 50 mL de medio selectivo y se incubó toda la noche a 37 °C con agitación, se recuperaron las células por centrifugación durante 10 minutos a 5,500 rpm. El sedimento bacteriano se resuspendió en 1.5 mL de la solución 1 (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris 25 mM pH 8), luego se adicionaron 2 ml de la solución 2 (NaOH 0.2 N, SDS 1%) recién preparada, se mezcló por inversión y se incubó 5 minutos en hielo.

Después se agregaron 1.5 mL de la solución 3 (acetato de potasio 3 M, pH 6), por las paredes, se mezcló por inversión y se incubó 10 minutos en hielo. La mezcla se centrifugó 15 minutos a 5,500 rpm, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo, se agregaron 50 µL de RNAsa (10 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 1 hora. Un mililitro de la solución fue transferido a tubos de microcentrifuga de 2 mL al cual se le adicionó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos para separar la fase acuosa. Los ácidos nucleicos se precipitaron al agregar un volumen de isopropanol frío (-20°C). La mezcla se incubó por 20 minutos a -20°C y luego se centrifugó 20 minutos a 13,000 rpm a 4°C. El sedimento se lavó con 500 µL de etanol frío (70%) y se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se secó a 45°C al vacío durante 10 minutos, finalmente se resuspendió en agua desionizada y se midió la concentración final.

Las purificaciones de DNA plasmídico se visualizaron en un gel de agarosa (1%) para confirmar el correcto tamaño del vector. La cuantificación del ADN se realizó por espectrofotometría utilizando un Nanodrop™.

2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

a. Amplificación inicial del gen BMV

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl con 12.5 µL de 2x Q5 HF Master Mix (NEB), una concentración final de oligonucleótidos de 0.2 µM y 10 ng de ADN.

Las temperaturas, tiempos y ciclos empleados para el PCR se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Programa de PCR para la amplificación del gen de la proteína BMV

Temperatura (°C)	Duración	Número de ciclos	Paso
98°C	30 s	1	Desnaturalización inicial
98°C	10 s	35	Desnaturalización
62°C	30 s		Alineamiento
72°C	20 s		Extensión
72°C	2 min	1	Extensión final
4°C	∞	-	Enfriamiento

b. PCR de colonia

Inicialmente se prepararon tubos de PCR de 0.2 mL con 40 µL de agua desionizada y se enumeraron, de manera estéril se recolectaron las colonias de la caja y se estriaron en una placa nueva cuadrículada y numerada, sumergiendo el resto de la colonia en uno de los tubos con agua.

Una vez tomadas las colonias elegidas, para el caso de *E. coli*, se colocaron los tubos en el termociclador 10 min a 95°C, mientras que para *P. pastoris* se realizaron 2 ciclos de congelación a -20°C por 10 minutos y descongelación en microondas por 1 minuto.

La solución se preparó con PCR Master Mix 2X (Sigma Aldrich) agregando de este 10 μ L, 1 μ L de oligonucleótidos (10 μ M) y agua hasta completar 15 μ L por tubo, se distribuyó el volumen en los tubos y se adicionaron 5 μ L de ADN obtenido de las colonias.

Las condiciones utilizadas para el PCR se describen en la Tabla 3.

3. Purificación de productos de PCR

Para la purificación de los productos de PCR se utilizó el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific), Inicialmente se agregó un volumen 1:1 de solución de unión a la mezcla, se transfirió la solución a una columna de purificación GeneJET. Se centrifugó durante 30-60 s y se desechó el líquido. Después se adicionaron 700 μ L de la solución de lavado a la columna y se centrifugó durante 30-60 segundos. Se desechó el flujo y se colocó la columna de purificación nuevamente en el tubo colector. Posteriormente se centrifugó la columna vacía durante 1 minuto para eliminar cualquier residuo de la solución de lavado, se transfirió la columna a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio y se agregaron 50 μ L de agua desionizada al centro de la columna, se centrifugó durante 1 min y finalmente se procedió a medir concentración de ADN y almacenarlo a -20°C hasta su uso.

4. Ligación del gen en plásmido

a. Ligación de los productos de PCR en pJET 1.2

La ligación de los productos de PCR, BMV1 y BMV2, en pJET 1.2 se realizó siguiendo el protocolo CloneJET PCR Cloning Kit. Para un volumen total de 20 μ L se siguió la siguiente reacción: 10 μ L del 2X buffer de reacción 2X, 1 μ L de producto de PCR, 0.5 μ L de pJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/ μ L), 0.5 μ L de T4 DNA Ligasa y el resto de agua. Se mezclaron los componentes y se incubó a 25°C por 15 minutos.

b. Ligación del fragmento en pPICZ α A

Para la ligación del fragmento en pPICZ α A, primero se realizó la digestión del vector de pJET que contenía el fragmento del gen de la proteína BMV y del vector pPICZ α A.

Se utilizaron las enzimas *NotI* HF y *EcoRI* HF en una reacción final de 50 μ L usando 1 μ L de cada enzima y entre 1.5 a 2.5 μ g de DNA en Buffer CutSmart recomendado por el proveedor (NEB), empleando las condiciones mostradas en la Tabla 1. Posteriormente se purificó siguiendo el protocolo descrito anteriormente utilizando el kit GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific).

Con los productos de la digestión purificados se realizó una ligación del plásmido pPICZ α A y de cada uno de los genes usando T4 DNA Ligasa. Se empleó una relación molar inserto:vector 5:1, en un volumen de 20 μ L, la reacción se llevó a cabo a 16°C durante 16 horas.

5. Secuenciación

La secuenciación del gen de la proteína de BMV se realizó en la unidad de síntesis y secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para la secuenciación se utilizaron los oligonucleótidos BMV Fw1 y BMV Fw2, así como el BMV Rv, mostrados en la Tabla 2.

6. Preparación de células competentes y transformación de cepas

a. Preparación de *E. coli* XL1-Blue

Se preparó un preinóculo de 5 ml de la cepa *E. coli* XL1-Blue en medio LB, se creció el cultivo a 37 °C con agitación durante 24 horas, a continuación se inocularon 200 mL de medio LB con los 5 mL del preinóculo, el cual se incubó hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5, una vez alcanzada la densidad óptica deseada, se enfriaron las células rápidamente en hielo, posteriormente se centrifugó el cultivo por 15 minutos a una velocidad de 3,500 rpm a 4 °C.

Una vez centrifugado el cultivo, se descartó el sobrenadante y se lavaron las células con 50 mL de CaCl₂, posteriormente se incubaron en hielo durante 10 minutos y se centrifugó bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 2 ml de una solución de CaCl₂ con glicerol al 15%. Se prepararon alícuotas de 700 µL de células en tubos de microcentrifuga estériles y se congelaron a -80 °C, hasta su uso.

b. Preparación de *P. pastoris* X-33

Se prepararon siguiendo el protocolo del manual Pichia EasyComp Kit (ThermoFisher Scientific), para lo cual se inocularon 10 mL de medio YPD con una colonia de la cepa X-33 de *P. pastoris*. El cultivo se dejó crecer durante toda la noche a 30 °C (250 rpm), se diluyó en 10 mL de YPD y se incubó hasta que el OD₆₀₀ alcanzó 0.6-1.0. Las células se centrifugaron a 500 ×g durante 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendieron en 10 mL de Solución I. Se volvieron a centrifugar a 500 ×g durante 5 minutos y se resuspendieron, esta vez, en 1 mL de Solución I. Finalmente se hicieron alícuotas de 50 µL en tubos de microcentrifuga estériles de 1.5 mL y se congelaron a -80 °C, para su conservación hasta su uso.

c. Transformación de *E. coli* XLI-Blue

Inicialmente se tomaron 10 µL de ligación para 70 µL de células, se mezclaron e incubaron en hielo 20 minutos, luego se les dio un choque térmico durante 1 minuto a 42°C, seguido de un choque térmico durante 5 minutos en hielo (4°C). Se agregó medio LB hasta 1 mL y se incubó 2 horas a 37 °C con agitación, pasado el tiempo de incubación se sembraron 100 µL de las células en placas con medio LB selectivo, dependiendo del plásmido con el que se transformó, y se incubaron a 37°C toda la noche.

d. Transformación de *P. pastoris* X-33

Para la transformación de X-33, se siguió el protocolo descrito en el manual de Pichia EasyComp Kit (ThermoFisher Scientific). Se descongeló un tubo de 50 µL de células competentes a temperatura ambiente, se agregaron 3 µg de vector de expresión de *Pichia* linealizado, se adicionó 1 mL de Solución II (a temperatura ambiente) y se mezcló por vortex. El tubo se incubó durante 1 hora a 30 °C en un baño de agua, mezclando cada 15 minutos por vortex, luego se colocó en un thermo block a 42 °C durante 10 minutos. Se dividieron las células en 2 tubos de microcentrifuga (aproximadamente 525 µL por tubo), se agregó 1 mL de medio YPD a cada tubo y se incubaron las células a 30 °C durante 2 horas para permitir la expresión de la resistencia a zeocina. Las células se centrifugaron a 3,000 ×g durante 5 minutos a temperatura ambiente y cada tubo se resuspendió en 500 µL de Solución III. Se combinaron las células en un tubo y se centrifugó a 3,000 ×g durante 5 minutos. Finalmente se resuspendió la pastilla de células en 100 µL de la

Solución III y se sembró en placas de medio YPDS con zeocina (100 mg/mL), las cuales se incubaron durante 2 a 4 días a 30 °C.

7. Electroforesis en gel de agarosa (1%)

Se realizó electroforesis en geles de agarosa para la visualización de los plásmidos, productos de PCR y digestiones de ADN. Se pesó 1 g de agarosa al cual se le agregaron 100 mL de buffer TAE 1X (Tris, ácido acético, EDTA 0.5 M pH 8). La mezcla se calentó en un horno de microondas por pulsos de 30 segundos hasta lograr una mezcla homogénea.

Se colocó cinta adhesiva alrededor del casete de la cámara de electroforesis, se vaciaron alrededor de 30 mL de la mezcla caliente en el casete, se colocó el peine y se esperó a que enfriara la mezcla y gelificara.

Una vez frío el gel, se retiró la cinta adhesiva y se colocó el casete dentro de la cámara de electroforesis, la cual se llenó con buffer TAE 1X (Tris, ácido acético, EDTA) hasta el límite marcado, se retiró el peine y se llenaron los pocillos con el marcador de peso molecular y las muestras preparadas (1 µL de buffer de carga por cada 5 µL de muestra). Posteriormente se dejó correr el gel a 110 Volts durante 40 min.

8. Expresión de BMV en *P. pastoris*

Para expresar la proteína BMV se inocularon las cepas positivas y un control de X-33 sin transformar en un precultivo de 25 mL de medio BMGY el cual se incubó durante 24 horas a 30 °C con agitación constante (150 rpm). Posteriormente se centrifugó a 3,000 ×g durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se lavaron las células con 5 mL de medio BMMY, se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones y se resuspendió el paquete celular en 5 mL de medio BMMY. Se inocularon las células lavadas en 25 mL de medio BMMY ajustando una densidad óptica OD₆₀₀ de 1 y se volvió a incubar durante 4 días a las mismas condiciones de temperatura y agitación. Para inducir la producción de la proteína BMV se adicionó metanol absoluto al cultivo cada 24 horas. Se muestreo el proceso tomando 500 µL del cultivo en medio BMGY y 500 µL a cada día de crecimiento en el medio BMMY.

Para la expresión de la proteína a purificar se realizó un escalamiento en el proceso anterior. Se inició con un precultivo de 200 mL de una de las cepas positivas en medio BMGY para finalmente crecer a 500mL de medio BMMY. Al final de los 4 días de incubación en el medio inducido se centrifugó el cultivo a 8,000 rpm durante 15 minutos, se separó el sobrenadante del paquete celular y se almacenó a 4 °C.

9. Purificación de BMV

a. Preparación del sobrenadante

Al sobrenadante centrifugado, obtenido del cultivo inducido, se le ajustó el pH a 7.4 con buffer Tris 500 mM. Se centrifugó a 8,000 rpm durante 90 minutos a 8 °C, se filtró con ayuda de un filtro de 0.45 µm y se inició la purificación con la columna de níquel.

b. La purificación de la proteína se realizó por medio de afinidad a columna de níquel.

Antes de iniciar la purificación se preparó la columna. Inicialmente se pasaron 2 volúmenes (1 volumen corresponde a 5 mL) de Imidazol 1M, para eliminar cualquier residuo de usos anteriores, se lavó con 10 volúmenes agua destilada, finalmente se

equilibró con 10 volúmenes de *buffer* de lisis-unión ($Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4$ 50 mM, $NaCl$ 150 mM, *Imidazol* 10 mM, *glicerol* 1%, $\beta - Mercaptoetanol$ 2 mM).

Una vez lavada y equilibrada la columna, se pasó el sobrenadante con ayuda de una bomba peristáltica a una velocidad de 3 mL/min, posteriormente se realizaron 2 lavados con 10 volúmenes de *buffer* lisis-unión, para separar la proteína de la columna se realizó un gradiente con *Buffer* de Elución ($Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4$ 50 mM pH 7.4, $NaCl$ 150 mM, *Imidazol* 500 mM, *glicerol* 10%, $\beta - Mercaptoetanol$ 2 mM), utilizando 2 volúmenes del *buffer* con una concentración de 50, 100, 200 y 500 mM de *Imidazol* en cada caso. Finalmente se realizó un lavado con 1 M de *Imidazol*.

c. Cromatografía de intercambio aniónico

El sobrenadante del cultivo inducido se precipitó mediante adición de sulfato de amonio sólido hasta alcanzar una concentración de saturación de 80% en agitación constante. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 20 mL de *buffer* A ($Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4$ 20 mM, $NaCl$ 100 mM, *glicerol* 1%, $\beta - mercaptoetanol$ 2 mM) y se dializó durante 24 horas contra *buffer* A a 4 °C. La muestra dializada se inyectó en una columna High Q (BioRad) de 60 mL previamente equilibrada con *buffer* A, se lavó con 1 volumen de columna y se eluyeron fracciones utilizando un gradiente lineal de 100 mL desde 0 a 100% de *buffer* B ($Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4$ 20 mM, $NaCl$ 1 M, *glicerol* 1%, $\beta - Mercaptoetanol$ 2 mM).

d. Cromatografía por filtración en gel

La fracción no unida de la cromatografía de intercambio aniónico se concentró utilizando un equipo de ultrafiltración (Centricon) y una membrana con un corte de 10 kDa hasta un volumen de 2 mL. La muestra concentrada se inyectó en una columna Sephacryl 100 HR 16/600 (Cytiva) previamente equilibrada con *buffer* A ($Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4$ 20 mM, $NaCl$ 100 mM, *glicerol* 1%, $\beta - Mercaptoetanol$ 2 mM), se utilizó un flujo de 0.5 mL/min. Se colectaron las fracciones que presentaron mayor absorbancia a 280 nm.

10. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

Para cuantificar la concentración de proteína purificada, se utilizó el método de Bradford, siguiendo el procedimiento descrito en el manual de Quick Start™ Bradford Protein Assay de BIO-RAD. La curva de calibración de la proteína estándar se realizó con albúmina de suero bovino (BSA) (0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.5, 2 mg/ml). En una placa de 96 pocillos (300 μ l) se agregaron 60 μ L de colorante (BIO-RAD protein Assay Reagent concentrate) y 240 μ L de agua. A cada pocillo se le agregó 5 μ L de la solución estándar o muestra según el caso correspondiente, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm.

11. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE)

a. Preparación de muestras

La precipitación de las proteínas se realizó para las muestras recolectadas durante la expresión de la proteína BMV en X-33. Las muestras se centrifugaron a 3000 ×g durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se tomaron 400 µL de sobrenadante, se agregaron 100 µL de ácido tricloroacético (TCA 100% m/v) y se dejó durante 20 minutos a -20 °C. Se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto, se lavó la pastilla con 500 µL de acetona a -20 °C resuspendiendo con ayuda de vortex. Posteriormente se volvió a centrifugar a las mismas condiciones y se decantó la acetona. La muestra se dejó secar durante 10 min a 45 °C en centrífuga con vacío. Se agregaron 20 µL de *buffer* de carga 2X (Laemmli Sample Buffer 2X: SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.004%, Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, -Mercaptoetanol 10%), se resuspendió por vortex y finalmente se calentaron las muestras a 95 °C durante 10 minutos.

b. Preparación del gel y corrida

El gel de poliacrilamida se preparó al 15% para la visualización de la proteína BMV (21.48 kDa), con un volumen final de 5 mL para el gel separador y 3 mL para el concentrador. La composición del gel se detalla en la Tabla 4.

Todas las muestras se prepararon con *buffer* de carga 2X y se calentaron a 95°C durante 10 minutos.

Tabla 4. Composición de los geles para electroforesis de proteínas

Componente	Separador	Concentrador
Acrilamida 30%	2.5 mL	510 µL
Tris 1.5 M pH 8.8	1.25 mL	-
Tris 1 M pH 6.8	-	375 µL
PSA 10%	50 µL	30 µL
SDS 10%	50 µL	30 µL
TEMED	5 µL	3 µL
Agua desionizada	1.145 mL	2.04 mL

La electroforesis se realizó en *buffer* de corrida Tris-glicina-SDS 1X (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%), se cargaron *10 µl de las muestras por pocillo y se corrió a un voltaje de 100 V durante 20 minutos, para la fase de concentración, y posteriormente a 200 V durante 40-50 minutos, para la fase de separación.

*El valor puede cambiar dependiendo de la concentración de las muestras.

c. Tinción del gel

Para la visualización de las proteínas, se cubrió el gel con colorante azul de Coomassie (50% Metanol, 10% ácido acético, 0.1% Coomassie Brilliant Blue), se calentó en microondas durante 30 segundos y se puso en agitación durante 1 minuto. Para desteñir el gel, se retiró el exceso de colorante y se lavó con agua. El gel cubierto con agua se calentó durante 2 minutos, se desechó el agua y se repitió

el lavado 2 veces adicionales. Finalmente, se dejó en agitación durante toda la noche o hasta ver las bandas.

12. Encapsidación de RNA

La proteína purificada a una concentración de 1 mg/mL se dializó contra buffer para proteína de cápside (NaCl 1 M, Tris pH 7.2 20 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM y PMSF 1 mM). Se utilizaron muestras de RNA obtenidas a partir de virus de BMV purificados de plantas infectadas para los ensayos de encapsidación. El ensamble se realizó utilizando 58 µg de proteína BMV2 y ARN en un volumen final de 100 µL a una relación 6:1 de proteína-ARN. El ensamble se dializó durante 24 horas contra buffer de ensamble para ARN (NaCl 50 mM, KCl 100 mM, 5 mM MgCl₂ Tris-HCl 50 mM pH 7.2, DTT 1 mM). Los ensambles se dializaron durante 24 horas en buffer de suspensión de virus (acetato de sodio 50 mM, acetato de magnesio 8 mM) a 4 °C, las muestras se recuperaron y se almacenaron a 4 °C para su posterior análisis por dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM).

13. Caracterización por dispersión dinámica de luz (DLS)

Las muestras recuperadas de los ensambles se centrifugaron por 30 minutos a 13,000 rpm y se analizaron por DLS para determinar el tamaño de partícula y la distribución de tamaños, utilizando una celda de cuarzo de 40 µl en el equipo Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments.

14. Microscopía electrónica de transmisión

Para la microscopía electrónica de transmisión se depositaron las muestras de las cápsides ensambladas en rejillas de cobre de 400-mesh cubiertas con Formvar (TedPella, USA). Para lo anterior se tomaron 8 µl de las VLPs, se incubaron por 2 minutos para permitir el depósito de la muestra, se retiró el exceso de solución con papel filtro, evitando tocar la rejilla. Posteriormente se tiñeron con 6 µl de acetato de uranilo al 2% durante 1 minuto, el exceso se retiró utilizando papel filtro Whatman No. 2. Las rejillas se analizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2010 operado a 100 kV a 80 keV. Las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ (NIH).

RESULTADOS

1. Obtención y amplificación del gen de la proteína BMV

Inicialmente se identificó la secuencia del gen que codifica para la proteína de cápside de BMV en la base de datos “National Center for Biotechnology Information” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), en base a esta se diseñaron los oligonucleótidos que hibridan en los extremos 5' y 3', cuyas secuencias y detalles se describen en la Tabla 2.

El plásmido pB3 que contenía el gen para codificar la proteína de cápside de BMV se obtuvo de un stock de células proporcionado por el Dr. Rubén D. Cadena Nava. Se prepararon cajas Petri con medio LB con Ampicilina (100 µg/mL) y se estirió una porción de las células con ayuda de un asa bacteriológica, se incubaron las cajas a 37 °C durante toda la noche.

Se preparó un inóculo en medio LB Ampicilina para la extracción del plásmido siguiendo el protocolo de GeneJET plasmid Miniprep kit (ThermoFisher), obteniendo 50 µL de plásmido con una concentración de 207 ng/µL.

Posteriormente se realizó una digestión de 5 μ L del plásmido con la enzima de restricción BamHI, con las condiciones descritas en la Tabla 1. Las muestras digeridas se corrieron un gel de agarosa 1% (**Figura 2**), obteniéndose una banda correspondiente al fragmento esperado, con un tamaño de ~4,500pb (3,996 pb plásmido pB3 y 570 pb del gen de la proteína BMV).

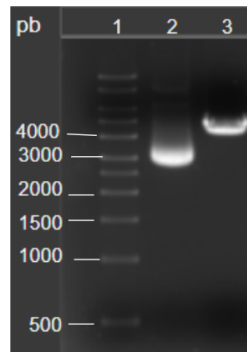


Figura 2. Digestión del plásmido pB3 con el gen de la proteína BMV

Carril 1: Marcador (1kb Ladder DNA Marker). Carriles 2 y 3 muestran el plásmido sin digerir y digerido por BamHI, respectivamente.

Para la amplificación inicial del gen se realizó el PCR utilizando Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR Master Mix con las cantidades y tiempos descritos en la metodología, sustituyendo los oligonucleótidos BMV Fw1 y BMV Fw2 en cada caso. Una vez terminado el PCR se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 3**), para verificar la amplificación del fragmento deseado (~600pb).

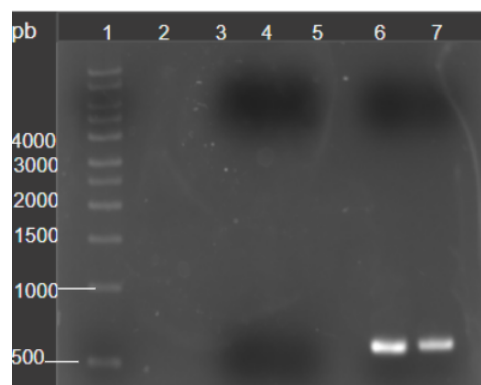


Figura 3. Amplificación del gen BMV1 y BMV2

Carril 1: Marcador (1kb Ladder DNA Marker), carril 6: gen BMV amplificado con oligonucleótido BMV Fw1 (BMV1), carril 7: gen BMV amplificado con oligonucleótido BMV Fw2 (BMV2).

2. Ligación del gen BMV a los plásmidos y transformación en XLI-Blue

Los productos de amplificación, BMV1 y BMV2, se clonaron en el vector pJET 1.2, generando las construcciones BMV1-pJET y BMV2-pJET, respectivamente.

Se transformó la cepa de *E. coli* XLI-Blue con los plásmidos generados, las transformaciones se cultivaron en placas de LB con ampicilina (100 μ g/mL).

Pasado el tiempo de incubación se observaron las placas, para el caso de BMV1-pJET solo se observó el crecimiento de 3 colonias, mientras que para BMV2-pJET se eligieron 6 colonias, al finalizar la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 4**), como resultado se observaron unas bandas con un tamaño aparentemente mayor al esperado de ~600 pb, una de ellas para una

colonia de BMV1-pJET (carril 4) y las demás para las colonias de los carriles 5, 8 y 10 de BMV2-pJET. Posteriormente se comprobó que la colonia de BMV1-pJET era negativa, mientras que para BMV2-pJET si hubo una colonia positiva (carril 10).

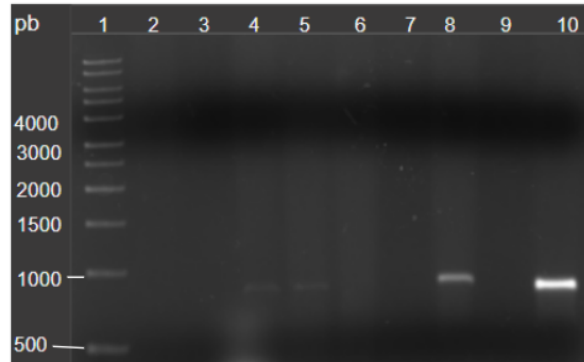


Figura 4. PCR de colonia de la transformación BMV-pJET

Carril 1: Marcador (1kb Ladder DNA Marker), carriles 2 al 4: colonias transformadas con BMV1-pJET, carriles 5 al 10: colonias transformadas con BMV2-pJET.

Se repitió la transformación de BMV1-pJET en XLI Blue en las mismas condiciones, obteniendo en este caso una colonia positiva (carril 4 **Figura 5**).

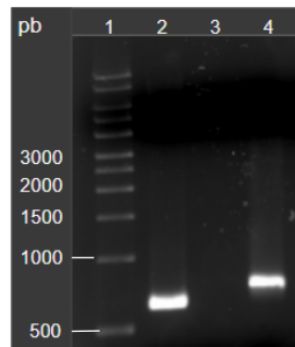


Figura 5. PCR de colonia para BMV1-pJET

Carril 1: Marcador (1kb Ladder DNA Marker), carril 2: control positivo, carril 3 y 4 colonias transformadas con BMV1-pJET.

Los genes BMV1 y BMV2, se clonaron entre el sitio de EcoRI y NotI del vector pPICZ α A, a partir de los productos de digestión del vector pPICZ α A y los plásmidos, BMV1-pJET y BMV2-pJET extraídos de las colonias positivas, generando las construcciones BMV1-pPICZ α A y BMV2-pPICZ α A.

La enzima T4 DNA ligasa se inactivó y se prosiguió con el proceso de transformación para células competentes de XL1-Blue. En este caso, las células se sembraron en placas de LB bajo en sales suplementado con zeocina (25 μ g/mL), las cuales se incubaron a 37°C durante toda la noche.

Después del tiempo de incubación de las placas, se realizó un PCR de colonia, identificando una posible colonia positiva para BMV1-pPICZ α A y 2 colonias para BMV2-pPICZ α A.

Posteriormente se realizó una purificación de plásmidos a partir de cultivos de las colonias encontradas como posibles positivas y los plásmidos purificados se dirigieron con las enzimas de restricción XhoI y XbaI, esperando obtener 3 fragmentos de alrededor de 70, 500 y 3500 pb, donde solo los plásmidos obtenidos

de las colonias transformadas con BMV2-pPICZ α A mostraron el patrón esperado (**Figura 6**).

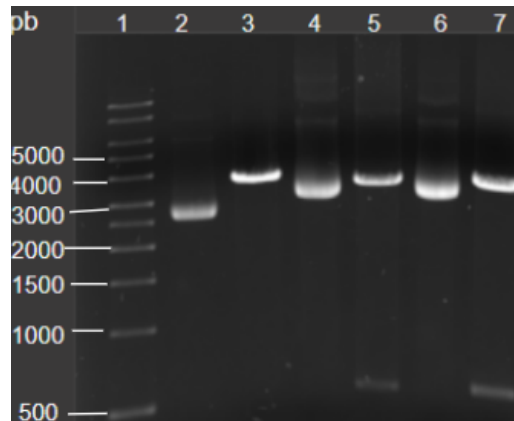


Figura 6. Resultados de la digestión de los plásmidos BMV-pPICZ α A con XhoI y XbaI
Carril 1: Marcador (1kb Ladder DNA Marker), carril 2 y 3: plásmido BMV1-pPICZ α A (sin digerir y digerido, respectivamente), carril 4 al 7: plásmidos BMV2-pPICZ α A (sin digerir y digerido, ambos casos).

Al no encontrar colonias positivas para la transformación de BMV1-pPICZ α A, se realizó un PCR para la amplificación del fragmento BMV1 a partir del plásmido de BMV1-pJET, para su posterior ligación al vector pPICZ α A. El resultado de la ligación se transformó en cepas de *E. coli* XL1-Blue, utilizando el protocolo anteriormente descrito.

Se realizó el PCR de colonia utilizando los oligos BMV Fw1 y BMV Rv, obteniendo 2 colonias positivas (**Figura 7**: carril 5 y 10), las cuales se comprobaron por digestión enzimática, de la misma manera anteriormente mencionada.

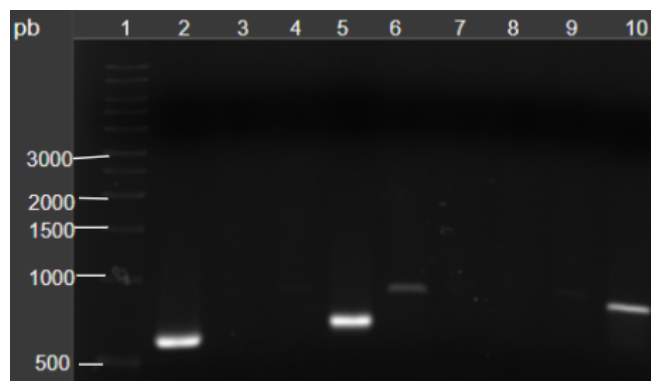


Figura 7. PCR de colonia BMV1-pPICZ α A
Carril 1: Marcador (1kb Ladder DNA Marker), carril 2: control positivo, carril 3 al 10: colonias transformadas con BMV1-pPICZ α A.

3. Extracción de plásmido y transformación en *Pichia pastoris* X-33

Se eligieron dos de las colonias positivas obtenidas de la transformación con los plásmidos BMV-pPICZ α A; una para BMV1-pPICZ α A y otra para BMV2-pPICZ α A, las cuales se inocularon en 50 mL de medio LB Low Salt suplementado con zeocina (25 μ g/mL) para la extracción de plásmido, siguiendo el procedimiento de “extracción de plásmido por lisis alcalina” descrito en la metodología, donde se obtuvieron 200 μ L a 1053 ng/ μ L de plásmido para BMV1-pPICZ α A y 200 μ L a 853.7 ng/ μ L para BMV2-pPICZ α A.

La identidad del gen de la proteína de cápside del virus BMV se comprobó por la secuenciación del inserto clonado en el vector pPICZ α A, a partir de los plásmidos extraídos por lisis-alcalina.

Una vez obtenidas las secuencias, se realizó un alineamiento con ayuda del software Clustal Omega, utilizando las secuencias resultantes de la secuenciación (BMV-secuenciado) con respecto a la secuencia BMV obtenida de la base de datos (BMV teórico), dando como resultado una similitud de 99.95% para el inserto BMV1 (Anexos: Figura 8) y 99.93% para BMV2(Anexos: Figura 9).

Los plásmidos obtenidos fueron linealizados con BglIII. Se prosiguió a iniciar el proceso de transformación en la cepa de *P. pastoris* X-33, siguiendo la metodología descrita utilizando 7 μ L de plásmido (~7000 ng para BMV1 y ~6000 ng para BMV2), para 50 μ L de células competentes. El paquete celular final se resuspendió en 100 μ L de solución III y las células se plaquearon en cajas de medio YPDS zeocina (100 μ g/mL), las cuales se incubaron a 30°C durante 3 días.

Para verificar la integración del gen recombinante a *P. pastoris* se realizó un PCR de colonia, utilizando los oligonucleótidos BMV Fw1 y BMV Rv, donde se pudo observar una amplificación positiva correspondiente a la colonia transformada con BMV1-pPICZ α A (Figura 10).

