

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

**POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

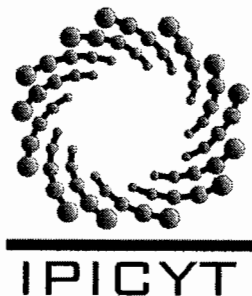
**Diseño de un sistema de expresión de proteínas  
recombinantes del virus de influenza A (H7N9) en  
*Bacillus subtilis***

Tesis que presenta  
**IBt. Marco Antonio Pereyra Camacho**

Para obtener el grado de  
**Maestro en Ciencias en Biología Molecular**

**Codirectores de la Tesis:**  
**Dr. Antonio De León Rodríguez**  
**Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández**

San Luis Potosí, S.L.P., Julio 2016



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis ***“Diseño de un sistema de expresión de proteínas recombinantes del virus de influenza A (H7N9) en Bacillus subtilis”*** presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Marco Antonio Pereyra Camacho** y aprobada el **catorce de julio del dos mil dieciséis** 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.

---

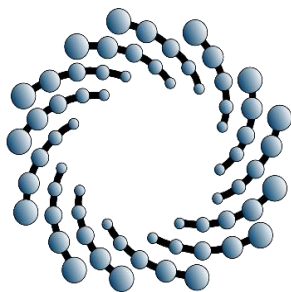
**Dr. Antonio de León Rodríguez**  
Codirector de la tesis

---

**Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández**  
Codirector de la tesis

---

**Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro**  
Miembro del Comité Tutorial



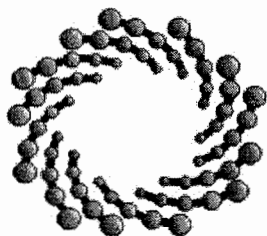
---

**IPICYT**

## **Créditos institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Bioingeniería y Biotecnología Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Antonio De León Rodríguez y el Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández.

Durante la realización del trabajo el autor recibió la beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología No. 331852 y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

# Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 153 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de julio del año 2016, se reunió a las 09:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Antonio De León Rodríguez</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó el C.

**Marco Antonio Pereyra Camacho**

sobre la Tesis intitulada:

*Diseño de un sistema de expresión de proteínas recombinantes del virus de influenza A (H7N9) en Bacillus subtilis*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Antonio De León Rodríguez**  
**Dr. Victor Emmanuel Balderas Hernández**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLO**

Dándose por terminado el acto a las 10:38 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 14 días del mes de julio de 2016.

**Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento del Posgrado

**Dr. Marcial Benfía Marín**  
Secretario Académico



## Dedicatorias

*Dedico esta tesis a mi familia, amigos, compañeros y maestros.*

*De forma muy especial se la dedico a mi novia Margarita Guerra por su amor y por siempre estar a mi lado a pesar de la distancia.*

*Se la dedico a mis padres y abuelos por su apoyo incondicional y por sus palabras de aliento siempre.*

*A mis hermanos Marialeidy y Claudio*

*A mis grandes mentores y amigos Antonio De León y Víctor Balderas*

*Gracias por todo*

## Agradecimientos

A mi familia, por brindarme su apoyo incondicional y por el gran esfuerzo que hicieron para que yo estudiara y creciera profesionalmente, por esos momentos en que siempre estuvieron ahí para darme palabras de aliento para no rendirme y trascender como persona.

A Mi fiel compañera, que está en todo momento a pesar de la distancia, gracias por brindarme tu amor y compañía, por siempre escucharme, por estar en las buenas y en las malas conmigo, por todas las sonrisas, miradas, suspiros que compartimos. Porque eres mi inspiración y mi fuerza para seguir creciendo y solo a tu lado lo quiero hacer.

A mis compañeros y amigos que siempre estuvieron a mi lado en este largo camino, por sus valiosos consejos y por los buenos momentos que pasamos juntos. En especial a mis amigos Julián, Clara y Karen. A mis maestros que son parte de mi formación y que me enseñaron lo que se ahora. En especial a la Dra. Irene Castaño por su apoyo y comentarios que enriquecen mi trabajo de tesis.

A IPICYT y CONACYT, por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría. En especial a mis codirectores el Dr. Antonio De León Rodríguez y el Dr. Víctor Emmanuel Balderas Hernández por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo y compartir su conocimiento. Su pasión por la ciencia me impulso a seguir en este camino que es gratamente satisfactorio. Y a mis amigos L4: Cecy, Kelly, Joel, Karen, Abraham, Sergio, Musu, David, Pris.

Gracias por todo: familia, amigos, compañeros y maestros.

Este logro es para ti mi viejo RACR†

# Contenido

Constancia de aprobación de la tesis .....	ii
Créditos institucionales.....	iii
Acta de examen.....	iv
Dedicatorias.....	v
Agradecimientos .....	vi
Lista de tablas .....	x
Lista de figuras.....	xi
Anexos .....	xii
Resumen .....	xiv
Abstract.....	xv
<b>1 Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Materiales y métodos .....</b>	<b>8</b>
2.1 Cepas bacterianas y plásmidos.....	8
2.2 Extracción de ADN y procedimiento de transformación bacteriana.....	8
2.3 Optimización de los genes sintéticos de las proteínas del virus de influenza A (H7N9) .....	8
2.4 Diseño de un vector replicativo para <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Escherichia coli</i> ...	9
2.5 Construcción de plásmidos de expresión.....	9

2.5.1	Construcción de los vectores replicativos para la expresión de las proteínas Verde Fluorescente (GFP), Neuraminidasa (NA), Matriz (M1) y Hemaglutinina (HA).....	9
2.5.2	Construcción de un vector replicativo para la expresión del policistrón divalente de los genes de las proteínas Neuraminidasa (NA) y de Matriz (M1). .....	10
2.5.3	Construcción de un vector replicativo para la expresión del policistrón trivalente de los genes de las proteínas Neuraminidasa (NA), Matriz (M1) y Hemaglutinina (HA).....	11
2.6	Evaluación de la expresión de los vectores: pMK, pMK-GFP, pMK-NM, pMK-NMH.....	11
2.7	Detección de proteínas mediante análisis de Western blot .....	12
<b>3</b>	<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>13</b>
3.1	Diseño de los genes sintéticos de las proteínas NA, M1 y HA del virus de influenza A (H7N9). .....	13
3.2	Construcción de un vector replicativo para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP).....	13
3.3	Construcción de un vector replicativo para la expresión del policistrón divalente de los genes de las proteínas Neuraminidasa (NA) y de Matriz (M1). .....	14
3.4	Construcción de un vector replicativo para la expresión del policistrón trivalente de los genes de las proteínas NA, M1 y HA.....	14



3.5	Construcción de un vector replicativo para la expresión de la proteína de matriz (M1): pMK-M1 .....	15
3.6	Construcción de un vector replicativo para la expresión de la proteína Hemaglutinina.....	15
3.7	Efecto de la presencia de los plásmidos sobre el crecimiento de <i>B. subtilis</i> .....	15
3.8	Evaluación de la expresión y secreción medida por el sistema Tat en <i>B. subtilis</i> y <i>E.coli</i> .....	17
<b>4</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>Referencias .....</b>	<b>22</b>
<b>7</b>	<b>Tablas .....</b>	<b>29</b>
<b>8</b>	<b>Pies de figuras .....</b>	<b>34</b>
<b>9</b>	<b>Figuras.....</b>	<b>39</b>
<b>10</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>49</b>

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Proteínas del virus de la influenza A (H7N9) .....	29
<b>Tabla 2.</b> Características genotípicas de las cepas y plásmidos utilizados en este estudio.....	30
<b>Tabla 3.</b> Especificaciones de los oligonucleótidos .....	32
<b>Tabla 4.</b> Contenido de codones y su frecuencia de uso en <i>B. subtilis</i> en los genes NA, M1 y HA.....	33

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Modelo para la secreción de proteínas a través de la vía de traslocación Tat en <i>B. subtilis</i> .....	34
<b>Figura 2.</b> Comprobación del vector pMK-GFP. A) Representación esquemática de la construcción pMK-GFP .....	34
<b>Figura 3.</b> Evaluación de la fluorescencia con GFP en las cepas <i>B. subtilis</i> WB600 LBMB/pMK-GFP y B168-IPI/pMK-GFP y <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS/pMK-GFP .....	35
<b>Figura 4.</b> Comprobación de la construcción de Neuraminidasa y proteína de Matriz: pMK-NM .....	35
<b>Figura 5.</b> Comprobación de la construcción de Neuraminidasa, proteína de Matriz y Hemaglutinina: pMK-NMH.....	36
<b>Figura 6.</b> Comprobación de la construcción con el gen de la proteína de Matriz: pMK-M1 .....	36
<b>Figura 7.</b> Comprobación de la construcción con el gen de la proteína Hemaglutinina: pMK-Ha. ....	37
<b>Figura 8.</b> Cinéticas de crecimiento de las diferentes cepas con los vectores de expresión.....	37
<b>Figura 9.</b> Inmunodetección de la proteína GFP de extractos celulares en <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i> .....	37
<b>Figura 10.</b> Inmunodetección de la proteínas NA y M1 del extractos celulares en <i>B. subtilis</i> y <i>E. coli</i> .....	38

## Anexos

10.1	Protocolos .....	49
10.1.1	Extracción de DNA plasmídico en Gram negativas y Gram positivas .....	49
10.1.2	Células rubidio competentes .....	50
10.1.3	Transformación de células rubidio competentes .....	51
10.1.4	Transformación en <i>Bacillus subtilis</i> .....	52
10.1.5	Western Blot.....	52
10.2	Medios de cultivo.....	54
10.2.1	Medio LB .....	54
10.2.2	Medio LBON.....	54
10.2.3	Medios para transformación de <i>Bacillus subtilis</i> .....	54
10.2.3.1	Medio A base 10X .....	54
10.2.3.2	<i>Bacillus</i> sales 10X .....	54
10.2.3.3	Medio A .....	55
10.2.3.4	Medio B .....	55
10.3	Soluciones para purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina.....	55
10.3.1	Solución I.....	55
10.3.2	Solución II.....	55
10.3.3	Solución III.....	55
10.3.4	Solución I- Lisis alcalina Gram positivas .....	56
10.4	Soluciones para células rubidio competentes .....	56
10.4.1	Solución RF I.....	56
10.4.2	Solución RF II.....	56

10.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	56
10.5.1 TAE 10X.....	56
10.5.2 Gel de agarosa al 1%.....	57
10.6 SDS-PAGE.....	57
10.6.1 Gel separador de poliacrilamida 12%.....	57
10.6.2 Gel concentrador de poliacrilamida 4%.....	57
7.6.3 Buffer de carga de proteínas.....	57
10.6.4 Buffer de corrida- TGS 10X.....	58
10.6.5 Solución de teñido.....	58
10.6.6 Solución de desteñido.....	58
10.7 Reactivos Western Blot.....	58
10.7.1 Buffer de transferencia.....	58
10.7.2 Buffer TBS 10X- Tris buffered saline.....	59
10.7.3 Buffer TBST 10X- Tris buffered saline with Tween 20.....	59
10.7.4 Buffer de fosfatos 1X (PBS).....	59
10.7.5 Solución de bloqueo.....	59
10.7.6 Buffer de la fosfatasa alcalina.....	59
10.8 Antibióticos.....	59
10.9 Determinación de biomasa.....	60
10.10 Virus de influenza.....	60
10.11 Diseño de los vectores replicativos.....	61

## Resumen

### **Diseño de un sistema de expresión de proteínas recombinantes del virus de influenza A (H7N9) en *Bacillus subtilis***

La influenza es una enfermedad infecciosa provocada por el virus de la influenza, sus principales hospederos son las aves silvestres, sin embargo, puede infectar personas, aves de corral, cerdos y otros animales. Actualmente el virus de la influenza A (H7N9) forma parte de un subgrupo de virus gripales que normalmente circulan en las aves, sin embargo, recientemente se ha reportado la aparición de graves epidemias humanas causadas por este virus. Esto ha generado la necesidad de desarrollar nuevas alternativas para la producción de vacunas candidatas. Los estudios más recientes muestran que la producción de proteínas recombinantes es una estrategia viable para dicho propósito. El presente trabajo tiene la finalidad de desarrollar un sistema de expresión de proteínas recombinantes de influenza A (H7N9) en *Bacillus subtilis*. Debido a que se disponen de pocos vectores de expresión para *B. subtilis*, en este trabajo se diseñó un sistema de expresión bajo el promotor del fago T7. El sistema consiste en un vector replicativo que contiene los genes de las proteínas virales hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA) y de matriz (M1). Además, el vector cuenta con un péptido señal perteneciente a la vía de secreción TAT. La funcionalidad del sistema de expresión y secreción se evaluó mediante análisis por western blot y microscopía de fluorescencia utilizando el gen reportero de la proteína verde fluorescente. Posteriormente se utilizará para la producción de proteínas del virus de influenza A (H7N9).

**Palabras clave:** *B. subtilis*, influenza, proteínas recombinantes, secreción, T7.

# Abstract

## Design of an expression system for recombinant proteins of influenza A (H7N9) in *Bacillus subtilis*

Influenza is an infectious disease caused by the influenza virus, its main hosts are wild birds, but can infect people, poultry, pigs and other animals. Currently the influenza A virus (H7N9) is part of a subgroup of influenza viruses that normally circulate in poultry, however, it has recently been reported the occurrence of serious human epidemics caused by this virus. This has created the need for development of new alternatives for the production of vaccine candidates. The most recent studies show that the production of recombinant proteins is a viable strategy for that purpose. This study aims to develop an expression system for recombinant proteins of influenza A (H7N9) in *Bacillus subtilis*. Because there are few expression vectors for *B. subtilis*, in this work we designed an expression system under the T7 phage promoter. The system consists of a replicative vector containing the genes of viral proteins hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA) and matrix (M1). Furthermore, the vector has a signal peptide belonging to the TAT secretion pathway. System expression functionality and secretion were assessed by western blot analysis and fluorescence microscopy using the reporter gene green fluorescent protein. Subsequently it will be used for the production of proteins of influenza A (H7N9).

**Keywords:** *B. subtilis*, influenza, recombinant proteins, secretion, T7.

# 1 Introducción

La influenza es una enfermedad respiratoria infecciosa provocada por el virus de la influenza perteneciente a la familia *orthomyxoviridae*, sus principales hospederos son las aves silvestres, sin embargo, puede infectar personas, aves de corral, cerdos y otros animales [1-3]. En los humanos es altamente contagiosa, de elevada morbilidad y capaz de provocar complicaciones letales [4, 5].

