



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Expresión del dominio de unión a receptor (RBD) de la
variante ómicron B.1.1.529 de SARS-CoV-2 en la
superficie de *E. coli* usando el autotransportador Ag43.**

Tesis que presenta

L.Q. Iván Alejandro Gallegos Galarza

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Antonio de León Rodríguez

San Luis Potosí, S.L.P., 16 de febrero de 2024



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Expresión del dominio de unión a receptor (RBD) de la variante ómicron b.1.1.529 de SARS-CoV-2 en la superficie de *E.coli* usando el autotransportador Ag43**” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Iván Alejandro Gallegos Galarza** y aprobada el **día 11 de enero del 2024** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Antonio de León Rodríguez
Director de la tesis

Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández
Miembro del Comité Tutorial

Dra. Daphne Edith González Juárez
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Antonio de León Rodríguez.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 798082 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Página en Blanco que se va a utilizar para colocar la copia del acta de examen.

Dedicatorias

Dedico esta tesis a mi familia, a mi madre Yuly por darme palabras de aliento y consejos durante este proyecto de vida, a mi padre Alejandro por recordarme que nunca hay que dejar de mover las piernas, a mi pequeña hermana Sofía por visitarme para darme un abrazo en esos momentos difíciles y a mi pareja de vida Mónica por apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos.

Agradecimientos

Al Dr. Antonio de León por asesorarme y permitirme formar parte de su equipo de laboratorio desde mi etapa en la licenciatura.

Al Dr. Víctor Balderas por su asesoría, consejos y apoyo durante mi trayectoria académica.

A la Dra. Daphne Edith González Juárez por su evaluación y comentarios.

A todos mis compañeros del laboratorio 4 por ser esa segunda familia.

Al laboratorio 2 por el acceso a sus equipos.

Al M.C Alberto barrera por su guía y enseñanza en el desarrollo del western blot.

Al IPICYT por la oportunidad de desarrollo de posgrado en Biología Molecular.

Al LAMBAMA por el acceso a sus equipos.

A CONAHCYT por el apoyo #798082.

A mi novia por su apoyo incondicional durante este proyecto.

A mi familia por darme palabras de aliento tras cada noche de trabajo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	II
Créditos Institucionales	III
Dedicatorias	V
Agradecimientos	VI
Resumen	X
Abstract	XI
Introducción	1
Objetivos	4
Materiales y métodos	5
Construcción del plásmido pAg43_RBD	5
Cepas	5
Condiciones de cultivo	5
Liberación y purificación de RBD	6
Fraccionamiento celular	6
Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot	7
Análisis por densitometría de RBD recombinante	8
Resultados y Discusión	9
1 Diseño del vector pAg43_RBD	9
2 Expresión de la proteína RBD en las cepas de E. coli BL21-SI y JM101	9
3 Análisis por Western Blot de la expresión de RBD en BL21-SI/pAg43_RBD	10
4 Cinética de la producción de RBD recombinante en E. coli BL21-SI	11
5 Exportación de proteína RBD al sobrenadante	11
6 Análisis de la distribución proteica por fraccionamiento celular	13
Conclusiones	15
Referencias	16
Tablas	19
Figuras	21
Anexos	33
Anexo 1. Protocolos	33
Anexo 2. Soluciones	35

Lista de tablas

Tabla 1 Parámetros analizados en los cultivos de E. coli BL21-SI/pAg43_RBD	19
Tabla 2 Concentración de proteína en fraccionamiento celular de BL21-SI/pAg43_RBD	20

Lista de figuras

Figura 1 Reconocimiento del receptor ACE2 humano por RBD de SARS-CoV-2.	21
Figura 2 Plásmido pAg43_RBD.	22
Figura 3 SDS-Page del sobrenadante de E. coli JM101/pAg43_RBD.	23
Figura 4 SDS-PAGE de lisados de E. coli BL21-SI/pAg43_RBD con inducción de expresión de la proteína recombinante.	24
Figura 5 Análisis de proteínas de BL21-SI/pAg43_RBD.	25
Figura 6 Native western blot de lisados de BL21-SI/pAg43_RBD.	26
Figura 7 Cinética de crecimiento de E. coli BL21-SI/pAg43_RBD.	27
Figura 8 Producción de proteína total en cinética de crecimiento de E. coli BL21-SI/pAg43_RBD.	28
Figura 9 SDS-PAGE de Proteína liberada al sobrenadante en cinética de crecimiento BL21-SI/pAg43_RBD.	29
Figura 10 Proteína liberada al sobrenadante en cinética de crecimiento BL21-SI/pAg43_RBD.	30
Figura 11 Comparativa de concentración en lisados de BL21/pAg43_RBD al someterse a calentamiento a 60°C.	31
Figura 12 SDS-PAGE de Fraccionamiento celular de BL21-SI/pAg43_RBD	32

Resumen

Durante la pandemia de COVID-19, se ha estudiado con énfasis a la proteína espícula (S) de SARS-CoV-2 debido a su importancia en el proceso de infección. La proteína S se considera como la proteína estructural más importante, ya que permite la entrada a las células epiteliales del hospedero. La espícula está presente en la superficie del virón y se encarga de mediar la entrada a la célula hospedera mediante el primer contacto virus-célula, a través del dominio de unión al receptor (RBD) que reconoce al receptor convertidor de angiotensina 2 (ACE2) en la superficie celular, posterior RBD se puede plegar independientemente del resto de la proteína S para permitir la fusión de la membrana viral y la membrana del huésped. RBD surge como objetivo al ser un dominio conservado, que ha demostrado puede emplearse en vacunas de proteína recombinante y generar inmunidad contra la variedad de cepas emergentes de SARS-CoV-2. Por ello en el presente trabajo se expresó la proteína RBD de la variante ómicron B.1.1.529 de forma recombinante en *E. coli*. Se utilizó al autotransportador del antígeno 43 (Ag43) para exportar la proteína RBD recombinante de 34kDa a la membrana externa de la bacteria. Se empleó la cepa BL21-SI que carece de proteasas de membrana externa lo que favoreció la acumulación de proteína recombinante y se evaluó la capacidad de Ag43 para liberar al pasajero al sobrenadante al calentarse a 60°. Este autotransportador facilitó el proceso de purificación de la proteína recombinante al reducir tiempos y gasto de reactivos.

PALABRAS CLAVE: Espícula, RBD, ACE2, Ag43, proteína recombinante, secreción de proteínas.

Abstract

During the COVID-19 pandemic, the SARS-CoV-2 Spike (S) protein has been studied with great emphasis due to its importance during the infection process. The S protein is the most important structural protein, as it allows the entry into the host epithelial cells. Spike is present on the surface of the virion and is involved in the first virus-cell contact because is responsible for mediating the entry into the host cell, through the receptor binding domain (RBD), which recognizes the angiotensin converting receptor 2 (ACE2) on the cell surface, later RBD can fold independently from the rest of the S protein to allows the fusion of the viral membrane and the host membrane. RBD emerges as a target as it is a conserved domain and can be employed as active ingredient in recombinant protein vaccines that can generate immunity against the variety of emerging SARS-CoV-2 strains. Therefore, in the present work, the RBD protein of the omicron variant B.1.1.529 was expressed in *E. coli*. Antigen 43 (Ag43) autotransporter was used to export the 34kDa recombinant RBD protein to the outer membrane of the bacteria. The BL21-SI strain was used, which lacks outer membrane proteases, which let the accumulation of recombinant protein. Then we evaluated the ability of Ag43 to release the passenger into the supernatant when the sample is heated to 60°. This autotransporter facilitated the purification process of the recombinant protein by reducing time during the methodology and use of reagents.

KEYWORDS. SARS-CoV-2, Spike, RBD, ACE2, Ag43, recombinant protein, secretion system

Introducción

La enfermedad COVID-19 que estalló en Wuhan en la provincia de Hubei, en diciembre de 2019 es causada por el virus SARS-CoV-2 (Ochani et al., 2021). Al 29 de noviembre de 2023 se han reportaron un total de 695,781,740 casos de personas infectadas a nivel mundial. Esta pandemia ha provocado más de 6,9 millones de muertes en todo el mundo (Johns Hopkins, EE. UU., Centro de recursos de coronavirus). El virus de SARS-CoV-2 pertenece a la familia *Coronaviridae*, estos son virus de genoma de ARN monocatenario no segmentado de sentido positivo. (Santos-López et al., 2021). En los virus de ARN la tasa de mutación es muy alta, debido a la ausencia de corrección de errores en las polimerasas que son dependientes de ARN, lo que da lugar a nuevas cepas virales (Fitzsimmons et al., 2018).

El virión de coronavirus tiene cuatro proteínas estructurales: proteína de envoltura (E), de membrana (M), de nucleocápside (N) y la glicoproteína espícula o *spike* (S). La proteína S es considerada como la proteína estructural de superficie más importante, ya que permite la entrada a las células epiteliales del hospedero. Esta proteína forma trímeros anclados a la membrana viral, cubriendo la superficie del virión en su dominio extracelular. Cada monómero contiene un péptido señal en el extremo N, un subdominio de unión al receptor S1 y otro subdominio de fusión S2 (Zhang et al., 2021). El proceso de unión al hospedero se da por el reconocimiento del receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) por el dominio RBD, para ello una característica importante es que la proteína S se encuentra fuertemente glicosilada (cada subunidad S1 con 22 sitios de glicosilación) lo que permite que RBD cumpla su función de reconocer al receptor (ACE2) en la superficie celular. Posteriormente, al tener RBD la capacidad de plegamiento independiente del resto de la proteína S puede hacer un reordenamiento estructural para regular la fusión de la membrana viral con la membrana del hospedero, esto se puede visualizar en la Figura 1, donde A) es la estructura de RBD (magenta) de SARS-CoV-2 complejado con el receptor ACE2 humano (cian). Mientras que en B) es la interfase de unión entre RBD-ACE2. Se resaltan los residuos críticos de unión entre

RBD-ACE2(N501, Q493, S494, L455 y F48) (Lupala et al., 2021; Petruk et al., 2020). Es por ello que las estrategias de los tratamientos empleados contra el SARS-CoV-2 se busca bloquear la entrada viral al suministrar una gran cantidad de RBD mimético que pueda unirse a los receptores de ACE2 previniendo la unión del virión con el hospedero. También el emplear anticuerpos contra los receptores de ACE2 para cumplir la misma función, usar dominios ACE2 extracelulares para que se unan al RBD del virus previniendo la infección (Balloux et al., 2022). También se ha reportado que el uso de la subunidad RBD en vacunas puede inducir una respuesta alta de anticuerpos neutralizantes (Liu et al., 2020) sin importar que sean distintos tipos de SARS, esto confirma que el dominio se conserva en gran medida entre cepas y dado que la subunidad cuenta con múltiples epítomos, la aparición de mutaciones dentro de RBD no afectará tanto la eficacia de estas vacunas. Otra ventaja que tiene el emplear proteínas recombinantes como principio activo en vacunas, es que carecen de los componentes infecciosos del virión y no se replican, razón por la cual son consideradas más seguras en comparación con las vacunas que son producidas a partir de un virus atenuado (Pollet et al., 2021a).