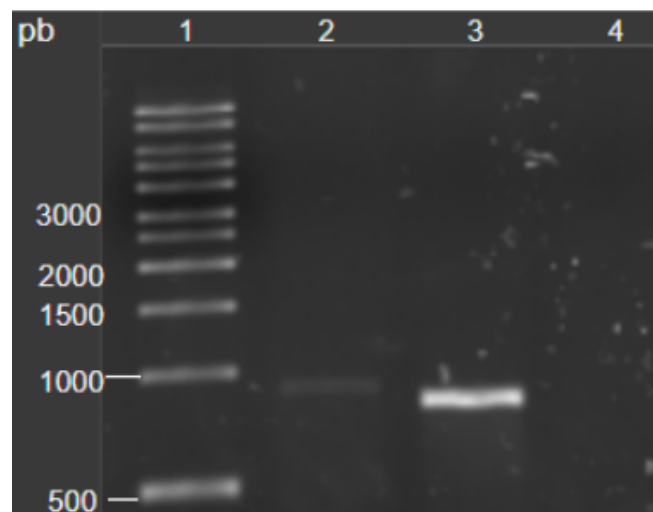


Figura 10. PCR de colonias de X-33 transformadas con BMV-pPICZ α A

Carril 1: Marcador (1kb Ladder DNA Marker), carril 2: control positivo, carril 3: colonia transformada con BMV1-pPICZ α A, carril 4: colonia transformada con BMV2-pPICZ α A.

Se repitió la transformación de BMV2-pPICZ α A en *P. pastoris* X-33 con 10 μ l de plásmido linealizado. De las colonias obtenidas se confirmaron por PCR utilizando en esta ocasión los oligonucleótidos AOX1 Fw y BMV Rv. Se obtuvieron 5 colonias positivas correspondientes a los carriles 3, 5, 6, 8 y 9, de alrededor de 1,000 pb.

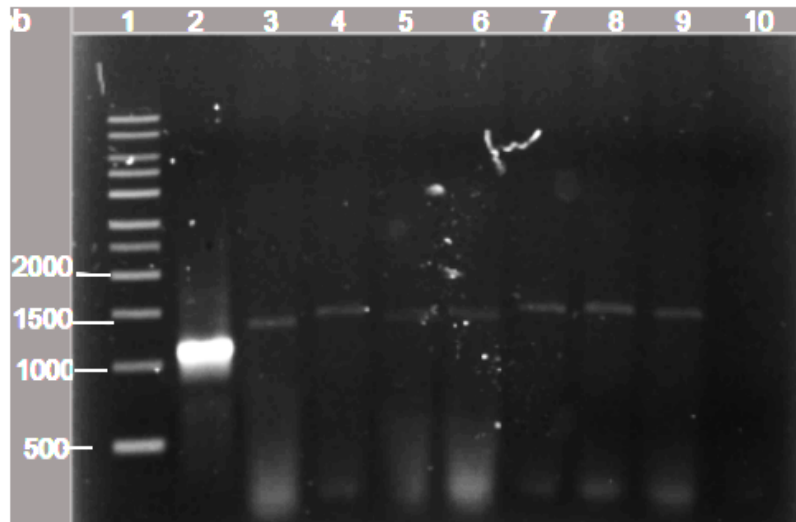


Figura 11. PCR de colonias de X-33 transformadas con BMV2-pPICZaA

Carril 1: Marcador (1kb Ladder DNA Marker), carril 2: control positivo, carril 3 al 9: colonias transformadas con BMV2-pPICZaA, carril 10: control negativo.

4. Expresión y purificación de la proteína BMV

En el primer ensayo de expresión se eligieron 4 de las 5 colonias positivas transformadas con BMV2-pPICZaA. Para la fase de producción de la proteína, se prepararon 5 matraces de 25 mL con medio BMGY y 5 matraces con medio BMMY utilizando como control una cepa de X-33 sin transformar. Los cultivos se indujeron con 2% de metanol durante 4 días y crecieron bajo las condiciones descritas en la metodología.

Se analizó la expresión de la proteína BMV a partir del sobrenadante de las muestras tomadas por gel de poliacrilamida al 15%, observando la expresión de la proteína de alrededor de 22 kDa únicamente 6 y 7, correspondientes a los días de inducción de la colonia 4 (**Figura 12 y 13**).

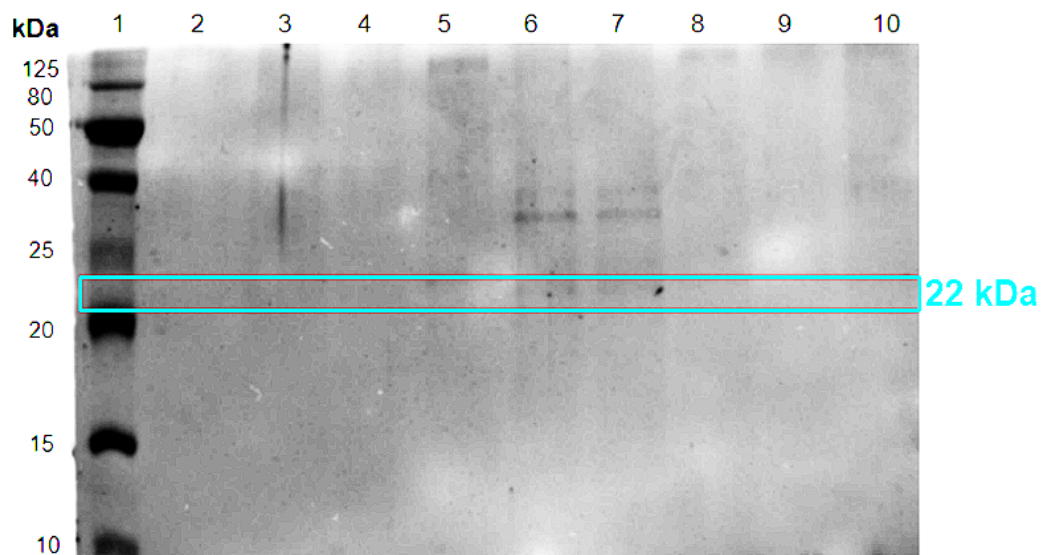


Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% para el análisis de la inducción de las colonias 4 y 6 de la transformación BMV2-pPICZaA

Carril 1: Marcador (HyperPage), carril 2 al 4: control (No inducido, inducido día 3, inducido día 4, respectivamente), carril 5 al 7: colonia 4 (No inducido, inducido día 3, inducido día 4,

respectivamente), carril 8 al 10: colonia 6 (No inducido, inducido día 3, inducido día 4, respectivamente).

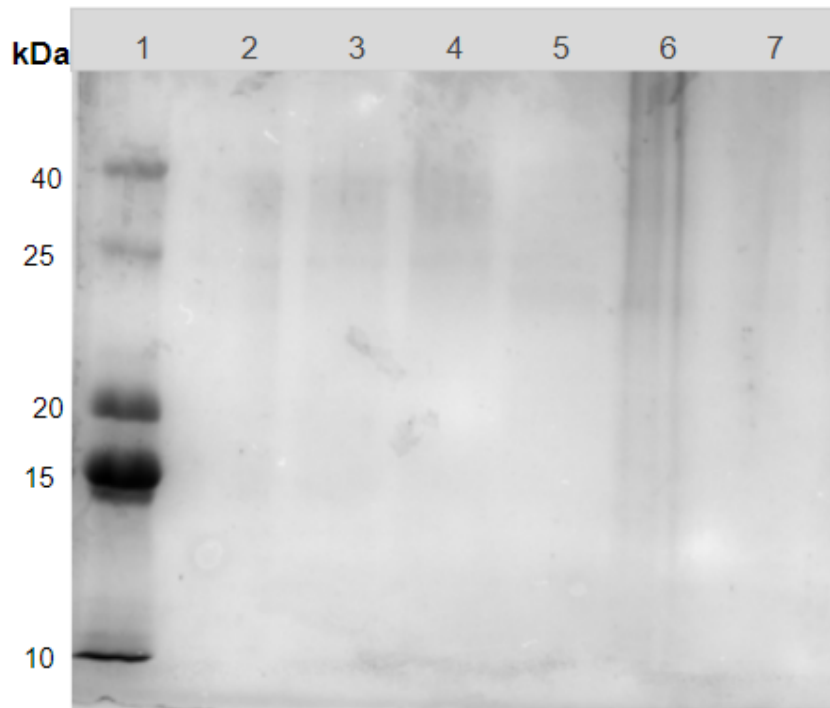


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% para el análisis de la inducción de las colonias 7 y 8 de la transformación BMV2-pPICZ α A

Carril 1: Marcador (HyperPage), carril 2 y 3: control (No inducido, inducido día 4, respectivamente), carril 4 y 5: colonia 7 (No inducido, inducido día 4, respectivamente), carril 6 y 7: colonia 8 (No inducido, inducido día 4, respectivamente).

Debido a la poca expresión observada en las cepas seleccionadas donde solo se aprecian bandas tenues en la cepa 4, se repitió la transformación de BMV2-pPICZ α A en *P. pastoris* X-33. Se obtuvieron 4 nuevas colonias positivas correspondientes a las clonas 1, 2, 4 y 7.

Se realizó un segundo ensayo de expresión con las clonas 1, 2, 4 y 7. En esta ocasión los cultivos se indujeron con 1% y 2% de metanol durante 4 días, siguiendo las condiciones de incubación descritas en la metodología.

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% para verificar la expresión de la proteína BMV a través del sobrenadante de los cultivos, observando en los carriles correspondientes a la clona 4 la expresión de la proteína con una banda de 22.5 kDa de acuerdo con el valor calculado con el software del equipo iBright FL1000 (Invitrogen) (**Figura 14**).

Se eligió la colonia 4 para un escalamiento de la producción, inicialmente se realizó a partir de un preinóculo de 25 ml en medio BMGY, para una producción final de 250 mL en medio BMMY siguiendo la misma metodología de producción con inducción con 1% de metanol.

El sobrenadante se cargó en una columna HisTrap (Cytiva), de acuerdo con el protocolo descrito en la sección de métodos. Las fracciones recolectadas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% (**Figura 15**) la proteína

de cápside BMV2 no se unió a la resina, por lo que se optó por una estrategia diferente para realizar la purificación.

Se repitió el cultivo a 300 mL finales de medio, el sobrenadante recuperado se precipitó al adicionar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido hasta un 80% de saturación, el precipitado se resuspendió en 12 mL de buffer de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, 150 mM NaCl, glicerol 10% y 2 mM de β -mercaptoetanol, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 30 minutos y la fracción soluble se dializó contra un buffer de $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, NaCl 50 mM, glicerol 1% y β -mercaptoetanol 2mM. Las fracciones se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (**Figura 16**).

Utilizando un volumen de 2 mL de la muestra dializada se realizó una cromatografía de intercambio aniónico en una columna Q Fast Flow de 1 mL (Cytiva) con el objetivo de analizar la utilidad de esta cromatografía en el proceso de purificación. Las muestras de las distintas fracciones se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida. La proteína de cápside no se une a la columna, pero las otras proteínas en la solución si, por lo que el paso de purificación es útil para eliminar la mayoría de las proteínas contaminantes. Con la información anterior se decidió realizar una cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna con 60 mL de la resina High Q (BioRad). Se inyectaron 10 mL del sobrenadante dializado y al analizar el gel se observó nuevamente la proteína de ~22 kDa en la fracción no unida a la columna (**Figura 17 y 18**).

La fracción se concentró a un volumen de 2 mL, teniendo una concentración final de 1.3 mg/mL, esta se inyectó en una columna de exclusión molecular Sephacryl S-100 HR 16/60, en esta cromatografía se lograron eliminar las bandas superiores a la proteína de interés, pero no las de un peso inferior (aproximadamente 16 kDa) (**Figura 19 y Figura 20**). Posteriormente se concentraron las fracciones que mostraron la banda de ~22 kDa (21-29), una parte de la proteína en solución se precipitó y después de 4 días en almacenamiento a 4 °C la intensidad de las bandas por debajo de ~22 kDa se vió disminuida, obteniéndose así una sola banda en el carril que corresponde a la proteína de cápside. (**Figura 21**).

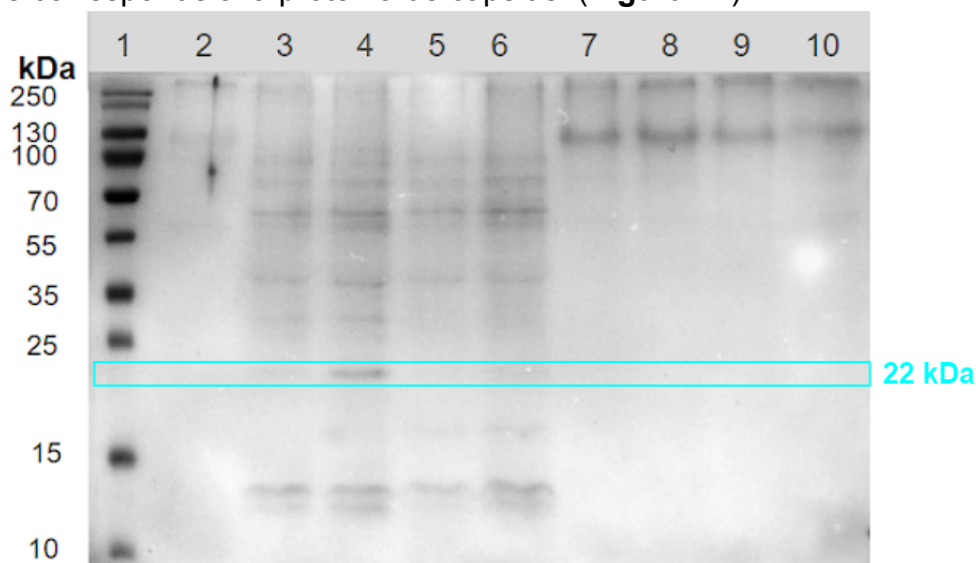


Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% de la proteína obtenida por la inducción de las cepas 4 y 7 de BMV2-pPICZ α A con 1% y 2% de metanol.

Carril 1: marcador (Page Ruler), carril 2: control clona 4 no inducido, carril 3 al 6: clona 4 (inducido día 3 metanol 1%, inducido día 4 metanol 1%, inducido día 3 metanol 2%, inducido día 4 metanol 2%, respectivamente), carril 7 al 10: clona 7 (inducido día 3 metanol 1%, inducido día 4 metanol 1%, inducido día 3 metanol 2%, inducido día 4 metanol 2%, respectivamente).

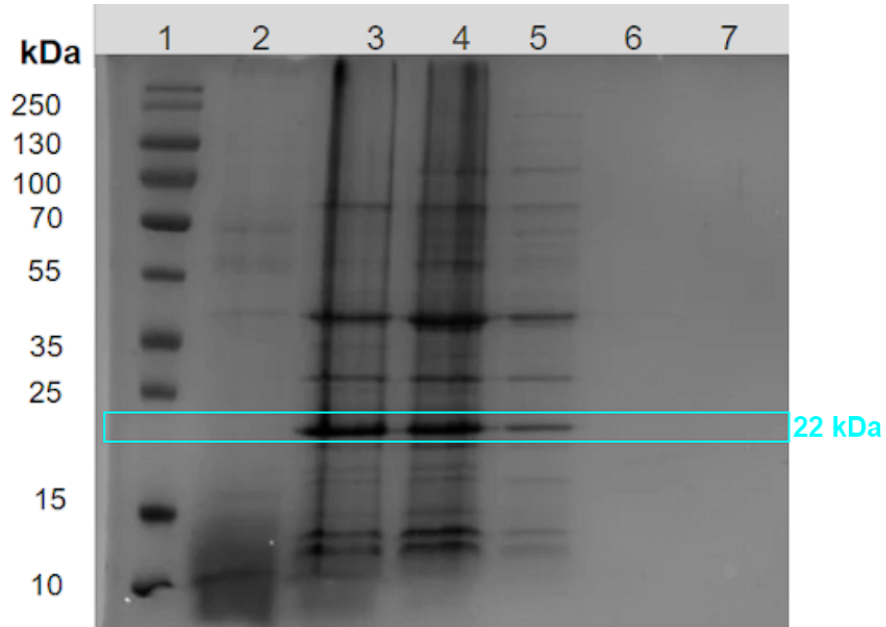


Figura 15. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% de la proteína producida por el escalamiento en el cultivo de la colonia 4 BMV2-pPICZαA purificada por cromatografía de afinidad a níquel

Carril 1: marcador (Page Ruler), carril 2: control no inducido (BMGY), carril 3: colonia 4 inducida día 4, carril 4: paso por columna, carril 5: lavado 10 mM, carril 6: elución a 250 mM, carril 7: elución con imidazol 500 mM.