Su genoma viral es de RNA de cadena sencilla, de sentido negativo, está compuesto por 8 segmentos de RNA los cuales codifican para 10 proteínas. Las polimerasas (PA, PB1 y PB2), la nucleocápside (NP), las proteínas de matriz (M1 y M2), proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y dos glicoproteínas superficiales; neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA) (Anexo 7.10) [4]. Con base en sus características moleculares e inmunológicas, los virus de influenza se clasifican en tipos A, B, y C. Estas mismas características le permiten al virus el intercambio de material genético continuo, dando lugar a nuevas variantes que causan epidemias anuales en la población, se clasifican en subtipos de acuerdo a las diferencias genéticas y serológicas asociadas principalmente con las dos glicoproteínas superficiales NA (N1-N9) y HA (H1-H18) [2, 6], esta cantidad de subtipos en las glicoproteínas se debe a pequeños cambios en la secuencia nucleotídica de los genes que codifican para cada proteína, lo que genera una combinación distinta de aminoácidos y esto produce variaciones en su plegamiento, esto último es un punto importante para el reconocimiento del virus por su huésped y su nivel de infección. Periódicamente emergen nuevos subtipos del virus ante los que el sistema inmune humano se encuentra desprotegido.



Actualmente se encuentra circulando en países de Asia Oriental y Canadá el virus de la influenza A (H7N9), que forma parte de un subgrupo de virus gripales que circula en aves, pero recientemente se han reportado casos de infecciones humanas [7]. El virus H7N9 ha tenido implicaciones graves en la mayoría de los casos reportados, sin embargo, la información existente sobre el alcance de la enfermedad causada por este virus es escasa [8, 9]. Esto ha generado un esfuerzo mundial para el desarrollo de vacunas candidatas para este virus. Aunque hasta la fecha, no existe evidencia de una vacuna para la influenza A (H7N9) que muestre ser viable, las vacunas candidatas para el subtipo H7N9 han sido poco inmunogénicas y de difícil producción. Las vacunas tradicionales contra la gripe aviar son producidas a partir de virus atenuados o inactivados, sin embargo, aunque son técnicas efectivas estas pueden presentar desventajas o reacciones adversas como alergias, convulsiones, fiebre y otras afecciones [7]. Los estudios más recientes han propuesto a las vacunas recombinantes como una estrategia viable para su producción.

Las vacunas recombinantes están basadas principalmente en dos modelos, el primero se basa en la producción de vacunas recombinantes di, tri o tetravalentes, sin embargo, las más usadas son las trivalentes (3 tipos de HA). Mientras que el segundo modelo se enfoca en la producción de *pseudo*-partículas del virus conformado por las proteínas HA, NA y MP y que se asemejan a los viriones maduros del virus de influenza A.

El uso de sistemas bacterianos para la producción de proteínas recombinantes tiene la ventaja de ser un sistema simple, que requiere un menor tiempo de producción y costo comparado con otros sistemas. Las bacterias se han utilizado

durante décadas como fuente de investigación para la producción de enzimas de interés industrial, proteínas terapéuticas y metabolitos, incluidos los antibióticos, aditivos alimentarios y suplementos nutricionales [10].

En este sentido, *Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, aerobia, formadora de endosporas, no patógena, que se encuentra comúnmente en el agua, suelo y en asociación con las plantas [11]. La bioquímica, fisiología y genética de *B. subtilis* y sus cepas derivadas se han investigado a detalle durante más de 40 años, facilitando así un mayor desarrollo y una mayor explotación de estos organismos en los procesos industriales. Esto hace que *B. subtilis* sea un buen microorganismo para la producción de proteínas heterólogas. Otras de sus ventajas es que no tiene un sesgo significativo en el uso de codones [12], también se conoce información sobre los mecanismos de transcripción y traducción [13]. Hoy en día *B. subtilis* y sus cepas derivadas son los principales microorganismos productores de enzimas en la microbiología aplicada e industrial incluyendo proteasas y amilasas [11, 14, 15]. Debido a la capacidad demostrada de esta especie para producir y secretar cantidades del orden de gramos por litro de estas y otras enzimas, han sido considerados como candidatos potenciales para utilizarse como anfitriones para la producción de proteínas heterólogas [15, 16]. Sus ventajas sobre *Escherichia coli* como sistema de expresión son la ausencia natural de producción de endotoxinas y la capacidad de secretar normalmente proteínas al medio extracelular, un evento que ocurre difícilmente en *E. coli*. Sus ventajas sobre los sistemas eucariotas incluyen una mayor tasa de síntesis y secreción de proteínas y la ausencia de mecanismos de modificación de proteínas

que podrían conducir a la conversión de algunas proteínas a formas antigénicas [17, 18].

Una de las principales desventajas de *B. subtilis* descubiertas hasta ahora es la presencia de altos niveles de proteasas que podrían degradar proteínas heterólogas producidas por la célula, esto hace difícil distinguir si el fallo para producir una proteína heteróloga se debe a proteólisis o a la incompatibilidad de la proteína con la maquinaria secretora de *B. subtilis* [13]. Sin embargo, actualmente, ocho de los genes que codifican para proteasas extracelulares, se han clonado y caracterizado. Actualmente, existen cepas deficientes en seis, siete y ocho genes de las proteasas extracelulares (ej. WB600, WB700 y WB800 respectivamente). Otras de sus desventajas es la ausencia de sistemas de modificación post-traduccional compleja como glicosilación y la dificultad de secretar proteínas eucarióticas a tasas elevadas [17].

Actualmente existe una amplia variedad de sistemas de expresión descritos para las especies de *Bacillus*, los cuales se combinan con secuencias para secretar a las proteínas. Sin embargo, estos plásmidos monofuncionales y los vectores derivados de ellos, han presentado inestabilidad plasmídica. Pueden distinguirse dos tipos de inestabilidad: estructural y segregacional. La inestabilidad estructural se refiere a los re-arreglos en el DNA, es decir, después de varios ciclos de replicación, estos plásmidos son altamente susceptibles a reordenamientos estructurales [19]. La inestabilidad segregacional se refiere a la pérdida del plásmido completo de la población celular bajo condiciones no selectivas [20].

Una alternativa para evitar el problema de la inestabilidad plasmídica en *B. subtilis* es utilizar plásmidos integrativos. La integración de genes a nivel de cromosoma

tiene varias ventajas sobre el mantenimiento de los genes en plásmidos. En primer lugar, la integración asegura que una sola copia del transgén está presente, lo que puede ser importante para la regulación de genes [21]. En segundo lugar, genes integrados en el cromosoma son muy estables y se mantienen en el mismo número de copias, incluso en ausencia de selección [22]. También diversos autores han desarrollado varios vectores de expresión inducibles basados en plásmidos que exhiben estabilidad estructural, que contienen promotores inducibles que pueden inducirse mediante la adición de xilosa, IPTG, glicina o por un choque de frío [23-25].

Una de las principales ventajas de *B. subtilis* y especies cercanas es que presentan la capacidad para secretar proteínas directamente al medio de cultivo a altas concentraciones lo cual representa una estrategia más rentable de producir proteínas que la extracción desde el citoplasma o periplasma [13]. Por otra parte, la secreción de proteínas a menudo conduce a la mejora de la autenticidad estructural y se requiere significativamente menos del tratamiento de purificación para evitar la co-purificación de contaminantes indeseables, tales como endotoxinas y ácidos nucleicos [10]. En la práctica, los intentos de utilizar este grupo de bacterias para la fabricación de proteínas heterólogas han tenido un éxito mixto. Las razones para esto son complejas, pero se refieren a las propiedades intrínsecas tanto de las proteínas diana como a los propios sistemas de secreción [26]. En particular, dada la importancia de la secreción de la proteína con el crecimiento y la integridad de las células, los sistemas de secreción nativos incluyen una serie de puntos de control de calidad diseñados para evitar bloqueos potencialmente letales [27]. En general, las proteínas recién sintetizadas se

pueden dirigir y translocar a través de la membrana por una amplia variedad de rutas que posee *B. subtilis* [27]. Hasta el momento, se han reportado cuatro vías diferentes para la exportación de proteínas desde el citoplasma. El mayor número de proteínas exportadas son transportadas a través de la principal vía de secreción Sec-SRP [28]. Otras rutas, como la vía de translocación de doble arginina (Tat), transportadores de casete de unión a ATP (ABC) y la vía de exportación *pseudopili* para el desarrollo de la competencia [27], pueden considerarse como vías para usos especiales, a través de las cuales pocas proteínas parecen ser transportadas [26, 29]. El destino final de una proteína está definido por la presencia o ausencia de péptido señal. Los péptidos señal consisten en pequeñas secuencias de aminoácidos que tienen señales de reconocimiento para dirigirlos a diferentes compartimentos intra o extra celulares, después de liberar la proteína al compartimiento subcelular correcto, son removidos frecuentemente por peptidasas señal especializadas [30].

La secreción de proteínas a partir de especies de *Bacillus* es una herramienta importante de la producción industrial de proteínas y péptidos recombinantes, las tecnologías estándar de secreción se basan en la vía secretora general Sec, sin embargo, con frecuencia se presentan inconvenientes en los procesos de producción de proteínas, uno de los principales inconvenientes es la incompatibilidad de las proteínas de origen eucarionte con la maquinaria de exportación de Sec, así como también la secreción de proteínas de alto peso molecular [31, 32]. Avances recientes muestran que la vía de secreción Tat (translocación de doble arginina) presenta un gran potencial para el transporte de proteínas y para la producción de proteínas incompatibles con la vía Sec [33]. Los

péptidos señal de los sustratos de la vía Sec-dependiente y Tat son similares en organización estructural: un extremo N-terminal cargado positivamente (región N) seguido por un núcleo hidrófobo (región H) y una región corta de escisión (C) que contiene el sitio diana para la peptidasa señal [29, 34]. El sistema de Tat está más estudiado en la bacteria *E. coli* (Gram-negativa). Sin embargo, en los últimos años, la comprensión del sistema Tat en bacterias Gram-positivas, tal como *B. subtilis* se ha expandido ampliamente [35] (Fig. 1).

A diferencia de las bacterias Gram-negativas que están rodeadas por una membrana externa, las proteínas exportadas a través de la membrana citoplasmática de las bacterias Gram-positivas son liberadas directamente en el ambiente externo esto debido a que sólo tienen que atravesar una sola membrana para entrar en el entorno extracelular [30, 36]. Por lo tanto, las bacterias Gram-positivas son anfitriones atractivos para la producción industrial de enzimas que se producen naturalmente en estos organismos y que son secretados en el sobrenadante en grandes cantidades [37]. Esto presenta una ventaja importante para utilizar *B. subtilis* como un sistema de clonación y expresión de proteínas heterólogas [17].

El objetivo de este trabajo es diseñar un sistema de expresión de las proteínas NA, M1 y HA del virus de influenza A (H7N9) en *B. subtilis*. El vector replicativo está bajo el promotor del fago T7 acoplado al péptido señal Tat para la expresión y secreción de proteínas recombinantes, la funcionalidad del sistema de expresión se evaluará con el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP).

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen), *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen), *B. subtilis* 168 y *B. subtilis* WB600 (proporcionada por el Dr. Wong de la Universidad de Calgary, Canadá) fueron cultivadas en medio de cultivo Luria Bertani (Invitrogen). Las características genotípicas de las cepas se muestran en la tabla 2. Cuando fue necesario a los medios de cultivo se les agregaron antibióticos a las concentraciones finales que se indican a continuación: ampicilina (Amp<sup>r</sup>) 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; kanamicina (Kan<sup>r</sup>) 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; tetraciclina (Tet<sup>r</sup>) 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , cloranfenicol (Cm<sup>r</sup>) 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 2.2 Extracción de ADN y procedimiento de transformación bacteriana

Los ensayos de extracción y purificación de ADN, PCR, restricción, ligación, electroforesis en geles de agarosa y transformación de células competentes de *E. coli* se realizaron usando técnicas estandarizadas (Anexo 7.1-5).

Las células competentes de *B. subtilis* fueron transformadas mediante la técnica descrita por Anagnostopoulos y Spizizen [38] (Anexo 7.1-3).

### 2.3 Optimización de los genes sintéticos de las proteínas del virus de influenza A (H7N9)

Las secuencias de las proteínas NA, M1 y HA del virus de la influenza A (H7N9) se obtuvieron de la base de datos GISAID- EpiFlu™ (Tabla 1).

Se realizó el análisis de codones de los genes de las proteínas HA, NA y M1 del virus de influenza A (H7N9) con el programa MacVector 12.6 (MacVector Inc.)

para su correcta expresión en *B. subtilis*. Los genes sintéticos de las proteínas NA, M1 y HA se adquirieron con GenScript®.

## **2.4 Diseño de un vector replicativo para *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli***

Se diseñó el vector replicativo, el cual contiene todos los elementos esenciales optimizados para su expresión tanto en *B. subtilis* como en *E. coli*, incluyendo el péptido señal perteneciente a la vía de secreción TAT para así lograr expresar y secretar las proteínas de interés al medio de cultivo.

El vector replicativo está formado por el promotor T7 de la RNA polimerasa, un sitio de unión a ribosoma, un péptido señal perteneciente a la vía de secreción Tat, un marco abierto de lectura, una cola de histidinas para facilitar la purificación de los péptidos, el terminador de la RNA polimerasa T7, repU (origen de replicación para *B. subtilis*), Col E1 (origen de replicación para *E. coli*) y el gen de resistencia a tetraciclina (Tet<sup>r</sup>) como gen de selección. El diseño y los elementos del vector de expresión se analizaron con el programa MacVector 12.6 (MacVector Inc.) cuidando que todos los elementos se encontraran en fase.