Con base a lo anterior, la producción de proteínas recombinantes es crucial para el desarrollo de nuevos fármacos proteínicos y para la determinación estructural de los objetivos diana en los cuales actuará dicho fármaco. Los sistemas bacterianos se han empleado comúnmente para la producción de estas proteínas recombinantes, que representan aproximadamente el 30% mercado actual de biofarmacéuticos (Nascimento and Leite, 2012; Pollet et al., 2021b)

Se han buscado distintos sistemas de expresión de proteínas, entre los cuales se encuentran células de insecto infectadas con baculovirus, células animales, que si bien destacan por realizar modificaciones postraduccionales en la proteína recombinante, el rendimiento de proteína obtenida es muy bajo en comparación con el costo que tiene su producción limitando el escalamiento que puede tener para producción industrial. Por otro lado, las plantas transgénicas si bien su producción se puede dar con mucha facilidad a gran escala, dependiendo del organismo, el tiempo de crecimiento y producción puede ser muy largo, además que la aprobación por comités de ética puede retrasar el proceso. Finalmente, se

encuentran las bacterias que destacan por tener costos bajos, alta producción y facilidad de escalar los procesos. Sin embargo, su uso presenta problemas técnicos para la purificación del producto final al formarse cuerpos de inclusión (Soler and Houdebine, 2007) o bien arrastrar diversos componentes intracelulares, pero al ser organismos simples y bien conocidos, es fácil aplicar ingeniería genética para mejorar los procesos de exportación y purificación de la proteína recombinante (Fujita et al., 2020; Villaverde González, 2021). La bacteria *Escherichia coli* ya se ha usado con anterioridad para producir otros antígenos para vacunas, como en 1998 en el desarrollo de una vacuna contra la Borreliosis y en 2014 contra el Meningococo (Lagacé-Wiens et al., 2010). Un problema que surge al emplear bacterias es el laborioso proceso de purificación para extraer la proteína recombinante. Una opción es el empleo de sistemas de secreción bacteriano que permitan la exportación de la proteína recombinante a la superficie celular de la bacteria. Entre estos, el sistema de tipo V también conocido como autotransportadores destaca por contener toda la información necesaria para secretar la proteína al espacio periplásmico y para su posterior despliegue en la superficie bacteriana, lo cual permite obtener un mayor rendimiento de la proteína y facilitar su purificación. (De Ciencias and Marín Muñoz, 2009). El antígeno 43 (Ag43) pertenece a este grupo de autotransportadores, Ag43 es una proteína de superficie de *E. coli* K12, se codifica por el gen *flu* y se distribuye uniformemente en la superficie bacteriana. Ag43 tiene dos subunidades, α (dominio pasajero) y β (dominio de translocación) (Ferri et al., 2015). Una vez que la proteína se encuentra en el periplasma, β se une a la membrana externa formando una estructura con forma de barril, formando un poro por donde α puede salir, de forma que se mantiene anclado a la superficie celular, α se escinde de forma auto catalítica, pero permanece unido a β de forma no covalente, esto le confiere la característica de que α puede desprenderse por calentamiento a 60°C. Otras propiedades que otorga Ag43 es un plegamiento estable de la proteína, así como el poder exportar proteínas plegadas aún con puentes disulfuro y un correcto procesamiento al expresar proteínas heterólogas. (Kjærsgaard et al., 2002). En la literatura de trabajos enfocados a la expresión de RBD recombinante de SARS-CoV-2, no existen

reportes del empleo de Ag43 para la translocación de la proteína recombinante y solo emplean métodos convencionales para la purificación de la proteína, en los cuales presentan inconvenientes en el rendimiento de extracción debido a la formación de cuerpos de inclusión. Por ello el empleo de un sistema como el autotransportador Ag43, que permita exportar la proteína recombinante al sobrenadante facilitando el proceso de purificación, plantea un panorama favorable para lograr un escalamiento a nivel biorreactor.

Objetivos

Objetivo general

Expresar el dominio de unión a receptor (RBD) de la variante ómicron B.1.1.529 de SARS-CoV-2 en la superficie de *E. coli* mediante el auto transportador Ag43.

Objetivos específicos

1. Diseñar el sistema de expresión de RBD de la variante ómicron B.1.1.529 de SARS-CoV-2 con el auto transportador Ag43.
2. Evaluar la eficiencia del auto transportador Ag43 para exportar el RBD en la superficie celular y/o en el medio de cultivo.
3. Cuantificar y determinar la localización celular del RBD recombinante producido en *E. coli*.

Materiales y métodos

Construcción del plásmido pAg43_RBD

El diseño del vector de expresión se llevó a cabo en SnapGene software 7.0 (www.snapgene.com). Se utilizó como base al plásmido pUC57, este vector cuenta con un origen de replicación de alto número de copias (ColE1). El subdominio α (pasajero) del auto transportador Ag43 se sustituyó por el gen de la proteína RBD de la variante ómicron B.1.1.529 unido al dominio β (translocación) del auto transportador Ag43. Se le adicionó una cola de histidinas para facilitar la purificación e identificación de la proteína recombinante. El gen resultante de la construcción de fusión está bajo el control del promotor *lac*. El casete está flanqueado por los sitios de restricción *NdeI* y *PciI*. El plásmido contiene además el gen de resistencia a kanamicina para su selección (Mante et al., 2021). El plásmido resultante se identificó como pAg43_RBD. La construcción se mandó sintetizar a Biomatik (LLC, Delaware, USA).

Para comprobar que la construcción efectivamente tuviera las especificaciones del diseño, se realizó una digestión con las enzimas *NdeI* y *PciI* para obtener un control negativo con el plásmido vacío denominado como pAg43, posteriormente se realizó electroforesis en agarosa al 1% para su confirmación.

Cepas

Se emplearon las cepas de *E. coli* BL21-SI y JM101, estas se dejaron crecer en medio líquido LB sin antibiótico a 37°C. Posteriormente las células competentes de *E. coli* BL21-SI y JM101 se transformaron por electroporación con el plásmido pAg43_RBD (Anexo 1 A y B) para la expresión de la proteína RBD. Las transformantes correspondientes BL21-SI/pAg43_RBD y JM101/pAg43_RBD se crecieron en placas de LB con kanamicina (30mg/L) a 37°C para selección de las colonias que contienen el plásmido.

Condiciones de cultivo

Para la expresión de la proteína recombinante RBD se empleó medio mínimo, los componentes se enlistan en el anexo 2A (Balderas Hernández et al., 2008). En

todos los experimentos, al pre-inóculo se le añadió 5 g/L de extracto de levadura y se dejó en crecimiento toda la noche a 37°C con agitación orbital de 150 rpm. Los cultivos se hicieron en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 150 mL de medio inoculados para una OD_{600nm} inicial de 0.1 a 37°C. La inducción de la expresión se realizó al alcanzar una OD_{600nm} de 0.6 en los cultivos que se usó IPTG 25 µM y a 0.8 en los cultivos que se empleó lactosa a 5 g/L. Posterior a la inducción los cultivos se llevaron a 20°C. Para todos los experimentos se realizó un control negativo donde no se indujo la expresión de la proteína. Durante toda la cinética se tomaron muestras de 1 mL a distintos intervalos de tiempo para posteriormente cuantificar la biomasa y analizar las proteínas por SDS-Page.

Liberación y purificación de RBD

Las muestras a las que se les hizo el tratamiento térmico se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min a 4°C y el pellet celular se resuspendió en buffer PBS a 4°C. Posteriormente para liberar al pasajero las muestras se llevaron a baño maría a 60°C por 15 minutos, las células se removieron por centrifugación y la proteína liberada al sobrenadante se precipitó con acetona 3:1 en hielo por una hora. Después se resuspendió en buffer Tris 0.1 M pH 8 (Kjærsgaard et al., 2002).

Por otro lado, una fracción de las células se lisaron por completo mediante sonicación con pulsos de 10 s (6 veces) con 10 s de reposo en hielo entre pulso. Se centrifugó y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio.

Fraccionamiento celular

Las fracciones de periplasma (P), citoplasmática soluble (CS) y de membrana insoluble (IM) se obtuvieron por la metodología descrita por Robbins et al. (2006), como sigue: Las células de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD inducidas se cultivaron hasta alcanzar una OD_{600nm} de 3. Se tomaron muestras de 6 mL, se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, se retiró el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 800 µL de solución hipertónica (Tris-HCl 100 mM, pH 7.4, sacarosa al 20% (p/v) y EDTA 10 mM), se incubó en hielo por 5 min. Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4°C se extrajo el sobrenadante que es donde viene la fracción PS. El *pellet* se resuspendió en 500 µL de agua estéril y se sonicó en hielo 10 s por 6 ciclos, amplitud

30%, después se centrifugó y se colectó el sobrenadante, en el cual viene la fracción CS. El *pellet* final se resuspendió en 200 μ L de agua y se rotuló como fracción IM.

Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western blot

Se siguió el protocolo propuesto por Lowry et al., (1951). Para ello se cuantificó la concentración de proteína total en las muestras. Las soluciones empleadas se enlistan en el anexo 2 D, se utilizó albumina sérica bovina (BSA) como estándar.

Las proteínas se separaron por electroforesis desnaturalizante (SDS-Page) al 12% siguiendo el método de Laemmli, 1970, se calentaron las muestras por 5 min a 95°C, se inyectaron 20 μ g de proteína total con una relación de 4:1 con buffer de Laemmli para un total de 25 μ L por pocillo. Para visualizar las bandas, el gel se tiñó con Azul de Coomassie por 1.5 h y posteriormente se dejó en solución de desteñido toda la noche. Las soluciones empleadas se enlistan en el anexo 2 E. Para comprobar la presencia del RBD recombinante unido al fragmento β de Ag43, se realizó un gel nativo o *Native-Page*. Para ello, las muestras no se calentaron, no se empleó SDS y en el buffer Laemmli tampoco se añadió β -mercaptoetanol. La electroforesis se realizó a 95V cuidando que no se elevara la temperatura.

Para el Western blot, se transfirieron las proteínas de los geles de acrilamida a membranas PVDF (BioRad) con el sistema de transferencia semiseco Transblot (BioRad). Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-polihistidinas de ratón (SIGMA) diluido 1:3000 en solución de bloqueo (Anexo 2 G) con incubación toda la noche a 4°C. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-ratón IgG conjugado con fosfatasa alcalina (SIGMA) diluido 1:3000 en solución de bloqueo (Anexo 2 G) y se incubó a temperatura ambiente por 1 h. El revelado se realizó empleando cloruro de nitro azul de tetrazolio (NBT, 50 mg/mL) y sal de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato (BCIP, 50 mg/mL) con buffer de fosfatasa alcalina (AP), las soluciones empleadas se encuentran en el anexo F(Hirano, 2012).

Análisis por densitometría de RBD recombinante

Los geles de poliacrilamida obtenidos y que fueron teñidos con Coomasie (Anexo 2 F Viii y iX) se analizaron por densidad de píxeles con el software ImageJ versión 1.53t (Abramoff et al., 2004). Se empleó una curva estándar de BSA con un rango de 0.05 – 0.35 mg/mL y se cuantificó de forma aproximada la cantidad de proteína recombinante para cada gel.

Resultados y Discusión

1. Diseño del vector pAg43_RBD

La construcción final del vector de expresión pAg43_RBD se muestra en la Figura 2, donde: A) Corresponde al diseño del plásmido pAg43 en el software Snapgene. B) Comprobación de su correcta construcción por electroforesis en agarosa. La banda en el carril 1 de 4157pb corresponde al tamaño completo del plásmido. En los carriles 2 y 3 corresponden a la digestión del plásmido con las enzimas de restricción *NdeI* y *PciI*, donde se observan dos bandas, una a 2174 pb que corresponde al fragmento con Ag43_RBD. Mientras que la banda a 1983 pb corresponde al resto del plásmido. Con ello se confirma que la construcción que se mandó sintetizar a Biomatik (LLC, Delaware, USA) es la correcta y se procedió a la transformación por electroporación de la cepa de *E. coli* BL21-SI.

2. Expresión de la proteína RBD en las cepas de *E. coli* BL21-SI y JM101

Se ha reportado que la cepa de *E. coli* BL21-SI carece de las proteasas Lon y OmpT de la membrana externa. Esta carencia de proteasas favorece la acumulación de proteínas recombinantes y son menos propensas a degradarse durante su purificación (Robert A. Donahue Jr. and Robert L. Bebee, 1999). Por lo que el empleo de esta cepa puede favorecer el rendimiento de proteína recombinante producida. Los cultivos de *E. coli* BL21-SI_RBD y JM101_RBD se crecieron e indujeron en la fase exponencial ($0.7 \text{ OD}_{600 \text{ nm}}$) con IPTG 25 μM para la cepa JM101_RBD, en el caso de BL21-SI_RBD se indujo a $1 \text{ OD}_{600 \text{ nm}}$ con lactosa 5 g/L.

El peso molecular teórico de la proteína recombinante RBD es de 34 kDa, mientras que la proteína recombinante unida al autotransportador (RBD- β Ag43) es de 70 kDa. Dichos pesos se determinaron con base las secuencias de residuos de aminoácidos obtenidos a partir de la base de datos de NCBI.

En la Figura 3 se muestra el análisis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-Page) de las muestras de proteína exportada al sobrenadante que se calentó a 60°

de los cultivos de *E. coli* JM101/pAg43_RBD. En los carriles 1 y 2 corresponden al cultivo con inducción con IPTG, se puede observar una banda a 70 kDa mientras que en el carril 3 que corresponde al sobrenadante del cultivo sin inducir, no se observa ninguna banda.

En la Figura 4 se muestra un gel de proteínas de los cultivos con la cepa *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD. En el carril 1 se muestra el lisado de las células de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD inducidas mientras que en el carril 2 son las células sin inducir. Se puede observar una banda a 34 kDa, sugiere que el calentamiento previo a realizar el gel SDS-PAGE favorece la liberación de la proteína RBD recombinante. El carril 3 corresponde al sobrenadante de los cultivos de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD sin inducir y el carril 4 es el sobrenadante de los cultivos de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD inducidos. En este carril se puede observar una banda de 34 kDa que corresponde al tamaño esperado del RBD recombinante. Al no observar la banda a 34kDa de la proteína RBD en las muestras de sobrenadante de los cultivos en *E. coli* JM101/pAg43_RBD, indica que no se está procesando correctamente el sistema de autotransporte para la proteína RBD- β Ag43, por ello se descartó el uso de la cepa *E. coli* JM101 para los experimentos posteriores.

3. Análisis por Western Blot de la expresión de RBD en BL21-SI/pAg43_RBD

Se analizaron los perfiles proteínicos de las muestras correspondientes a la expresión de RBD en la cepa *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD inducida con lactosa a través de Western Blot, con la intención de comprobar la identidad de la proteína recombinante.

En la Figura 5 A) Se visualiza el SDS-PAGE de los lisados de las células de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD. En el carril 1 se encuentra el lisado de BL21-SI/pAg43_RBD sin someterse a tratamiento térmico, en el carril 2 el lisado de BL21-SI/pAg43_RBD tras recibir tratamiento a 60°C y en el carril 3 el lisado de BL21-SI/pAg43_RBD sin inducción. En la Figura 5 B) se encuentra el análisis por Western Blot de estas muestras, confirmando así la identidad de la proteína RBD

recombinante. Se puede observar diferencia de intensidad entre las bandas que corresponden a RBD recombinante del lisado que se calentó a 60°C (carril 2) y del lisado que no se calentó (carril 3)

Posterior a este análisis se procedió a realizar un Western Blot en condiciones no desnaturizantes, para confirmar si el calor generado durante la corrida electroforética del SDS-PAGE ocasionó la liberación del fragmento de 34 kDa correspondiente a RBD. En el Western blot del gel nativo (Figura 6) se observó la banda de 70 kDa correspondiente a RBD-βAg43, lo cual confirma que las condiciones desnaturizantes favorecen la liberación del RBD recombinante del resto del autotransportador.

4. Cinética de la producción de RBD recombinante en *E. coli* BL21-SI

Para evaluar la dinámica de producción de la proteína recombinante en las células hospedadoras se realizó un cultivo por lote en matraz de la cepa de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD. La Figura 7 A) corresponde a la cinética de crecimiento y la flecha indica el tiempo de inducción con lactosa. La Figura 7 B) corresponde a la cinética de crecimiento de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD sin inducción. Se puede observar un incremento de 2.2 veces en la velocidad específica de crecimiento (Tabla 1) entre la cepa transformada inducida y la no inducida. Esto debido a que ante la presencia de la lactosa como inductor también es una fuente de carbono y la fase estacionaria llegó a una mayor OD_{600nm}. Es de remarcar que la expresión de la proteína recombinante no inhibió el crecimiento bacteriano. Estos resultados sugieren que la proteína RBD recombinante no es tóxica para *E. coli*.

5. Exportación de proteína RBD al sobrenadante

En la Figura 8 se observa la cuantificación por el método de Lowry de la proteína total de los lisados, la flecha indica el tiempo al cual se indujo la expresión de RBD con lactosa a 5 g/L. Al comparar la proteína total de los lisados sin tratamiento y de los lisados que se calentaron a 60°C, se observó una reducción en la concentración

de proteína total en las muestras que se sometieron al tratamiento térmico, esto sugiere que hay liberación de proteína al sobrenadante y por ello hay menos concentración de proteína en los lisados que se calentaron.

Con base en los resultados anteriores se procedió a analizar la proteína que es liberada al sobrenadante en la cinética de crecimiento de BL21-SI/pAg43_RBD inducido y se muestra como un análisis por SDS-PAGE en la Figura 9 . Donde el carril 1) corresponde a la proteína liberada al sobrenadante de cultivos sin inducir, el carril 2) es la proteína liberada a las 8 h, el 3) a las 13 h, el 4) a las 18 h, el 5) a las 22 h y el 6) a las 30 h. Solo es observable una banda a 35kDa la cual corresponde al RBD recombinante. Se procedió a realizar el análisis por densitometría de las bandas de los sobrenadantes previamente analizados por SDS-PAGE (Figura 10). Se puede observar proteína en el sobrenadante de las muestras sin inducir y debido a que a las 30 horas se observan bandas en los sobrenadantes de las muestras inducidas, puede existir liberación de proteínas de membrana al calentar las muestras.

En cuanto al rendimiento de la producción de la proteína RBD, se obtuvieron 167 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 30 h, es posible observar una tendencia lineal en la concentración de RBD con respecto al tiempo y que gran parte de la concentración de proteína total en el sobrenadante corresponde a la proteína RBD recombinante. En el estudio hecho por Rahbar et al., 2022 se obtuvo una concentración de RBD recombinante de 176 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al purificar la proteína generada como cuerpos de inclusión y solubilizada con urea 8 M a través de cromatografía de afinidad Ni-NTA.

En la Figura 11 se encuentra la comparativa de concentración de proteína total de las muestras calentadas a 60°C y las no tratadas, a 0, 3, 4, 8, 13, 18, 22 y 30 horas. Se observa aproximadamente un 50% más de proteína en los lisados que fueron inducidos con lactosa, este valor es similar a la concentración de proteína que se liberó al sobrenadante. Se comparó la suma de la concentración de proteína en el lisado que se calentó a 60°C (0.2 mg/mL) más la proteína liberada en el sobrenadante (0.22 mg/mL), dando un total de 0.42 mg/mL contra 0.68 mg/mL que se encuentra en el lisado sin tratamiento, se observa una pérdida de proteína total en aproximadamente un 40%, esto se atribuye a pérdidas durante el proceso de

precipitación de proteína liberada al sobrenadante. Se ha reportado que cambios en el tiempo de precipitado y la relación acetona:proteína puede afectar a la cantidad de proteína recolectada (González-Fernández, 2017; Simpson and Beynon, 2010).

En comparación con otros métodos de extracción y purificación de proteína, como lo reportado por Andrade et al. (2021) que requieren el empleo de diversos solventes y los protocolos conllevan múltiples pasos, que se reflejan en tiempos largos, el empleo del autotransportador Ag43 permite optimizar recursos, al solo requerirse de 10-15 min para liberar la proteína al sobrenadante. Con ello, no se requiere el uso otros solventes distintos a la acetona y solo se necesita poco gasto energético para elevar la temperatura hasta 60°C.

6. Análisis de la distribución proteínica por fraccionamiento celular

Para determinar la eficacia de exportación del péptido señal NSP4 se evaluó la distribución de la proteína RBD recombinante en el cultivo de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD inducido con lactosa a 5 g/L. Para ello a través de fraccionamiento celular se obtuvo la fracción del periplasma (P), de citoplasma soluble (CS) y membrana insoluble (MI), de los lisados que se calentaron a 60°C y los que no se calentaron. En la Figura 12, el carril 1 y 2 corresponden a los sobrenadantes (a 60° y sin calentar respectivamente), se puede observar la proteína RBD y su respectiva banda a 34 kDa. Así mismo, se observa en el sobrenadante de las muestras sin calentar que la proteína a 34 kDa se encuentra en menor intensidad, esto indica que la proteína es soluble y se está liberando al sobrenadante.

En los carriles 3 y 4 se encuentra la fracción del periplasma, donde es visible la presencia de la proteína RBD de 34 kDa, sin embargo, en el lisado que se calentó a 60°C se ve reducido en un 75%.

En la Tabla 2 se encuentra la concentración de proteína y el % de RBD recombinante en cada fracción celular. Finalmente, estos resultados indican que el péptido señal sintético NSP4 (Han et al., 2017) fue eficiente para lograr la exportación de la proteína recombinante al periplasma. Reportes realizados por Jing et al. (2019) y Koh et al. (2023) emplearon fragmentos o modificaciones al péptido

señal nativo de Ag43 y a pesar de que lograron exportar la proteína al sobrenadante, son péptidos de gran tamaño alrededor de 50 aminoácidos lo que dificulta la modificación al péptido para mejorar su eficiencia, en comparación con NSP4 que al ser de solo 20 aminoácidos puede modificarse en su secuencia para optimizarse con mayor facilidad.

Conclusiones

El vector pAg43 permite la expresión de RBD ómicron B.1.1.529 de SARS-CoV-2 junto al autotransportador Ag43 y al péptido señal sintético NSP4.

La proteína recombinante RBD- β Ag43 no se procesa en *E. coli* JM101 al no encontrar el fragmento de RBD en el sobrenadante, mientras que en *E. coli* BL21-SI, sí se pudo exportar y liberar a RBD del autotransportador β Ag43 al calentarse a 60°C. El incremento de temperatura en el tratamiento previo a la electroforesis favorece la liberación de la proteína recombinante, lo cual confirma el correcto funcionamiento del autotransportador.

El péptido señal sintético NSP4 permite la exportación de la proteína al periplasma y en conjunto con Ag43 permite exportar mayor cantidad de proteína a la membrana externa, lo cual facilita la purificación de la proteína recombinante.

El autotransportador Ag43 permite liberar a la proteína recombinante RBD al sobrenadante. Mediante el análisis por densitometría se obtuvo que un 70% de la proteína liberada al sobrenadante corresponde a RBD recombinante y finalmente se obtuvo un rendimiento de 53.35 μ g RBD/g biomasa en la proteína exportada al sobrenadante. Con base a estos resultados y al comparar con lo reportado en la literatura, se puede concluir que el autotransportador Ag43 permite exportar a la proteína RBD recombinante al medio de cultivo, lo que podría permitir escalamiento a biorreactor para RBD u otras proteínas recombinantes de interés industrial.

Referencias

- Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11, 36–42.
- Andrade, G., Alcántara, H., González, M., Silva, R., Vilchis Landeros, L., 2021. Purificación de proteínas. *Mensaje Bioquímico* 45, 35–47.
- Balderas Hernández, V.E., Paz Maldonado, L.M.T., Rivero, E.M., Barba de la Rosa, A.P., Ordoñez Acevedo, L.G., Rodríguez, A.D.L., 2008. Optimization of human interferon gamma production in *Escherichia coli* by response surface methodology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13, 7–13. <https://doi.org/10.1007/s12257-007-0126-5>
- Balloux, F., Tan, C., Swadling, L., Richard, D., Jenner, C., Maini, M., van Dorp, L., 2022. The past, current and future epidemiological dynamic of SARS-CoV-2. *Oxf Open Immunol.* <https://doi.org/10.1093/oxfimm/iqac003>
- De Ciencias, F., Marín Muñoz, E., 2009. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Tesis Doctoral.
- Ferri, S., Nakamura, M., Ito, A., Nakajima, M., Abe, K., Kojima, K., Sode, K., 2015. Efficient surface-display of autotransporter proteins in cyanobacteria. *Algal Res* 12, 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.09.013>
- Fitzsimmons, W.J., Woods, R.J., McCrone, J.T., Woodman, A., Arnold, J.J., Yennawar, M., Evans, R., Cameron, C.E., Luring, A.S., 2018. A speed–fidelity trade-off determines the mutation rate and virulence of an RNA virus. *PLoS Biol* 16. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006459>
- Fujita, R., Hino, M., Ebihara, T., Nagasato, T., Masuda, A., Lee, J.M., Fujii, T., Mon, H., Kakino, K., Nagai, R., Tanaka, M., Tonooka, Y., Moriyama, T., Kusakabe, T., 2020. Efficient production of recombinant SARS-CoV-2 spike protein using the baculovirus-silkworm system. *Biochem Biophys Res Commun* 529, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.06.020>
- González-Fernández, Á.G., 2017. Comparación de métodos de extracción de proteínas de cerebro y linfocitos de rata. *Tecnociencia (Panama)* 11.
- Han, S.J., Machhi, S., Berge, M., Xi, G., Linke, T., Schoner, R., 2017. Novel signal peptides improve the secretion of recombinant *Staphylococcus aureus* Alpha toxinH35L in *Escherichia coli*. *AMB Express* 7. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0394-1>
- Jing, K., Guo, Y., Ng, I.S., 2019. Antigen-43-mediated surface display revealed in *Escherichia coli* by different fusion sites and proteins. *Bioresour Bioprocess* 6. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0248-6>
- Kjærgaard, K., Hasman, H., Schembri, M.A., Klemm, P., 2002. Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *J Bacteriol* 184, 4197–4204. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4197-4204.2002>
- Koh, D.W.S., Tay, J.H., Gan, S.K.E., 2023. Engineering Ag43 Signal Peptides with Bacterial Display and Selection. *Methods Protoc* 6. <https://doi.org/10.3390/mps6010001>

- Laemmli, U., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lagacé-Wiens, P.R.S., Rubinstein, E., Gumel, A., 2010. Influenza epidemiology—past, present, and future. *Crit Care Med* 38. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181cbaf34>
- Liu, Z., Xu, W., Xia, S., Gu, C., Wang, X., Wang, Q., Zhou, J., Wu, Y., Cai, X., Qu, D., Ying, T., Xie, Y., Lu, L., Yuan, Z., Jiang, S., 2020. RBD-Fc-based COVID-19 vaccine candidate induces highly potent SARS-CoV-2 neutralizing antibody response. *Signal Transduct Target Ther* 5. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00402-5>
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Lupala, C.S., Li, X., Lei, J., Chen, H., Qi, J., Liu, H., Su, X.D., 2021. Computational simulations reveal the binding dynamics between human ace2 and the receptor binding domain of sars-cov-2 spike protein. *Quantitative Biology* 9, 61–72. <https://doi.org/10.15302/J-QB-020-0231>
- Mante, J., Roehner, N., Keating, K., McLaughlin, J.A., Young, E., Beal, J., Myers, C.J., 2021. Curation Principles Derived from the Analysis of the SBOL iGEM Data Set. *ACS Synth Biol* 10, 2592–2606. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00225>
- Nascimento, I.P., Leite, L.C.C., 2012. Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 45, 1102–1111. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500142>
- Ochani, R.K., Kumar Ochani, R., Asad, A., Yasmin, F., Shaikh, S., Khalid, H., Batra, S., Rizwan Sohail, M., Mahmood, S.F., Ochani, R., Arshad, M.H., Kumar, A., Surani, S., Civil, R.K.M.P., Karachi, H., Karachi, P., 2021. COVID-19 pandemic: from origins to outcomes. A comprehensive review of viral pathogenesis, clinical manifestations, diagnostic evaluation, and management, *Le Infezioni in Medicina*, n.
- Petruk, G., Puthia, M., Petrlova, J., Samsudin, F., Strömdahl, A.C., Cerps, S., Uller, L., Kjellström, S., Bond, P.J., Schmidtchen, A., 2020. SARS-CoV-2 spike protein binds to bacterial lipopolysaccharide and boosts proinflammatory activity. *J Mol Cell Biol* 12, 916–932. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa067>
- Pollet, J., Chen, W.H., Strych, U., 2021a. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Adv Drug Deliv Rev*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.001>
- Pollet, J., Chen, W.H., Strych, U., 2021b. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics. *Adv Drug Deliv Rev* 170, 71–82. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.01.001>
- Rahbar, Z., Nazarian, S., Dorostkar, R., Sotoodehnejadnematalahi, F., Amani, J., 2022. Recombinant expression of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain (RBD) in *Escherichia coli* and its immunogenicity in mice. *Iran J Basic Med Sci* 26, 1110–1116. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.65045.14333>
- Robbens, J., De Coen, W., Fiers, W., Remaut, E., 2006. Improved periplasmic production of biologically active murine interleukin-2 in *Escherichia coli*