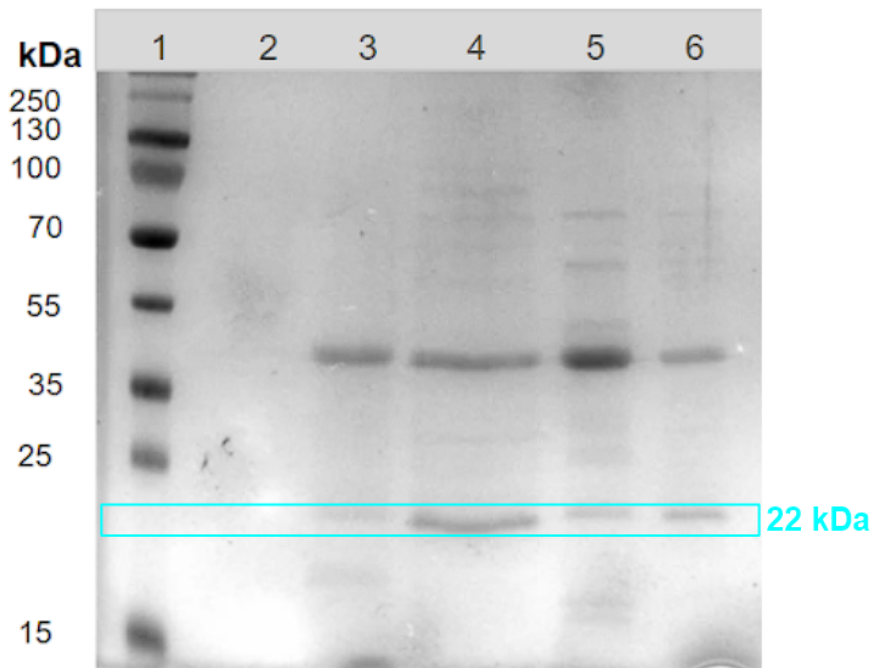


Figura 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% del sobrenadante de la cepa 4 BMV2-pPICZαA precipitado con sulfato de amonio y dializado

Carril 1: marcador (Page Ruler), carril 2: control no inducido, carril 3: colonia 4 inducida con 1% metanol día 4, carril 4: resuspendido después de precipitar con sulfato de amonio, carril 5: precipitado de la solución dializada, carril 6: sobrenadante de la solución dializada

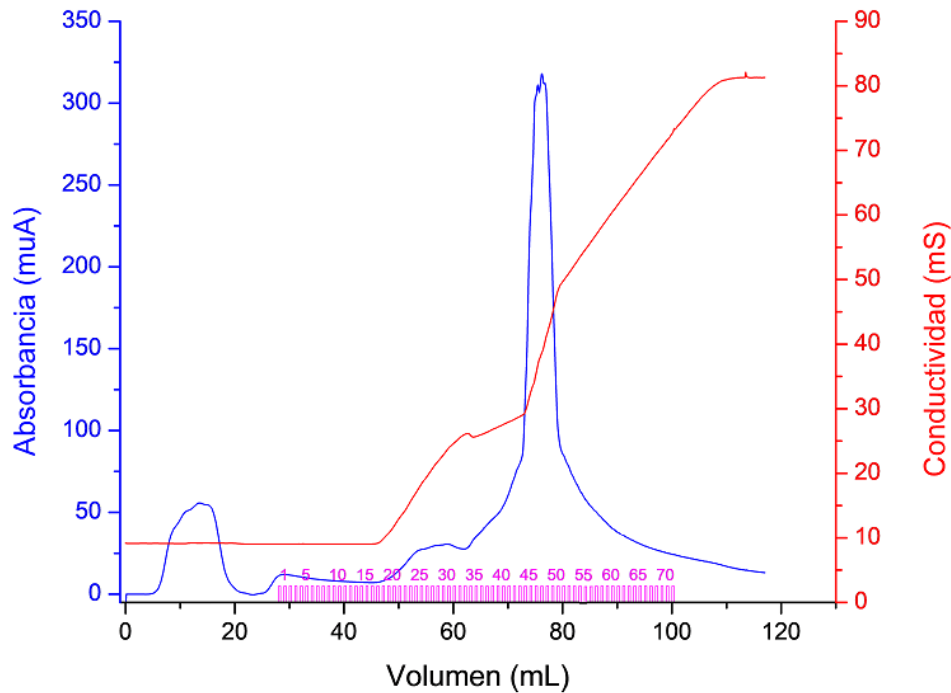


Figura 17. Cromatograma de la purificación del sobrenadante del cultivo de BMV2 por resina de intercambio aniónico High Q.

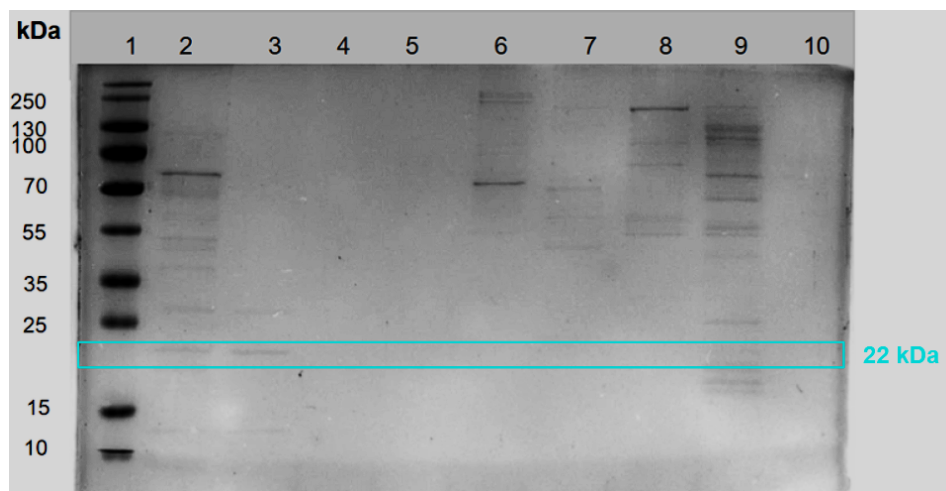


Figura 18. Purificación de BMV2 por cromatografía de intercambio aniónico en resina High Q a partir de un sobrenadante de 180 mL finales.

Carril 1: marcador (Page Ruler), carril 2: sobrenadante dializado, carril 3: paso por columna, carril 4: lavado, carril 5: fracción 2, carril 6: fracción 25, carril 7: fracción 40, carril 8: fracción 45, carril 9: fracción 49, carril 10: fracción 56

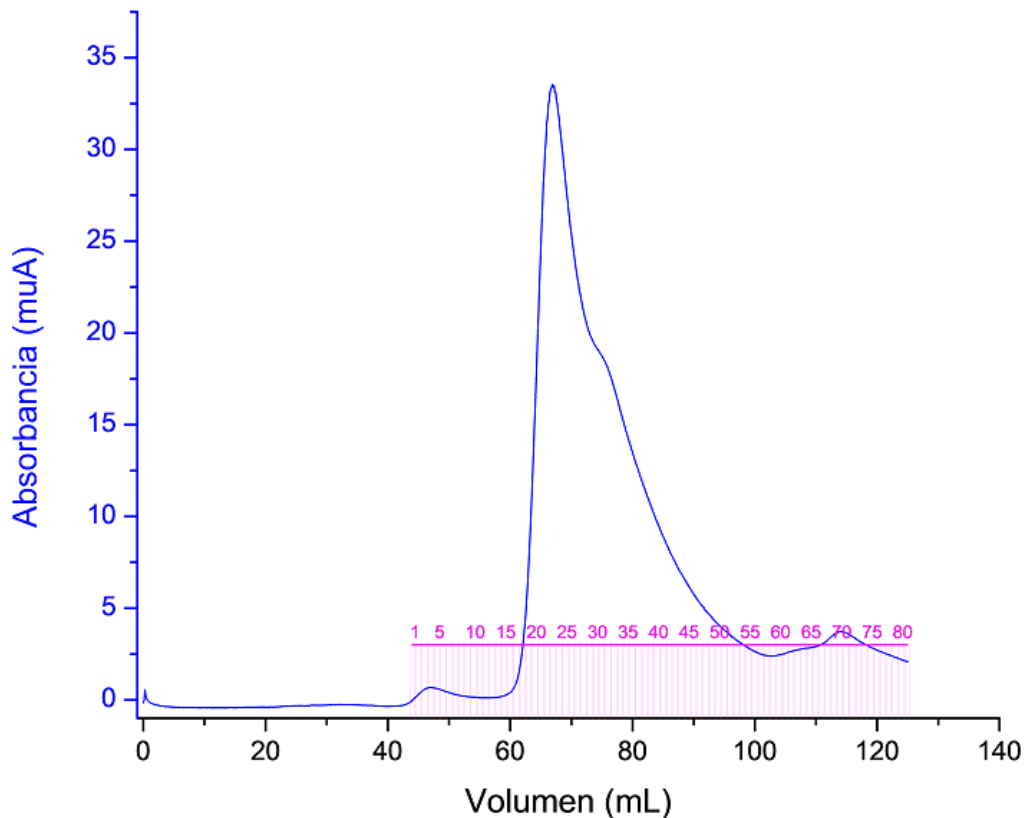


Figura 19. Cromatograma de la purificación de BMV2 por filtración en gel utilizando Sephacryl S-100 HR.



Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% de la purificación por filtración en gel utilizando Sephacryl 100 HR.

Carril 1: Muestra concentrada BMV2, carril 2: marcador (PAGEruler), carril 3: Fracción 20, carril 4: Fracción 23, carril 5: Fracción 26, carril 6: Fracción 28, carril 7: Fracción 30, carril 8: Fracción 32, carril 9: Fracción 35, carril 10: Fracción 38. Las muestras fueron concentradas mediante precipitación con TCA.

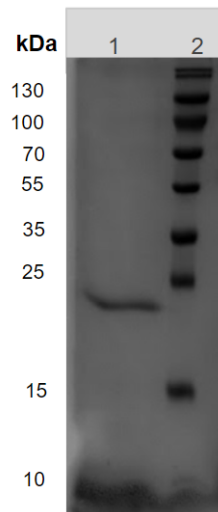


Figura 21. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% de la proteína BMV2 concentrada.
Carril 1: BMV2 concentrado, carril 2: marcador (Page Ruler).

Para obtener la proteína de cápside sin la etiqueta de histidinas se realizó un ensayo de expresión con la colonia obtenida de BMV1-pPICZ α A inducida con 2% de metanol en el cual no se logró observar la producción de la proteína BMV. Se repitió la transformación del plásmido BMV1-pPICZ α A en X-33, obteniéndose en esta ocasión 3 colonias positivas correspondientes a la colonia 1, 3 y 4 con las cuales se realizó otro ensayo de expresión, logrando visualizar la proteína del tamaño esperado como resultado de la inducción de las colonias con 1% de metanol durante los 4 días de cultivo (**Figura 22**).

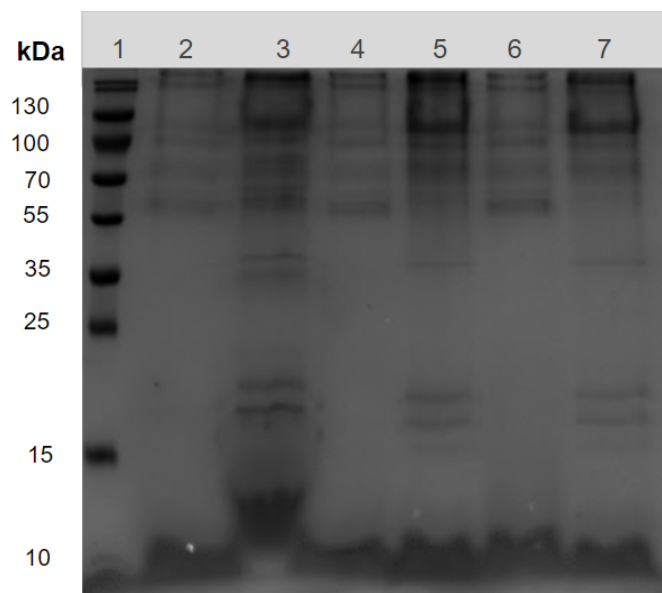


Figura 22. Electroforesis gel de poliacrilamida al 15% para el análisis de la inducción de las colonias 1, 3 y 4 de la transformación BMV1-pPICZ α A.

Carril 1: marcador (Page Ruler), carril 2: control clona 1 no inducido, carril 3: clona 1 inducido día 4, carril 4: control clona 3 no inducido, carril 5: clona 3 inducido día 4, carril 6: control clona 4 no inducido, carril 7: clona 4 inducido día 4.

5. Formación de nanopartículas tipo virus.

La proteína BMV se concentró y se intercambió el buffer por NaCl 1M, EDTA 1 mM, Tris 50 mM a pH 7.2, se cuantificó la proteína utilizando tanto el método de Bradford como el coeficiente de extinción molar teórico de la proteína CP de BMV2 ($\epsilon=23,950$) obteniéndose un volumen final de 500 μL a una concentración de 600 $\mu\text{g/mL}$.

Se realizó un experimento de encapsidación utilizando la proteína de cápside BMV2 y RNA purificado de BMV nativo. Al analizar las muestras por dispersión dinámica de luz, se observa un pico con un radio hidrodinámico promedio de 21.04 nm (**Figura 23**), aunque aparecen otros picos de mayor tamaño, lo que indica que hay también formación de algunos agregados.

Finalmente, para comprobar que las nanopartículas que se observaban en los experimentos de DLS correspondieran a VLPs y no a agregados inespecíficos se fijaron las muestras obtenidas de los ensambles en rejillas de cobre y se analizaron por TEM. A pesar de que se observan múltiples agregados en las micrografías, se lograron encontrar partículas esféricas de diferentes tamaños, entre las que se encuentran diversas partículas de 25 nm, lo que corresponde a nanopartículas tipo virus con un tamaño que ha sido reportado previamente para el BMV (**Figura 24**).

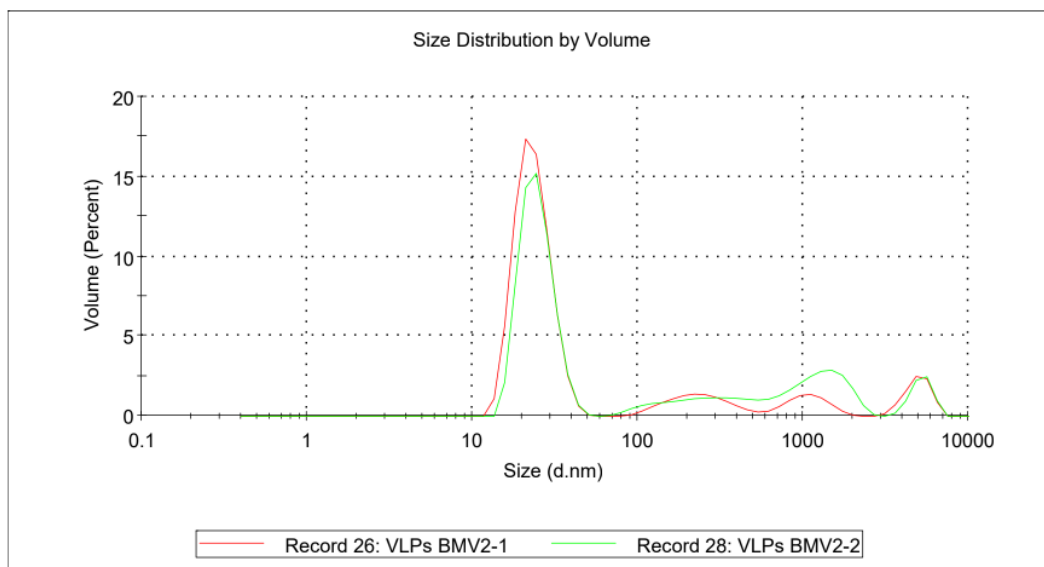


Figura 23. Distribución de tamaño por volumen para las partículas de BMV2 con RNA de BMV nativo obtenida por DLS en el equipo Zetasizer Nano ZS.