## **2.5 Construcción de plásmidos de expresión**

### **2.5.1 Construcción de los vectores replicativos para la expresión de las proteínas Verde Fluorescente (GFP), Neuraminidasa (NA), Matriz (M1) y Hemaglutinina (HA).**

A partir del plásmido pKa diseñado por Gutierrez, 2015 [38], se construyeron los plásmidos de expresión pMK-GFP, pMK-NA, pMK-M1 y pMK-HA (Anexo 7.11) Para ello se comenzó con la escisión del péptido VS (*Sal*-**VS**-*Sal*) del plásmido pKa, posteriormente se religó el plásmido y se obtuvo el plásmido pMKsec, se



siguió con una digestión con las enzimas *SalI* y *BglII* esto permite la clonación de los genes de interés (GFP, NA, M1 y HA). El gen reportero y los genes de interés se obtuvieron de la siguiente forma: el gen reportero GFP (*SalI*-**GFP**-*BglII*) se obtuvo del vector pAKG-GFP [38], los genes NA, M1 y HA se amplificaron a partir de los vectores pNAM2015 y pHA2015 (Tabla 2) con sus respectivos oligonucleótidos (Tabla 3). Los productos amplificados fueron subclonados individualmente en el plásmido pGEMT-easy Vector (Promega) y digeridos con las enzimas *SalI* y *BglII*. Los productos de restricción (*SalI*-*BglII*) fueron clonados en el plásmido pMKsec, obteniendo los vector replicativos denominados pMK-GFP, pMK-NA, pMK-M1 y pMK-HA. Posteriormente se hizo el cambio del péptido señal SEC (*NheI*-**Sec**-*SalI*) por el péptido señal Tat en su posición correcta dentro del vector replicativo (extremo N-terminal), para finalizar se escindió el péptido señal TAT (*XbaI*-**Tat**-*XhoI*) que se encuentran en una posición no correcta del vector para ser sustituido por el marcador de selección Tet<sup>r</sup>.

### **2.5.2 Construcción de un vector replicativo para la expresión del policistrón divalente de los genes de las proteínas Neuraminidasa (NA) y de Matriz (M1).**

Se realizó una construcción para la expresión de las proteínas NA y M1. Para ello se clonó el gen M1 (*PstI*-**M1**-*BglII*) en el vector pMK-NA previamente digerido con las enzimas de restricción (*PstI* y *BglII*). El gen de la proteína M1 se obtuvo del plásmido pNAM2015 utilizando las enzimas de restricción *PstI* y *BglII*, el producto de restricción *PstI*-**M1**-*BglII* fue clonado en el plásmido pMK-NA, obteniendo el

vector replicativo denominado pMK-NAM y la construcción se transformó en dos cepas de *B. subtilis* (IPI y LBMB) y *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen).

### **2.5.3 Construcción de un vector replicativo para la expresión del policistrón trivalente de los genes de las proteínas Neuraminidasa (NA), Matriz (M1) y Hemaglutinina (HA).**

Se realizó una construcción para la expresión de las proteínas NA, M1 y HA. Para ello se clonó el gen HA (*NcoI*-HA-*BglII*) en el vector pMK-NAM previamente digerido con las enzimas de restricción (*NcoI* y *BglII*). El gen de la proteína HA se obtuvo del plásmido pHA2015 utilizando las enzimas de restricción *NcoI* y *BglII*, el producto de restricción *NcoI*-HA-*BglII* fue clonado en el plásmido pMK-NAM, obteniendo el vector replicativo denominado pMK-NMH. La construcción se transformó en dos cepas de *B. subtilis* (IPI y LBMB) y *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen).

### **2.6 Evaluación de la expresión de los vectores: pMK, pMK-GFP, pMK-NM, pMK-NMH**

Para llevar a cabo el ensayo, se prepararon pre-inóculos de las cepas de *B. subtilis* 168-IPI y WB600-LBMB y *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen) transformadas con los plásmidos replicativos, se incubaron toda la noche a 37°C, en agitación (180 rpm) y con su respectivo antibiótico. Con ellos se iniciaron las cinéticas de crecimiento a una densidad óptica inicial a 600nm de 0.05 en matraces de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo LB suplementado con tetraciclina (10 µg mL<sup>-1</sup>), el cultivo de *E. coli* fue inducido con IPTG (0.5 mM) al llegar a una OD<sub>600</sub> 0.5. La cinética de crecimiento se siguió mediante mediciones a

la misma longitud de onda cada 2 h durante 24 h y posteriormente cada 12 h hasta 48 h. Se colectaron alícuotas a diferentes tiempos y las células fueron cosechadas mediante centrifugación a 12000  $xg$  durante 8 min. Las proteínas secretadas al medio de cultivo fueron precipitadas en 5 volúmenes de metanol; las pastillas de proteína fueron resuspendidas en 250  $\mu L$  de PBS 1X (138 mM NaCl, 3 mM KCl, 8.1 mM  $Na_2HPO_4$ , 1.5 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7.4) y alícuotas de 25  $\mu L$  fueron analizadas por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12%. Para la obtención de las proteínas intracelulares, la pastilla de células fue lavada, resuspendida en 250  $\mu L$  de amortiguador PBS 1X. La fracción intracelular fue analizada por electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% (Anexo 7.6). Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

## **2.7 Detección de proteínas mediante análisis de Western blot**

Las distintas fracciones de proteínas fueron separadas por electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) (Anexo 7.6). Las proteínas NA, M1 y HA recombinantes fueron detectadas por inmunoblot; en estos ensayos se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal de ratón Anti-His tag (Millipore). Para la detección de la proteína reportera GFP se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal de conejo anti-GFP (Living Colors® A.v. Peptide Antibody; Clontech). Los anticuerpos de cabra anti IgG de ratón (Invitrogen) y de conejo (Sigma-Aldrich) acoplados a fosfatasa alcalina fueron utilizados como anticuerpos secundarios a una dilución de 1:3000. Los inmunoblots, fueron revelados con *p*-nitro azul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato (NBT/BCIP, Amersham Biosciences; Piscataway, NJ).

### **3 Resultados y discusión**

#### **3.1 Diseño de los genes sintéticos de las proteínas NA, M1 y HA del virus de influenza A (H7N9).**

Los genes nativos de las proteínas virales NA, M1 y HA presentaron en total 84 codones reportados como poco frecuentes en *B. subtilis* y que pueden causar una disminución en la expresión de proteínas. Se sabe que la presencia de codones de baja frecuencia es uno de los principales factores limitantes en la expresión de proteínas heterólogas [39, 40]. Los codones poco frecuentes fueron sustituidos por otros que han sido reportados como de mayor uso por *B. subtilis* (Tabla 4). Los genes sintéticos de NA, M1 y HA presentaron una homología, con respecto a los genes nativos, de 96%, 97% y 95% respectivamente.

#### **3.2 Construcción de un vector replicativo para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP).**

Se realizó la construcción de un vector de expresión para la proteína verde fluorescente. La construcción se transformó en las cepas de *B. subtilis* 168-IPI y WB600-LBMB y en *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen). La construcción se comprobó mediante la amplificación del gen GFP por PCR con los oligonucleótidos sentido GFPfor y antisentido GFPprev (Tabla 3), así como por análisis de restricción con las enzimas *SalI* y *BglII*. El tamaño correspondiente al gen de la proteína GFP es de 729 pb (Fig. 2). El objetivo del uso de la proteína GFP es usarla como gen reportero y verificar de una manera rápida y sencilla la funcionalidad del sistema de expresión. Para comprobar la funcionalidad del sistema, la construcción pMK-GFP se transformó en las cepas de *B. subtilis* 168

IPI, *B. subtilis* WB600 LBMB y *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen). Las transformantes se crecieron a 37°C en medio LB durante 18 h y se tomó una muestra del cultivo celular para observarse por microscopía de fluorescencia (Microscopio óptico Zeiss acoplado a ApoTome) utilizando los filtros para la visualización de la GFP (Fig. 3).

El sistema de expresión mostró funcionalidad tanto en las dos cepas de *B. subtilis*, así como en la de *E. coli*, esto se concluye con la fluorescencia observada en las cepas de estudio.

### **3.3 Construcción de un vector replicativo para la expresión del policistrón divalente de los genes de las proteínas Neuraminidasa (NA) y de Matriz (M1).**

Se realizó la construcción de un policistrón divalente para la expresión de las proteínas NA y M1. La construcción se transformó en las cepas de *B. subtilis* 168-IPI y WB600-LBMB y de *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen). La comprobación se llevó a cabo mediante una PCR con los oligonucleótidos NAFwd y HMrev (Tabla 3) y por análisis de restricción con las enzimas *SalI* y *BglII*. El tamaño correspondiente al policistrón divalente es de 2367 pb (Fig.4). Además se confirmó mediante secuenciación.

### **3.4 Construcción de un vector replicativo para la expresión del policistrón trivalente de los genes de las proteínas NA, M1 y HA**

Se realizó la construcción de un policistrón trivalente para la expresión de las proteínas NA, M1 y HA. La construcción se transformó en las cepas de *B. subtilis* 168-IPI y WB600-LBMB y de *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen). La comprobación se llevó a cabo mediante análisis de restricción con las enzimas

*Sall* y *BgIII*. El tamaño correspondiente al policistrón trivalente es de 4051 pb (Fig. 5).

### **3.5 Construcción de un vector replicativo para la expresión de la proteína de matriz (M1): pMK-M1**

Se realizó una construcción con el gen de la proteína M1. La construcción se transformó en las cepas de *B. subtilis* 168-IPI, WB600-LBMB y *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen). La comprobación se llevó a cabo mediante una PCR con los oligonucleótidos M1fwd y HMrev (Tabla 3) y por análisis de restricción con las enzimas *Sall* y *BgIII*. El tamaño correspondiente al gen de la proteína M1 es de 777 pb (Fig. 6).

### **3.6 Construcción de un vector replicativo para la expresión de la proteína Hemaglutinina.**

Se realizó una construcción con el gen de la proteína HA. La construcción se transformó en las cepas de *B. subtilis* 168-IPI, WB600-LBMB y *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Invitrogen). La comprobación se llevó a cabo mediante una PCR con los oligonucleótidos HAFwd y HMrev (Tabla 3) y por análisis de restricción con las enzimas *Sall* y *BgIII*. El tamaño correspondiente al gen de la proteína HA es de 1726 pb (Fig. 7).

### **3.7 Efecto de la presencia de los plásmidos sobre el crecimiento de *B. subtilis***

Estos ensayos se realizaron con la finalidad de evaluar si los genes de interés bajo el promotor de la RNA polimerasa T7 afectan o no el crecimiento de la bacteria. El sistema de expresión T7 fue descrito por primera vez en *E. coli* y es conocido por

su alta eficiencia y especificidad en la expresión de genes diana bajo el control del promotor de T7. La iniciación de la transcripción a partir del promotor T7 requiere de la función de la T7 RNA polimerasa, esto permite que la expresión sea exclusiva de los genes regulados por el promotor T7 sin competir por la RNA polimerasa bacteriana [41].

Para estudiar este efecto, las cepas de *B. subtilis* IPI y LBMB y *E. coli*(DE3) pLysS transformadas con los vectores: pMK, pMK-GFP, pMK-NM y pMK-NMH, se cultivaron, siguiendo su cinética de crecimiento, comenzando con un OD<sub>600</sub> de 0.05 (Fig. 8). Al comparar y evaluar el crecimiento de las cepas con el vector de expresión, se observó que el crecimiento de la bacteria se ve afectado en presencia de los vectores replicativos. Todas las cepas generadas en este estudio con el vector vacío (pMK) muestran una la velocidad de crecimiento específica similar de 0.38 h<sup>-1</sup> que al compararla con la velocidad específica de crecimiento para todas las cepas con los vectores pMK-GFP, pMK-NM y pMK-NMH fue de 0.32 h<sup>-1</sup>, 0.22 h<sup>-1</sup> y 0.21 h<sup>-1</sup> respectivamente, lo que representa un decremento del 20 al 40 %. Este efecto puede deberse a que los plásmidos representan una carga metabólica significativa para sus anfitriones. La carga metabólica asociada con un plásmido en particular, se determina tanto por la expresión de sus productos y el número de copias de los plásmidos dentro de una célula. Se observó que el plásmido divalente (pMK-NM) y el trivalente (pMK-NMH) presentan una reducción mayor en el crecimiento que el plásmido pMK-GFP. Esto sugiere que hay un efecto directo por el del tamaño del inserto y por la naturaleza biológica propia de los genes que codifican.

Algunas de las curvas de crecimiento (Fig. 8) presentan un comportamiento diaúxico, efecto que se da principalmente cuando hay presentes dos sustratos diferentes que pueden ser utilizados como fuente de carbono por el microorganismo. También se ha sugerido que se presenta como resultado a la pérdida segregacional de los plásmidos que repercute en el comportamiento de crecimiento de la bacteria [42]. También se ha reportado que el uso de tetraciclina tiene un impacto en el crecimiento del huésped, se ha visto que después de las 12 h la tasa de crecimiento cambia [43]. Sin embargo, aún no está claro a qué se debe este comportamiento diaúxico en algunas de las cepas obtenidas en este estudio.

### **3.8 Evaluación de la expresión y secreción medida por el sistema Tat en *B. subtilis* y *E. coli***

Las fracciones proteicas (intra y extra celulares) fueron separadas por electroforesis en gel SDS-PAGE al 12% y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa. El análisis de western blot de la fracción intracelular de 5 clonas que contienen el vector pMK-GFP (Fig. 9A) muestra una banda principal de 27 kDa, la cual corresponde al tamaño de la proteína GFP y una banda secundaria de mayor tamaño (34 kDa) correspondiente a la masa molecular esperada de la proteína de GFP no procesada, esto puede deberse a una baja eficiencia de la peptidasa encargada de escindir el péptido señal Tat de la proteína durante el proceso de translocación, también se logran apreciar una tercera banda que puede ser producto de una degradación proteolítica posterior. Snyder y cols. [44] obtuvieron un resultado similar donde detectaron la forma procesada y sin procesar de GFP



unida al péptido señal Tat. Este efecto fue reportado también por Medina y cols. [45] donde detectaron la proteína procesada y sin procesar de hIL-2 fusionada con un péptido señal Tat-dependiente en la fracción insoluble de la membrana de *E. coli*. Ellos concluyen que el sistema de secreción fue rápidamente saturado y que la secuencia señal del sustrato acumulado es a menudo sensible a la acción de proteasas, lo que resulta en la digestión de la secuencia señal mientras que la proteína madura permanece intacta. Como se mencionó anteriormente, la maquinaria de secreción de *B. subtilis* y *E. coli* son similares y por lo tanto se puede esperar un comportamiento similar con respecto al transporte de proteínas y procesamiento del péptido señal.

La figura 9B, muestra el análisis de western blot de la fracción extracelular, donde solo las muestras de *B. subtilis* muestran secreción de las proteínas al medio extracelular, sin embargo, la secreción del sistema es muy baja. El western blot mostró una única banda correspondiente al peso molecular de la GFP (27 kDa) y ligeras bandas de tamaño inferior que puede deberse a la degradación de la proteína por procesos de proteólisis [46]. Resultados similares fueron obtenidos por Rojas y cols. [47] donde detectaron la presencia de una banda única de hIL-2 y donde observaron bandas de menor tamaño a partir de las 27 h del cultivo, ellos concluyen que la proteína está siendo parcialmente degradada y el inicio de la degradación coincide con el comienzo de la fase de crecimiento estacionario. Es bien sabido que al final de la fase de crecimiento exponencial, cuando los nutrientes comienzan a disminuir, *B. subtilis* produce proteasas, lipasas y otras enzimas degradativas [48].