- through a single amino acid change at the cleavage site. *Process Biochemistry* 41, 1343–1346. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.01.009>
- Robert A. Donahue Jr., Robert L. Bebee, 1999. BL21-SIpaper. *Focus (Madison)* 21.
- Santos-López, G., Cortés-Hernández, P., Vallejo-Ruiz, V., Reyes-Leyva, J., 2021. SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *Gac Med Mex* 157. <https://doi.org/10.24875/gmm.20000505>
- Simpson, D.M., Beynon, R.J., 2010. Acetone precipitation of proteins and the modification of peptides. *J Proteome Res* 9, 444–450. <https://doi.org/10.1021/pr900806x>
- Soler, E., Houdebine, L.M., 2007. Preparation of recombinant vaccines. *Biotechnol Annu Rev.* [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13004-0](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13004-0)
- Villaverde González, A., 2021. NANOMÁQUINAS BACTERIANAS Sistemas de secreción tipo VI y Tailocinas BACTERIAL NANOMACHINES Type VI secretion system and Tailocins.
- Zhang, J., Xiao, T., Cai, Y., Chen, B., 2021. Structure of SARS-CoV-2 spike protein. *Curr Opin Virol.* <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.08.010>

Tablas

Tabla 1 Parámetros analizados en los cultivos de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD

Parámetro	<i>BL21-SI/pAg43_RBD</i> inducida		<i>BL21-SI/pAg43_RBD</i> sin inducir con calentamiento a 60°C
	Tratamiento a 60°C	Sin calentamiento a 60°C	
Tasa de crecimiento específica (h^{-1})		0.454	0.19
Concentración de biomasa (g_{DCW} / L)		3.3	1.91
Concentración de proteína total en sobrenadante (mg/L)	195	0.004	30.67
Concentración de proteína RBD recombinante en sobrenadante (mg/L)	160	0.0034	0

Tabla 2 Concentración de proteína en fraccionamiento celular de BL21-SI/pAg43_RBD (n=3)

<i>Fracción</i>	<i>[RBD] (mg/mL)</i>	<i>[Proteína Total] (mg/mL)</i>	<i>Desviación estándar (mg/mL)</i>	<i>%RBD</i>
Sobrenadante 60°C	0.16	0.2	0.033	80
Sobrenadante	-	0.004	0.0002	-
Periplasma 60°C	0.05	0.13	0.011	38.5
Periplasma	0.22	0.34	0.013	64.70
Soluble	0.16	0.49	0.008	32.65
Insoluble 60°C	0.14	0.67	0.006	20.89
Insoluble	0.33	0.87	0.003	37.93

Figuras

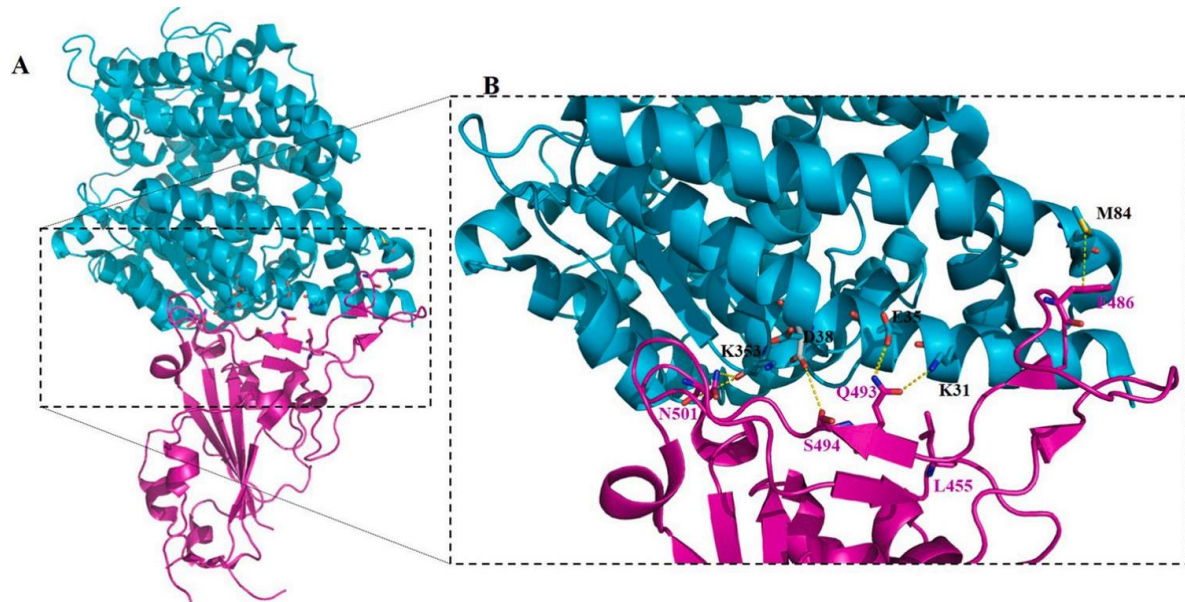


Figura 1 Reconocimiento del receptor ACE2 humano por RBD de SARS-CoV-2. A) Estructura de RBD (magenta) de SARS-CoV-2 complejo con el receptor ACE2 humano (cian). B) Interfase de unión entre RBD-ACE2. Se resaltan los residuos críticos de unión entre RBD-ACE2 (N501, Q493, S494, L455 y F48).

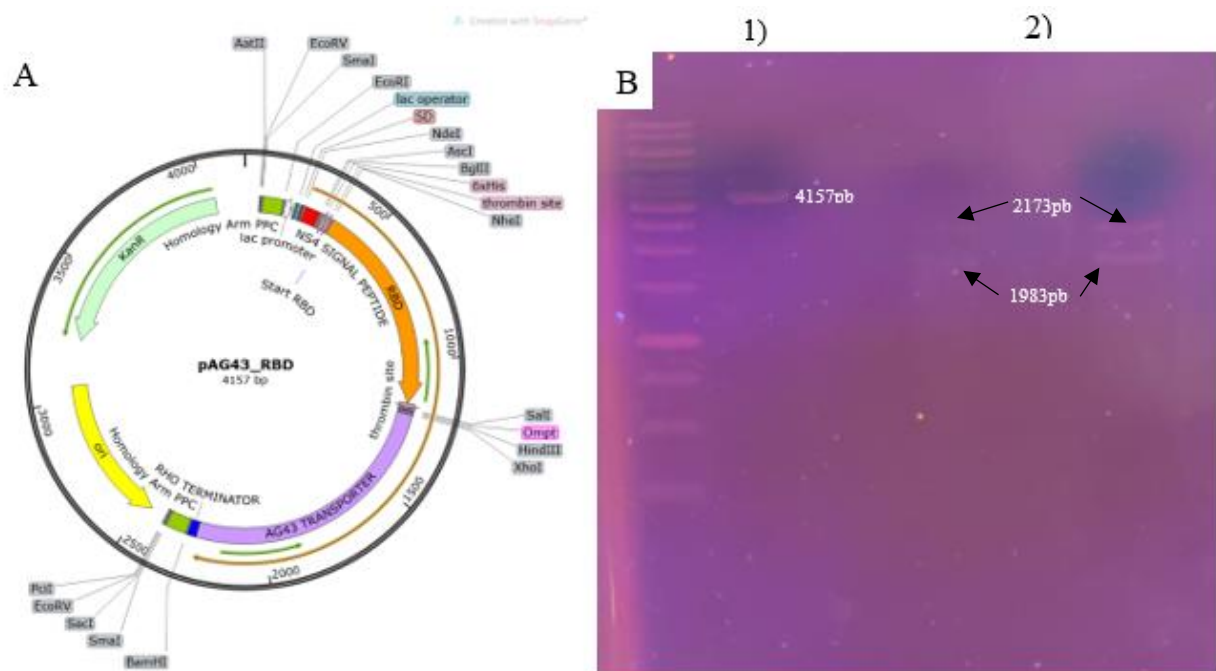


Figura 2 Plásmido pAg43_RBD. A) Diseño del plásmido pAg43 en el software Snapgene. B) Digestión del plásmido con las enzimas de restricción NdeI y PciI.

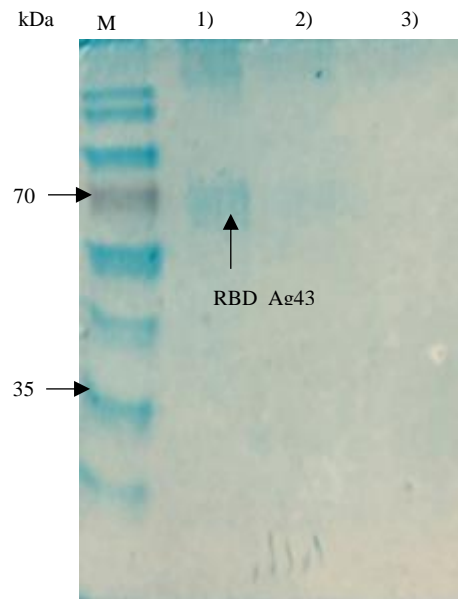


Figura 3 SDS-Page del sobrenadante de *E. coli* JM101/pAg43_RBD.

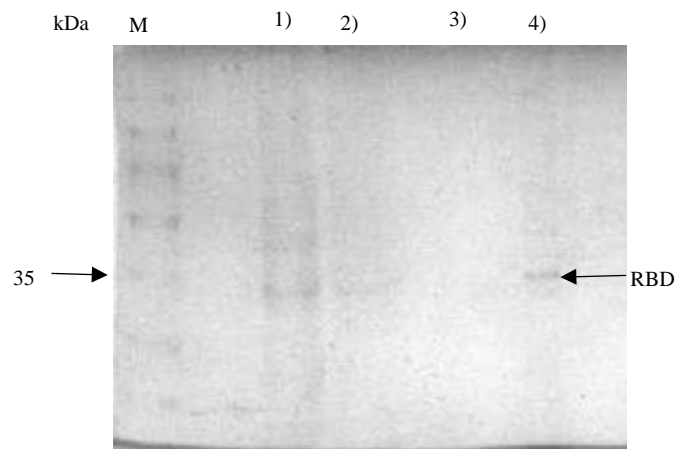


Figura 4 SDS-PAGE de lisados de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD con inducción de expresión de la proteína recombinante.

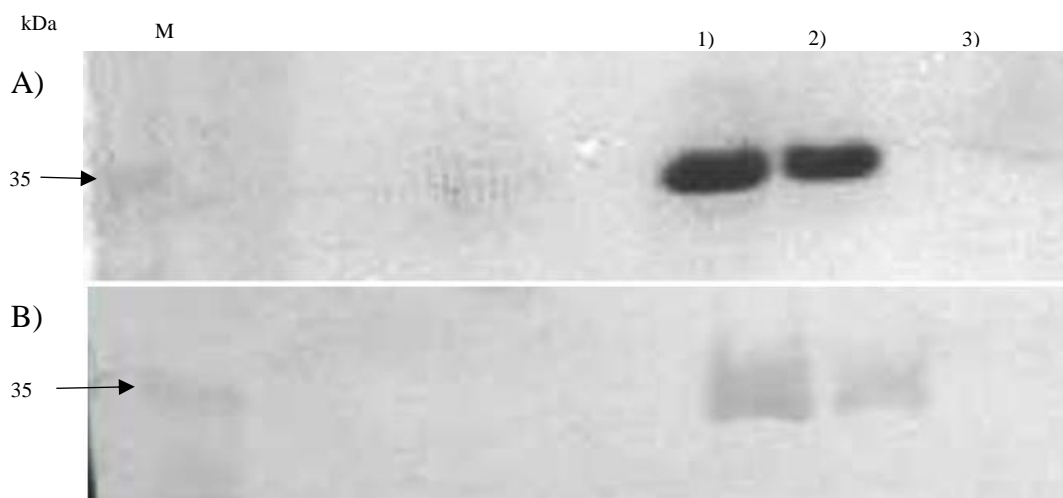


Figura 5 Análisis de proteínas de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD A) SDS-Page de lisados de BL21-SI/pAg43_RBD. B) Western blot de lisados de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD.

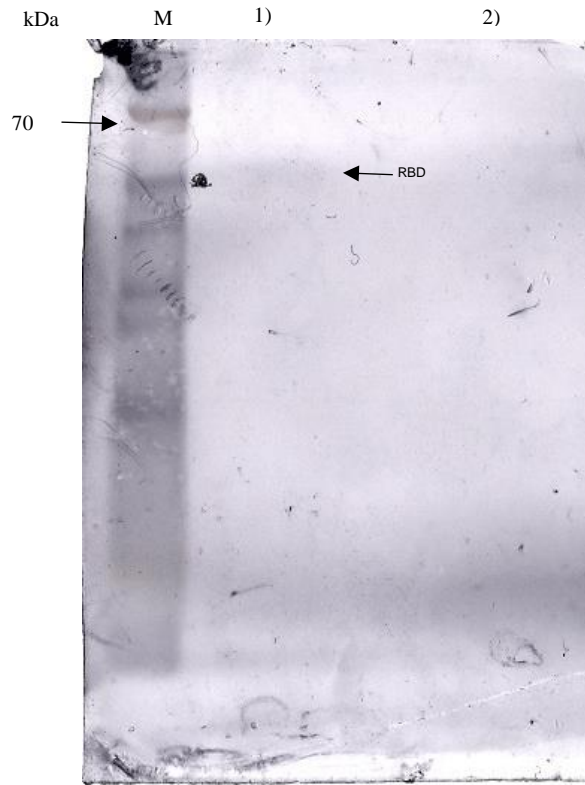


Figura 6 Native western blot de lisados de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD.

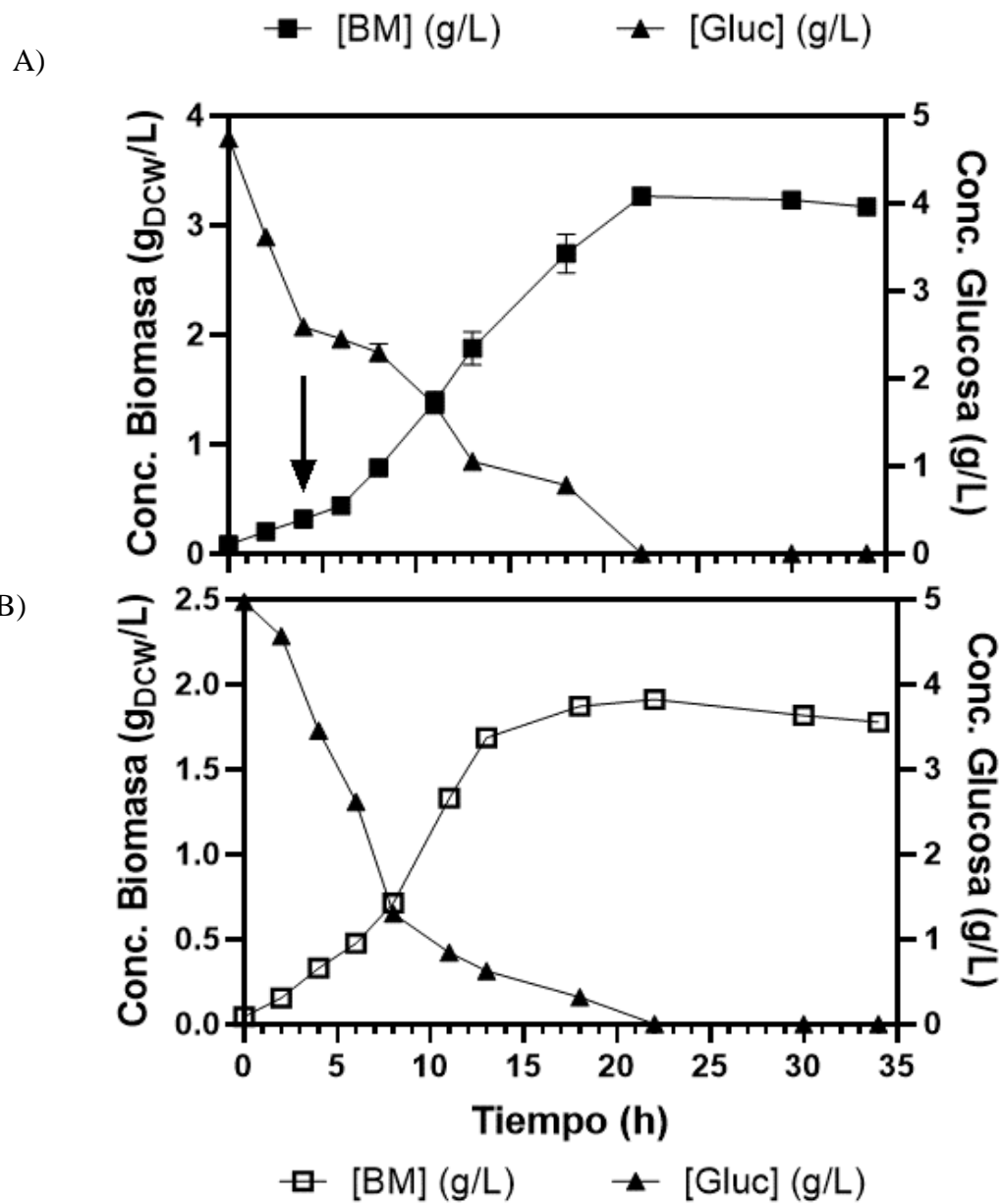


Figura 7 Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD. A) Cultivo que se indujo con lactosa, la flecha indica el tiempo al cual ocurrió la inducción. B) Cultivo que no se indujo con lactosa.

Producción de proteína total BL21-SI/pAg43_RBD

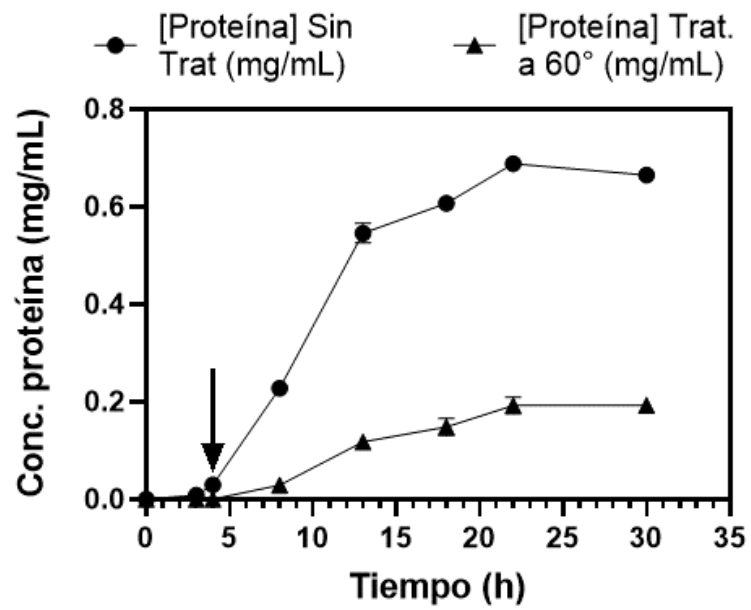


Figura 8 Producción de proteína total en cinética de crecimiento de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD.

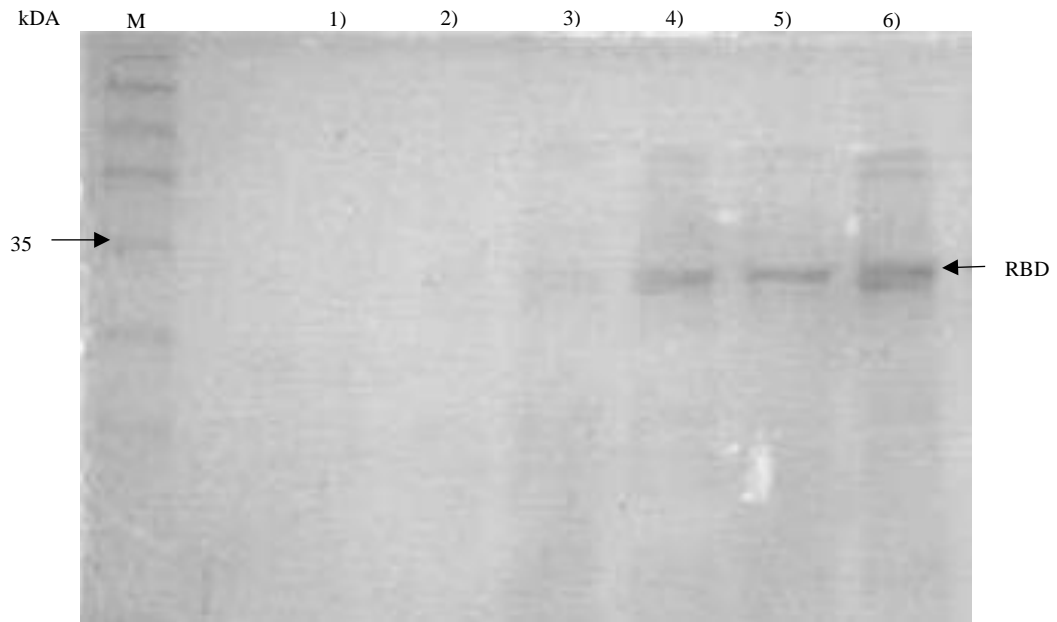


Figura 9 SDS-PAGE de Proteína liberada al sobrenadante en cinética de crecimiento de *E.coli* BL21-SI/pAg43_RBD.

Concentración de proteína total liberada al sobrenadante en cinética de crecimiento BL21-SI/pAg43_RBD

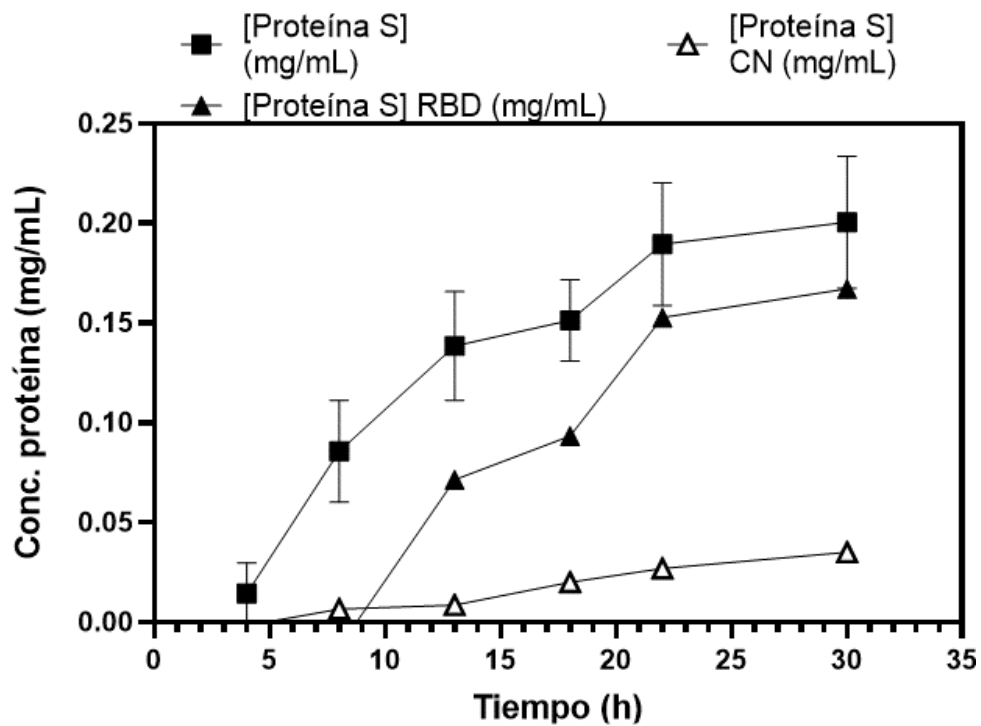


Figura 10 Proteína liberada al sobrenadante en cinética de crecimiento de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD.

Concentración de proteína total en cinética de crecimiento BL21-SI/pAg43_RBD

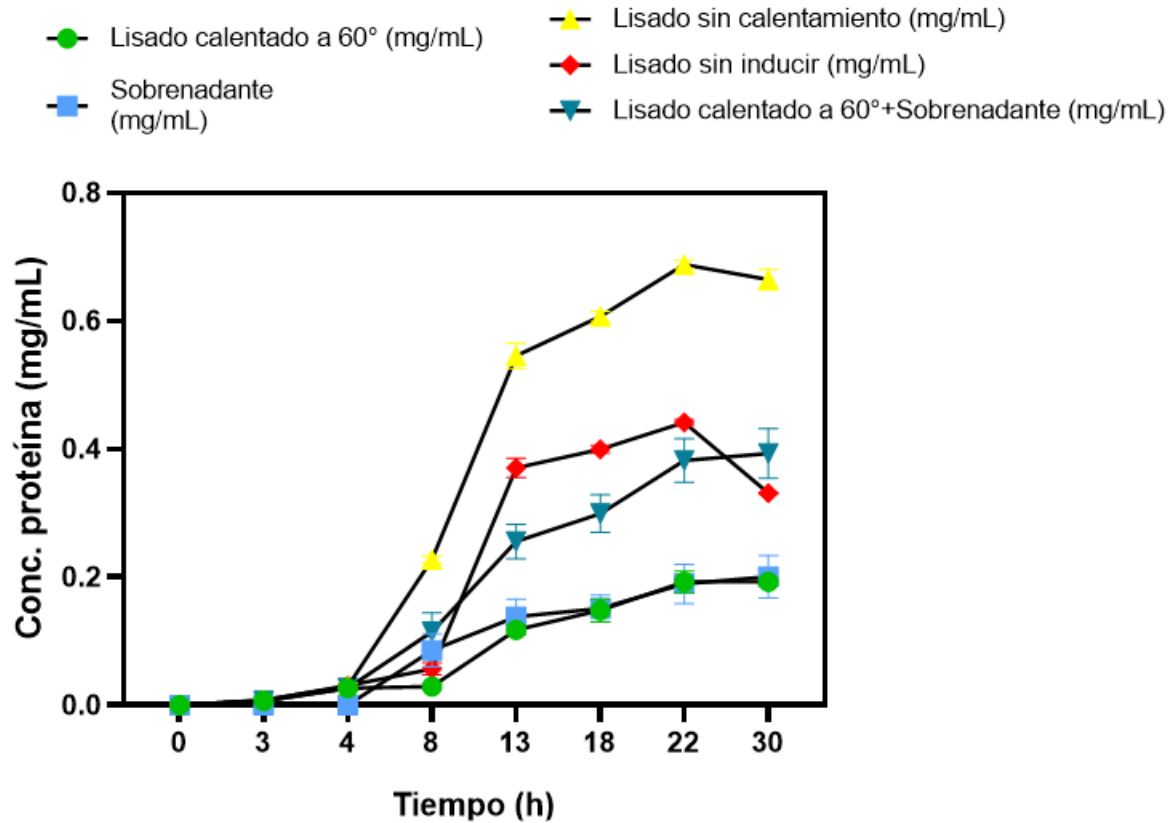


Figura 11 Comparativa de concentración en lisados de *E. coli* BL21/pAg43_RBD al someterse a calentamiento a 60°C.

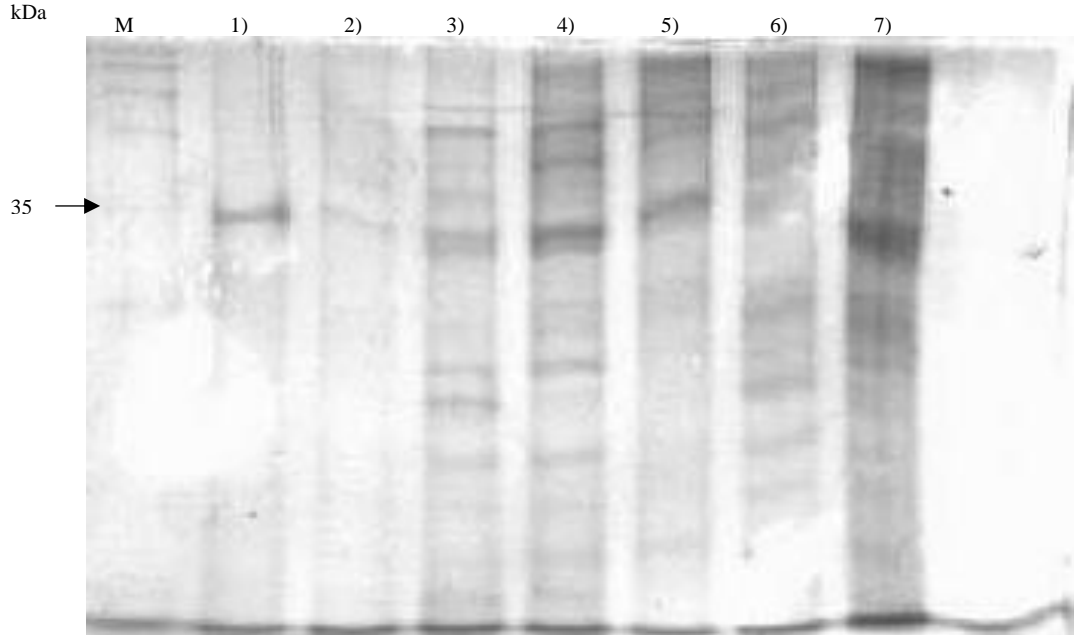


Figura 12 SDS-PAGE de Fraccionamiento celular de *E. coli* BL21-SI/pAg43_RBD.

Anexos

Anexo 1. Protocolos

A. Células de *E. coli* competentes

1. Crecer un preinóculo de la cepa en 5m por toda la noche a 37°C y 250 rpm.
2. Inocular medio de cultivo fresco con el preinóculo para comenzar a una OD_{600nm} de 0.1.
3. Incubar a 37°C hasta alcanzar una OD_{600nm} de entre 0.5-0.7.
4. Transferir a tubos Eppendorf estériles previamente fríos y dejar reposar en hielo por 30 minutos.
5. Centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos, decantar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 0.3 mL de MgCl₂ frío.
6. Centrifugar por 5 minutos, decantar sobrenadante y resuspender el pellet en 0.6 mL de CaCl₂ frío, mantener en hielo por 20 minutos.
7. Centrifugar por 5 minutos, decantar sobrenadante y resuspender pellet celular en 0.15 mL de CaCl₂ – 15% Glicerol.
8. Hacer alícuotas en tubos Eppendorf y almacenar a -80°C.

B. Transformación por electroporación de células de *E. coli* competentes

1. Descongelar en hielo una alícuota de las células competentes.
2. Añadir 5uL del ADN plasmídico a las células competentes y dejar reposar en hielo por 30min.
3. Pasar el contenido a una celda de electroporación estéril y dejar reposar por 5 minutos en hielo.
4. Introducir en el equipo y dar dos pulsos a 1800v
5. Tomar 300 uL de medio LB líquido para lavar la celda y asegurarse de que no quede ningún residuo en esta.
6. Pasar a un Eppendorf estéril e incubar a 37°C por 1 h.
7. Sembrar en medio LB sólido con el antibiótico de selección del plásmido empleado.

C. Purificación de ADN plasmídico con QIAprep® Spin Miniprep Kit

1. Inocular 3 mL de medio LB líquido e incubar toda la noche a 37°C a 200 rpm.
2. Centrifugar a 10000 rpm por 1 min a 4°C y descartar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet de células bacterianas en 250 uL del Buffer P1.
4. Añadir 250 uL del Buffer P2, mezclar invirtiendo el tubo hasta que la solución se torne azul. No dejar que la reacción transcurra por más de 5 min.
5. Añadir 350 uL del Buffer N3 y mezclar inmediatamente invirtiendo el tubo hasta que la solución sea transparente.
6. Centrifugar por 10 min a 10000 rpm, posterior a esto tomar 800 uL del sobrenadante y añadirlos a la columna spin QIAprep 2.0.
7. Añadir 0.5 mL del buffer PB, centrifugar por 1 min y descartar el flujo.

8. Añadir 0.75 mL del buffer PE, centrifugar por 1 min y descartar el flujo. Centrifugar nuevamente por 1 min para remover cualquier residuo del buffer de lavado.
9. Colocar la columna QIAprep 2.0 en un tubo Eppendorf limpio. Para eluir el ADN añadir 50 uL de agua estéril a 37°C, para mejorar la extracción dejar reposar por 5 min.
10. Centrifugar por 1 min. Posterior a esto se puede verificar la integridad del ADN plasmídico por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

D. Montaje de geles SDS-PAGE

1. Preparar la solución del gel separador y concentrador.
2. Añadir el PSA y TEMED a la solución del gel separador.
3. Añadir una pequeña cantidad de isopropanol para eliminar burbujas.
4. Dejar polimerizar el gel separador, posterior retirar el remanente de isopropanol.
5. Añadir el PSA y TEMED a la solución del gel concentrador, vaciarlo entre las dos placas de vidrio y antes de que polimerice, introducir en la parte superior el peine que formara los pocillos en el gel.

E. Electroforesis SDS-PAGE

1. Añadir de 25 ug de proteína en de cada muestra, debido a que todas las muestras deben contener la misma cantidad de proteína, tomar el volumen necesario para que cada una de las proteínas problema tenga una concentración de 1 ug proteína/uL.
2. En una relación 4:1 v/v añadir el buffer de Laemmli 5x a la solución problema.
3. Utilizar un patrón preteñido de peso molecular conocido.
4. Para desnaturalizar las muestras dejar en calentamiento a 95°C por 5 min. Centrifugar a baja velocidad por un minuto para concentrar toda la muestra en el fondo del tubo.
5. Colocar el "sándwich" en la cubeta de electroforesis y retirar con cuidado el peine del gel separador.
6. Llenar ambas cámaras de la cubeta de electroforesis con el buffer de glicina, de manera que esté en contacto con ambos lados del gel. Asegurarse de que el gel quede cubierto en la parte superior.
7. Añadir el patrón de peso molecular y las muestras en los pocillos del gel, completar el volumen del pocillo con buffer de Laemmli 1x.
8. Correr el gel a 90V hasta que la banda visible de azul de bromofenol se acerque al extremo inferior del gel.

Anexo 2. Soluciones

A. Medios de cultivo

i) Medio Luria Broth Líquido (LB)

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

Disolver en 1 L de agua destilada, ajustar pH a 7.0 con NaOH y esterilizar. Para medio LB sólido añadir 15 g de agar.

ii) Medio Mínimo

Reactivos	Concentración (g/L)
Glucosa	5
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3.5
KH_2PO_4	3.5
MgSO_4	1
Elementos traza	3 mL

Ajustar el pH a 7.0-7.4 con KOH previo a su esterilización.

iii) Elementos traza

Reactivos	Cantidad por litro
FeCl_3	27 g
ZnCl_2	2 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g
H_3BO_3	0.5 g
HCl	100

B. Soluciones para células competentes

Reactivos	Concentración (M)
MgCl_2	0.1
CaCl_2	0.1
CaCl_2 + Glicerol 15%	0.085 M + 0.015M

C. Soluciones para electroforesis en gel de agarosa

i) TAE 10X

Reactivos	Concentración
Tris (Base)	48.4 g
Ácido acético glacial	11.4 mL
EDTA (0.5 mM, pH 8)	20 mL

Aforar a 1 L con agua miliQ

ii) Gel de agarosa al 1%

Reactivos	Concentración
Agarosa	1 g
TAE 1X	100 mL

Calentar en microondas hasta que la solución sea cristalina.

D. Método de Lowry

Solución	Reactivos	Concentración (g/mL)
A	CuSO ₄ .H ₂ O	5 g/L en agua destilada
B	Tartrato de sodio y potasio	10 g/L en agua destilada
C	Na ₂ CO ₃	20 g/L en NaOH 0.1N
D	Solución A+B+C	1 mL A + 1 mL B + 98 mL C
	Folín	1:2 en agua destilada

E. Fraccionamiento celular

i) Buffer de shock

Reactivos	Concentración
Tris-HCl	100 mM
Sacarosa	20%
EDTA	10mM

Disolver en agua miliQ y ajustar pH a 7.4

F. SDS-PAGE

i) Gel separador

Reactivos	Volúmen (mL)
Acilamida-Bis 40%	3
Tris 1.5 M pH 8.8	2.5
SDS 10%	0.1
Agua MQ	3.33
PSA 10%	0.1
TEMED	0.015

ii) Gel concentrador

Reactivos	Volúmen (mL)
Acrilamida-Bis 40%	0.365
Tris 0.5 M pH 6.8	0.7
SDS 10%	0.03
Agua MQ	1.650
PSA 10%	0.01
TEMED	0.015

iii) Buffer tris 1.5 M pH 8.8 50mL

Reactivos	Peso (g)
Tris base	9.08

Ajustar pH con HCl, almacenar a 4°C.

iv) Buffer tris 0.5 M pH 6.8 50mL

Reactivos	Peso (g)
Tris base	3

Ajustar pH con HCl, almacenar a 4°C.

v) SDS 10% 10mL

Reactivos	Peso (g)
SDS	1

Ajustar pH con HCl, almacenar a 4°C.

vi) Buffer de Laemmli 5x

Reactivos	Concentración
Tris-HCl pH6.8	375 mM
Glicerol	50 %
SDS	5 %
Azul de bromofenol	0.05 %
B-mercaptoetanol	5 %

Almacenar en refrigeración en protección de luz.

vii) Buffer de Tris-Glicina

Reactivos	Concentración (g/L)
Tris (base)	3
Glicina	14.4
SDS	1

Disolver en 1 L de agua destilada.

viii) Solución de tinción (Coomasie)

Reactivos	Concentración
Coomasie blue R-250	2.5 g
Ácido acético	5%
Metanol	45%

Disolver Coomasie en metanol, posterior añadir agua y el ácido acético.

ix) Solución de desteñido

Reactivos	Concentración (v/v)
Ácido acético	5 %
Metanol	20 %

Preparar solución en agua destilada.

G. Soluciones Western blot

i) Buffer de transferencia

Reactivos	Concentración (mM)
Tris base	25
Glicina	192

Disolver en metanol al 20% y aforar con agua destilada

ii) Buffer PBS

Reactivos	Concentración (mM)
NaCl	140
Na ₂ HPO ₄	7.2
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2.8

Disolver en agua miliQ y ajustar pH a 7.5.

iii) Buffer TBS 10x

Reactivos	Concentración (g/L)
NaCl	88
Tris (base)	24

Disolver en agua destilada, ajustar pH a 7.6 con HCl y ajustar volumen a 1L.

iv) Solución de bloqueo

Reactivos	Concentración
Albúmina de suero bovino (BSA)	2-3%

Disolver en buffer PBS frío.

v) Solución de lavado

Reactivos	Concentración (v/v)
Tween 20	0.05%

vi) Solución de revelado BCIP/NBT

Reactivos	Volúmen (uL)
Buffer fosfatasa alcalina (AP) 10x	300
Tween 20 25%	120
BCIP (puro)	10
NBT (50 mg/mL)	20

Completar volumen con agua MilliQ a 3mL.