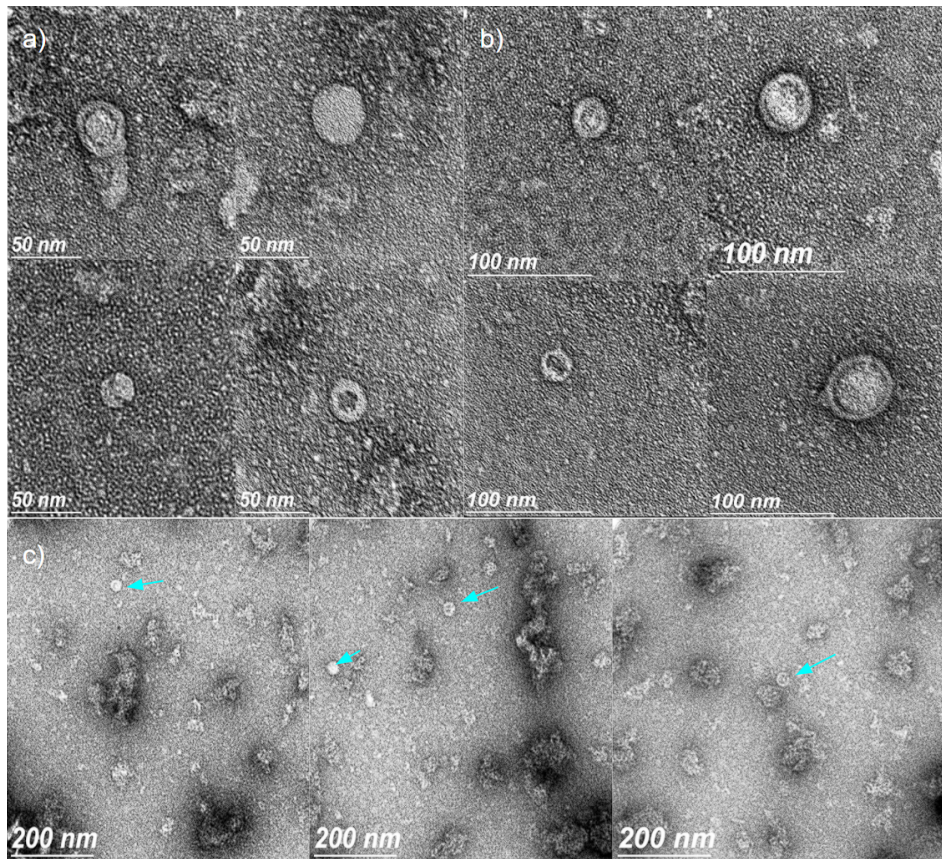


Figura 24. Micrografías electrónicas de transmisión de las partículas de BMV2 con RNA de BMV nativo. Las VLPs muestran la forma y tamaño característicos de la cápside de BMV. Las imágenes corresponden a diferentes campos de una misma muestra. a) escala 50 nm, b) escala 100 nm y c) escala 200 nm.

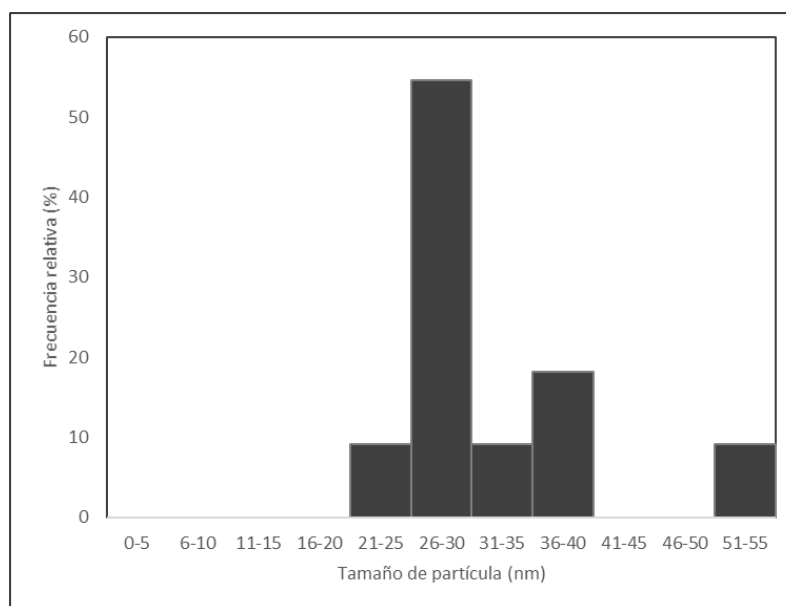


Figura 25. Histograma: Frecuencia relativa de la cantidad de partículas formadas por tamaño.

DISCUSIÓN

En este proyecto se llevó a cabo la expresión y purificación de la proteína de cápside del virus del mosaico del *Bromo*. De manera inicial se identificó la secuencia del gen por medio de la base de datos GenBank, lo cual nos ayudó de manera acertada para el diseño de los oligonucleótidos necesarios para la amplificación del gen de la proteína BMV. Durante las transformaciones a las cepas utilizadas, tanto para *E. coli* XLI-Blue como para *P. pastoris* X-33, se pudo observar una baja eficiencia de transformación ya que hubo poco crecimiento de colonias en las placas, así como también por la presencia de falsos positivos, lo cual pudo ser resultado de una baja eficiencia en las células competentes preparadas.

Para la clonación final del gen se utilizó el vector pPICZ α A, para la integración del gen de interés al genoma de la cepa *P. pastoris* X-33. Este vector permite la producción de la proteína a partir de la inducción con metanol, debido a que cuenta con el promotor de la enzima alcohol oxidasa (AOX1), el cual está estrictamente regulado y permite la sobreexpresión de proteínas heterólogas, además de que cuenta con una señal de secreción para el factor alpha (α -factor) de *S. cerevisiae*, permitiendo su expulsión al medio, lo cual facilita la purificación de la proteína. Además, el vector es un sistema bi-funcional que permite la replicación en *E. coli* y el mantenimiento en *P. pastoris* utilizando un gen que confiere resistencia a zeocina (Ahmad et al., 2014).

En el presente estudio, a partir de la inducción con metanol se logró expresar la proteína de cápside de BMV tras un período de incubación de 96 horas, el peso molecular calculado a partir de los geles desnaturalizantes es de 21.5 a 22.5 kDa.

Pichia pastoris fue elegida por su fácil manejo, capacidad para producir proteínas extracelulares solubles y para retener las modificaciones postraduccionales, reconociéndose como uno de los sistemas hospedadores de producción de proteínas más adecuados y potentes (Ahmad et al., 2014).

En general, *P. pastoris* se ha utilizado para la producción de diversas partículas tipo virus, como Human papillomavirus L1 (HPV) (Coimbra et al., 2011), Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) (Silva et al., 2014), Proteína viral 2 (VP2) del parvovirus porcino (PPV) (Guo et al., 2014), Bromovirus del moteado clorótico del caupí (CCMV) (Brumfield et al., 2004), Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) (Farnós et al., 2009), entre otros. Sin embargo, hasta donde sabemos, hasta ahora solo se han expresado las proteínas de cápside viral de BMV en plantas como cebada, trigo, tabaco (Ni et al., 2014). Por lo tanto, el presente estudio informa por primera vez la expresión heteróloga de esta proteína en un sistema de levadura.

El análisis por SDS-PAGE confirmó la producción de la proteína de cápside de BMV a partir de las 24 horas de inducción, sin embargo, también se observaba la presencia de otra proteína de mayor tamaño, la cual se sigue observando aún después de realizar la purificación por columna de afinidad a níquel y que podría tratarse de otra proteína que se esté expresando con la inducción de la cepa.

Durante el proceso de secreción de proteínas foráneas en *P. pastoris* pueden ocurrir eventos indeseables como la hiperglicosilación. *Pichia pastoris* puede glicosilar una proteína heteróloga incluso si esa proteína no está glicosilada por su huésped nativo (Cereghino y Cregg, 2000; Gonzalez et al., 2004; Romanos, Scorer y Clare, 1992).

El servidor GlycoPred permite predecir diversos sitios probables de glicosilación de la proteína expresada, al analizar la secuencia de la CP de BMV se pudieron predecir los probables sitios de glicosilación, aunque se pudo comprobar que el peso molecular de la proteína expresada, de acuerdo con el análisis por electroforesis, corresponde al esperado para la proteína sin modificaciones por lo tanto se concluye que no experimentó glicosilaciones.

A partir de la transformación del inserto BMV2-pPICZ α A en *P. pastoris* X-33, se identificó la colonia 4 como la mejor productora y se eligió para realizar un escalado de la producción inicialmente se realizó a partir de un preinóculo de 25 ml en medio BMGY, para una producción final de 100 mL en medio BMMY, siguiendo la misma metodología de producción, la expresión de la proteína de cápside de BMV2 se indujo inicialmente con 2% de metanol a 30 °C durante 4 días, la proteína se expresó en el medio (de manera extracelular/soluble), la purificación de la proteína producida se realizó por columna de afinidad a níquel, debido a la presencia de una etiqueta de 6 histidinas, siguiendo los pasos descritos en la metodología. A partir de la ecuación de la recta, se calculó la cantidad de proteína purificada, obteniendo un valor bajo de concentración (0.600 mg/mL y un volumen final de 500 μ L) (resultados no mostrados).

Bajo las condiciones de cultivo utilizadas para la expresión del gen se obtuvieron bajos rendimientos de proteína purificada, esto podría indicar que la columna no está logrando retener parte de la proteína BMV o que la producción bajo las condiciones de temperatura (30 °C), tiempo (96 horas) e inducción (2% de metanol) es muy baja.

Se ha demostrado que para la inducción del promotor AOX1 en *P. pastoris*, una concentración baja de metanol podría causar una tasa de crecimiento celular más baja y, por ello, un rendimiento bajo en la expresión de la proteína recombinante (Murray et al., 1989). Sin embargo, las cantidades excesivas de metanol podrían ser tóxicas para las células y afectar negativamente en la producción de las proteínas (Zhang et al., 2000; Cereghino y Cregg, 2000). Para mejorar el rendimiento de CP de BMV2 secretada, se modificó la concentración de metanol a 1% para optimizar las condiciones del cultivo, logrando observar una mayor cantidad de proteína secretada en comparación con las condiciones iniciales.

Debido a una contaminación en el stock de células, correspondientes a la colonia 4 del inserto BMV2-pPICZ α A, se repitió la transformación de BMV2-pPICZ α A en *P. pastoris* X-33, a partir de la cual se obtuvieron 4 colonias positivas (cepas 1, 2, 4 y 7).

Se realizó un segundo ensayo de expresión siguiendo las condiciones de incubación descritas en la metodología, pero modificando la concentración de metanol para la inducción del medio. En esta ocasión se comparó la expresión de la proteína en el sobrenadante inducido con 1% y 2% de metanol durante los 4 días de cultivo y se encontró que reduciendo la concentración de metanol a 1% se lograba una mayor producción de la proteína, datos observados a partir de las muestras tomadas del sobrenadante y visualizadas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Se eligió cromatografía de afinidad a níquel como método para la purificación de la proteína secretada debido a la presencia de la etiqueta de 6 histidinas en el extremo

N-terminal de la secuencia de la proteína BMV2. El sobrenadante se cargó en una columna HisTrap, siguiendo el protocolo descrito en la metodología y se analizó por electroforesis en gel de poliacrilamida, como resultado se logró observar la proteína de cápside BMV2 en las fracciones correspondientes al paso por columna y en el lavado, pero no en los pasos de elución con imidazol en donde se esperaba, lo cual podría indicar que los CP de BMV2 no fueron retenidos por la columna de afinidad, esto podría estar relacionado con la estructura de la proteína. Cada subunidad de la proteína de cápside de BMV de tipo salvaje contiene un brazo N-terminal rico en residuos básicos, los cuales son esenciales durante el proceso de encapsidación en el reconocimiento del ARN, por lo que se pliegan hacia el interior de la cápside e interactúan con el ARN (Choi et al., 2000; Calhoun et al., 2007; Janda et al., 1993). Esto podría explicar la incapacidad de la proteína expresada por unirse a la resina, al encontrarse la etiqueta de afinidad doblada hacia el interior de la estructura de la proteína junto al N-ARM.

Sucesos similares se han visto en otros estudios para la purificación de diversas proteínas fusionadas a etiquetas de polihistidinas, como en CCMV expresada de manera recombinante en *P. pastoris* con etiqueta N-terminal en donde los CP secretados no fueron retenidos por la columna de afinidad (Zhu et al., 2020), en un estudio se construyeron dos ARN polimerasas dependiente de ARN (RdRps) recombinantes fusionadas con etiquetas N- y C-terminales en donde la proteína fusionada con la etiqueta en el extremo C-terminal se unió de manera más débil a la resina y eluyó a una concentración de imidazol más baja (Kamkaew & Chimnaronk, 2015), también se pudo observar en la producción de la enzima Mandelato racemasa en *E. coli* fusionada con la etiqueta en los extremos N y C terminal en donde se observó que la proteína que contiene la etiqueta ubicada en el extremo C-terminal no se unió a la matriz cargada con níquel (Narmandakh & Bearne, 2010). En todos los casos la purificación ineficaz por cromatografía de afinidad a níquel se asoció a la estructura de la proteína a purificar, en donde esta podía adoptar ciertas conformaciones, lo que sugiere que la etiqueta 6xHis puede estar parcial o totalmente encerrada dentro de la estructura de la proteína, impidiendo el acceso a la misma y por lo tanto evitando que esta hiciera contacto con la resina y/o estuviera menos expuesta al solvente.

Al no lograrse la purificación de la proteína BMV2 por afinidad a níquel, se optó por utilizar una estrategia diferente, el siguiente ensayo de purificación de la proteína se llevó a cabo en 3 etapas: una purificación parcial en la que se empleó precipitación por sales, con sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, la segunda etapa de la purificación por intercambio iónico utilizando una columna comercial y finalmente se realizó una purificación por filtración en gel para recuperar la proteína presente en la fracción no unida en la cromatografía de intercambio iónico.

La precipitación con sulfato de amonio es uno de los métodos más utilizados en la purificación de proteínas, ya que éste permite la precipitación por reducción de la solubilidad con base en la fuerza iónica y no por la desnaturalización de las proteínas. Cuando se agrega la sal, los iones de sal interactúan con el agua, disminuyendo la interacción proteína-agua, mientras la concentración de sal aumenta, el agua es removida de los alrededores de la proteína, exponiendo las regiones hidrofóbicas y promoviendo así la interacción proteína-proteína, produciéndose con esto la precipitación. El objetivo principal de este método es

remover una cantidad importante de residuos que se encuentren en el medio, como pueden ser ácidos nucleicos, toxinas y otros compuestos. La proteína no es desnaturalizada, incluso al tratarse de enzimas, éstas logran recuperar su actividad enzimática mediante la resuspensión del pellet (Bollineni, et al., 2015; Rojas, V. R., 2009).