Se llevó a cabo la expresión del vector replicativo pMK-NM, se recuperó la fracción proteica (intra y extra celular) de los cultivos, sin embargo, el análisis de western blot de ambas fracciones no mostraron respuesta (Fig. 10). A diferencia de los sistemas de expresión y secreción de proteínas homólogas, la producción de proteínas heterólogas en *B. subtilis* es en ocasiones ineficaz. Esto ha sido atribuido a inestabilidad plasmídica, proteólisis o a los cuellos de botella presentes en la vía secretora de proteínas [10, 36, 44]. Por ello es necesario optimizar las condiciones de expresión y secreción de las proteínas virales en *B. subtilis*.

## 4 Conclusiones

1. El sistema de expresión constitutivo basado en el promotor T7 es funcional en las cepas de *B. subtilis* IPI, *B. subtilis* LBMB y *E. coli* BL21(DE3) pLysS, esto se concluye con la fluorescencia observada en las cepas de estudio y su análisis de por western blot de las cepas con el gen reportero GFP.
2. El sistema de translocación Tat mostró ser funcional, sin embargo, parece presentar saturación, para ello es necesario optimizar las condiciones de cultivo para favorecer la secreción al medio extracelular.
3. El sistema de expresión bajo un promotor constitutivo afecta el crecimiento de las bacterias, por lo cual, el uso de un promotor inducible para definir el momento del inicio de expresión podrían ser una alternativa para contrarrestar dicho problema.
4. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el uso de secreción mediado por Tat en *B. subtilis* puede ser una alternativa para la producción de proteínas recombinantes de interés, sin embargo, es necesario contar con un diseño experimental que permita evaluar las condiciones óptimas de producción y secreción de las proteínas.

## 5 Perspectivas

1. Optimizar y evaluar la expresión de las proteínas virales NA, M1 y HA del virus de influenza A (H7N9).
2. Optimizar las condiciones del medio de cultivo para favorecer la secreción de las proteínas mediante el sistema de translocación Tat.
3. Evaluar diseñar un sistema de expresión inducible o un vector integrativo para la producción de las proteínas virales de influenza.
4. Llevar a cabo la expresión y purificación de las proteínas NA, M1 y HA del virus de influenza A (H7N9) para la formación de una *pseudo*- partícula viral.

## 6 Referencias

1. Bouvier NM, Palese P: **The biology of influenza viruses.** *Vaccine* 2008, **26**:D49-D53.
2. Flores-Munguía ME, Vázquez-Moreno L, Ramos-Clamont M: **Glicobiología del virus de la influenza A.** *Rev Latinoam Microbiol* 2007, **49**(3-4):74-87.
3. de Jong MD, Hien TT: **Avian influenza A (H5N1).** *J Clin Virol* 2006, **35**(1):2-13.
4. Horimoto T, Kawaoka Y: **Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents.** *Nature Reviews Microbiology* 2005, **3**(8):591-600.
5. Chen Z, Baz M, Lu J, Paskel M, Santos C, Subbarao K, Jin H, Matsuoka Y: **Development of a high-yield live attenuated H7N9 influenza virus vaccine that provides protection against homologous and heterologous H7 wild-type viruses in ferrets.** *J Virol* 2014, **88**(12):7016-7023.
6. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF: **Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11.** *Trends in microbiology* 2014, **22**(4):183-191.
7. Smith GE, Flyer DC, Raghunandan R, Liu Y, Wei Z, Wu Y, Kpamegan E, Courbron D, Fries LF, 3rd, Glenn GM: **Development of influenza H7N9 virus like particle (VLP) vaccine: homologous A/Anhui/1/2013 (H7N9) protection and heterologous A/chicken/Jalisco/CPA1/2012 (H7N3) cross-protection in vaccinated mice challenged with H7N9 virus.** *Vaccine* 2013, **31**(40):4305-4313.

8. Gao HN, Lu HZ, Cao B, Du B, Shang H, Gan JH, Lu SH, Yang YD, Fang Q, Shen YZ *et al*: **Clinical findings in 111 cases of influenza A (H7N9) virus infection.** *N Engl J Med* 2013, **368**(24):2277-2285.
9. Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H, Xu K: **Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus.** *New England Journal of Medicine* 2013, **368**(20):1888-1897.
10. Pohl S, Bhavsar G, Hulme J, Bloor AE, Misirli G, Leckenby MW, Radford DS, Smith W, Wipat A, Williamson ED: **Proteomic analysis of Bacillus subtilis strains engineered for improved production of heterologous proteins.** *Proteomics* 2013, **13**(22):3298-3308.
11. Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, Albertini A, Alloni G, Azevedo V, Bertero M, Bessieres P, Bolotin A, Borchert S: **The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis.** *Nature* 1997, **390**(6657):249-256.
12. Moszer I, Rocha EP, Danchin A: **Codon usage and lateral gene transfer in Bacillus subtilis.** *Current opinion in microbiology* 1999, **2**(5):524-528.
13. Wong S-L: **Advances in the use of Bacillus subtilis for the expression and secretion of heterologous proteins.** *Current Opinion in Biotechnology* 1995, **6**(5):517-522.
14. Harwood CR: **Bacillus subtilis and its relatives: molecular biological and industrial workhorses.** *Trends in biotechnology* 1992, **10**:247-256.
15. Schallmeyer M, Singh A, Ward OP: **Developments in the use of Bacillus species for industrial production.** *Can J Microbiol* 2004, **50**(1):1-17.

16. Ming YM, Wei ZW, Lin CY, Sheng GY: **Development of a *Bacillus subtilis* expression system using the improved Pglv promoter.** *Microb Cell Fact* 2010, **9**:55.
17. Doi RH, Wong S-L, Kawamura F: **Potential use of *Bacillus subtilis* for secretion and production of foreign proteins.** *Trends in Biotechnology* 1986, **4**(9):232-235.
18. Kakeshita H, Ara K, Ozaki K, Nakamura K, Kageyama Y: **Improvement of heterologous protein secretion by *Bacillus subtilis*:** INTECH Open Access Publisher; 2012.
19. Janni re L, Bruand C, Ehrlich SD: **Structurally stable *Bacillus subtilis* cloning vectors.** *Gene* 1990, **87**(1):53-61.
20. Bron S, Luxen E: **Segregational instability of pUB110-derived recombinant plasmids in *Bacillus subtilis*.** *Plasmid* 1985, **14**(3):235-244.
21. Hidenori S, Henner DJ: **Construction of a single-copy integration vector and its use in analysis of regulation of the trp operon of *Bacillus subtilis*.** *Gene* 1986, **43**(1):85-94.
22. Vazquez-Cruz C, Ochoa-Sanchez J, Olmedo-Alvarez G: **Pulse-field gel-electrophoretic analysis of the amplification and copy-number stability of an integrational plasmid in *Bacillus subtilis*.** *Applied microbiology and biotechnology* 1996, **46**(1):55-60.
23. Pohl S, Harwood CR: **Heterologous Protein Secretion by *Bacillus* Species.** 2010, **73**:1-25.
24. Vavrova L, Muchova K, Barak I: **Comparison of different *Bacillus subtilis* expression systems.** *Res Microbiol* 2010, **161**(9):791-797.

25. Phan TT, Tran LT, Schumann W, Nguyen HD: **Development of Pgrac100-based expression vectors allowing high protein production levels in Bacillus subtilis and relatively low basal expression in Escherichia coli.** *Microb Cell Fact* 2015, **14**:72.
26. Ling Lin F, Zi Rong X, Wei Fen L, Jiang Bing S, Ping L, Chun Xia H: **Protein secretion pathways in Bacillus subtilis: implication for optimization of heterologous protein secretion.** *Biotechnol Adv* 2007, **25**(1):1-12.
27. Tjalsma H, Antelmann H, Jongbloed JD, Braun PG, Darmon E, Dorenbos R, Dubois JY, Westers H, Zanen G, Quax WJ *et al*: **Proteomics of protein secretion by Bacillus subtilis: separating the "secrets" of the secretome.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2004, **68**(2):207-233.
28. Yamane K, Bunai K, Kakeshita H: **Protein traffic for secretion and related machinery of Bacillus subtilis.** *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 2004, **68**(10):2007-2023.
29. Schumann W: **Production of Recombinant Proteins in Bacillus subtilis.** 2007, **62**:137-189.
30. Brockmeier U, Caspers M, Freudl R, Jockwer A, Noll T, Eggert T: **Systematic screening of all signal peptides from Bacillus subtilis: a powerful strategy in optimizing heterologous protein secretion in Gram-positive bacteria.** *Journal of molecular biology* 2006, **362**(3):393-402.
31. Lee PA, Tullman-Ercek D, Georgiou G: **The bacterial twin-arginine translocation pathway.** *Annu Rev Microbiol* 2006, **60**:373-395.



32. Goosens VJ, Monteferrante CG, van Dijl JM: **The Tat system of Gram-positive bacteria.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2014, **1843**(8):1698-1706.
33. Palmer T, Berks BC: **The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway.** *Nat Rev Microbiol* 2012, **10**(7):483-496.
34. Harwood CR, Cranenburgh R: **Bacillus protein secretion: an unfolding story.** *Trends Microbiol* 2008, **16**(2):73-79.
35. van Dijl JM, Braun PG, Robinson C, Quax WJ, Antelmann H, Hecker M, Müller J, Tjalsma H, Bron S, Jongbloed JD: **Functional genomic analysis of the Bacillus subtilis Tat pathway for protein secretion.** *Journal of biotechnology* 2002, **98**(2):243-254.
36. Li W, Zhou X, Lu P: **Bottlenecks in the expression and secretion of heterologous proteins in Bacillus subtilis.** *Research in microbiology* 2004, **155**(8):605-610.
37. van Wely KH, Swaving J, Freudl R, Driessen AJ: **Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria.** *FEMS microbiology reviews* 2001, **25**(4):437-454.
38. Gutiérrez AKG: **Diseño de un sistema de expresión de proteínas heterólogas en Bacillus subtilis.** Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica; 2015.
39. Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S: **OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences.** *Nucleic acids research* 2007, **35**(suppl 2):W126-W131.

40. Sharp PM, Cowe E, Higgins DG, Shields DC, Wolfe KH, Wright F: **Codon usage patterns in Escherichia coli, Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Drosophila melanogaster and Homo sapiens; a review of the considerable within-species diversity.** *Nucleic acids research* 1988, **16**(17):8207-8211.
41. Chen PT, Shaw J-F, Chao Y-P, David Ho T-H, Yu S-M: **Construction of chromosomally located T7 expression system for production of heterologous secreted proteins in Bacillus subtilis.** *Journal of agricultural and food chemistry* 2010, **58**(9):5392-5399.
42. Grabherr R, Nilsson E, Striedner G, Bayer K: **Stabilizing plasmid copy number to improve recombinant protein production.** *Biotechnology and bioengineering* 2002, **77**(2):142-147.
43. Oliver BG, Silver PM, Marie C, Hoot SJ, Leyde SE, White TC: **Tetracycline alters drug susceptibility in Candida albicans and other pathogenic fungi.** *Microbiology* 2008, **154**(3):960-970.
44. Snyder AJ, Mukherjee S, Glass JK, Kearns DB, Mukhopadhyay S: **The canonical twin-arginine translocase components are not required for secretion of folded green fluorescent protein from the ancestral strain of Bacillus subtilis.** *Applied and environmental microbiology* 2014, **80**(10):3219-3232.
45. Medina-Rivero E, Balderas-Hernández V, Ordoñez-Acevedo L, Paz-Maldonado L, Barba-De la Rosa A, De León-Rodríguez A: **Modified penicillin acylase signal peptide allows the periplasmic production of soluble**

- human interferon- $\gamma$  but not of soluble human interleukin-2 by the Tat pathway in Escherichia coli.** *Biotechnology letters* 2007, **29**(9):1369-1374.
46. Sørensen HP, Mortensen KK: **Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli.** *Journal of biotechnology* 2005, **115**(2):113-128.
47. Contreras JAR, Pedraza-Reyes M, Ordoñez LG, Estrada NU, de la Rosa APB, De León-Rodríguez A: **Replicative and integrative plasmids for production of human interferon gamma in Bacillus subtilis.** *Plasmid* 2010, **64**(3):170-176.
48. Hamoen LW, Venema G, Kuipers OP: **Controlling competence in Bacillus subtilis: shared use of regulators.** *Microbiology* 2003, **149**(1):9-17.

## 7 Tablas

**Tabla 1.** Proteínas del virus de la influenza A (H7N9)

<b>Proteína</b>	<b>Nombre de la cepa</b>	<b>Longitud (pb)</b>	<b>Clave de acceso</b>
Hemaglutinina	A/Anhui/1/2013	1683	EPI439507
Neuraminidasa	A/Anhui/1/2013	1398	EPI439509
Matriz 1	A/Anhui/1/2013	759	EPI439506

Base de datos- GISAID (EpiFlu™)

**Tabla 2.** Características genotípicas de las cepas y plásmidos utilizados en este estudio

<b>Cepas y Plásmidos</b>	<b>Genotipo/propiedades</b>	<b>Fuente/Referencia</b>
<b>Cepas</b>		
<b><i>E. coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	F- $\Phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>endA1 recA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK-, mK-) <i>supE44 relA1 deoR</i> $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169	Invitrogen Life Technologies (USA)
<b><i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS</b>	F-, <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (rB-, mB-), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , $\lambda$ (DE3), pLysS, Cmr. Inducible por IPTG	Promega Corporation (USA)
<b><i>B. subtilis</i> 168 IPI</b>	<i>ind<sup>r</sup> tyr<sup>r</sup> trpC2</i> Tiene integrado el gen de la polimerasa T7 en el cromosoma bajo promotor p43, <i>Kan<sup>r</sup></i>	[38]
<b><i>B. subtilis</i> WB600 LBMB</b>	<i>trpC2 nprE aprE epr bpr mpr nprB</i> ; Em <sup>r</sup> Tiene integrado el gen de la polimerasa T7 en cromosoma bajo promotor p43, <i>Kan<sup>r</sup></i>	[38]
<b>Plásmidos</b>		
<b>pKa</b>	Plásmido que contiene el cassette de expresión, bajo el control del promotor T7. Amp <sup>r</sup>	[38]
<b>pAKG</b>	Plásmido que contiene el cassette de expresión con el péptido señal SEC (SP-Sec). Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	[38]
<b>pMK<sub>Tat</sub></b>	Plásmido proveniente de pKa, que contiene el cassette de expresión vacío con el SP-TAT. Amp <sup>r</sup>	Este estudio
<b>pMK</b>	Plásmido proveniente de pMK <sub>Tat</sub> , que contiene el cassette de expresión vacío con el SP-TAT. Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Este estudio
<b>pMK-GFP</b>	Plásmido proveniente de pMK, que contiene el cassette de expresión para el gen de la GFP con el SP-TAT y. Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Este estudio
<b>pMK-NM</b>	Plásmido proveniente de pMK, que contiene el cassette de expresión de los genes NA y M1 con el SP-TAT y. Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Este estudio
<b>pMK-NMH</b>	Plásmido proveniente de pMK, que contiene el	Este estudio

	cassette de expresión de los genes NA, M1 y HA con el SP-TAT y. Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	
<b>pMK-NA</b>	Plásmido proveniente de pMK, que contiene el cassette de expresión para el gen NA con el SP-TAT y. Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Este estudio
<b>pMK-M1</b>	Plásmido proveniente de pMK, que contiene el cassette de expresión para el gen M1 con el SP-TAT y. Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Este estudio
<b>pMK-HA</b>	Plásmido proveniente de pMK, que contiene el cassette de expresión para el gen HA con el SP-TAT y. Amp <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>	Este estudio
<b>pNAM2015</b>	Plásmido que contiene el cassette con los genes sintéticos NA y M1. Amp <sup>r</sup>	Este estudio
<b>pHA2015</b>	Plásmido que contiene el cassette con el gen sintético HA. Amp <sup>r</sup>	Este estudio

**Tabla 3.** Especificaciones de los oligonucleótidos

<b>Oligonucleótidos</b>	<b>Secuencia 5'→3'</b>	<b>Longitud (pb)</b>	<b>Tm (°C)</b>
NaFwd	GTCGACAATGAACCCAAACCA	21	55.5
NaRev	AGATCTCTGCAGTTAGTGGTGGTG	24	
HaFwd	CTAGTCGACAATGAACACCCAGATT	25	58.1
HMRev	TGAAAGAGATCTTTAGTGGTGGTG	24	
M1Fwd	CTAGTCGACAATGAGTCTTCTTACC	25	52.7
GFPfor	GTCGACATGTCTAAAGGTGAAAGAA	24	53.7
GFPrev	GAGATCTTTATTTGTACAATTCATCCATACC	31	
TETfor	GTCTAGAGTTTGACAGCTTATCATC	25	49.7
TETrev	GCTCGAGATATGTTCTGCCA	20	

**Tabla 4.** Contenido de codones y su frecuencia de uso en *B. subtilis* en los genes NA, M1 y HA

Aminoácido	Genes nativos NA, M1 y HA		Genes sintéticos NA, M1 y HA	
	Codón	Frecuencia por cada 1000 codones	Codón	Frecuencia por cada 1000 codones
<b>Arg</b>	AGA	1.4*	CGT	15.6
<b>Arg</b>	AGG	0.0	AGC	19.5
<b>Arg</b>	CGC	11.7	AGC	19.5
<b>Arg</b>	CGG	0.0	CGT	15.6
<b>Leu</b>	CTA	3.9	CTT	11.9

Base de datos de uso de codones: <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

\*Frecuencia de uso de codón en *E. coli*



## 8 Pies de figuras

**Figura 1. Modelo para la secreción de proteínas a través de la vía de traslocación Tat en *B. subtilis*.** Los precursores con un péptido señal de doble arginina (RR-) tienen el potencial de plegarse en el citoplasma antes de su translocación por la maquinaria de Tat en la membrana. Los componentes conocidos de la vía Tat en *B. subtilis* son las proteínas TatAc/Ad/Ay y TatCd/Cy, que son especificados por dos familias de genes parálogos, respectivamente. TatCd y TatCy son determinantes para la especificidad de la vía. En la actualidad se desconoce si las proteínas Tat de *B. subtilis* forman complejos en la membrana. En caso afirmativo, es posible que existan dos complejos distintos (TatAd-TatCd y TatAty-TatCy), o bien las proteínas Tat conocidas son parte de un complejo. La función de la proteína TatAc es actualmente desconocida y, por lo tanto, no se incluye en este modelo. Además, no se sabe si la vía de Tat está implicada en la biogénesis de proteínas integrales de membrana y lipoproteínas. Tras la translocación, el procesamiento por la peptidasa señal, y el paso a través de la pared celular, las proteínas maduras plegadas se secretan en el medio de crecimiento. SP, péptido señal; SEC, vía Sec; TAT, vía Tat. Tomada de [1].

**Figura 2. Comprobación del vector pMK-GFP. A)** Representación esquemática de la construcción pMK-GFP. Elementos del vector: promotor T7, péptido señal TAT (SP-TAT), gen de GFP, terminador de la T7, gen de resistencia a tetraciclina (Tet<sup>r</sup>, marcador de selección), gen de resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>, marcador de selección), etiqueta 6xHis (HIS TAG), repU (origen de replicación para *B. subtilis*) y Col E1 (origen de replicación para *E. coli*). **B y C.** Comprobación de la

construcción por digestión enzimática y amplificación por PCR. **(B)** Amplificación del gen de la proteína GFP por PCR de varias clonas de *B. subtilis* 168 (T1) y WB600 (T2 y T3). **(C)** Análisis de restricción con las enzimas *SalI* y *BglII* de 2 clonas que liberan el inserto del gen de la proteína GFP (729 bp) (T1 y T2).

**Figura 3. Evaluación de la fluorescencia con GFP en las cepas *B. subtilis* WB600 LBMB/pMK-GFP y B168-IPI/pMK-GFP y *E. coli* BL21(DE3) pLysS/pMK-GFP. A y B:** corresponden a cultivos celulares de *B. subtilis* WB600 (*nprE aprE epr bpr mpr nprB*) LBMB/pMK-GFP y WB600 LBMB/pMK, **C y D:** corresponden cultivos celulares de *B. subtilis* B168 IPI/pMK-GFP y B168-IPI/pMK, y **E y F:** corresponden cultivos celulares de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pMK-GFP y BL21(DE3) pLysS/pMK. En la columna I se puede observar el campo claro, en la columna II la fluorescencia de la cepa en el campo de la GFP y en la columna III se observa el campo de la GFP sobrelapado con el campo claro, esto para confirmar que la fluorescencia corresponde a las células bacterianas.

**Figura 4. Comprobación de la construcción de Neuraminidasa y proteína de Matriz: pMK-NM. A)** Representación esquemática de la construcción pMK-NM. Elementos del vector: promotor T7, péptido señal TAT (SP-TAT), genes NA y M1, terminador de la T7, gen de resistencia a tetraciclina (Tet<sup>r</sup>, marcador de selección), gen de resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>, marcador de selección), etiqueta 6xHis (HIS TAG), repU (origen de replicación para *B. subtilis*) y Col E1 (origen de replicación para *E. coli*). B y C. Comprobación de la construcción por digestión enzimática y amplificación por PCR. **B)** Análisis de restricción con las enzimas *SalI* y *NcoI* de 2 clonas que liberan el inserto policistrónico NA-M1 (T1 y T2). **C)** Amplificación del

inserto policistrónico NA-M1 por PCR de varias clonas de *B. subtilis* 168 (T1) y WB600 (T2 y T3). Carril M (1Kb plus ladder- pb).

**Figura 5. Comprobación de la construcción de Neuraminidasa, proteína de Matriz y Hemaglutinina: pMK-NMH.** **A)** Representación esquemática de la construcción pMK-NMH Elementos del vector: promotor T7 constitutivo, péptido señal TAT (SP-TAT), genes de las proteínas NA, M1 y HA, terminador de la T7, gen de resistencia a tetraciclina (Tet<sup>r</sup>, marcador de selección), gen de resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>, marcador de selección), etiqueta 6xHis (HIS TAG), repU (origen de replicación para *B. subtilis*) y Col E1 (origen de replicación para *E. coli*). **B)** Comprobación de la construcción por amplificación por PCR. Amplificación del inserto NMH por PCR de 1 clona, Carril M (1Kb plus ladder- pb) y (-) control negativo.

**Figura 6. Comprobación de la construcción con el gen de la proteína de Matriz: pMK-M1.** Comprobación de la construcción por digestión enzimática y amplificación por PCR. **A)** Representación esquemática de la construcción pMK-M1; Elementos del vector: promotor T7 constitutivo, péptido señal TAT (SP-TAT), gen de la proteína de matriz (M1), terminador de la T7, gen de resistencia a tetraciclina (Tet<sup>r</sup>, marcador de selección), gen de resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>, marcador de selección), etiqueta 6xHis (HIS TAG), repU (origen de replicación para *B. subtilis*) y Col E1 (origen de replicación para *E. coli*). **B)** Análisis de restricción con las enzimas *SalI* y *BglII* de una clona que libera el inserto M1 (T1). **C)** Amplificación del inserto M1 por PCR de varias clonas de *B. subtilis* 168 (T1, T3 y T4) y WB600 (T2, T5 y T6). Carril M (1Kb plus ladder- pb).

**Figura 7. Comprobación de la construcción con el gen de la proteína Hemaglutinina: pMK-Ha.** Comprobación de la construcción por digestión enzimática y amplificación por PCR. **A)** Elementos del vector: promotor T7 constitutivo, péptido señal TAT (SP-TAT), gen de la hemaglutinina, terminador de la T7, gen de resistencia a tetraciclina (Tet<sup>r</sup>, marcador de selección), gen de resistencia a ampicilina (Amp<sup>r</sup>, marcador de selección), etiqueta 6xHis (HIS TAG), repU (origen de replicación para *B. subtilis*) y Col E1 (origen de replicación para *E. coli*). **B** y **C.** Comprobación de la construcción por digestión enzimática y amplificación por PCR. **(B)** Análisis de restricción con las enzimas *Sa*II y *Nco*I de 1 clona que libera el inserto HA (T1). **(C)** Amplificación del inserto HA por PCR de varias clonas de *B. subtilis* 168 (T1, T2 y T3) y WB600 (T4, T5 y 6), solo la T5 mostro el inserto. Carril M (1Kb plus ladder- pb) y carril (+) muestra control positivo que contiene el inserto

**Figura 8. Cinéticas de crecimiento de las diferentes cepas con los vectores de expresión.** Cinéticas de crecimiento de *B. subtilis* WB600-IPI, B168-LBMB y de *E. coli* BL21(DE3) pLysS con los vectores de expresión di y trivalentes de las proteínas del virus de influenza A (H7N9), el vector de expresión de la proteína GFP y el vector vacío .

**Figura 9. Inmunodetección de la proteína GFP de extractos celulares en *B. subtilis* y *E. coli*.** **A)** Detección de la proteína GFP en la fracción intracelular; **B)** Detección de la proteína GFP en la fracción extracelular: **T1** (LBMB-pMK-GFP), **T2** (IPI-pMK-GFP), **T3** y **T4** (BL21-pLysS pMK-GFP), **T5** (LBMB-pMK-GFP), **T6** (IPI-pMK-GFP). **+** control positivo de una cepa que expresa GFP, **-** Control negativo de una cepa con el vector vacío.

**Figura 10. Inmunodetección de la proteínas NA y M1 del extractos celulares en *B. subtilis* y *E. coli*.** Detección de la proteínas NA y M1; fracción intracelular **T1** (LBMB-pMK-NM), **T2** (IPI-pMK-NM), **T3** (BL21-pLysS pMK-NM); fracción extracelular: **T4** (LBMB-pMK-NM), **T5** (IPI-pMK-NM) y **T6** (BL21-pLysS pMK-NM).  
+ control positivo, - Control negativo de una cepa con el vector vacío.

# 9 Figuras

Figura 1

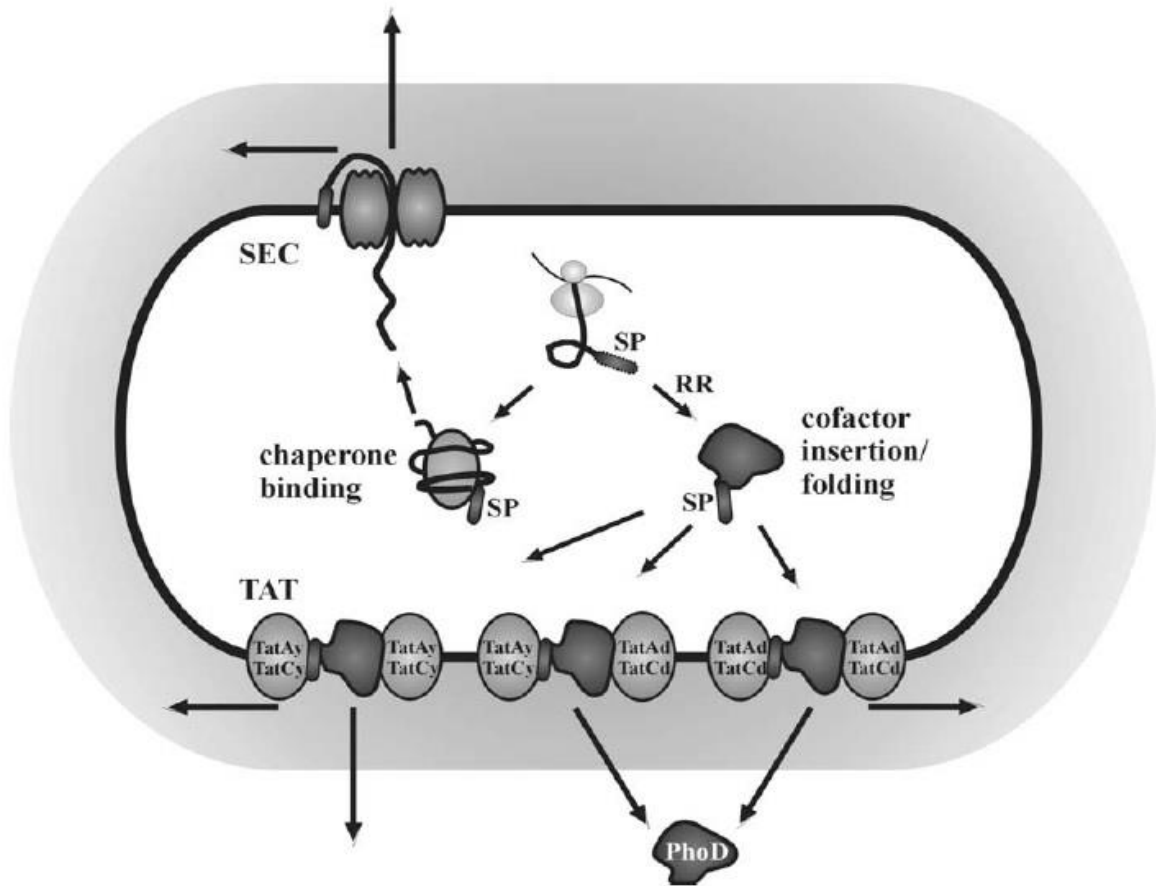
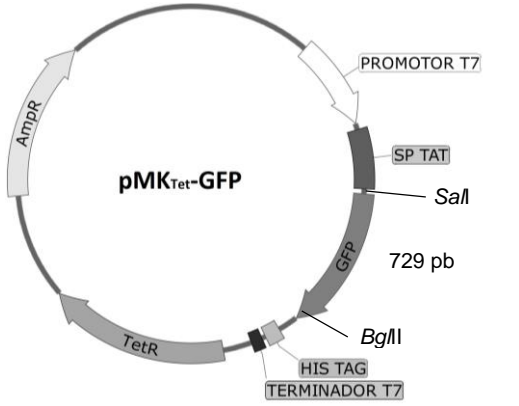
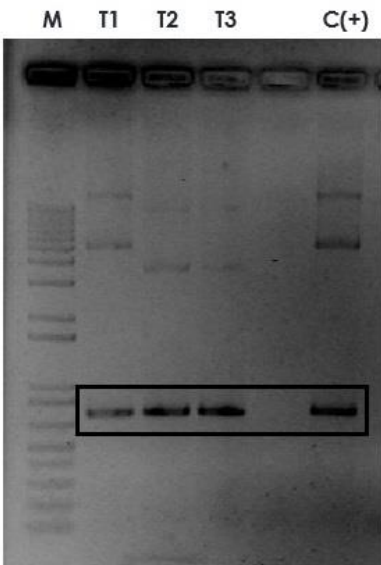


Figura 2

**A**

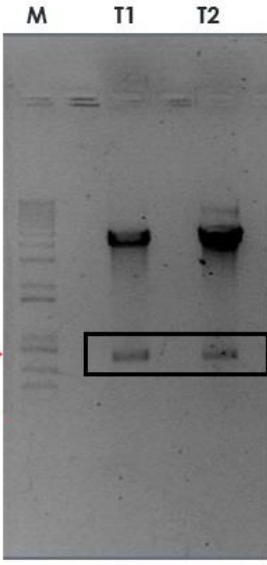


**B**



Corroboración por PCR

**C**



Corroboración por ER (Sal I & Bgl II)

**Figura 3**

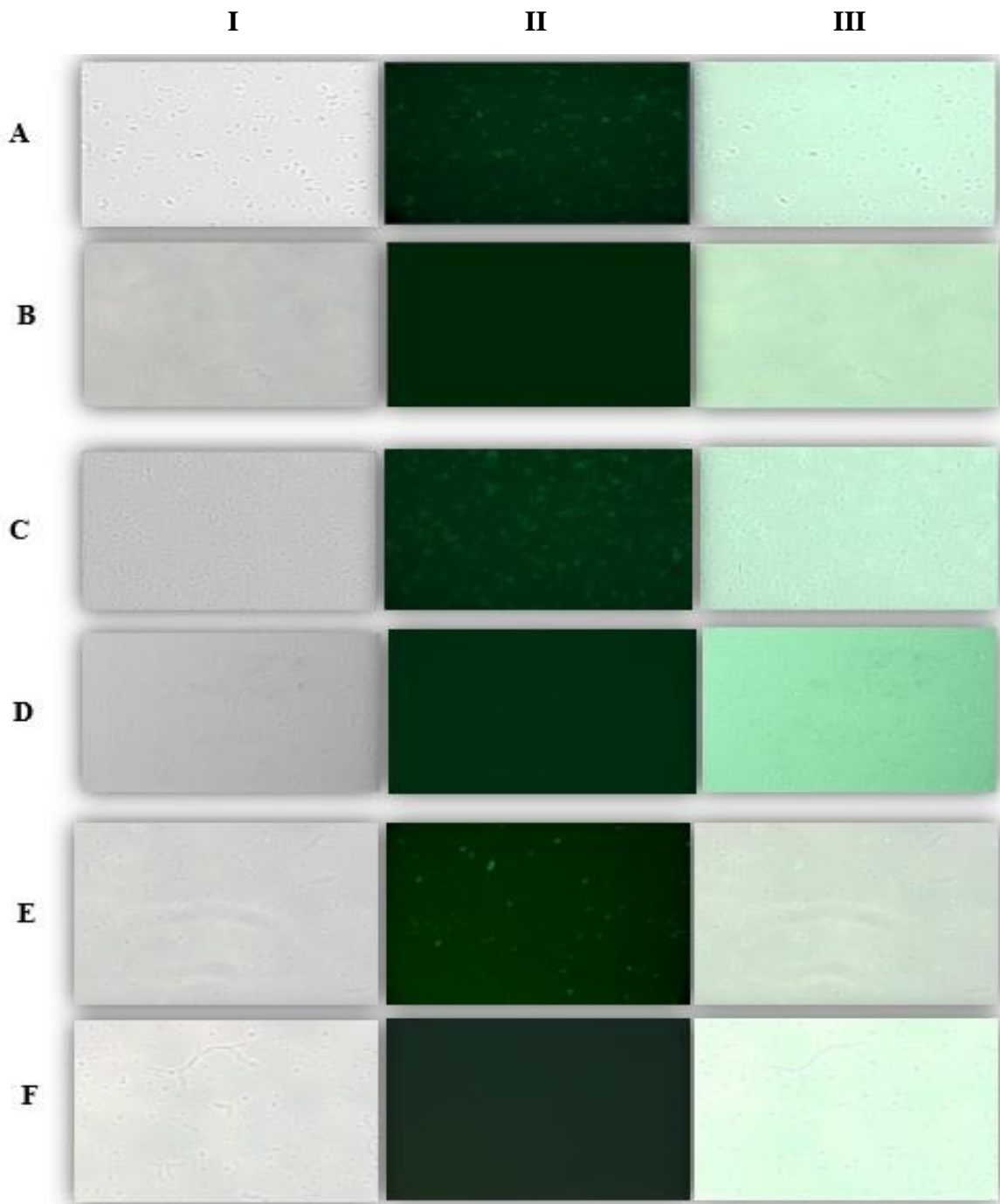




Figura 4

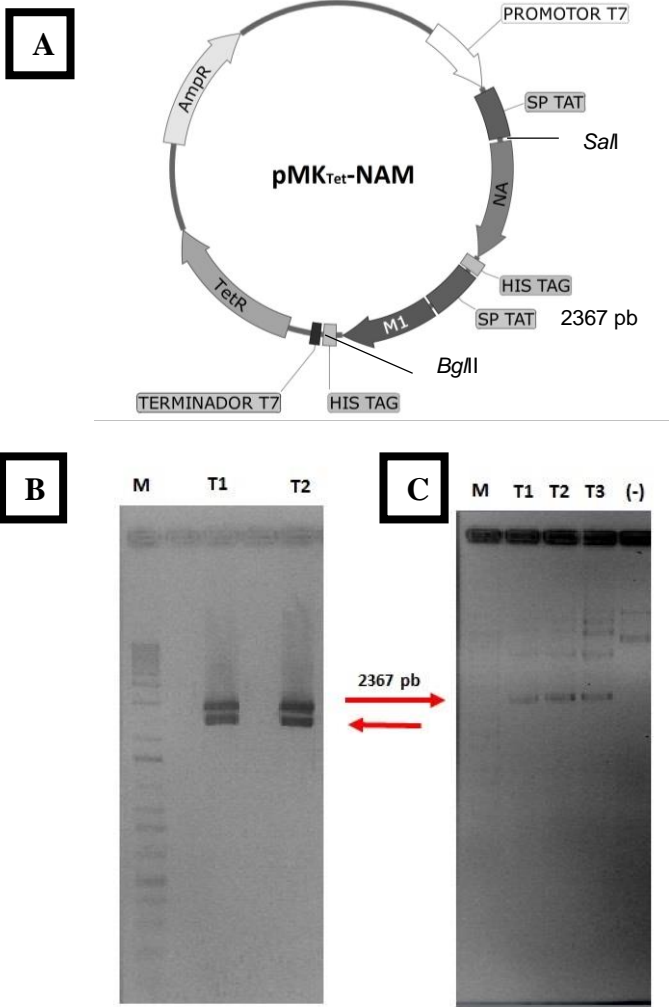


Figura 5

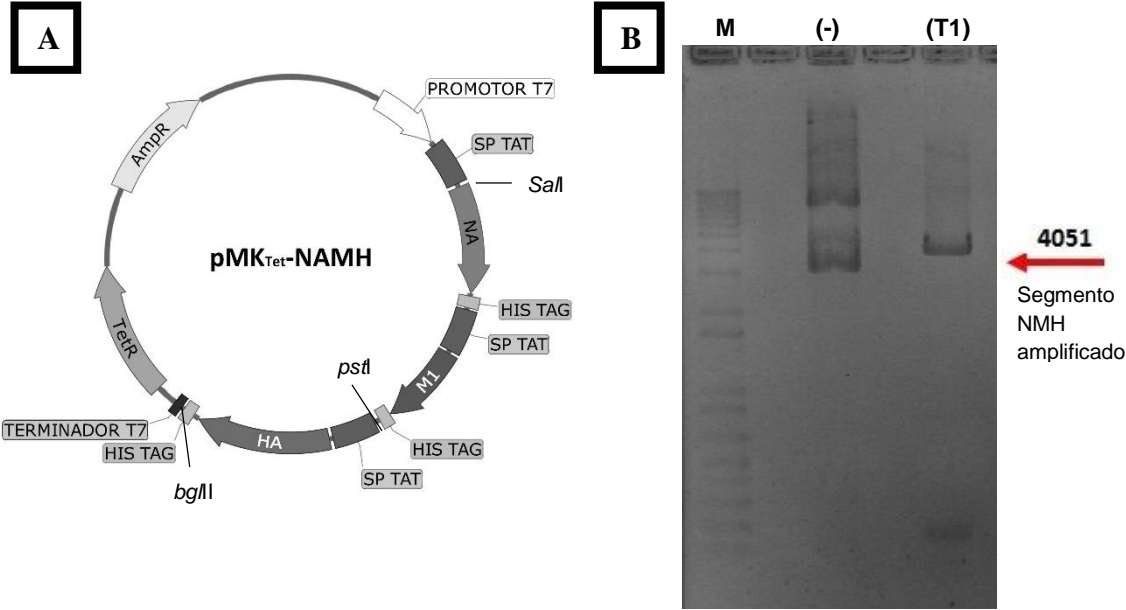


Figura 6

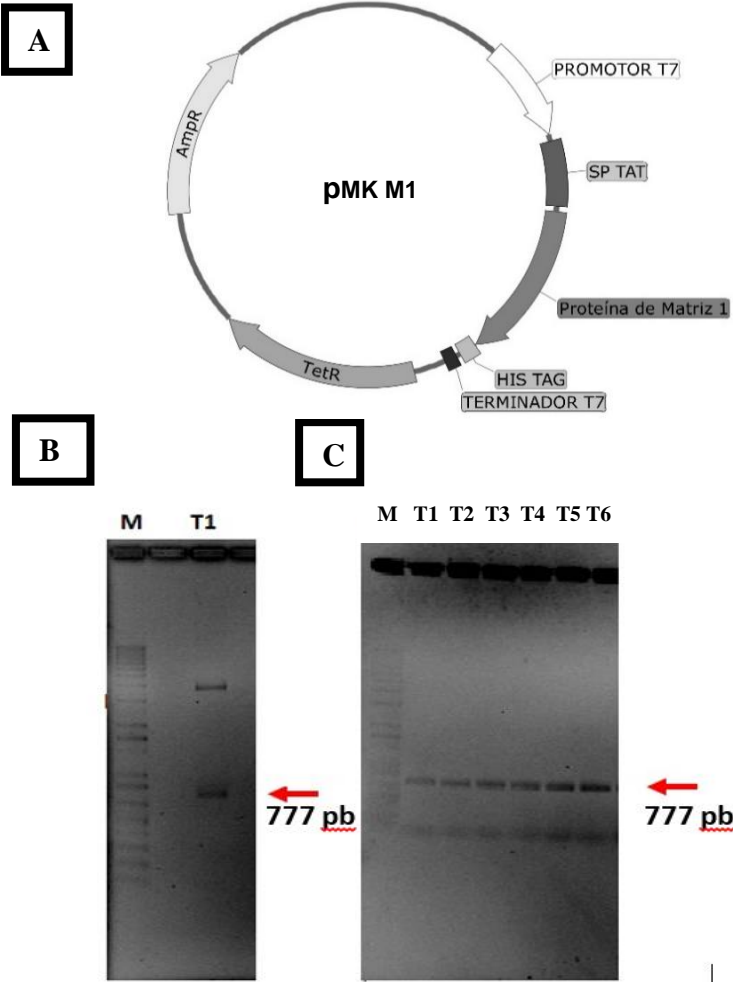


Figura 7

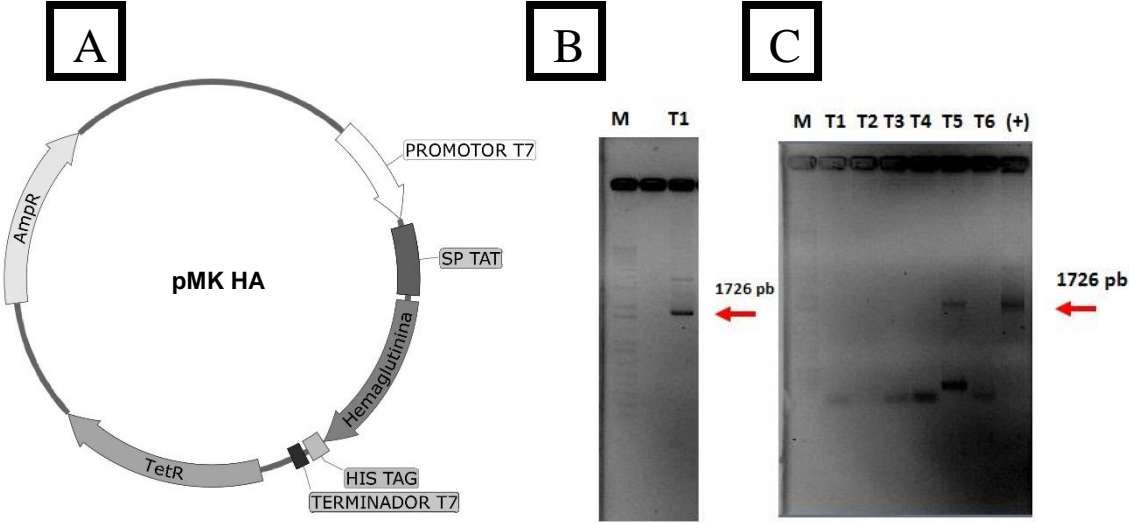
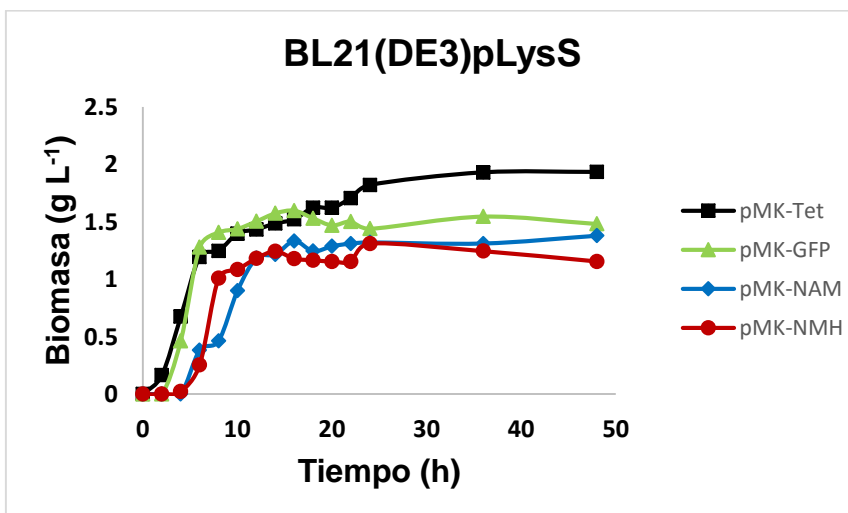
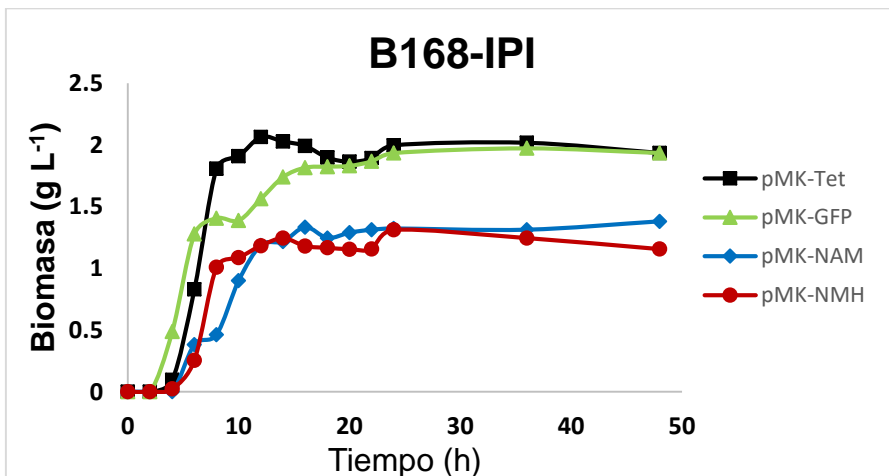
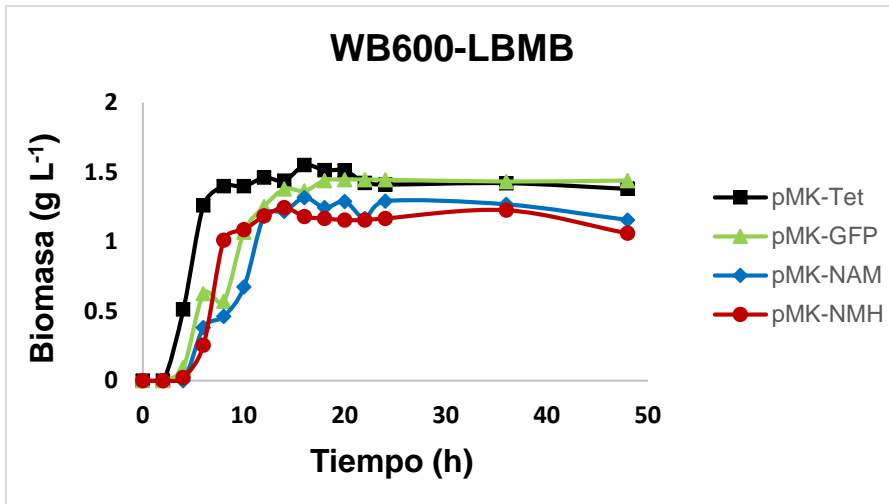
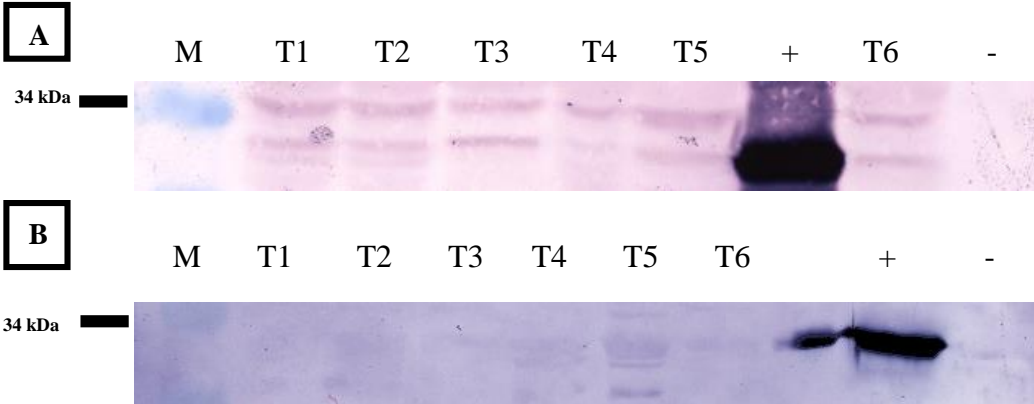


Figura 8



**Figura 9**



**Figura 10**

M T1 T2 T3 T4 T5 T6 - +



## 10 Anexos

### 10.1 Protocolos

#### 10.1.1 Extracción de DNA plasmídico en Gram negativas y Gram positivas

1. Inocular 5 mL de medio de cultivo rico (LB) e incubar toda la noche a 37°C, 200 rpm.
2. Alicuotar el cultivo en tubos Eppendorf de 1.5 mL.
3. Centrifugar a máxima velocidad por 8 min a 4°C.
4. Descartar sobrenadante y dejar el pellet tan seco como sea posible.
5. Añadir en esterilidad y en hielo 100µL de la solución de lisis alcalina I, mezclar en vortex y dejar reposar en hielo.
6. Añadir en hielo 200µL de la solución de lisis alcalina II recién preparada y mezclar (no usar vortex), almacenar el tubo en hielo.
7. Adicionar 150µL de la solución de lisis alcalina III, mezclar y dejar reposar de 3-5 min en hielo.
8. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 min a 4°C, transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio.
9. Añadir un volumen igual al que se tiene en el tubo (aproximadamente 450µL) de fenol:cloroformo, mezclar en vortex y centrifugar a máxima velocidad por 2 min a 4°C.
10. Transferir la fase acuosa a un tubo limpio.
11. Precipitar el ADN plasmídico con 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C. Mezclar y dejar reposar 30 min.
12. Centrifugar a máxima velocidad por 10 min a 4°C.



13. Remover el sobrenadante por aspiración y colocar el tubo en posición invertida sobre un papel para remover el etanol.
14. Dar 2 lavados con etanol 70% frío.
15. Invertir el tubo y dejar secar por evaporación a temperatura ambiente.
16. Resuspender el ADN plasmídico en 30µL de buffer TE o agua MQ estéril.
17. Añadir 2µL de RNAsa 20µg/mL, incubar a 37°C durante 1 h.
18. Analizar la integridad del ADN plasmídico en geles de agarosa 1%.

**NOTA:**

- Para extraer ADN plasmídico de Gram positivas, tratar previamente con una solución de lisozima a una concentración de 30 mg/mL.
- Resuspender en 500 µL de 50mM de EDTA y agregar 100 µL de solución de lisozima. Incubar 60 min a 37°C.
- Centrifugar a 13000 rpm por 10 min. Desechar sobrenadante.
- Resuspender en 500 µL de 50mM de EDTA y agregar proteinasa K a una concentración de 0.8mg/mL.
- Incubar 60 min a 37°C. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y continuar con protocolo de extracción de ADN plasmídico.

**10.1.2 Células rubidio competentes**

1. Crecer un pre-inóculo de la cepa en 5 mL durante toda la noche a 37°C.
2. Tomar una muestra del pre-inóculo (1 mL) e inocular en medio de cultivo fresco (100 mL)
3. Incubar a 37°C hasta alcanzar una OD550nm de 0.5.
4. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min a 4°C.

5. Decantar sobrenadante.
6. Resuspender suavemente el pellet celular en 5 ml de la solución 1\* (sin agitar en vortex) e incubar en hielo por 15 min.
7. Centrifugar a 3000 rpm por 10 min a 4°C y decantar el sobrenadante.
8. Resuspender suavemente el pellet celular en 2 mL de la solución 2\* (sin agitar en vortex).
9. Alicuotar en tubos eppendorf previamente congelados volúmenes de 200µL.
10. Almacenar a -80°C.

*\*Ver más adelante la preparación de las soluciones 1 y 2.*

### **10.1.3 Transformación de células rubidio competentes**

1. Descongelar en hielo un tubo eppendorf de las células rubidio competentes.
2. Añadir 1ng de ADN plasmídico o el total del ADN proveniente de una reacción de ligación, mezclar gentilmente.
3. Incubar en hielo durante 30 min, agitando cada 10 min.
4. Incubar el tubo a 42°C por 70s e inmediatamente volver a reposar en hielo por 2 min.
5. Añadir 1 mL de medio LB precalentado (37°C/ 1h)
6. Incubar las células a 37°C durante 1 h: 20 min estable (sin agitación) y 40 min en agitación vigorosa.
7. Preparar un rango de varias diluciones del mix de transformación y sembrar en placas de LB con su respectivo antibiótico.

**Nota:** Para mejorar la obtención de células competentes

- Después del **paso 5** centrifugar a 13000 rpm por 30 s y decantar el sobrenadante

- Resuspender el pellet en 100  $\mu$ L de medio LB precalentado y de ahí tomar de 15, 30 o 50  $\mu$ L para sembrar.

#### **10.1.4 Transformación en *Bacillus subtilis***

1. Inocular de 2 a 3 colinas frescas en un tubo con 20 mL de medio A. Incubar toda la noche a temperatura ambiente sin agitación.
2. Transferir el cultivo a un matraz de 250 mL, incubar a 37°C y 250 rpm.
3. Tomar alícuotas de 1 mL para seguir la cinética de crecimiento a una OD600, se registran los valores hasta alcanzar el final de la fase logarítmica.
4. Se continúa la incubación durante 90 min después de haber cesado la fase log de crecimiento (t90). En este punto se diluyen 50  $\mu$ L de cultivo en 450  $\mu$ L de medio B en un tubo de vidrio estéril.
5. Los tubos se incuban con agitación vigorosa (250 rpm) durante 90 min más. En este punto las células son altamente competentes para su transformación.
6. Para transformar agregar a los 500  $\mu$ L de células competentes 1  $\mu$ g de ADN transformante.
7. Incubar los tubos durante 30 min a 37°C.
8. La mezcla de transformación se siembra en alícuotas de 200  $\mu$ L sobre placas con medio LB sólido con antibiótico.

*\*Las soluciones de este protocolo se encuentran en la siguiente sección.*

#### **10.1.5 Western Blot**

1. Después de correr los geles de poliacrilamida con las muestras de interés
2. Incubar en buffer de transferencia a la membrana de transferencia y el gel de poliacrilamida, cada uno por separado. Por 10 min, agitación suave y a temperatura ambiente.

3. Una vez terminado el tiempo de incubación, iniciar la transferencia.

La transferencia se llevó a cabo en el equipo Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell. Para el sándwich de transferencia se utilizaron 3 papeles filtro (8.5 x 6.5 cm), 1 membrana de nitrocelulosa (8.0 x 6.5 cm), el gel de poliacrilamida y papeles filtro (8.5 x 6.5 cm), todo fue acomodado en este orden.

Nota: Humedecer los papeles filtro con buffer de transferencia cada que se coloquen y al final del sándwich pasar con un tubo de ensayo usándolo como rodillo para eliminar las burbujas generadas en el proceso.

4. Cerrar la cámara de transferencia y correr a 15 V por 90 min.
5. Finalizada la transferencia, la membrana debe incubarse en solución de bloqueo por 2 h a 20° C en agitación suave.

Nota: Colocar hacia arriba la parte de la membrana que estuvo en contacto con el gel.

6. Desechar la solución de bloqueo y hacer tres lavados con TBS, 5 min por lavado. Posteriormente hacer 3 lavados con TBST de 5 min c/u.
7. Desechar la solución de lavado y aplicar el primer anticuerpo en buffer TBST e incubar a por 11 h a 4° C con agitación suave. Después incubar a temperatura ambiente por 1 h.
8. Retirar la solución de anticuerpo primario y repetir los lavados del paso 6.
9. Aplicar el anticuerpo secundario en TBST e incubar por 4 h a temperatura ambiente con agitación suave.
10. Retirar la solución de anticuerpo secundario y hacer 3 lavados con TBST de 5 min c/u y posteriormente 3 lavados con TBS de 5 min c/u.

11. Incubar en buffer de fosfatasa alcalina previamente acondicionado a temperatura ambiente por 5 min en agitación suave.

12. La membrana se reveló con NBT y BCIP (66 y 33  $\mu$ L respectivamente en 10 mL de buffer de fosfatasa alcalina). La reacción de revelado se para con lavados de agua Milli-Q.

## 10.2 Medios de cultivo

### 10.2.1 Medio LB

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

Disolver en 1 L de agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH, esterilizar a 121°C durante 15 min. Para LB sólido, adicionar 15 g de agar bacteriológico.

### 10.2.2 Medio LBON

Reactivos	Cantidad
Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g

Disolver en 1 L de agua destilada y ajustar el pH a 7.0 con NaOH, esterilizar a 121°C durante 15 min. Para LB sólido, adicionar 15 g de agar bacteriológico.

### 10.2.3 Medios para transformación de *Bacillus subtilis*

#### 10.2.3.1 Medio A base 10X

Reactivos	Cantidad
Bacto triptona	2 g
Extracto de levadura	10 g
Glucosa 50%	100 mL

Disolver el extracto de levadura y la bacto triptona en 900 mL de agua destilada, esterilizar 121°C durante 15 min. Posteriormente agregar la glucosa al 50% previamente esterilizada por filtración.

#### 10.2.3.2 *Bacillus sales* 10X

Reactivos	Cantidad
-----------	----------

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	183 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	60 g
Citrato de sodio	10 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2 g

Disolver las sales hasta un volumen de 1 L y esterilizar en autoclave.

### 10.2.3.3 Medio A

Reactivos	Cantidad
Medio A base 10X	10 mL
Sales <i>Bacillus</i> 10X	9 mL
Agua estéril	81 mL

### 10.2.3.4 Medio B

Reactivos	Cantidad
Medio A	4.98 mL
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (50mM)	0.05 mL
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (250 mM)	0.05 mL

## 10.3 Soluciones para purificación de DNA plasmídico por lisis alcalina

### 10.3.1 Solución I

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl (pH. 8)	25 mM
EDTA	10 mM
Glucosa	50 mM

### 10.3.2 Solución II

Reactivos	Cantidad
SDS	1%
NaOH	0.2 N

### 10.3.3 Solución III

Reactivos	Cantidad
Acetato de sodio	5 M

Ajustar a pH. 4.8 con ácido acético glacial

### 10.3.4 Solución I- Lisis alcalina Gram positivas

Reactivos	Cantidad
Tritón X-100	2.40%
Tris-HCl	25 mM
EDTA	10 mM

Ajustar a pH. 8.0

### 10.4 Soluciones para células rubidio competentes

#### 10.4.1 Solución RF I

Reactivos	Cantidad
100 mM de RbCl	20 g
45 mM de MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	183 g
10 mM de CaCl <sub>2</sub>	60 g
15 % de glicerol	10 g

Ajustar a 200 mL con agua destilada, esterilizar en autoclave y posteriormente agregar 6 mL de KAc1M pH. 7.5 estéril.

#### 10.4.2 Solución RF II

Reactivos	Cantidad
100 mM de RbCl	20 g
75 mM de CaCl <sub>2</sub>	183 g
15 % de glicerol	60 g

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

### 10.5 Electroforesis en gel de agarosa

#### 10.5.1 TAE 10X

Reactivos	Cantidad
Tris (base)	48.5 g
Ácido acético glacial	11.4 g
EDTA (0.5 mM, pH 8)	20 mL

Aforar a 1 L con agua Milli-Q

## 10.5.2 Gel de agarosa al 1%

Reactivos	Cantidad
Agarosa	48.5 g
TAE 10 X	11.4 g

Calentar la solución en horno de microondas hasta disolver.

## 10.6 SDS-PAGE

### 10.6.1 Gel separador de poliacrilamida 12%

Soluciones	Cantidad
H2O destilada	2.63 mL
Tris-HCl 1.5 M pH. 8.8	2 mL
SDS 10%	80 $\mu$ L
Acrilamida 30%	3.2 mL
PSA (10%)	80 $\mu$ L
TEMED	8 $\mu$ L

Después de la adición de PSA y TEMED agitar suavemente y verter de inmediato.

### 10.6.2 Gel concentrador de poliacrilamida 4%

Soluciones	Cantidad
H2O destilada	900 mL
Tris-HCl 0.5 M pH. 6.8	378 $\mu$ L
SDS 10%	15 $\mu$ L
Acrilamida 30%	198 mL
PSA (10%)	7.5 $\mu$ L
TEMED	1.5 $\mu$ L

Después de la adición de PSA y TEMED agitar suavemente y verter de inmediato.

### 10.6.3 Buffer de carga de proteínas

Soluciones	Cantidad
Tris-HCl 0.5 M pH. 6.8	9 mL
SDS 10%	8 mL
Glicerol	10 mL
2- $\beta$ -Mercaptoetanol	2 mL
Azul de bromofenol al 1%	1 mL



H<sub>2</sub>O destilada 14 mL  
Conservar a temperatura ambiente  
Se utilizar en una relación 1:1 (Muestra:Buffer)

#### 10.6.4 Buffer de corrida- TGS 10X

Reactivos	Cantidad
Glicina	144 g
Tris-base	30 g
SDS	10 g

Disolver en 1 L de agua destilada y conservar a temperatura ambiente

#### 10.6.5 Solución de teñido

Soluciones	Cantidad
Azul de coomassie	0.25 g
Metanol	125 mL
Ácido acético glacial	25 mL
H <sub>2</sub> O destilada	100 mL

Disolver en 250 mL de agua destilada. Conservar en un frasco ámbar y a temperatura ambiente

#### 10.6.6 Solución de desteñido

Soluciones	Cantidad
Metanol	100 mL
Ácido acético glacial	100 mL
H <sub>2</sub> O destilada	800 mL

Conservar a temperatura ambiente

### 10.7 Reactivos Western Blot

#### 10.7.1 Buffer de transferencia

Reactivos	Cantidad
Tris-base	25 mM
Glicina	190 mM
Metanol	20%

Ajustar el pH a 8.3

### 10.7.2 Buffer TBS 10X- Tris buffered saline

Reactivos	Cantidad
Tris-base pH.7.5	20 mM
NaCl	150 mM

Ajustar el pH a 7.6

### 10.7.3 Buffer TBST 10X- Tris buffered saline with Tween 20

Soluciones	Cantidad
Tris-base pH.7.5	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20®	0.10%

Ajustar el pH a 7.6

### 10.7.4 Buffer de fosfatos 1X (PBS)

Reactivos	Cantidad
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8 mM

Ajustar el pH a 7.4

### 10.7.5 Solución de bloqueo

Reactivos	Cantidad
Leche descremada Svelty®	3%

Disolver en TBS, prepararse al momento.

### 10.7.6 Buffer de la fosfatasa alcalina

Reactivos	Cantidad
Tris-HCl pH.9.5	0.1 M
NaCl	0.1 M
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	50 mM

### 10.8 Antibióticos

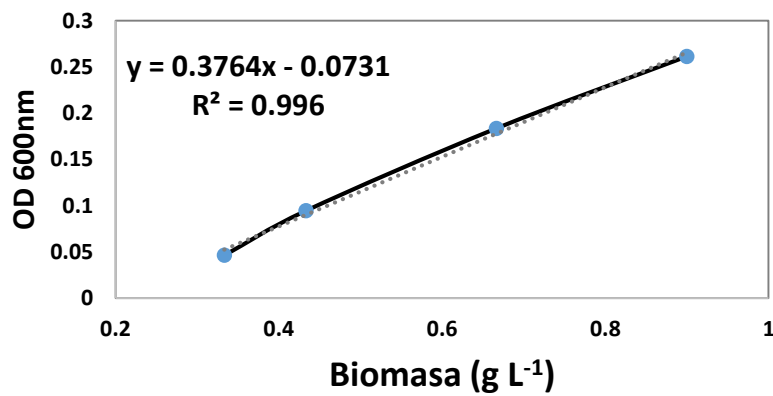
Antibióticos	Concentración stock	Concentración final
--------------	---------------------	---------------------

Ampicilina	200 mg mL <sup>-1</sup>	100 µg mL <sup>-1</sup>
Kanamicina	50 mg mL <sup>-1</sup>	25 µg mL <sup>-1</sup>
*Tetraciclina	10 mg mL <sup>-1</sup>	10 µg mL <sup>-1</sup>
Cloranfenicol	25 mg mL <sup>-1</sup>	10 µg mL <sup>-1</sup>

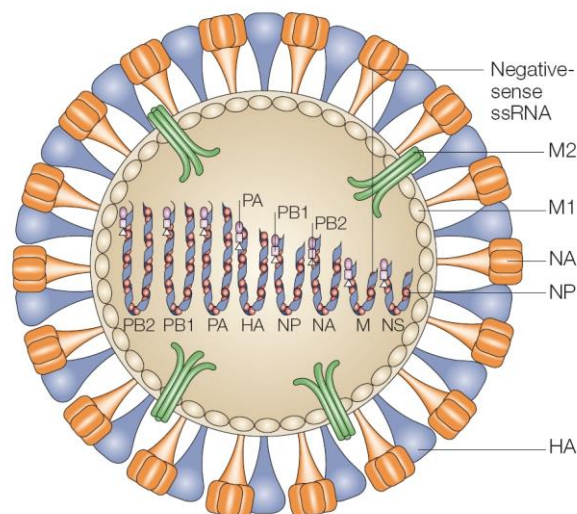
\*Disolver en metanol y mantener cubierto (fotosensible)

### 10.9 Determinación de biomasa

La concentración celular se determinó como OD<sub>600nm</sub> utilizando un espectrofotómetro Varian Cary Bio-50 y se convirtió a peso seco mediante una curva estándar de *B. subtilis*.

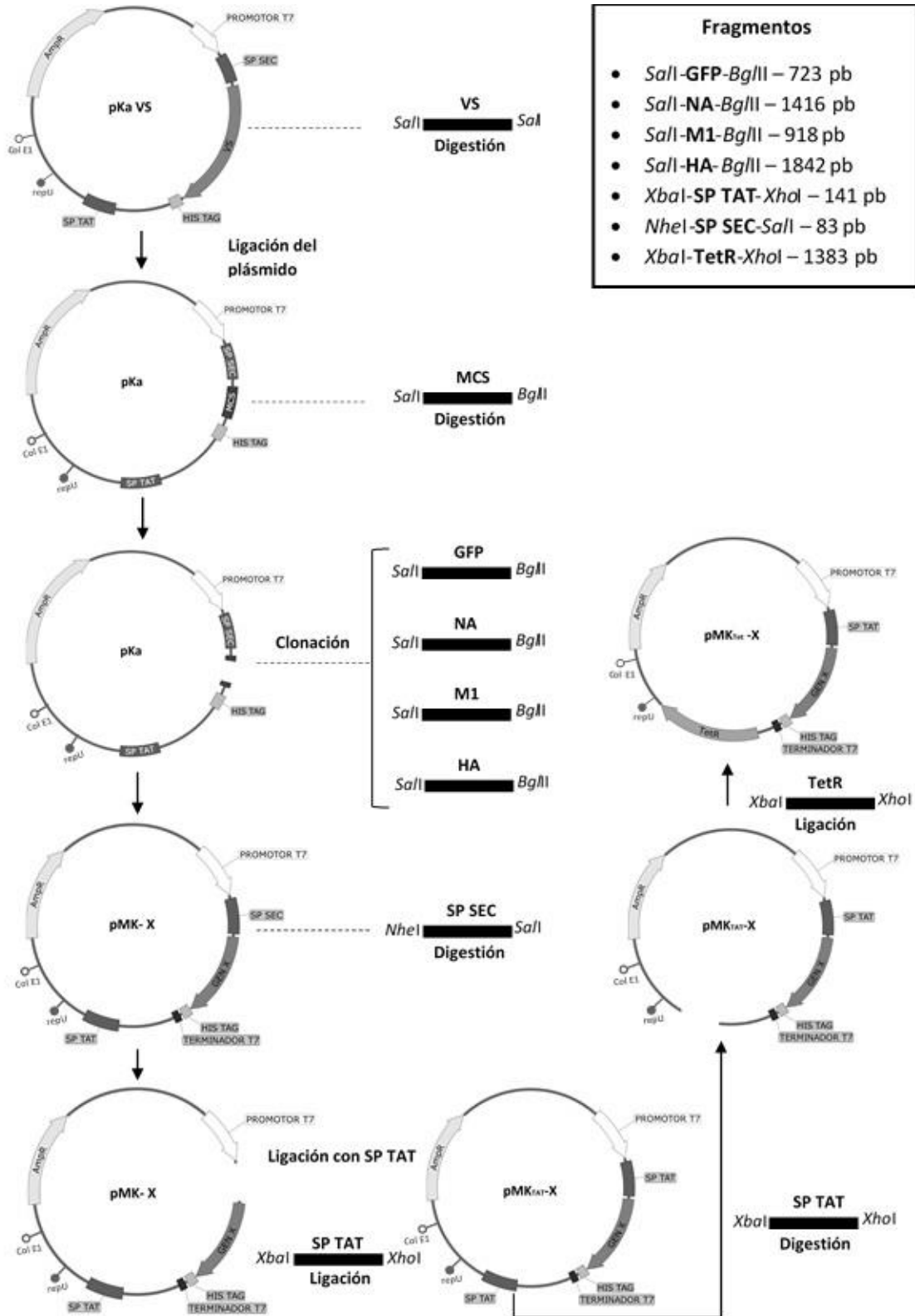


### 10.10 Virus de influenza



Representación gráfica del virión de la Influenza [4]

## 11.1 Diseño de los vectores replicativos



En la figura se describe la estrategia para la construcción del vector replicativo mediante

herramientas de ingeniería genética. La figura A) muestra al plásmido pKa a partir del cual se construyó el vector replicativo de interés, se comenzó con la escisión del péptido VS, seguido de la religación del vector pKa, en las figura B y C se aprecia la digestión del vector pKa con las enzimas Sall y BglII seguido de la clonación de los genes de interés (GFP,NA,M1 y HA), posteriormente en las figuras D, E y F se muestra el cambio del péptido señal SEC por el péptido señal TAT en su posición correcta dentro del vector replicativo, para finalizar la construcción en las figuras F, G y H se aprecia la escisión del péptido señal TAT (XbaI-XhoI) que se encuentran en una posición no correcta del vector para ser sustituido por el marcador de selección TetR. Elementos de los vectores: promotor T7 constitutivo, sitio de unión a ribosoma (RBS), péptido señal TAT (SP-TAT), péptido señal SEC (SP-SEC), sitio múltiple de clonación (MCS), genes de interés (GEN X), terminador de la T7, gen de resistencia a tetraciclina (TetR, marcador de selección), gen de resistencia a ampicilina (AmpR, marcador de selección), etiqueta 6xHis (HIS TAG), repU (origen de replicación para *B. subtilis*) y Col E1 (origen de replicación para *E. coli*).