A partir del sobrenadante recuperado del cultivo de 300 mL de medio de X-33 con la construcción BMV2-Ppicz α A inducido con 1% de metanol, se realizó la precipitación con sulfato de amonio al adicionar (NH₄)₂SO₄ sólido hasta un 80% de saturación. Posteriormente las proteínas fueron resuspendidas y dializadas para eliminar la presencia de sal en las muestras. En la electroforesis se pudo observar la formación de bandas claras resultado de la concentración, resuspensión y diálisis de las proteínas contenidas en el sobrenadante, las muestras visualizadas en gel de poliacrilamida contenían la proteína esperada, así como otra proteína de mayor tamaño en concentración similar a la nuestra junto con otras proteínas de bajo peso molecular.

La cromatografía de intercambio iónico continuó a partir de la muestra dializada, se decidió la utilización de esta técnica debido a que es una de las más utilizadas para la purificación de proteínas, el método mencionado se utilizó además debido a que se disponía de los materiales y reactivos necesarios en el laboratorio, anterior a este proceso se realizó una precipitación con sulfato de amonio, el cual se ha descrito su uso para la separación de las proteínas de otros componentes del medio, en nuestro caso además de ello, se utilizó para poder concentrar la proteína en un volumen menor y así poder realizar el proceso de cromatografía en un volumen razonable.

Para la elección de la columna para la cromatografía de intercambio iónico se necesita conocer el punto isoeléctrico de BMV, este se calculó en base a la secuencia teórica, para lo cual se utilizó el servidor "ProtParam" disponible en ExPASy Proteomics Server (<https://web.expasy.org/protparam/>), como resultado se predijo un punto isoeléctrico de 9.2 para ambas proteínas, tanto para la que contiene la etiqueta de 6 histidinas como la que no.

Inicialmente se utilizó la resina de intercambio catiónico High S que contiene grupos funcionales sulfonato y es ideal para purificar proteínas y péptidos básicos y neutros, el pI calculado para BMV y BMV2 fue de 9.2, por lo que se trabajó a un pH de 4, con lo cual se esperaba que la proteína estuviera cargada positivamente, sin embargo no se pudo purificar la proteína por este medio (resultados no mostrados).

La cromatografía de intercambio iónico consiste en la unión de una proteína cargada a una resina con grupos iónicos de carga opuesta. La separación se logra debido a las diferencias entre las cargas, densidades de carga y las distribuciones de carga en la superficie de las proteínas en solución, lo que genera diferentes grados de interacción con el intercambiador iónico de la resina, estas interacciones pueden variar dependiendo de condiciones como la fuerza iónica y el pH (Vargas, 2006).

El fenómeno de adsorción de proteínas en superficies sólida es de gran complejidad ya que depende de varios factores, desde la propia naturaleza de la proteína, ya que incluso una misma proteína puede mostrar diferente grado de afinidad en distintas regiones de su superficie dependiendo de los residuos de aminoácidos presentes; hasta otros fenómenos asociados con las proteínas en solución y la

resina a utilizar, como lo son la cinética de adsorción, las interacciones proteína-proteína, la adsorción cooperativa o la agregación de proteínas.

Los parámetros externos que principalmente influyen en la adsorción de proteínas son la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la composición de los tampones de unión y elución, ya que estos pueden interferir con los tiempos de retención en la matriz sólida y con la realización de un proceso de separación eficiente (Rabe, Verdes & Seeger, 2011). Por lo cual, puede ser necesario optimizar las condiciones de purificación con este tipo de resina en ensayos posteriores, variando la composición del tampón, el pH y la temperatura del proceso.

Como consecuencia de los resultados obtenidos con la resina High S, y debido a la escasez de tiempo, se decidió utilizar una columna de intercambio aniónico para la purificación de la proteína. Inicialmente se utilizó como prueba la columna Q Fast Flow (Cytiva) con capacidad de 1 ml, la cual contiene grupos funcionales de aminas cuaternarias y es ideal para purificar proteínas y péptidos ácidos y neutros. Las fracciones se eluyeron utilizando un gradiente lineal de sales de 0 a 100% con buffer B y se visualizaron en un gel de poliacrilamida. La proteína de cápside no se unió a la columna, sin embargo, se pudo observar que este paso de purificación sería útil para la eliminación de la mayoría de las proteínas contaminantes que si se unen a la columna. A partir de los resultados obtenidos se decidió la utilización de la resina High Q (BioRad), una columna de intercambio aniónico con una capacidad mayor a QFF, en la cual se lograron retener la mayoría de las proteínas de tamaño superior a 22 kDa, mientras que la proteína BMV2 se logró observar nuevamente en la fracción no unida a la columna, junto con otras proteínas de peso menor a 15 kDa.

Una de las limitantes de la cromatografía de intercambio iónico, es que, si dos proteínas expresadas son muy similares en su carga superficial neta, estas pueden eluir juntas, por lo cual puede ser necesario el uso de otro método para su separación, como puede ser la cromatografía de exclusión de tamaño o filtración en gel (Duong-Ly & Gabelli, 2014). Para lograr eliminar el resto de las proteínas contaminantes se realizó una cromatografía por filtración en gel utilizando la columna Sephacryl 100HR, debido a la resolución de la columna se pudo observar en el cromatograma la presencia de dos picos transpuestos, el primer pico observado correspondiente a la proteína de interés que mostraba mayor concentración, mientras que el otro se trataba de las proteínas contaminantes que tenían un peso molecular más pequeño (<16 kDa).

Se tomaron muestras de las fracciones contenidas entre estas regiones del cromatograma para visualizar la presencia de BMV2, las muestras se precipitaron con TCA y se cargaron en el gel de poliacrilamida, en donde se pudo observar como resultado la eliminación completa de las bandas con pesos superiores al de nuestra proteína, sin embargo, aún se observó la presencia de bandas de peso inferior, ya que eluyeron muy cercanas a las nuestras.

Se recuperaron las fracciones que contenían la banda de ~22 kDa, correspondiente a la proteína BMV2, se concentró la proteína y se dializó contra buffer para proteína de cápside. Posteriormente se almacenó para continuar con los ensayos de encapsidación, después de 4 días en almacenamiento a 4 °C se logró observar, a partir de un gel de poliacrilamida, que las bandas correspondientes a las proteínas

de entre 10-15 kDa habían disminuido en intensidad, lo cual pudo haber sucedido debido a la precipitación de las mismas durante el almacenamiento.

La precipitación de estas proteínas pudo haber sido provocada por la presencia de algún factor de estrés en particular como la variación en la temperatura, las condiciones de agitación de la muestra, la composición del buffer, el pH, la concentración de sales o incluso la concentración de la misma proteína (Linn, 2009; Chen, Lau, Brodsky, Kleemann & Latypov, 2010).

Para la formación de las nanopartículas tipo virus utilizando la proteína BMV2 purificada, se realizó un cambio de buffer a solución de ensamble con RNA del virus silvestre, el cual fue proporcionado por la Dra. Verónica Villagrana.

La formación de las VLPs se confirmó por DLS y posteriormente por TEM. La gráfica de DLS permitió observar la presencia de otros picos de mayor tamaño al esperado, indicando la presencia de moléculas más grandes y la formación de posibles agregados. Los intervalos de tamaños y la cantidad de VLPs formadas se calcularon a partir de las micrografías obtenidas con TEM, utilizando el programa ImageJ.

Se pudo observar que las VLP formadas mostraban una simetría icosaédrica, el diámetro medio de las mismas fue de 27.68 nm, mientras que el tamaño general osciló entre 24 y 52 nm, dónde se pudo presenciar que la mayoría de las VLP formadas se encontraban entre 26 y 28 nm, con una frecuencia relativa de 54.54%.

El proceso de ensamblaje de VLPs *in vitro* se reconoce como un proceso complejo y que además puede variar entre diferentes cápsides virales. Se ha reconocido que el tamaño del genoma o la carga empaquetada en las cápsides influye directamente sobre el tamaño de la VLP, sin embargo no es un factor independiente. La forma y tamaño final de la VLP también se ve influenciada por otros factores como lo es la interacción entre la proteína de cápside y el ARN y las interacciones proteína-proteína, las cuales dependen en gran parte de las condiciones experimentales, como lo son el pH, la fuerza iónica, la temperatura e incluso la concentración de la misma proteína (Le & Müller, 2021; Hosseini et al., 2019).

Las variaciones en los tamaños de las VLPs formadas pueden ser resultado de algún factor que afecta las interacciones entre los componentes durante el proceso de encapsidación. Se ha demostrado que el pH afecta directamente en las interacciones proteína-proteína, donde un pH más bajo lleva a interacciones más fuertes entre las mismas provocando con ello la formación de VLPs más compactas. Además, dependiendo de la forma en que interaccione la proteína (debido a su plegamiento espontáneo) con el genoma (o partícula a encapsidar) y el tamaño del mismo, la cápside puede cambiar su forma de ensamblaje y/o su diámetro final, (Hu et al., 2008; Strugała et al., 2021), por lo cual otro factor que pudo haber afectado el ensamblaje es la presencia de la etiqueta de histidinas en el extremo N terminal, la cual podría haber interferido con las interacciones electrostáticas entre la proteína de cápside y el RNA, conduciendo así a la formación de VLPs menos compactas o inhibiendo la interacción proteína-RNA y evitando la formación de las VLPs (Ren, Wong & Lim, 2006; Strugała et al., 2021).

Los factores que afectan la cantidad de VLPs producidas, también pueden ser los mismos que propicien la formación de agregados durante el proceso de encapsidación al promover el plegamiento incorrecto las proteínas (Chen, Lau, Brodsky, Kleemann & Latypov, 2010; Hu et al., 2008; Linn, 2009; Ren, Wong & Lim, 2006).

Debido a los resultados obtenidos en el proceso de encapsidación, puede ser necesaria la optimización en los parámetros experimentales, como lo son el pH, la fuerza iónica, la concentración de proteína de cápside y la concentración de ARN, para evitar la formación de agregados y promover la formación de VLPs.

Por otra parte, bajo las condiciones iniciales de cultivo inducido con 2% de metanol, no se logró la expresión de la proteína BMV a partir de las células transformadas con la construcción BMV1-pPICZ α A, por lo que se repitió la transformación del plásmido obteniendo finalmente 3 colonias.

La capacidad de producción de la proteína BMV1 a partir de las cepas obtenidas se confirmó por medio de la realización de un ensayo de expresión, cambiando la concentración de metanol a las condiciones iniciales de cultivo, reduciendo el porcentaje de 2% a 1% para la inducción durante los 4 días de análisis, las muestras recuperadas del sobrenadante se visualizaron a partir de electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%, logrando observar la proteína de ~22 kDa en los cultivos de las 3 cepas.

Debido a cuestiones de tiempo los ensayos con BMV1 no pudieron continuar, quedando como perspectivas la expresión en un mayor volumen de cultivo, la purificación de la proteína y la verificación de su capacidad de encapsidación.

CONCLUSIONES

En este estudio se realizó la producción recombinante de la proteína de cápside del virus del mosaico del bromo (BMV) utilizando la cepa X-33 de *P. pastoris*.

- Por medio de PCR se logró la correcta amplificación del gen que codifica para la proteína de cápside de BMV tanto con el oligonucleótido Fw1 como Fw2.
- Se construyeron los plásmidos para la expresión de la proteína recombinante BMV en *P. pastoris* utilizando el vector pPICZ α A.
- Se expresó la proteína recombinante de BMV en las cepas transformadas de *P. pastoris* X-33.
- Se logró la producción de la proteína de cápside de BMV a partir de la mejor clona productora.
- Se consiguió purificar a homogeneidad la proteína de capa de BMV.
- Se logró encapsidar el RNA de BMV en nanopartículas tipo virus ensambladas con la proteína recombinante BMV2.

La producción de la proteína de cápside de BMV de manera recombinante en *P. pastoris* se logró en una concentración relativamente baja. Se espera poder mejorar

en gran medida la producción de esta proteína en cultivos de *P. pastoris*, por lo cual será necesario el análisis de las diversas etapas del proceso, queda como trabajo pendiente para posteriores experimentos, la reevaluación de los parámetros de cultivo (temperatura, tiempo de incubación y concentración de metanol sobre la inducción del cultivo) con el fin de mejorar los rendimientos en la producción de la proteína; la optimización del proceso de purificación, que permita la obtención de la proteína de manera funcional en altas concentraciones, con menos pasos y en una menor cantidad de tiempo, asegurando que ninguna de las etapas, como la precipitación con sulfato de amonio o la adición de la etiqueta de histidinas, este afectando de manera negativa las características de la proteína y con ello comprometiendo su purificación o el ensamblaje *in vitro* de las VLPs.

Además, es necesario la optimización en el proceso de ensamble de VLPs *in vitro* para mejorar los rendimientos de ensamble y con ello permitir una producción a mayor escala. Queda como trabajo pendiente la evaluación de la capacidad para encapsidar otras moléculas como proteínas, nanopartículas de oro, RNAi y RNA viral, así como continuar con los ensayos de la proteína BMV1, evaluando su capacidad de expresión, purificación y encapsidación.

CITAS Y REFERENCIAS

Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., y Schwab, H. (abril 2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 5301–5317. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>

Annamalai, P., & Rao, A. L. N. (2006). Delivery and Expression of Functional Viral RNA Genomes In Planta by Agroinfiltration. *Current Protocols in Microbiology*, 1, 16.B.2.1–16.B.2.15. doi:10.1002/9780471729259.mc16b02s01

Beren, C., Cuib, Y., Chakravarty, A., Yang, X., Raoc, L. N., Knoblera, C. M., Zhou, Z. H., y Gelbarta, W. M. (2020). Genome organization and interaction with capsid protein in a multipartite RNA virus. *PNAS*, 117 (20), 10673-10680. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915078117>

Bollineni, R. C., Guldvik, I. J., Grönberg, H., Wiklund, F., G. Mills, I. G. and Thiede, B. (2015). A differential protein solubility approach for the depletion of highly abundant proteins in plasma using ammonium sulfate. *Analyst*, 140(24). DOI:10.1039/c5an01560j

Brumfield, S., Willits, D., Tang, L., Johnson, J. E., Douglas, T., y Young, M. (abril 2004). Heterologous expression of the modified coat protein of Cowpea chlorotic mottle bromovirus results in the assembly of protein cages with altered architectures and function. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY*, 85(4). <https://doi.org/10.1099/vir.0.19688-0>

Calhoun, S. L., Speir, J. A., Rao, A. L. N. (2007). In vivo particle polymorphism results from deletion of a N-terminal peptide molecular switch in brome mosaic virus capsid protein. *Virology*, 364, 407–421. doi:10.1016/j.virol.2007.03.034

Calhoun, S. L., y Rao, A. L. N. (2007). Functional analysis of brome mosaic virus coat protein RNA-interacting domains. *Arch Virol*, 153,231–245. DOI 10.1007/s00705-007-1085-z

Cereghino, J. L. y Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24 (1), 45–66, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>

Chaturvedi, S., y Rao, A. (2018). Molecular and biological factors regulating the genome packaging in single-strand positive-sense tripartite RNA plant viruses. *Current Opinion in Virology*, 33, 113–119. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.07.019>

Chen, C., Daniel, M. C., Quinkert, Z. T., De, M., Stein, B., Bowman, V. D., Chipman, P. R., Rotello, V. M., Kao, C. C., Dragnea, B. (2006). Nanoparticle-templated assembly of viral protein cages. *Nano Lett.* 6, 611-615. <https://doi.org/10.1021/nl0600878>

Chen, S., Lau, H., Brodsky, Y., Kleemann, G. R. & Latypov, R. F. (2010). The use of native cation-exchange chromatography to study aggregation and phase separation of monoclonal antibodies. *PROTEIN SCIENCE*, 19 (6), 1191-1204. <https://doi.org/10.1002/pro.396>

Chen, X., Chen, J., Zhang, Y., Zhu, P., Deng, Y., y Liu, Q. (2016). Secreted expression of truncated capsid protein from porcine circovirus type 2 in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 38, 959–967. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2076-5>

Choi, Y. G., Grantham, G. L., y Rao, A. (2000). Molecular Studies on Bromovirus Capsid Protein: VI. Contributions of the N-Terminal Arginine-Rich Motif of BMV Capsid Protein to Virion Stability and RNA Packaging. *Virology*, 270, 377–385. doi:10.1006/viro.2000.0312

Coimbra, E. C., Gomes, F. B., Campos, J. F., D'arc, M., Carvalho, J. C., Mariz, F. C., Jesus, A. L. S., Stocco, R. C., Beçak, W., y Freitas, A. C. (2011). Production of L1 protein from different types of HPV in *Pichia pastoris* using an integrative vector. *Braz J Med Biol Res*, 44(12), 1209-1214. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500141>

Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Chapter Eight - Using Ion Exchange Chromatography to Purify a Recombinantly Expressed Protein. *Methods in Enzymology*, 541, 95-103. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00008-2>

Farnós, O., Boué, O., Parra, F., Martín, J. M., Valdés, O., Joglar, M., Navea, L., Naranjo, P., Lleonart, R. (2005). High-level expression and immunogenic properties of the recombinant rabbit hemorrhagic disease virus VP60 capsid protein obtained in

Pichia pastoris. *Journal of Biotechnology*, 117 (3), 215-224.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.01.013>

Farnós, O., Fernández, E., Chiong, M., Parra, F., Joglar, M., Méndez, L., Rodríguez, E., Moya, G., Rodríguez, D., Lleonart, R., González, E., Alonso, A., Alfonso, P., Suarez, M., Rodríguez, M., y Toledo, J. R. (2009). Biochemical and structural characterization of RHDV capsid protein variants produced in *Pichia pastoris*: Advantages for immunization strategies and vaccine implementation. *Antiviral Research*, 81(1), 25–36. doi:10.1016/j.antiviral.2008.08.007

Gonzalez, L. J., Cremata, J. A., Guanche, Y., Ramos, Y., Triguero, Á., Cabrera, G., Montesino, R., Huerta, V., Pons, T., Boue, O., Farnos, O., Rodríguez, M. (2004). The cattle tick antigen, Bm95, expressed in *Pichia pastoris* contains short chains of N- and O-glycans. *Arch. Biochem. Biophys.* 432, 205–211.

Gu, Z., Biswas, A., Zhao, M., y Tang, Y. (2011). Tailoring nanocarriers for intracellular protein delivery. *Chem. Soc. Rev.*, 40, 3638–3655. DOI: 10.1039/c0cs00227e

Guo, C., Zhong, Z., y Huang, Y. (2014). Production and immunogenicity of VP2 protein of porcine parvovirus expressed in *Pichia pastoris*. *Arch Virol*, 159, 963–970.
<https://doi.org/10.1007/s00705-013-1907-0>

Hema, M., Vishnu, G., Savithri, H., Murthy, M. (2019). Capítulo 6: Emerging Trends in the Development of Plant Virus-Based Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, pp 61-82, DOI: 10.1016/B978-0-12-816328-3.00006-4

Hosseini, Seyed., Sarvari, Taravat., Bashiri, Ghazal., Khatami, Maryam., y Shojaosadati, Seyed. (2019). Assessing virus like particles formation and r-HBsAg aggregation during large scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 697-711. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.019>

Hu, Yufang., Zandi, Roya., Anavitarte, Adriana., Knobler, Charles., y Gelbart, William. (2008). Packaging of a Polymer by a Viral Capsid: The Interplay between Polymer Length and Capsid Size. *Biophysical Journal*, 94(4), 1428-1436. DOI:<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.117473>

Janda, M. y Ahlquist, P. (1993). RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. *Cell*, 72, 961–970.

Jeevanandam, J., Pal, K., y Danquah, M. (2018). Danquah, Virus-like nanoparticles as a novel delivery tool in gene therapy., *Biochimie*, 157, 38-47.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.11.001>

Juturu, V., y Wu, J. C. (2017). Expresión de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*: Últimos avances en investigación y aplicaciones. *ChemBioChem*, 19 (1), 7–21. Doi: 10.1002 / cbic.201700460

Kamkaew, M., & Chimnaronk, S. (2015). Characterization of soluble RNA-dependent RNA polymerase from dengue virus serotype 2: The polyhistidine tag compromises the polymerase activity. *Protein Expression and Purification*, 112, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.04.008>

Kao, C. C., Ni, P., Hema, M., Huang, X., y Dragnea, B. (2011). The coat protein leads the way: an update on basic and applied studies with the Brome mosaic virus coat protein. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, 12(4), 403–412. DOI: 10.1111/J.1364-3703.2010.00678.X

Le, Dinh., & Müller, Kristian. (2021). In Vitro Assembly of Virus-Like Particles and Their Applications. *Life*, 11(4), 334; <https://doi.org/10.3390/life11040334>

Linn, S. (2009). Chapter 2 Strategies and Considerations for Protein Purifications. *Guide to Protein Purification*, 2nd Edition, 9–19. doi:10.1016/s0076-6879(09)63002-0

Lucas, R. W., Larson, S. B., y McPherson, A. (2002). The Crystallographic Structure of Brome Mosaic Virus. *J. Mol. Biol.*, 317, 95-108. doi:10.1006/jmbi.2001.5389

Mariz, F. C., Coimbra, E. C., Jesus, A. L. S., Nascimento, L. M., Torres, F. A. G., y Freitas, A. C. (2015). Development of an IP-Free Biotechnology Platform for Constitutive Production of HPV16 L1 Capsid Protein Using the *Pichia pastoris* PGK1 Promoter. *BioMed Research International*, 2015, 11 pag. <https://doi.org/10.1155/2015/594120>

Murray, W., Duff, S. B., y Lanthier, P. (1989). Induction and stability of alcohol oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 32(1). doi:10.1007/bf00164829

Narmandakh, A., & Bearne, S. L. (2010). Purification of recombinant mandelate racemase: Improved catalytic activity. *Protein Expression and Purification*, 69(1), 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.06.022>

Ni, P., Vaughan, R. C., Tragesser, B., Hoover, H., & Kao, C. C. (2014). The Plant Host Can Affect the Encapsidation of Brome Mosaic Virus (BMV) RNA: BMV Virions Are Surprisingly Heterogeneous. *Journal of Molecular Biology*, 426(5), 1061–1076. doi:10.1016/j.jmb.2013.09.007

Núñez, A., Fournier, P. G. J., Arellano, D. L., Rodriguez, A. G., Vazquez, R., y Cadena, R. D. (2020). Brome mosaic virus-like particles as siRNA nanocarriers for biomedical purposes. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 11, 372–382. doi:10.3762/bjnano.11.28

Pavlovic, M., Mayfield, J., y Balint, B. (2013). Nanotechnology and Its Application in Medicine. *Handbook of Medical and Healthcare Technologies*, 181–205. doi:10.1007/978-1-4614-8495-0_7

Pérez-Sánchez, J. E. (2017). *Cápsides virales como nanovehículos de moléculas hidrofóbicas* [tesis de pregrado]. Universidad Nacional Autónoma de México, Baja California, México.

Rabe, M., Verdes, D., & Seeger, S. (2011). Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 161(1-2), 87-106. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.007>

Ren, Yupeng., Wong, Sek-Man., y Lim, Lee-Yong. (2006). In vitro-reassembled plant virus-like particles for loading of polyacids. *Journal of General Virology*, 87(9). <https://doi.org/10.1099/vir.0.81944-0>

Rojas, V. R. (2009). EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ENZIMAS PECTINOLÍTICAS OBTENIDAS POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SEMISÓLIDO DEL *Aspergillus niger*. (Proyecto de pregrado). Universidad EAFIT, Medellín, Colombia.

Romanos, M. A., Scorer, C. A., y Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8(6), 423–488. doi:10.1002/yea.320080602

Saini, J., Saini, S., y Sharma, S.(2010). Nanotechnology: The Future Medicine. *J Cutan Aesthet Surg*, 3(1): 32–33. doi: 10.4103/0974-2077.63301

Salgado, R. (octubre 2016). NANOVEHÍCULOS: FÁRMACOS INTELIGENTES. *sabermas*. <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/tecnologia/230-numero-26/413-mini-vehiculos-farmacos-inteligentes.html>

Sánchez, L., Tapia, A., Juarez, K., Patterson, D., Cadena, R., Douglas, T., y Vazquez, R. (octubre 2015). Design of a VLP-nanovehicle for CYP450 enzymatic activity delivery. *Journal of Nanobiotechnology*, 13(66). <https://doi.org/10.1186/s12951-015-0127-z>

Sanchooli, A., Aghaiypour, K., Kiasari, B. A., Samarbaf, A., Ghadiri, A., Makvandi, M. (2018). VLP Production From Recombinant L1/L2 HPV-16 Protein Expressed in *Pichia Pastoris*. *Protein Pept Lett*, 25(8), 783-790. doi: 10.2174/0929866525666180809124633.

Schneemann, A., y Young, M. J. (2003). Viral assembly using heterologous expression systems and cell extracts. *Advances in PROTEIN CHEMISTRY*, 64, 1-36. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(03\)01001-5](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(03)01001-5)

Silva, J. G., Coimbra, E. C., Jesus, A. L. S., Mariz, F. C., Silva, K. M. G., Lobato, Z. I. P., Campos, A. C., Couthino, L., Castro, R., y Freitas, A. C. (2014). Secretory expression of Porcine Circovirus Type 2 capsid protein in *Pichia pastoris*. *Journal of Virological Methods*, 207, 226–231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.07.021>

Strugała, A., Jagielski, J., Kamel, K., Nowaczyk, G., Radom, M., Figlerowicz, M., Urbanowicz, A. (2021). Virus-Like Particles Produced Using the Brome Mosaic Virus Recombinant Capsid Protein Expressed in a Bacterial System. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 3098. <https://doi.org/10.3390/ijms22063098>

Sullivan, M. and Ahlquist, P. (1999) A brome mosaic virus intergenic RNA3 replication signal functions with viral replication protein 1a to dramatically stabilize RNA in vivo. *J. Virol.* 73, 2622–2632.

Torchilin, V. P. (2000). Drug targeting. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, S81–S91. doi:10.1016/s0928-0987(00)00166-4

Vargas, M. (2006). IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA PURIFICACIÓN DE ALBÚMINA A PARTIR DE PLASMA EQUINO. (Tesis de pregrado). INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA, Cartago, Costa Rica.

Viader-Salvadó, J. M., Guerrero-Olazarán, M. (2011). Biotecnología de proteínas recombinantes con *Pichia pastoris*. XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. (p. 1). Querétaro. Recuperado de https://smbb.mx/congresos%20smbb/queretaro11/TRABAJOS/simposios/SimposioV1_Viader.pdf

Yildiz, I., Tsvetkova, I., Wen, A. M., Shukla, S., Masarapu, M. H., Dragnea, B., Steinmetz, N. F. (2012). Engineering of Brome mosaic virus for biomedical applications. *RSC Advances*, 2, 3670-3677. DOI: 10.1039/c2ra01376b

Zhang, W., Inan, M., y Meagher, M. M. (2000). Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 5(4), 275–287.

Zhao, X., Fox, J. M., Olson, N. H., Baker, T. M., y Young, M. J. (1995). In vitro assembly of cowpea chlorotic mottle virus from coat protein expressed in *Escherichia coli* and in vitro-transcribed viral cDNAs. *Virology*, 207, 486–494.

Zhu, J., Yang, K., Liu, A., Lu, X., Yang, L., Zhao, Q. (2020). Highly secretory expression of recombinant cowpea chlorotic mottle virus capsid proteins in *Pichia pastoris* and in-vitro encapsulation of ruthenium nanoparticles for catalysis. *Protein Expr Purif*, 174:105679. doi:10.1016/j.pep.2020.105679

ANEXOS

Figura 8. Alineamiento entre secuencias BMV1

Alineamiento entre las secuencias BMV1-teórico y BMV1-real mediante el software ClustalW, donde la coincidencia de bases se representa por “*”.

pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	AGATCTAACATCCAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTGGCCATCCGACATCCACAG AGATCTAACATCCAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTGGCCATCCGACATCCACAG *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GTCCATTCTCACATAAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGT GTCCATTCTCACATAAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGGCCATCGAAAAACC TGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGGCCATCGAAAAACC *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	AGCCCAAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTA AGCCCAAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTA *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	ACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTGTTTA ACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTGTTTA *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTG TTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTG *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	AGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAAATGGCCCAAACTGACAGTTAAACGCT AGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAAATGGCCCAAACTGACAGTTAAACGCT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACCTAAGTTGGTTCG GTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACCTAAGTTGGTTCG *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATACCGTTTGT TTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATACCGTTTGT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CTTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCT CTTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAATGGGGAACACCCGCT CTCTATCGCTTCTGAACCCCGGTGCACCTGTGCCGAAACGCAATGGGGAACACCCGCT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACT TTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAAT GCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAAT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	ATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTT ATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	ACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGTATTTAACGACTTTTAACGA ACTTTCATAATTGCGACTGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGTATTTAACGACTTTTAACGA *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CAACTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAACGATGAGATTCCTTCAATTTT CAACTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAACGATGAGATTCCTTCAATTTT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TACTGCTGTTTTATTTCGAGCATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGA TACTGCTGTTTTATTTCGAGCATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGA *****

pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	AGATGAAACGGCACAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTACTCAGATTTAGAAGGGGA AGATGAAACGGCACAAATCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTACTCAGATTTAGAAGGGGA *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATACGGGTATTGTTTATAAA TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATACGGGTATTGTTTATAAA *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	TACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGC TACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGC *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	TGAAGCTGAATTCATGTCGACTTCAGGAAGTGGTAAGATGACTCGCGCGCAGCGTCGTGC TGAAGCTGAATTCATGTCGACTTCAGGAAGTGGTAAGATGACTCGCGCGCAGCGTCGTGC *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	TGCCGCTCGCAGAAATCGTTGGACCGCTAGGGTCCAACAGTAATTGTCGAACCACTCGC TGCCGCTCGCAGAAATCSTTGGACCGCTAGGGTCCAACAGTAATTGTCGAACCACTCGC *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	TGCTGGCCAAAGGCAAGGCCATTAAGCGATTGCAAGGATACAGCATATCAAAGTGGGAGGC TGCTGGCCAAAGGCAAGGCCATTAAGCGATTGCAAGGATACAGCATATCAAAGTGGGAGGC *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	GTCTTCGGACGCGATTACAGCGAAAGCCACCAATGCCATGAGTATCACTCTGCCCATGA GTCTTCGGACGCGATTACAGCGAAAGCCACCAATGCCATGAGTATCACTCTGCCCATGA *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	GCTCTCTTCTGAAAAGAATAAAGGAGCTTAAGGTCGGCAGGGTGTCTTTGGTTGGGACT GCTCTCTTCTGAAAAGAATAAAGGAGCTTAAGGTCGGCAGGGTGTCTTTGGTTGGGACT *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	TCTTCTAGCGTTGCTGGGAGGATTAAGGCTTGTGTGCTGAGAAACAGGCACAGGCCGA TCTTCTAGCGTTGCTGGGAGGATTAAGGCTTGTGTGCTGAGAAACAGGCACAGGCCGA *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	GGCTGCTTTTCAAGTAGCCTTGGCGGTTGCAGACTCCTCGAAAGAGGTGGTCGCGGCCAT GGCTGCTTTTCAAGTAGCCTTGGCGGTYGCAGACTCCTCGAAAGAGGTGGTCGCGGCCAT *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	GTATACGGACGCCCTTTCGAGGGGCGACTCTGGGGGATTGTCTTAATCTCCAGATTTATCT GTATACGGACGCCCTTTCGAGGGGCGACTCTGGGGGATTGTCTTAATCTCCAGATTTATCT *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	GTATGCATCTGAAGCAGTGCCTGCTAAGGCGGTCGTTGTACATCTAGAAGTTGAGCACGT GTATGCATCTGAAGCAGTGCCTGCTAAGGCGGTCGTTGTACATCTAGAAGTTGAGCACGT *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	AAGGCTACGTTGATGACTTCTTACCCCGGTTTATAGGTAGGCGGCCAGCAGTTTCT AAGGCTACGTTGATGACTTCTTACCCCGGTTTATAGGTAGGCGGCCAGCAGTTTCT *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	AGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCA AGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCA *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	TCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGA TCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGA *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	AGACCGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCTCGAGAGATG AGACCGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATGCCATTTGCTCGAGAGATG *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	CAGGCTTCATTTTGTACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTGTGTC CAGGCTTCATTTTGTACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGTATAGGATTTTTTTTGTGTC *****
pPiczaA-BMW1teorico pPICZaA-BMW1-real	ATTTTGTTCCTTCTCGTACGAGCTTGTCTCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATAT ATTTTGTTCCTTCTCGTACGAGCTTGTCTCTGATCAGCCTATCTCGCAGCTGATGAATAT *****

pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCATTGAGTTTGATGTTTTCTTGGTATTTCCCACT CTTGTGGTAGGGGTTTGGGAAAATCATTGAGTTTGATGTTTTCTTGGTATTTCCCACT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACACACCA CCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACACACCA *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTTTACTCTTCCAGATTTCTCGGACTCCGCGCAT TAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTTTACTCTTCCAGATTTCTCGGACTCCGCGCAT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CGCCGTACCACCTCAAACACCCCAAGCACAGCATACTAAATTTCCCTCTTTCTTCTCT CGCCGTACCACCTCAAACACCCCAAGCACAGCATACTAAATTTCCCTCTTTCTTCTCT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	AGGGTGTGTTAATTACCCGTAATAAGGTTTGGAAAAGAAAAAGAGACCGCTCGTTT AGGGTGTGTTAATTACCCGTAATAAGGTTTGGAAAAGAAAAAGAGACCGCTCGTTT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CTTTTTCTTGTGAAAAAGGCAATAAAAAATTTTATCACGTTCTTTTTCTTGAATTT CTTTTTCTTGTGAAAAAGGCAATAAAAAATTTTATCACGTTCTTTTTCTTGAATTT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TTTTTTTTAGTTTTTCTCTTTCAGTGACCTCCATTGATATTAAGTTAATAAACGGTC TTTTTTTTAGTTTTTCTCTTTCAGTGACCTCCATTGATATTAAGTTAATAAACGGTC *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTTCATTACAACTTTTTTACTTCTT TTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTTCATTACAACTTTTTTACTTCTT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GTTTCATTAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGGTGTGACAATTAATCATC GTTTCATTAGAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGGTGTGACAATTAATCATC *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GGCAGTATATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAATAAACATGGCCAAGTT GGCAGTATATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAATAAACATGGCCAAGTT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGACGTCCGCCGAGCGGTGAGTTCTGGAC GACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGACGTCCGCCGAGCGGTGAGTTCTGGAC *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CGACCGGCTCGGTTCTCCCGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGA CGACCGGCTCGGTTCTCCCGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGA *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACAGGTGGTGCCGGACAACACCTGGC CGACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACAGGTGGTGCCGGACAACACCTGGC *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CTGGGTGTGGGTGCGCGGCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTGTTGTCAC CTGGGTGTGGGTGCGCGGCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCGGAGGTGTTGTCAC *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GAACTTCGGGACGCCCTCCGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCGTGGGGCG GAACTTCGGGACGCCCTCCGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCGTGGGGCG *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GGAGTTCGCCCTGCGGACCCGGCCGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGA GGAGTTCGCCCTGCGGACCCGGCCGCAACTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGA *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CTGACACGTCCGACGGCGCCACGGTCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCTCCCTTTTCTCT CTGACACGTCCGACGGCGCCACGGTCCAGGCCTCGGAGATCCGTCCTCCCTTTTCTCT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTACGCCCTCCCCACATCCG TTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTACGCCCTCCCCACATCCG *****

pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CTCTAACCGAAAAGGAGGAGTTAGACAACCTGAAGCTAGGTCCTATTTATTTTTTTA CTCTAACCGAAAAGGAGGAGTTAGACAACCTGAAGCTAGGTCCTATTTATTTTTTTA *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TAGTTATGTTAGTATTAAGAAGCTTATTTATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACA TAGTTATGTTAGTATTAAGAAGCTTATTTATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACA *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GACGCGTGACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCT GACGCGTGACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGAGACCAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCA CGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGAGACCAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCA *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GGAACCGTAAAAAGGCGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGC GGAACCGTAAAAAGGCGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGC *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	ATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACC ATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACC *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	AGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTCCGACCCCTGCCGCTTACCG AGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTCCGACCCCTGCCGCTTACCG *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTA GATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTA *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGG GGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGG *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGAC TTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGAC *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	ACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG ACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAG *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGAT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	CCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGC CCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGC *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGT GCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGTCTGACGCTCAGT *****
pPiczaA-BMV1teorico pPICZaA-BMV1-real	GGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATC GGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATC *****

Figura 9. Alineamiento entre secuencias BMV2

Alineamiento entre las secuencias BMV2-teórico y BMV2-real mediante el software ClustalW, donde la coincidencia de bases se representa por “*”.

```

pPICZaA-BMV2teorico      AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAG
pPICZaA-BMV2-real        AGATCTAACATCCAAAGACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAG
*****

pPICZaA-BMV2teorico      GTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGT
pPICZaA-BMV2-real        GTCCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGT
*****

pPICZaA-BMV2teorico      TGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTCCATCGAAAAACC
pPICZaA-BMV2-real        TGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTCCATCGAAAAACC
*****

pPICZaA-BMV2teorico      AGCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTA
pPICZaA-BMV2-real        AGCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTA
*****

pPICZaA-BMV2teorico      ACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTTA
pPICZaA-BMV2-real        ACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTTA
*****

pPICZaA-BMV2teorico      TTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTG
pPICZaA-BMV2-real        TTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTG
*****

pPICZaA-BMV2teorico      AGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAATGGCCAAAACCTGACAGTTTAAACGCT
pPICZaA-BMV2-real        AGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAATGGCCAAAACCTGACAGTTTAAACGCT
*****

pPICZaA-BMV2teorico      GTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACAAAGTTGGTTCCG
pPICZaA-BMV2-real        GTCTTGGAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACAAAGTTGGTTCCG
*****

pPICZaA-BMV2teorico      TTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATACCGTTTGT
pPICZaA-BMV2-real        TTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATACCGTTTGT
*****

pPICZaA-BMV2teorico      CTTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCT
pPICZaA-BMV2-real        CTTGTTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAATAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCT
*****

pPICZaA-BMV2teorico      CTCTATCGCTTCTGAACCCCGTGACCTGTGCCGAAACGCAATGGGGAAACACCCGCT
pPICZaA-BMV2-real        CTCTATCGCTTCTGAACCCCGTGACCTGTGCCGAAACGCAATGGGGAAACACCCGCT
*****

pPICZaA-BMV2teorico      TTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACT
pPICZaA-BMV2-real        TTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACT
*****

pPICZaA-BMV2teorico      GCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAAT
pPICZaA-BMV2-real        GCTGATAGCCTAACGTTTCATGATCAAAATTTAACTGTTCTAACCCCTACTTGACAGCAAT
*****

pPICZaA-BMV2teorico      ATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTT
pPICZaA-BMV2-real        ATATAAACAGAAGGAAGCTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTT
*****

pPICZaA-BMV2teorico      ACTTTCATAATTGCGACTGGTTCGAATTGACAAGCTTTTGATTTTAAAGACTTTTAAACGA
pPICZaA-BMV2-real        ACTTTCATAATTGCGACTGGTTCGAATTGACAAGCTTTTGATTTTAAAGACTTTTAAACGA
*****

pPICZaA-BMV2teorico      CAACTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATCGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTT
pPICZaA-BMV2-real        CAACTTGAGAAGATCAAAAAACAATAATTATCGAAACGATGAGATTTCTTCAATTTT
*****

```

pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	TACTGCTGTTTTATTGCGAGCATCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACTACAACAGA TACTGCTGTTTTATTGCGAGCATCTCCGCATTAGCTGCTCCAGTCAACTACAACAGA *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	AGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGA AGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGA *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAA TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAA *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	TACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGC TACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGC *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	TGAAGCTGAATTCATCATCACCATCACCACATGTCGACTTCAGGAAGCTGGTAAAGATGAC TGAAGCTGAATTCATCATCACCATCACCACATGTCGACTTCAGGAAGCTGGTAAAGATGAC ***** ** *
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	TCGCGCGCAGCGTCGTGCTGCCGCTCGCAGAAATCGTTGGACCGCTAGGGTCCAACCACT TCGCGCGCAGCGTCGTGCTGCCGCTCGCAGAAATCGTTGGACCGCTAGGGTCCAACCACT *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	AATTGTGCAACCACCTCGCTGCTGGCCAAGGCAAGGCCATTAAAGCGATTGACGAGTACAG AATTGTGCAACCACCTCGCTGCTGGCCAAGGCAAGGCCATTAAAGCGATTGACGAGTACAG *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	CATATCAAAGTGGGAGGCGTCTTCGGACGCGATTACAGCGAAAGCCACCAATGCCATGAG CATATCAAAGTGGGAGGCGTCTTCGGACGCGATTACAGCGAAAGCCACCAATGCCATGAG *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	TATCACTCTGCCCCATGAGCTCTCTTCTGAAAAGAATAAGGAGCTTAAGGTCGGCAGGGT TATCACTCTGCCCCATGAGCTCTCTTCTGAAAAGAATAAGGAGCTTAAGGTCGGCAGGGT *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	GCTGCTTTGGTTGGGACTTCTTCCTAGCGTTGCTGGGAGGATTAAGGCTTGTGTTGCTGA GCTGCTTTGGTTGGGACTTCTTCCTAGCGTTGCTGGGAGGATTAAGGCTTGTGTTGCTGA *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	GAAACAGGCACAGGCCGAGGCTGCTTTTCAAGTAGCCTTGGCGGTTGACAGACTCCTCGAA GAAACAGGCACAGGCCGAGGCTGCTTTTCAAGTAGCCTTGGCGGTTGACAGACTCCTCGAA *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	AGAGGTGGTCGCGGCCATGTATACGGACGCCTTTCGAGGGGCGACTCTGGGGGATTGCT AGAGGTGGTCGCGGCCATGTATACGGACGCCTTTCGAGGGGCGACTCTGGGGGATTGCT *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	TAATCTCCAGATTTATCTGTATGCATCTGAAGCAGTGCCTGCTAAGGCGGTCGTTGTACA TAATCTCCAGATTTATCTGTATGCATCTGAAGCAGTGCCTGCTAAGGCGGTCGTTGTACA *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	TCTAGAAGTTGAGCACGTAAGGCCACGTTTCGATGACTTCTTACCCTGGTTTATAGGTA TCTAGAAGTTGAGCACGTAAGGCCACGTTTCGATGACTTCTTACCCTGGTTTATAGGTA *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	GGCGGCCGCCAGCTTTCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGT GGCGGCCGCCAGCTTTCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGT *****
pPICZaA-BMV2teorico pPICZaA-BMV2-real	CGACCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCA CGACCATCATCATCATCATTGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCA *****

pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	AGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATG AGTTGGGCACTTACGAGAAGACCGGTCTTGCTAGATTCTAATCAAGAGGATGTCAGAATG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CCATTGCGCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTGTAAACCTATATAG CCATTGCGCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTGTAAACCTATATAG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	TATAGGATTTTTTTGTCATTTTGTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTAT TATAGGATTTTTTTGTCATTTTGTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTAT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTGGGAAAATCATTGAGTTTGATGTTT CTCGCAGCTGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTGGGAAAATCATTGAGTTTGATGTTT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	TTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTG TTCTTGGTATTTCCCACTCCTCTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CGGATCCCCACACACCATAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTTTACTCTTCCAGATT CGGATCCCCACACACCATAGCTTCAAATGTTTCTACTCCTTTTTACTCTTCCAGATT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	TTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCCTTCAAACACCCAAGCACAGCATACTAAATT TTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCCTTCAAACACCCAAGCACAGCATACTAAATT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	TTCCCTCTTCTCTCTAGGGTGTGTTAATTACCCGTAATAAGGTTTGGAAAAGAAA TTCCCTCTTCTCTCTAGGGTGTGTTAATTACCCGTAATAAGGTTTGGAAAAGAAA *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	AAAGAGACCGCTCGTTCTTTTTCTTCGTCGAAAAGGCAATAAAAAATTTTATCACGT AAAGAGACCGCTCGTTCTTTTTCTTCGTCGAAAAGGCAATAAAAAATTTTATCACGT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	TTCTTTTCTTGAATTTTTTTTTTAGTTTTTCTCTTTCAGTGACCTCCATTGATAT TTCTTTTCTTGAATTTTTTTTTTAGTTTTTCTCTTTCAGTGACCTCCATTGATAT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	TTAAGTTAATAAACGGTCTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTCTTGTCTATTA TTAAGTTAATAAACGGTCTCAATTTCTCAAGTTTCAGTTTCATTTTCTTGTCTATTA *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CAACTTTTTTACTTCTTGTTCATTAGAAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGG CAACTTTTTTACTTCTTGTTCATTAGAAAAGAAAGCATAGCAATCTAATCTAAGGGGCGG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	TGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAA TGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGACAAGGTGAGGAA *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CTAAACCATGGCCAAGTTGACCAAGTGCCTGTCACCGCGCGGACGTCCGCGG CTAAACCATGGCCAAGTTGACCAAGTGCCTGTCACCGCGCGGACGTCCGCGG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	AGCGGTGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTCTCCCGGACTTCTGGGAGGACGACTT AGCGGTGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTCTCCCGGACTTCTGGGAGGACGACTT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACAGGTGGT CGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACAGGTGGT *****

pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	GCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTG GCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	GTCGGAGGTGCTGTCCACGAACCTCCGGGACGCCCTCCGGGCGGCCATGACCGAGATCGG GTCGGAGGTGCTGTCCACGAACCTCCGGGACGCCCTCCGGGCGGCCATGACCGAGATCGG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CGAGCAGCGTGGGGGGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACCT CGAGCAGCGTGGGGGGGGAGTTCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCACCT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCGACGGCGGCCACGGGTCCCAGGCCCTCGGAG CGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCGACGGCGGCCACGGGTCCCAGGCCCTCGGAG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	ATCCGTCCCCCTTTTCTTTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTACAGCTTACATTAC ATCCGTCCCCCTTTTCTTTGTCGATATCATGTAATTAGTTATGTACAGCTTACATTAC *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	GCCCTCCCCCACCACCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGG GCCCTCCCCCACCACCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	TCCCTATTTATTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTT TCCCTATTTATTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	TTCTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTG TTCTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	AGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGAGACCAACATGTGAGCAA AGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTGGAGACCAACATGTGAGCAA *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGC AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCCATAGGC *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	TCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGA TCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGA *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTT CAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTT CGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	CTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTTCGCTCCAAGCTGGGCT CTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTTCGCTCCAAGCTGGGCT *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	GTGTGCACGAACCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTG GTGTGCACGAACCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTG *****
pPICZaA-BMW2teorico pPICZaA-BMW2-real	AGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTA AGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTA *****

pPICZaA-BMV2teorico	GCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT
pPICZaA-BMV2-real	GCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCT *****
pPICZaA-BMV2teorico	ACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAA
pPICZaA-BMV2-real	ACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAA *****
pPICZaA-BMV2teorico	GAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGT
pPICZaA-BMV2-real	GAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGT *****
pPICZaA-BMV2teorico	GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTA
pPICZaA-BMV2-real	GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTA *****
pPICZaA-BMV2teorico	CGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATC
pPICZaA-BMV2-real	CGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATC *****