

Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

**PRODUCCIÓN RECOMBINANTE DE TOXINA
BOTULÍNICA**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología y
Licenciado en Biotecnología

**Santiago Risi (187458)
Magdalena Curtti (180192)**

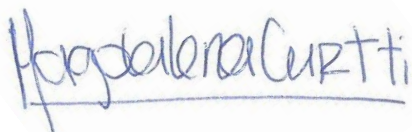
**Tutor: Carlos Sanguinetti
Co-tutor: Rodrigo Achigar**

2018

Declaración de autoría

Nosotros, Magdalena Curtti y Santiago Risi, declaramos que el trabajo que se presenta en esa obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el Trabajo Final de Carrera en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT;
- Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
- Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
- En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Magdalena Curtti, 1 de agosto de 2018



Santiago Risi, 1 de agosto de 2018

Agradecimientos

En primer lugar, nos gustaría agradecer a nuestro tutor Carlos Sanguinetti y nuestro Co tutor Rodrigo Achigar, por el apoyo, la dedicación y la confianza, así como también por todos los conocimientos brindados.

Por otro lado, quisiéramos agradecer a Sebastián Rodríguez que colaboró de manera importante en las actividades prácticas que se llevaron a cabo en el Laboratorio de la Universidad ORT, y al resto del equipo por estar siempre presentes.

A su vez, queremos agradecer a ANII y al Centro de Innovación en Ingeniería (CII) por el financiamiento necesario para este proyecto.

También nos gustaría agradecer a nuestras familias y amigos por el apoyo incondicional brindado a lo largo de todo este proyecto.

Por último, pero no menos importante, a todo aquellos que no nombramos pero que saben que ayudaron a que este proyecto se hiciera realidad.

Resumen

Las infecciones clostridiales, son enfermedades tóxico-infecciosas, producidas por bacterias del género *Clostridium*, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estas presentan riesgos económicos para los productores principalmente por las grandes pérdidas económicas que generan. Se caracterizan por ser súbitas, con alta tasa de prevalencia y mortalidad. La aparición de animales muertos en el campo es la manera clásica de presentación, por lo que el enfoque sanitario de estas enfermedades debe apuntar siempre a su prevención.

Una de las potentes enfermedades clostridiales que se conocen es el Botulismo. Hay siete serotipos de BoNTs identificados, que se denominan de la A a la G.

Los diferentes serotipos de BoNTs, afectan de forma diferente a los animales, las toxinas A, B, E y F son los principales responsables del botulismo en humanos mientras que las toxinas C y D están frecuentemente involucrados en la afección de los bovinos, ovinos y equinos.

Los síntomas del botulismo difieren dependiendo del ser vivo en cuestión y aparecen de tres a siete días luego de la ingesta del material tóxico, pero el período de incubación puede acortarse dependiendo de la cantidad de toxina que haya ingerido.

Las vacunas veterinarias, constituyen aproximadamente el 23% del mercado global de productos para la salud animal. En 2015, se preveía un valor de vacunas veterinarias en el mercado global de 5,6 billones de dólares, siendo las vacunas para ganado, el mayor segmento del mercado.

En Uruguay, la industria de la producción de vacunas veterinarias se desarrolla desde 1950. Al comienzo el mercado era principalmente interno, pero a partir de 1990 comenzaron a aumentar las ventas al exterior, a 7,9 millones de dólares en exportación de vacunas, principalmente bacterianas en el año 2009.

Las principales vacunas producidas en Uruguay son contra clostridiosis y ántrax.

Estas características del mercado derivan en un gran interés por mejorar las tecnologías utilizadas, para obtener mejores rendimientos de producción y acceder a un mayor mercado.

La producción de proteínas recombinantes se ha convertido en una realidad gracias al descubrimiento de la tecnología del ADN recombinante. La producción de estas en microorganismos como *E. coli*, es una forma robusta de producción, ya que su manipulación genética es sencilla y se encuentra muy bien descrita bibliográficamente.

La producción de proteínas recombinantes en *E. coli* es una opción prometedora para la producción de antígenos que puedan ser candidatos a generar una vacuna contra el botulismo. Además, si se lograra una nueva vía de producción, se saltearían los inconvenientes planteados de la producción de vacunas de forma convencional.

La generación de proteínas recombinantes es una opción prometedora para la producción de antígenos que puedan ser candidatos para generar una vacuna contra el botulismo. Además, si se lograra esta nueva vía de producción, se saltearían los inconvenientes de la producción de vacunas de forma convencional planteados.

Por esta razón se propone desarrollar un proceso simple, seguro y eficiente de expresión recombinante del fragmento Hc de BoNT/C en *E. coli*, con el fin de sortear los inconvenientes planteados de la producción de BoNT/C como antígeno para la fabricación de vacunas veterinarias contra el botulismo.

Palabras clave

C. botulinum tipo C, *C. botulinum* tipo D, BoNTs, Botulismo, Vacunas contra botulismo.

Abreviaciones

BoNT/C: Neurotoxina botulínica tipo C

BoNT/D: Neurotoxina botulínica tipo D

BoNT: Neurotoxina botulínica

bont/HcC: Gen codificante para la toxina recombinante tipo C

pBAD/His A: Plásmido de expresión que se utiliza en el trabajo

PBS: Buffer Fosfato Salino

g: Gramos

L: Litros

M: Molar

mg: Miligramos

mL: Mililitros

mM: Milimolar

dil: dilución

pb: Pares de bases

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

µg: Microgramos

µL: Microlitros

PM: Marcador de peso molecular

rpm: Revoluciones por minuto

ON: Overnight

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Generalidades de las infecciones clostridiales	8
1.2 Botulismo	8
1.2.1 Genética y estructura de las toxinas botulínicas	9
1.2.2 Mecanismo de acción de la toxina botulínica	9
1.2.3 Vías de infección y sintomatología	10
1.2.4 Detección de la enfermedad en bovinos, tratamiento y prevención	10
1.2.5 Botulismo bovino en Uruguay, la región y el mundo	11
1.3 Vacunas como método de prevención del botulismo y su problemática	12
1.4 Tecnología recombinante y utilización de <i>E. coli</i> como plataforma de producción	12
1.4.1 Microorganismos como plataforma de producción	13
1.4.2 <i>E. coli</i> como plataforma de producción	13
1.5 Proteínas recombinantes para la síntesis de vacunas contra el botulismo	14
2. OBJETIVOS	14
3. METODOLOGÍA	15
3.1 Obtención de la secuencia de <i>bont/HcC</i>	15
3.2 Clonado del fragmento <i>bont/HcC</i> en el plásmido de expresión pBAD/His A	15
3.3 Transformación de bacterias electrocompetentes	16
3.4 Screening para la detección de transformantes positivas	17
3.5 Extracción de ADN plasmídico y confirmación de las transformantes positivas por PCR	17
3.6 Evaluación de condiciones de expresión	17
3.7 Lisis celular	18
3.8 Solubilización de cuerpos de inclusión	18
3.9 Curva de crecimiento celular en matraz	18
3.10 Western Blot para la detección de HcC2 con anticuerpos anti-His tag	18
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1 Diseño de primers para amplificar el gen <i>bont/HcC</i>	19
4.2 Clonado de los fragmentos <i>bont/HcC1</i> y <i>bont/HcC2</i> en pBAD/His A	19
4.3 Screening para la detección de transformantes positivas	21
4.4 Confirmación de la transformación por PCR	22
4.5 Transformación de la cepa <i>E. coli</i> BL21 (DE3) con las construcciones pBAD/His A- <i>bont/HcC1</i> y pBAD/His A- <i>bont/HcC2</i>	24
4.6 Inducción de la expresión de <i>bont/HcC1</i> y <i>bont/HcC2</i>	24
4.7 Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3)- pBAD/His A- <i>bont/HcC2</i>	26

4.8	Western Blot anti His-tag de HcC2.....	27
5	CONCLUSIONES.....	27
6	PERSPECTIVAS A FUTURO	28
7	BIBLIOGRAFÍA.....	28
8	ANEXOS.....	30
8.1	Anexo 1: Electrocompetent cells protocol.....	30
8.2	Anexo 2: Protocolo de inducción de expresión pBAD/His A	31
8.3	Anexo 3: Tratamiento de muestras para SDS-PAGE.....	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de las infecciones clostridiales

Las infecciones clostridiales, también denominadas clostridiosis, son enfermedades tóxico-infecciosas, producidas por bacterias del género *Clostridium*, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se caracterizan por ser súbitas, con alta tasa de prevalencia y mortalidad (1,2).

En este tipo de enfermedades, el agente bacteriano, no es el causante de los daños y la muerte del animal por sí mismo, sino que son las diferentes toxinas que estos producen las responsables de los síntomas clínicos, las lesiones observadas y finalmente la muerte del animal (2).

Los clostridios son bacterias anaerobias, con forma de bastón, Gram positivas y formadoras de esporas, por lo que todas las enfermedades clostridiales necesitan de un factor desencadenante que produzca las condiciones adecuadas de baja tensión de oxígeno en los tejidos, para que se dé la esporulación (1,2).

El curso de estas enfermedades es muy rápido y ocurren generalmente en forma de brotes, aunque bajo ciertas condiciones, pueden producirse también muertes en goteo. La aparición de animales muertos en el campo es la manera clásica de presentación, por lo que el enfoque sanitario de estas enfermedades debe apuntar siempre a su prevención (2).

Según su capacidad invasiva las especies clostridiales se separan en dos grupos:

- Invasoras, con gran capacidad para colonizar tejidos, productoras de toxinas de variada potencia sin llegar a la toxicidad de los agentes no invasores. Incluye a las especies causantes de mancha, edema maligno, enterotoxemias, etc.
- No invasoras, caracterizadas por tener poco poder de multiplicación en tejidos vivos, y ser productoras de toxinas muy potentes. Dentro de ellos están incluidos los agentes causales de tétanos y botulismo (1).

Como los clostridios son bacterias esporuladas, presentes normalmente en el tubo digestivo de los animales, agua y en el suelo, se torna difícil el control de esas enfermedades solo con medidas higiénicas y sanitarias.

La única manera de controlar estas afecciones es realizando la vacunación preventiva de las mismas (2).

1.2 Botulismo

Una de las potentes enfermedades clostridiales que se conocen es el Botulismo.

Esta es una enfermedad grave, caracterizada por la parálisis flácida, que puede ser mortal si no es tratada. Tanto en humanos como en animales, el botulismo es causado por la toxina botulínica (BoNTs), producida por *C. botulinum*, una bacteria anaeróbica, Gram positiva y formadora de esporas, pero también puede ser producida por otras especies del género *Clostridium* como *C. barati*, *C. butyricum* y *C. argentinense*.

Hay siete serotipos de BoNTs identificados, que se denominan de la A a la G que varían antigénicamente, aunque tienen la misma actividad farmacológica (3). Actualmente, las BoNTs, son las toxinas más potentes que se han encontrado.

El botulismo, afecta a los animales vertebrados, como pueden ser bovinos, aves y humanos, entre otros (4).

Los diferentes serotipos de BoNTs, afectan de forma diferente a los animales, las toxinas A, B, E y F son los principales responsables del botulismo en humanos mientras que las toxinas C y D están frecuentemente involucrados en la afección de los bovinos, ovinos y equinos. En las aves también es común hallar botulismo causado por la toxina C (5).

1.2.1 Genética y estructura de las toxinas botulínicas

De los diferentes serotipos que existen de las BoNTs, hay algunos de ellos, cuyos genes se encuentran en el cromosoma (*C. botulinum* A, B, E y F; *C. butyricum*), en plásmidos (*C. argentinense*) o en bacteriófagos como los en el caso de *C. botulinum* tipo C y D. Algunas cepas pueden producir una mezcla de dos BoNTs, y muchas cepas de un tipo, contienen silenciados los genes de otra BoNT.

Existe una fuerte evidencia de que los locus del gen *bont*, se encuentran en elementos genéticos móviles, lo que explica su presencia en cromosomas, plásmidos y fagos, así como su probable transferencia a otras cepas clostridiales (6).

A los efectos de este trabajo, cabe destacar que el gen *bont/C*, el cual codifica para la toxina C, en *C. botulinum*, se encuentra en bacteriófagos (6).

Los dominios estructurales y funcionales que componen las BoNTs están bien conservados. Estas son producidas y secretadas como cadenas polipeptídicas inactivas de 150 kDa que se clívan en su forma activa por acción de proteasas extracelulares. Esto comprende una subunidad denominada cadena liviana de un solo dominio (LC) de 50 kDa, y una subunidad de cadena pesada (HC) de tres dominios, de 100 kDa (Figura 1). El sitio de clivaje, se llama bucle de activación y está delimitado por residuos de cisteína que forman un puente disulfuro y unen covalentemente las cadenas ligera y pesada (7).

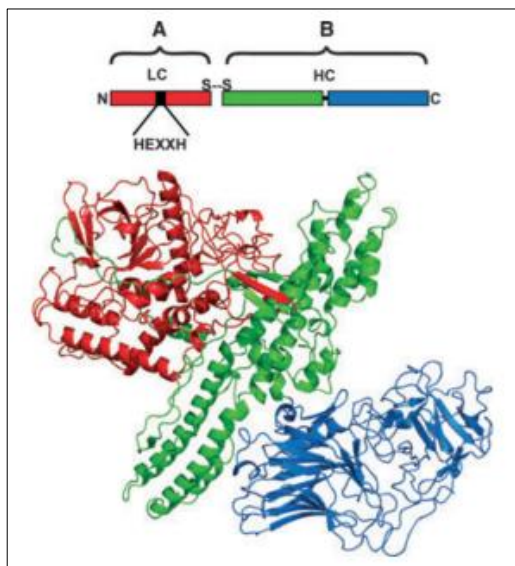


Figura 1: Organización estructural y funcional de las BoNTs. Superior: Las BoNTs son toxinas de tipo AB compuestas de dominios funcionales independientes, unidos por puentes disulfuros. Inferior: Estructura cristalina de BoNT/A. Protein Data Bank 3BTA. Tomado de (8).

El mecanismo de acción de las BoNTs consiste en el bloqueo de la liberación de acetilcolina en la sinapsis colinérgica, lo que resulta en la neuroparálisis que puede llevar a la muerte (9).

1.2.2 Mecanismo de acción de la toxina botulínica

La toxina botulínica es una exotoxina de tipo A-B, denominadas de esta forma porque consisten en dos partes designadas A y B.

La parte A, es el componente activo (enzima) y la parte B es el componente fijador (Figura 1).

En la primera etapa, la toxina A-B es liberada por la bacteria.

La parte B se fija a un receptor de superficie sobre la célula huésped. Tras la fijación, la toxina A-B es transportada a través de la membrana plasmática hacia el interior del citoplasma de la célula huésped.

Dentro de la célula, los componentes A-B se separan. la parte A inhibe la síntesis de proteínas y mata a la célula huésped mientras que la parte B es liberada por la célula (10).

La toxina botulínica es una neurotoxina A-B, actúa sobre la unión neuromuscular (unión entre las células nerviosas y las células musculares) e impide la transmisión de impulsos desde la célula nerviosa hacia el músculo, lo que logra al fijarse a las células nerviosas e inhibir la liberación de un neurotransmisor denominado acetilcolina. Como consecuencia, la toxina botulínica causa parálisis flácida (10).

1.2.3 Vías de infección y sintomatología

La enfermedad se transmite principalmente mediante la ingesta. En bovinos, la alimentación con huesos, heno, o una pequeña cantidad de un cadáver contaminado podrían ser focos de contagio.

Las esporas de *Clostridium botulinum* se ingieren generalmente con el material contaminado, estas proliferan en el animal y cuando muere, su cuerpo es invadido por la bacteria.

De esta forma el animal muerto constituye un riesgo potencial para los otros animales. Además, el suelo por debajo y alrededor del cadáver también se contamina con nuevas esporas (2,11).

La enfermedad suele adoptar la forma de brote en regiones de suelos deficientes de minerales, donde el ganado desarrolla osteofagia (consumo de huesos) y alotrofagia (conducta de consumir alimentos diferentes a los de su dieta normal) buscando suplir sus deficiencias. Estas deficiencias se agudizan durante la gestación y la lactancia, condiciones que aumentan la demanda de calcio y fósforo, razón por la cual se presenta en mayor proporción en animales de producción (2,11).

Respecto a los síntomas del botulismo, estos son diferentes, dependiendo del ser vivo en cuestión, pero nos focalizamos en la sintomatología que se presenta en bovinos.

Los síntomas aparecen de tres a siete días luego de la ingesta del material tóxico, pero el período de incubación puede acortarse dependiendo de la cantidad de toxina que haya ingerido.

Pueden presentarse casos hiperagudos, con muerte súbita sin ningún tipo de síntomas. Los casos agudos sólo se constatan en las etapas finales y en forma muy fugaz, los animales se rehúsan a comer o beber y luego presentan parálisis muscular progresiva ascendente, representada como un debilitamiento que se traduce en un andar tambaleante y descoordinado, debilidad del tren superior, seguida de la caída del animal y muerte por dificultades respiratorias. En la mayoría de los casos la enfermedad es subaguda, los pacientes presentan inquietud, descoordinación, marcha insegura y ataxia, seguidos de incapacidad para levantarse o erguir la cabeza, sin pérdida de sensibilidad cutánea. La muerte ocurre en medio de una parálisis respiratoria (2).

1.2.4 Detección de la enfermedad en bovinos, tratamiento y prevención

La detección de la enfermedad en bovinos es difícil, ya que los animales no están siendo vigilados todo el tiempo, por lo que generalmente se detecta con el hallazgo de un animal muerto. Igualmente, la aparición de pica y osteofagia tiene importante relación con la enfermedad, por lo que generan un estado de alerta.

Igualmente, hay que descartar otras posibles intoxicaciones alimenticias y otros padecimientos con sintomatología nerviosa (5).

Para la confirmación del diagnóstico clínico, se determina el tipo de toxina actuante en el campo. El método de diagnóstico más utilizado es la prueba de seroneutralización en ratón, usando antitoxina de referencia.

Las muestras de elección para el diagnóstico clínico podrían ser: filtrados de los alimentos sospechosos, suero sanguíneo, contenido ruminal, contenido intestinal e hígado de los animales afectados (2,5).

El botulismo no presenta un tratamiento específico, aunque en las formas clínicas subagudas pueden intentarse tratamientos sintomáticos con ciertas posibilidades de éxito. En estos casos se administran sueros antitóxicos a altas dosis al comienzo del proceso. También, puede revertirse el cuadro con el suministro de agua y alimento en los casos leves (ingesta de poca toxina) (5).

Una de las principales causas de muerte en bovinos, es el botulismo, generando grandes pérdidas económicas, lo que lo vuelve a esta enfermedad una cuestión de preocupación para la seguridad pública en todo el mundo (3).

Por este motivo, la forma de controlar el botulismo es su prevención por el método de vacunación, siendo este el más eficaz, debido a la rapidez con la que actúan las toxinas y la alta tasa de mortalidad de la enfermedad (12,13). La aplicación de vacunas específicas que contengan los toxoides (toxina inactivadas) que corresponden a los tipos actuantes (tipo C y D), es hoy en día la única vía de prevención que demuestra ser efectiva para controlar el botulismo en bovinos (3). Además, la vacunación debe ser complementada con medidas que ayuden al control de la enfermedad, se queman los cadáveres, se rotan los animales de potreros y en suelos con deficiencias de fósforo se corrige la misma mediante la administración de minerales por vía inyectable u oral en ganado (5).

1.2.5 Botulismo bovino en Uruguay, la región y el mundo

En Uruguay, se realizó en 1991 el primer comunicado sobre la detección de toxina botulínica en bovinos en Tacuarembó, a partir de dicha fecha también se encontraron diversos brotes de botulismo en los departamentos de Artigas, Salto, Treinta y Tres, Rocha y Montevideo.

Debido a que en Uruguay se está utilizando cada vez más el engorde de animales en confinamiento, se recomienda tener en cuenta como medida preventiva analizar el estado de conservación de los alimentos y considerar el uso preventivo de vacunas que contienen toxoide botulínico tipo C y D en su composición (1).

Hoy en día el botulismo no es una enfermedad común, ya que la vacunación ha sido un método preventivo eficiente y eficaz.

El botulismo es una enfermedad que se encuentra también en otros países de la región. Brasil, es uno de los países de la región con mayor incidencia del botulismo bovino en su historia, en los años 90 se reportó la muerte de bovinos por ingesta de aguas contaminadas con *C. botulinum* en 7 municipios de Mato Grosso do Sul y Sao Paulo siendo 52,5% el mayor porcentaje de muertes (14).

Otro reporte de los mismos autores señala muertes de hasta el 100% de los animales por la ingesta de alimento contaminado con *C. botulinum*, en diferentes establecimientos rurales de los estados de Sao Paulo y Minas Gerais, en un periodo máximo de 2 años entre 1989- 2000 (15).

En Colombia, por primera vez, de forma oficial se reconoció al botulismo como una patología propia de la región en los años 1994-1998, donde como consecuencia murieron cerca de 16 mil reses, lo cual representó pérdidas de 7 millones de dólares aproximadamente.

A raíz de ese problema se implementó un plan que se basa en la utilización de una vacuna, la cual se importa de Uruguay y tiene controles de comercialización (16).

En países como Paraguay, Bolivia y Venezuela, la enfermedad fue reconocida a partir del año 2003 (1).

En Argentina, el INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria), reconoció la enfermedad en 1978, luego de realizar diversos estudios metabólicos, nutricionales, infecciosos y toxicológicos. En ese momento la incidencia registrada fue oscilaba entre el 2,5% y 10% dependiendo de los diferentes establecimientos. Se siguieron registrando pérdidas económicas que rondan el 2,5% en el año 2016 (1).

El botulismo no es solamente una enfermedad de nuestra región, sino que está ampliamente difundido en muchas partes del mundo, se han registrado casos de botulismo en países como Australia, Sudáfrica, Dinamarca, Austria, EE. UU y otros (1,17,18).

1.3 Vacunas como método de prevención del botulismo y su problemática

Como se mencionó previamente, el único método existente para la prevención del botulismo es la vacunación.

Las vacunas, son preparados biológicos que buscan la protección ante determinado patógeno una vez que son administradas. Actúan simulando una infección natural sin que se genere la enfermedad desencadenando una respuesta inmune capaz de protegerlo frente a una infección posterior del patógeno previniendo la enfermedad (19).

Las vacunas veterinarias, constituyen aproximadamente el 23% del mercado global de productos para la salud animal. En 2015, se preveía un valor de vacunas veterinarias en el mercado global de 5,6 billones de dólares, siendo las vacunas para ganado, el mayor segmento del mercado (20).

En nuestro país, la industria de la producción de vacunas veterinarias se desarrolla desde 1950 (21). Al comienzo el mercado era principalmente interno, pero a partir de 1990 comenzaron a aumentar las ventas al exterior, llegando en 2009, a 7,9 millones de dólares en exportación de vacunas, principalmente bacterianas. Las principales vacunas producidas en Uruguay son contra clostridiosis y ántrax (21).

Estas características del mercado derivan en un gran interés por mejorar las tecnologías utilizadas, para obtener mejores rendimientos de producción y acceder a un mayor mercado.

Actualmente, las vacunas veterinarias que protegen del botulismo se producen de la forma clásica. Los toxoides se obtienen a partir de toxinas producidas por la fermentación de cepas de *C. botulinum* (12). Estos toxoides demuestran ser efectivos y seguros en cuanto a la protección del animal (19), pero su actual método de producción presenta grandes desventajas.

Una de las desventajas de este método de producción, es que requiere el cumplimiento de grandes exigencias en cuanto a bioseguridad, ya que las BoNTs son consideradas las toxinas biológicas más potentes que se conocen en la naturaleza (3).

Por otra parte, se ha observado, que la cantidad de toxina obtenida por lote de producción es variable y también lo es su potencia (12). Posiblemente, la explicación de este inconveniente sea que los elementos extracromosómicos en los que se encuentran los genes *bont/C* y *bont/D*, presenten cierta inestabilidad luego de varios pasajes de cultivo (6,22).

Otros factores que generan afectan la producción de toxina generando inconvenientes son las condiciones de fermentación, optimizar estas condiciones, permitirá mejorar los rendimientos obtenidos sin aumentar costos de producción.

1.4 Tecnología recombinante y utilización de *E. coli* como plataforma de producción

La producción de proteínas recombinantes se ha convertido en una realidad gracias al descubrimiento de la tecnología del ADN recombinante. La implementación de esta tecnología ha hecho posible la producción de la mayoría de las proteínas de interés, de forma recombinante. Antes de esto, las proteínas de interés se extraían de sus fuentes naturales a través de procesos costosos, de pobres rendimientos y generando problemas inmunológicos de compatibilidad con el organismo receptor.

Cada vez es más amplio el catálogo de proteínas de interés producidas de forma recombinante, incluidas las utilizadas para la producción animal.

Las proteínas más ampliamente estudiadas para el sector animal son aquellas que tienen un papel importante en la reproducción, la eficiencia alimenticia y la salud (23).

Aunque existe una amplia gama de microorganismos que actualmente se utilizan como plataformas con fines de producción de proteínas recombinantes tales como, bacterias, levaduras, hongos, algas, células de insectos y células de mamíferos, la bacteria *Escherichia coli* se ha convertido en el caballo de batalla en este campo. Esto no es solo debido a los bajos costos de producción asociados a este sistema de expresión procariota,

sino también a la cantidad de herramientas disponibles que hacen que este proceso sea fácil de implementar.

La primera proteína funcional recombinante (somatostatina) se produjo en 1977 utilizando *E. coli* como huésped celular y, solo unos años después, se lanzó una insulina humana recombinante también producida en *E. coli* (23).

Sin embargo, a pesar de los avances innegables realizados en el campo de la producción de proteína recombinante, los procesos de producción y, lo que es más importante, el procesamiento del producto *downstream*, tienen importantes costos asociados. Esto es particularmente limitante para la producción de proteínas recombinantes para la ciencia animal, donde el desarrollo de productos y estrategias de bajo costo es una prioridad.

A pesar de las limitantes, el uso de proteínas recombinantes en este campo, se ha incrementado claramente en las últimas décadas (23).

1.4.1 Microorganismos como plataforma de producción

La biotecnología industrial ha empleado tradicionalmente numerosos microorganismos bacterianos y eucariotas como plataformas de producción (24).

Originalmente, el primer criterio para elegir un determinado huésped era su capacidad natural para producir el compuesto deseado, ya sea un metabolito primario o secundario, una enzima o una proteína. Con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante, se ha hecho posible, introducir ADN foráneo en diferentes microorganismos, para la producción de compuestos deseados en productores que originalmente no poseen la información genética para hacerlo (25). Se determinan entonces, nuevos rasgos beneficiosos de ciertos organismos hospedadores, tales como: cultivo fácil, manipulación genética fácil, resistencia al estrés, etc. En cuanto a la producción en microorganismos, las levaduras y las bacterias comparten características beneficiosas como el crecimiento de células individuales, el cultivo fácil en medios baratos y la fácil manipulación genética, aunque también comparten características desfavorables como presencia de pirógenos y formación de cuerpos de inclusión en bacterias, mientras que en levaduras la formación de proteínas hiperglicosiladas y difícil lisis celular son los principales inconvenientes (24).

En consecuencia, la selección consiste en elegir cepas que proporcionen las características requeridas para el producto específico y que permitan una alta productividad con la calidad adecuada (25).

1.4.2 *E. coli* como plataforma de producción

La producción de proteínas recombinantes en microorganismos como *E. coli*, es una forma robusta de producción, ya que su manipulación genética es sencilla y se encuentra muy bien descrita bibliográficamente.

Actualmente, se han obtenido innumerables proteínas activas en *E. coli*, siendo estos, avances útiles y ejemplares para la producción de nuevas proteínas recombinantes.

Utilizar *E. coli* como plataforma de producción presenta varias ventajas ya descritas, pero cabe destacar que el poco tiempo para conseguir grandes cantidades de biomasa, la variedad de cepas existentes, la fácil manipulación genética y el gran conocimiento que se ha adquirido sobre estas son las más importantes.

Esencialmente, la expresión de proteínas usando *E. coli* puede dar como resultado dos estados proteicos:

Soluble, donde la proteína se mantiene en la conformación nativa casi exclusivamente.

Insoluble, donde la proteína forma agregados llamados cuerpos de inclusión, que requieren agentes desnaturizantes para la solubilización y etapas de plegamiento adicionales.

Ambos estados proteicos tienen ventajas y desventajas.

Las proteínas solubles pueden ser más inmunogénicas y, por lo tanto, sirven como un antígeno más eficiente, pero debido a que la mayoría de las proteínas de *E. coli* formarán parte del lisado celular, implican un procedimiento de purificación más intensivo.

Por otra parte, las proteínas insolubles pueden no tener la misma inmunogenicidad que las solubles, por lo que se debe realizar el repliegamiento de proteínas para evitar este inconveniente. Sin embargo, la etapa de purificación posterior de los cuerpos de inclusión es mucho menos laboriosa, debido a que pocas proteínas de *E. coli* estarán presentes después de usar agentes desnaturizantes para el repliegamiento de los cuerpos de inclusión. También se ha demostrado que los cuerpos de inclusión pueden tener actividad adyuvante, atenuando la deficiencia de antígeno conformacional (24).

1.5 Proteínas recombinantes para la síntesis de vacunas contra el botulismo

Las vacunas desarrolladas por el método convencional han desempeñado un papel importante no sólo al proporcionar inmunidad activa contra la neurotoxina a poblaciones en riesgo, sino también como un componente necesario para la producción de antitoxinas e inmunoglobulina de botulismo para su uso en el tratamiento del botulismo mediante inmunización pasiva (26).

La tecnología recombinante, sin embargo, ha proporcionado la capacidad de producir antígenos altamente purificados y eficaces en cantidades adecuadas sin la necesidad de cultivar ni manipular grandes volúmenes de *C. botulinum* ni de su neurotoxina, facilitando así las medidas de bioseguridad necesarias para su producción, de esta manera, las vacunas recombinantes han demostrado ser una gran alternativa para el desarrollo de vacunas contra el botulismo animal (26).

Como se detalló anteriormente, las BoNTs, están formadas por dos subunidades, LB y HC, en esta última, se pueden diferenciar dos regiones H_N (N-terminal) y H_C (C-terminal). El fragmento H_C comprende la región que interactúa con los receptores en las neuronas, cuando se desencadena la acción de las BoNTs. Además, ha sido demostrado que la región C-terminal de HC es un dominio no tóxico por sí solo y posee epítopes de protección (3,13,27,28).

Esta es una opción prometedora para la producción de antígenos que puedan ser candidatos para generar una vacuna contra el botulismo. Además, si se lograra esta nueva vía de producción, se saltearían los inconvenientes de la producción de vacunas de forma convencional planteados.

En este trabajo, se buscó desarrollar un proceso simple seguro y eficiente de expresión recombinante del fragmento H_C de BoNT/C en *E. coli*, con el fin de sortear los inconvenientes planteados de la producción de BoNT/C como antígeno para la fabricación de vacunas veterinarias contra el botulismo.

2. OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de un proceso simple, seguro y eficiente de expresión recombinante del fragmento H_C de BoNT/C en *E. coli*.

Para lograr esto, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Obtener las construcciones del plásmido de expresión pBAD/His A con el gen *bont/HcC*.
- Estudiar la expresión en las diferentes construcciones en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* e identificar los fragmentos de interés. Seleccionar la que presente mayor nivel de expresión.
- Optimizar y escalar la expresión de las mejores construcciones evaluando la concentración de inductor.
- Purificar la proteína recombinante obtenida y evaluar alguna de sus propiedades bioquímicas.

3. METODOLOGÍA

3.1 Obtención de la secuencia de *bont/HcC*

La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína HcC, se obtuvo de bibliografía y fue sintetizada por la empresa General Biosystems (Carolina del Norte, EE. UU). Esta secuencia, fue modificada mediante técnicas bioinformáticas, para evadir el sesgo de codones entre el microorganismo originario de la secuencia nucleotídica y el microorganismo utilizado como plataforma de expresión (3).

Se conoce, que el sesgo de codones entre microorganismos puede interferir en la velocidad de traducción y el plegamiento de la proteína y otros aspectos de la traducción (29).

3.2 Clonado del fragmento *bont/HcC* en el plásmido de expresión pBAD/His A

El plásmido pBAD/His A, fue brindado por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT (Montevideo, Uruguay).

Los primers utilizados se sintetizaron por la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Se diseñaron diferentes primers (Tabla 1) para amplificar mediante PCR el gen *bont/HcC*, teniendo en cuenta dos estrategias.

Tabla 1: Primers utilizados en el clonado del gen *bont/HcC* en pBAD/His A y sus características.

Nombre del primer	Secuencia del primer (5'→3')	Características del primer
F-HcC	ATATGAGCTCATGTACT TCAATAATATTAATG	Primer para amplificar HcC con sitio de corte SacI y seat sequence
F-HcC-RBS	ATATGAGCTCTGAAGG AGATATACCATGTACTT CAATAATATTAATG	Primer para amplificar HcC con sitio de corte SacI, seat sequence, codón stop para frenar la expresión de la His tag 5' de pET28 y pBAD, y RBS para guiar la expresión
R-HcC STOP	ATATAAGCTTTCAGGAT CCCTCAGAAACAGG	Primer para amplificar HcC con sitio de corte HindIII, seat sequence y codón stop. Este primer pone fin a la expresión y evita que se exprese la His Tag C terminal en pET28 y pone fin a la expresión en pBAD
R-HcC-His	ATATAAGCTTTCATGA TGATGATGATGATGGG ATCCCTCAGAAACAGG	Primer para amplificar HcC con sitio de corte HindIII, seat sequence, His tag y codón STOP. Este primer permite añadir una cola de histidina C terminal en pBAD.

Estrategia 1: Los primers utilizados fueron F-HcC y R-HcC STOP.

Estrategia 2: Los primers utilizados fueron F-HcC-RBS y R-HcC-His.

Para la reacción de PCR se utilizó el termociclador modelo Little Genius TC-25H (Hangouz BIOER Technology Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang, China), se siguió el mix (Tabla 2) y el programa de PCR (Tabla 3), variando únicamente los primers dependiendo de la estrategia con la cual se estuviese trabajando.

Tabla 2: Mix de reacción utilizado para PCR.

Reactivo	Mix (μL)
H ₂ O mq	17,7
1 X Buffer TopTaq PCR (Qiagen, Hilden, Alemania)	2,5
dNTPs (2,5 mM c/u)	1
Primer 1 (10 mM)	1
Primer 2 (10 mM)	1
MgCl ₂ (25 mM)	0,5
TopTaq (Qiagen, Hilden, Alemania)	0,3
ADN	1
Total	25

Tabla 3: Programa de PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo	
94	3 min	Desnaturalización inicial
94	30 seg	Desnaturalización
40	30 seg	Annealing
72	1 min	Extensión
72	10 min	Extensión final

Una vez obtenido el producto de PCR se corrieron en gel de Agarosa 1% y para visualizar las bandas obtenidas se utilizó un visualizador de geles E-Gel Imager (Life Technologies, EE. UU). El marcado de peso molecular de ADN utilizado fue GenRuler SM0331 (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU).

Este producto de PCR, se purificó con el kit comercial de Clean and concéntrate (Zymo Research, EE. UU), y se cuantificó con el equipo “Infinite® 200 PRO NanoQuant Multimode Microplate Reader”.

Se realizó Restricción enzimática de los productos de PCR *bont/HcC1* y *bont/HcC2*, y del plásmido pBAD/His A con las enzimas Anza 20 SacI (Thermo Scientific, EE. UU) y HindIII (Thermo Scientific, EE. UU). La incubación con cada una de estas duró 2 h a una temperatura de 37 °C, luego se dejó inactivando durante 20 min a 80 °C.

Se efectuó la ligación de los fragmentos *bont/HcC1* y *bont/HcC2* con pBAD/His A.

Para la ligación se utilizó la enzima T4 Ligasa (Thermo Scientific, EE. UU). Se utilizó una herramienta de cálculo llamado “Ligation Calculator”, el cual permitió calcular a partir de las concentraciones y la relación plásmido-inserto, la cantidad de plásmido y de inserto en dicha ligación.

Las condiciones de incubación para la ligación fueron 16 °C ON y se inactivo la enzima a 70 °C 20 min.

3.3 Transformación de bacterias electrocompetentes

Para la obtención de bacterias electrocompetentes, se utilizó el protocolo “Electrocompetent cells” (Anexo 1).

La transformación se realizó mediante electroporación, la cual consiste en provocar un aumento significativo de la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática celular mediante un campo eléctrico aplicado externamente (18). De esta forma, se abren pequeños poros en la membrana, ingresando por estos mismos el ADN que se encuentra en la misma solución que las células.

Las cepas celulares utilizadas fueron *E. coli* DH5 α y *E. coli* BL21 (DE3), brindadas por el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT (Montevideo, Uruguay).

Para la transformación es importante mantener todos los materiales en frío y aunque el trabajo no se realiza entre mecheros ni en cámara de flujo laminar, se debe evitar cualquier riesgo de contaminación.

En el tubo donde se contenían los 40 μ L de bacterias electrocompetentes, se agregaron 2 μ L de ADN. Se incubaron en hielo 30-60 seg. El mismo tratamiento se hizo tanto para muestras como para controles positivos y negativos.

Se estableció el programa de electroporación EC1.

Se colocó la mezcla de ADN/bacterias en las celdas de electroporación previamente lavadas con EtOH 70 %, esterilizadas en UV 1 h y enfriadas en hielo.

Luego del pulso eléctrico, se retiraron rápidamente la celda y se agregó 1 mL de medio SOC también enfriado en hielo. Se incubó a 37°C durante 1 h.

Se plaquearon 10 μ L, 100 μ L, y el resto en placas de LB con Ampicilina 0,1 mg/mL.

Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h.

3.4 Screening para la detección de transformantes positivos

Para realizar una primera confirmación de la transformación, con plásmidos que contienen el inserto, es decir con pBAD/ His A- *bont/HcC2* y pBAD/His A- *bont/HcC1*, se siguió un protocolo de extracción rápida de ADN, que permite visualizar en un gel de Agarosa 1%, el perfil de ADN de la bacteria y en este, el plásmido, con el equipo visualizador de geles E- Gel Imager (Life technologies, EE. UU), Dado que el tamaño del inserto es significativo, puede diferenciarse la banda del plásmido con inserto, de la correspondiente al plásmido sin inserto.

Este método, permitió realizar un muestreo más fácil, rápido y económico.

Se partió de un precultivo del cual se extrajo 1 mL, se colocó en un tubo eppendorf y se centrifugó a 13500 rpm durante 1 min. Se descartó el sobrenadante, se le agregó 10 μ L de fenol: cloroformo (relación 24:1) y 10 μ L de buffer de carga para ADN 6x. A continuación, se centrifugó a 13500 rpm durante 4 min y a partir de la fase acuosa que se presenta en la parte superior se cargó en gel de Agarosa 1%.

3.5 Extracción de ADN plasmídico y confirmación de las transformantes positivas por PCR

Una vez que se detectó la posible transformación positiva, con el método anterior, se, seleccionaron cuatro de las colonias confirmadas y se realizaron precultivos de estas, incubados a 37°C, 200 rpm, ON.

Se realizó extracción de ADN plasmídico, con el kit comercial Zippy™ Plasmid Miniprep (Zymo Research, EE. UU).

Esta extracción se utilizó como molde para PCR, donde se buscó amplificar los fragmentos *bont/HcC1* y *bont/HcC2* respectivamente.

Para esta reacción de PCR, se utiliza el mix (Tabla 2) y el ciclado de PCR (Tabla 3).

Los productos de PCR se corrieron en gel de Agarosa 1%.

3.6 Evaluación de condiciones de expresión.

En primer lugar, se realizó una inducción de la expresión de los clones ya confirmados, siguiendo el protocolo de pBAD/His A proporcionado por el fabricante (Anexo 2).

Esto se realizó a partir de un precultivo de *E. coli* BL21 (DE3)- pBAD/His A - *bont/HcC1* y otro de BL21 (DE3)-pBAD/ His A -*bont/HcC2*.

Las condiciones de inducción que se mantuvieron siempre constante fueron temperatura, 37°C y agitación, 200 rpm. La condición que se varió, para encontrar el mejor rendimiento de expresión, fue la concentración de inductor utilizado. Para el caso del vector pBAD/His A, el inductor que se utiliza es L-arabinosa y las concentraciones de este evaluadas fueron 0,2%; 0,002%; 0,00002%.

3.7 Lisis celular

Luego de la expresión, se cosecharon las células bacterianas centrifugando a 4800 rpm durante 15 min. A continuación, se resuspendieron los pellets en buffer de lisis (Fosfato de sodio 20 mM pH 7,4 + PMSF 1 mM + lisozima 0,2 mg/mL) y se incubaron durante 30 min a 37°C. La relación de buffer-pellet que se utilizó es de 35 mL de buffer de lisis por cada 4 g de pellet.

Posteriormente se sonicó (3 min; 15 seg ON; 30 seg OFF; 30 % amplitud), este paso se hizo en hielo. Luego se centrifugó durante 45 min a 17000x g y 4 °C en tubos de propileno.

En este punto es donde se obtuvieron muestras del sobrenadante y pellet para ver cómo se expresó la proteína, si fue en cuerpos de inclusión (pellet) o de manera soluble (sobrenadante). Estas dos muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.

El tratamiento que se realizó a las muestras para que puedan utilizarse para la electroforesis se encuentra en el anexo 3.

El del de poliacrilamida también se visualizó en el equipo E-Gel Imager (Life Technologies, EE. UU).

El marcador de peso molecular para proteínas que se utilizó es PageRuler™ Prestained Protein Ladder 26616 (Thermo Scientific, EE. UU).

3.8 Solubilización de cuerpos de inclusión

El protocolo de solubilización se obtuvo de bibliografía (30).

Para la solubilización de la proteína se resuspendieron los pellets en Buffer (KH₂PO₄ 20 mM, 1 mM PMSF, 6 mM β-mercaptoetanol, 0,5 % Tritón X-100), cuidando de no hacer mucha espuma. Se centrifugó a 10000x g y 20 °C durante 20 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los pellets en el Buffer (KH₂PO₄ 20 mM).

Se volvió a centrifugar a 10000x g y 20 °C durante 20 min, donde nuevamente se descartó el sobrenadante. A continuación, se resuspendieron los pellets en Buffer (KH₂PO₄ 50 mM, 8 M Urea) y se incubó a 30°C durante 2 h con agitación 160 rpm.

Luego se centrifugó nuevamente a 10000x g y 20 °C durante 20 min.

En este paso no se descartó el sobrenadante y se tomaron muestras del pellet para confirmar que la re-solubilización fue exitosa, visualizándolas en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%.

3.9 Curva de crecimiento celular en matraz

Se partió de precultivos de *E. coli* BL21-pBAD/His A- *bont/HcC2* en medio LB con ampicilina (37 °C, 200 rpm, ON), los cuales se utilizan para inocular tres matraces de 200 mL de medio LB con Ampicilina 0,1 mg/mL. De estos matraces dos fueron inducidos con arabinosa 0,02%, denominados matraz 1 y matraz 3. De esta forma se intenta determinar si la expresión de la proteína HcC2 altera el crecimiento de las bacterias.

3.10 Western Blot para la detección de HcC2 con anticuerpos anti-His tag

La identificación cualitativa de la proteína HcC2 se realizó mediante Western Blot.

Las proteínas se analizaron en una electroforesis desnaturizante, la cual se transfirió a una membrana de nitrocelulosa utilizando el equipo iBlot® 7-Minute Blotting System (Thermo Scientific, EE. UU).

La membrana se bloqueó con solución de bloqueo (PBS-Tween 0,1%, 2% leche descremada) a 4 °C por 1,5 h. Posteriormente se lavó con PBS-Tween 0,1% durante 5 min y se incubó con el anticuerpo primario anti-His-tag de conejo (dil 1/2000), durante 1 h con agitación. A continuación, se lavó tres veces la membrana, durante 5 min cada lavado con PBS-Tween 0,1%. Se incubó

con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado fosfatasa alcalina, durante 45 min con agitación.

Se lavo la membrana tres veces con PBS-Tween 0,1 % durante 5 min, se le agregó la solución de revelado (demora aprox. 15 min).

Finalizado el revelado, se descartó la solución y se observaron los resultados.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta la situación actual de la producción de vacunas contra el botulismo de forma convencional y los inconvenientes que esta presenta, se buscó abordar un nuevo método de producción para evadir las desventajas del método convencional, obteniendo iguales o mayores rendimientos.

4.1 Diseño de primers para amplificar el gen *bont/HcC*

El diseño de los primers se realizó teniendo en cuenta dos estrategias diferentes para la expresión de la proteína HcC.

- Estrategia 1: Los primers que se diseñaron fueron F-HcC y R-HcC STOP (Tabla 1). Estos primers amplifican el gen *bont/HcC* adicionándole sitio de corte para las enzimas de restricción SacI y HindIII, seat sequence y un codón stop que pone fin a la expresión en pBAD/His A. El fragmento obtenido por PCR utilizando esta estrategia, se denomina *bont/HcC1* y tiene un tamaño de 1316 pb. La construcción pBAD/His A- *bont/HcC1*, daría lugar a una proteína de 50 kDa aproximadamente, con His-tag en el extremo N-terminal.
- Estrategia 2: Los primers que se diseñaron fueron F-HcC-RBS y R-HcC-His (Tabla 1). Estos primers amplifican el gen *bont/HcC* adicionándole sitio de corte para las enzimas de restricción de SacI y HindIII, seat sequence y codón stop para frenar la expresión de la His-tag 5' de pBAD/His A. También agrega en la secuencia un sitio RBS que sirve para guiar la expresión y permite añadir una His-tag C-terminal. El fragmento obtenido por PCR utilizando esta estrategia se denomina *bont/HcC2* y tiene un tamaño de 1349 pb. La construcción pBAD/His A -*bont/HcC2*, daría lugar a una proteína de 50 kDa aproximadamente, con His-tag en el extremo C-terminal.

4.2 Clonado de los fragmentos *bont/HcC1* y *bont/HcC2* en pBAD/His A

En primer lugar, se realizó una PCR para amplificar el fragmento HcC, con los dos pares de primers que fueron diseñados, para las dos estrategias de clonado y expresión.

Con esta PCR, únicamente se busca obtener la mayor cantidad posible de copias de la secuencia de *bont/HcC1* y *bont/HcC2*.

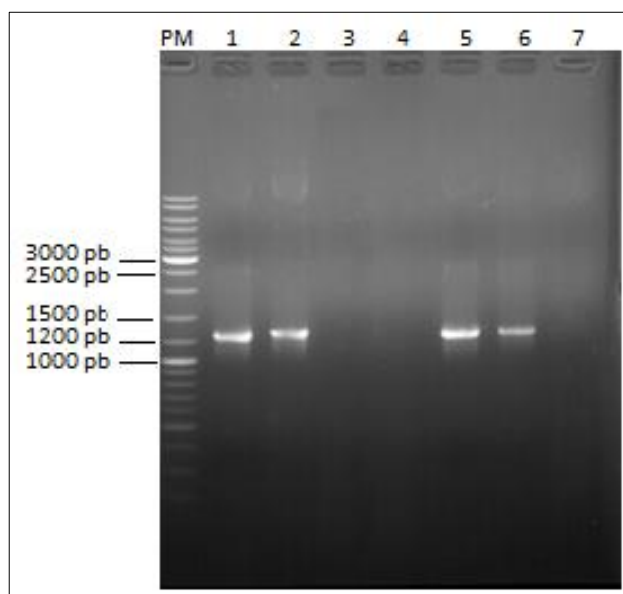


Figura 2: Electroforesis en gel de Agarosa 1% para visualizar la amplificación por PCR de los fragmentos *bont/HcC1* y *bont/HcC2*. De izquierda a derecha, se observa el marcador de peso molecular (PM), 1. Amplificación de *bont/HcC1*, 2. Amplificación de *bont/HcC2*, 3. Control negativo de PCR, 4. Vacío, 5. Amplificación *bont/HcC2*, 6. Amplificación de *bont/HcC2*.

Las reacciones para las dos estrategias se realizaron por duplicado. Podemos confiar en los resultados obtenidos ya que el control negativo no muestra amplificación.

Se pudo observar que ambos productos de PCR se amplificaron correctamente, tienen aproximadamente el peso molecular esperado (1300 pb) y no hay amplificación inespecífica en ninguno de los carriles.

Una vez obtenidos los fragmentos *bont/HcC1* y *bont/HcC2*, se procede a la restricción con las enzimas Anza 20 *SacI* y *HindIII*, estas enzimas actúan en buffers muy diferentes, por lo que previamente se realizó una prueba de actividad de ambas por separado en buffer Tango 1X. En esta prueba, se confirmó la actividad de ambas por lo que se utilizó el buffer Tango 1X en el mix de restricción, actuando ambas al mismo tiempo. Anza *SacI* es una enzima de rápida digestión, pero prolongar su incubación por más tiempo no afecta su actividad, por lo que incubarla con *HindIII* durante 2,5 h, no fue un inconveniente.

El plásmido pBAD/His A, también se incubó con estas dos enzimas, en las mismas condiciones.

Una vez finalizada la restricción enzimática, se procedió a ligar los fragmentos con el plásmido, con la relación plásmido: inserto 1:5.

Se transformaron bacterias de la cepa *E. coli* DH5α con las diferentes construcciones obtenidas de la ligación.

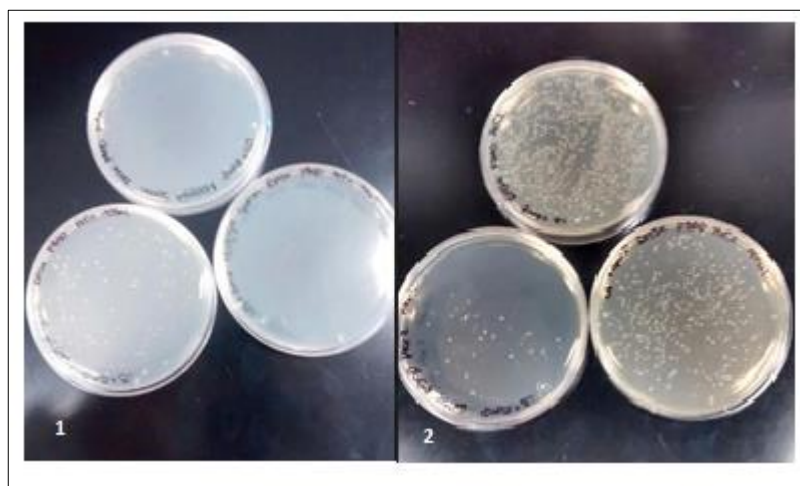


Figura 3: Transformación de *E. coli* DH5α con las construcciones obtenidas. 1. Resultado de la transformación con la construcción pBAD/His A- *bont/HcC1*. 2. Resultado de la transformación con la construcción pBAD/His A- *bont/HcC2*.

En las dos transformaciones que se realizaron hubo crecimiento por lo cual se pueden considerar exitosas (los controles de electroporación y viabilidad no se muestran, pero los resultados obtenidos fueron correctos). Posteriormente se realizó un screening de detección de transformantes positivos y confirmación por PCR de las mismas.

4.3 Screening para la detección de transformantes positivos

La transformación resultó exitosa, pero cuando se realizan con ADN proveniente de una ligación, se debe confirmar la presencia de la construcción deseada. En casos como este, puede pasar que parte del plásmido de la muestra no sea cortado por enzimas de restricción, o se corte un solo extremo y luego se religue, también puede suceder que dos plásmidos se ligen entre sí. Estas conformaciones darían a las bacterias transformadas la resistencia al antibiótico, en este caso Ampicilina, pero no contienen el gen de interés.

Por este motivo, se aplicó el protocolo de screening para la detección de transformantes positivos. Este protocolo se basa en un método de extracción de ADN total, que nos permite visualizar de forma rápida y sencilla la construcción que adquirieron las bacterias provenientes de una misma colonia.

Para el screening realizado a la transformación con pBAD/His A- *bont/HcC1*, se seleccionaron 9 colonias.

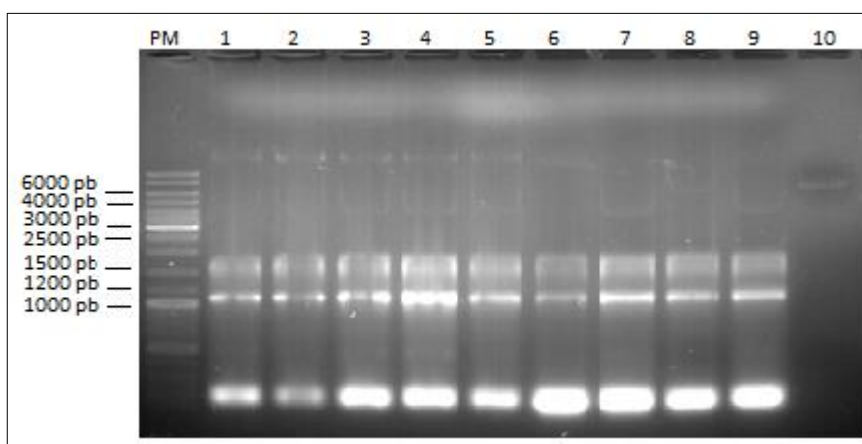


Figura 4: Screening para detectar transformaciones positivas (pBAD/His A- *bont/HcC1*). Gel de Agarosa 12 % en el que se visualizan de izquierda a derecha el marcador de peso molecular (PM), Las extracciones rápidas de ADN de las colonias (1-9), plásmido pBAD/His A (4102 pb).

La extracción de ADN total que se realizó con este método de screening rápido nos permitió visualizar el perfil de ADN de las bacterias en cuestión (varía dependiendo del microorganismo). Se observó que las bandas que corresponden al ADN plasmídico oscilan dependiendo de la colonia entre 4000 pb y 6000 pb (Figura 4).

El plásmido por sí solo tiene aproximadamente 4100 pb y el fragmento 1300pb, por lo que la diferencia de altura entre las bandas se corresponde con la presencia/ausencia de fragmento en el plásmido.

De igual manera, cabe destacar que el peso molecular real, no se corresponde totalmente con el que se visualiza, porque las moléculas de ADN no migran igual en una electroforesis cuando su conformación es lineal u enrollada (se ve más arriba).

Dada esta observación, se seleccionaron las colonias 1, 2 y 3, para confirmar la presencia del inserto mediante PCR.

A la transformación con la construcción pBAD/His A- *bont/HcC2*, también se aplicó el protocolo de screening para detectar transformantes positivos. Los fundamentos son exactamente iguales que los anteriores, solamente que se trata de otra construcción. En este caso se seleccionaron 10 colonias, las cuales ninguna fue aparentemente positiva (no se muestra figura), se seleccionaron 20 más, donde sí se pudo observar diferencias de tamaño entre las bandas que corresponden al ADN plasmídico.

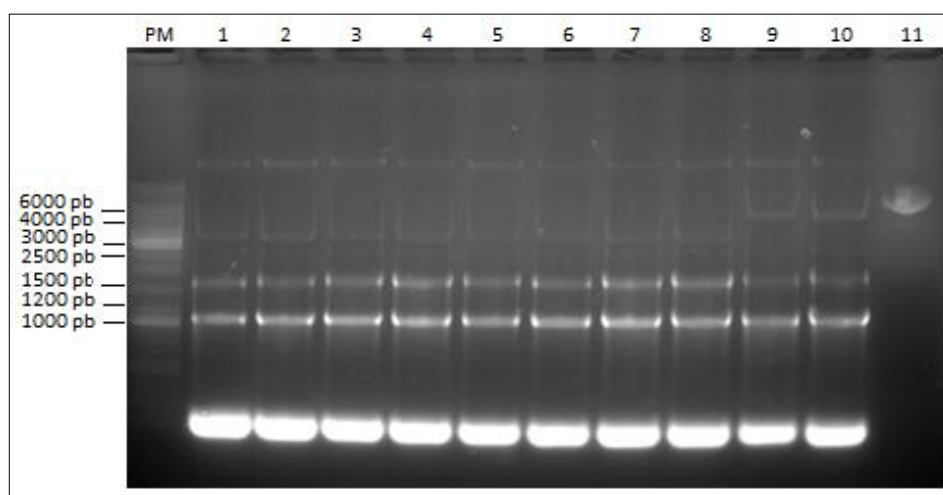


Figura 5: Screening para detectar transformaciones positivas (pBAD/His A- *bont/HcC2*). Gel de Agarosa 1 % en el que se visualizan de izquierda a derecha el marcador de peso molecular (PM), Las extracciones rápidas de ADN de las colonias (11-20), plásmido pBAD/His A (4102 pb).

Teniendo en cuenta la explicación para el caso anterior y el resultado del screening (Figura 5), se seleccionaron las colonias 17, 18, 19 y 20, para la confirmación de la presencia del inserto por PCR.

4.4 Confirmación de la transformación por PCR

De las colonias seleccionadas por el método de screening como transformantes positivas para las dos estrategias, se realizaron precultivos para la posterior extracción de ADN plasmídico y la utilización de este como molde.

La PCR que se realizó fue siguiendo el mix descrito en la Tabla 2 y el programa de ciclado descrito en la Tabla 3.

La única variante sigue siendo los primers utilizados, que dependen de la construcción y la estrategia en cuestión.

Los productos de las PCR se corrieron en geles de Agarosa 1%, para visualizar si hubo o no amplificación.

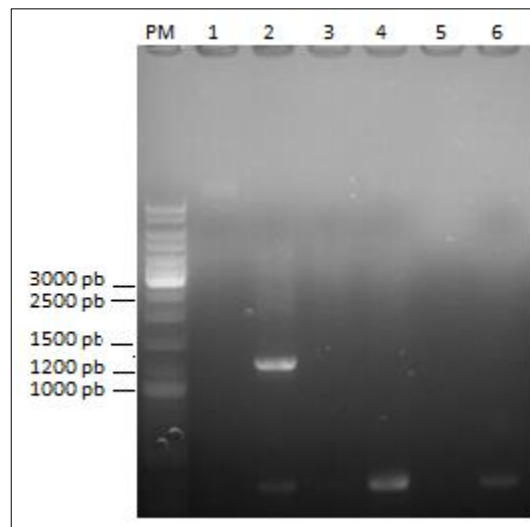


Figura 6: Electroforesis en gel de Agarosa 1% para visualizar la amplificación por PCR de los fragmentos *bont/HcC1*. De izquierda a derecha se observa el marcador de peso molecular (PM), 1. Vacío, 2. Producto de PCR colonia 3, 3. Producto de PCR colonia 2, 4. Producto de PCR colonia 5, 5. Vacío, 6. Control negativo de PCR.

Se observa amplificación únicamente para el ADN extraído a partir de la colonia 3 (Figura 6). Se confirma la transformación de la cepa *E. coli* DH5 α (colonia 3) con la construcción pBAD/His A-*bont/HcC1*.

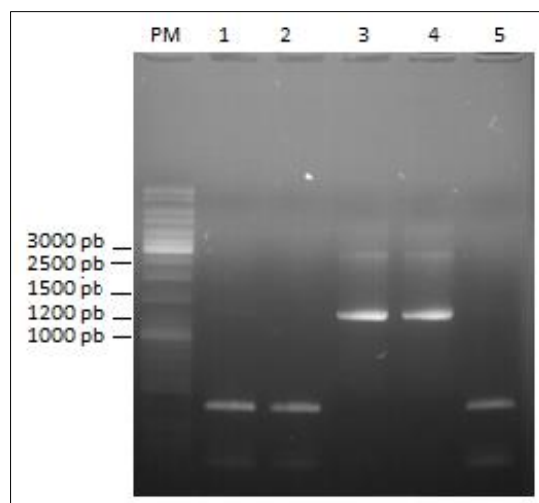


Figura 7: Electroforesis en gel de Agarosa 1% para visualizar la amplificación por PCR de los fragmentos *bont/HcC2*. De izquierda a derecha se observa el marcador de peso molecular (PM), 1. Producto de PCR colonia 17, 2. Producto de PCR colonia 18, 3. Producto de PCR colonia 19, 4. Producto de PCR colonia 20, 5. Control negativo de PCR.

Se observó amplificación para el ADN extraído de las colonias 19 y 20 (Figura 7), por lo que se confirma la transformación de la cepa *E. coli* DH5 α (colonias 19 y 20) con la construcción pBAD/His A-*bont/HcC2*.

4.5 Transformación de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) con las construcciones pBAD/His A- *bont/HcC1* y pBAD/His A- *bont/HcC2*

Existen diferentes cepas de *E. coli*, que son útiles en diferentes aspectos. En el caso de la cepa DH5 α , esta sirve para replicar el plásmido que contiene, en el caso de la cepa BL21 (DE3), esta es una cepa de expresión. Por este motivo, se transformó la cepa de expresión con las construcciones obtenidas.

Para la transformación de *E. coli* BL21 (DE3), se siguió la misma metodología que para la cepa anterior. La diferencia es que esta vez, la transformación no se realiza con productos de ligaciones, si no con un plásmido entero, lo que da mayor eficiencia de transformación.

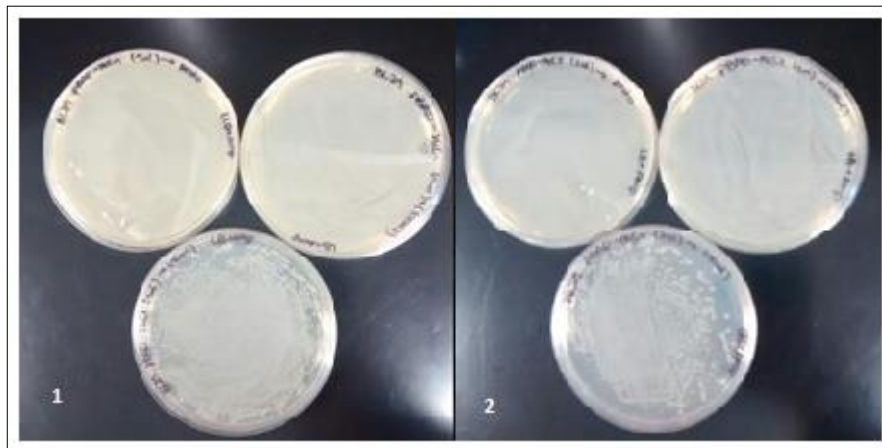


Figura 8: Transformación de *E. coli* BL21 (DE3) con las construcciones obtenidas. 1. Resultado de la transformación con la construcción pBAD/His A- *bont/HcC1*. 2. Resultado de la transformación con la construcción pBAD/His A- *bont/HcC2*.

La eficiencia de transformación que se puede observar es excelente, pero crecieron tantas colonias que no se pueden distinguir unas de otras, salvo en una de las placas. Igualmente, la transformación se considera exitosa.

La transformación se confirmó directamente por PCR en este caso, ya que como el ADN no provenía de ligaciones, no fue necesario realizar un screening para encontrar transformantes positivos.

4.6 Inducción de la expresión de *bont/HcC1* y *bont/HcC2*

Una vez obtenidas las cepas de expresión *E. coli* BL21 (DE3)- pBAD/His A- *bont/HcC1* y *E. coli* BL21 (DE3)- pBAD/His A- *bont/HcC2*, se procedió evaluando las condiciones de expresión, a modo de obtener el mejor rendimiento en cuanto a cantidad de proteína producida.

Las condiciones que se mantuvieron constantes fueron, temperatura y agitación, la concentración de inductor L-arabinosa, es el único factor que variamos para evaluar la expresión.

Se estudiaron entonces tres concentraciones diferentes de L-arabinosa: 0,2%; 0,002%; 0,00002%.

Al mismo tiempo, se buscó determinar con que conformación se expresaba la proteína, es decir si de forma soluble o como cuerpos de inclusión.

Para esto, se analizaron las muestras de las dos fases obtenidas al finalizar el protocolo de lisis celular, fase soluble (sobrenadante) y fase insoluble (pellet). Este análisis se realizó corriendo las muestras obtenidas en geles de poliácridamida SDS-PAGE 12%.

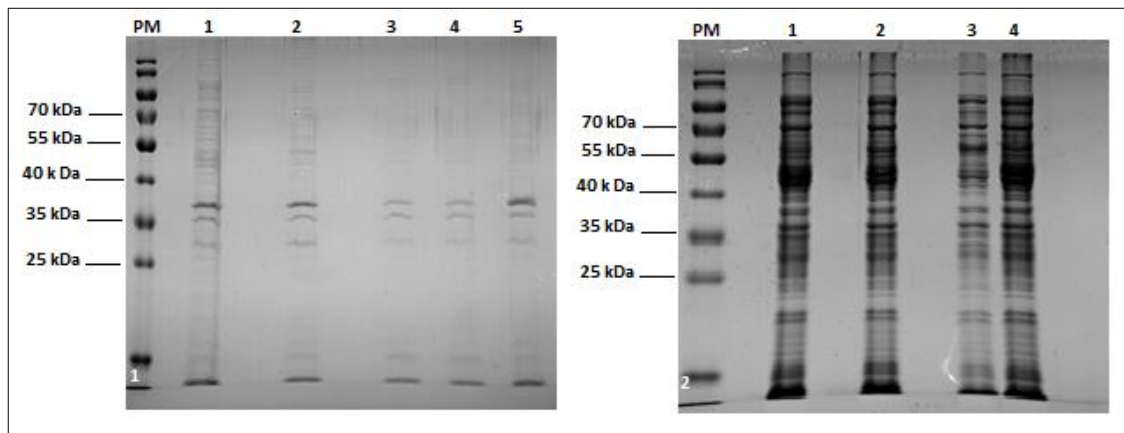


Figura 9: Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 12% para la evaluación de diferentes concentraciones inductor en cultivo *E. coli* BL21 (DE3)- pBAD/His A- *bont/HcC1*. (1) Fracción insoluble obtenida de la lisis celular, de izquierda a derecha se observa el marcador de peso molecular (PM), las muestras de los cultivos celulares con las diferentes condiciones de inductor 0,00002%, 0,002%, 0,2%(repetido) en los carriles del 1 al 4. En el carril 5 se encuentra en control sin inductor. (2) Fracción soluble obtenida de la lisis celular de las mismas muestras, de izquierda a derecha se observa el marcador de peso molecular (PM), las diferentes condiciones de inductor en los carriles del 1 al 3 y el control sin inductor en el carril 4.

El peso molecular de la proteína HcC1, es de aproximadamente 50 kDa, en el caso de la fracción insoluble, no se encuentra ninguna banda de expresión de este tamaño, en ninguna condición (Figura 9). En el caso de la fracción soluble, si se observaron bandas de expresión (Figura 9), la fracción soluble es mucho más compleja de proteínas que la insoluble, por lo que es difícil discernir cual es HcC1, aunque se conozca su peso molecular. De igual manera, se consideró que no hay inducción de la expresión, porque todos los carriles de condiciones de inductor se observan igual que el carril de control, por lo que no hay bandas de sobreexpresión.

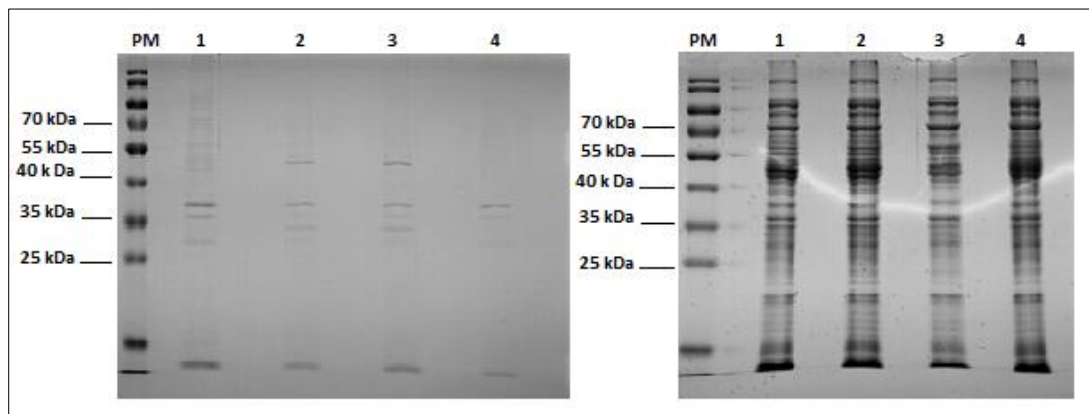


Figura 10: Electroforesis SDS-PAGE en gel de poliacrilamida 12% para la evaluación de diferentes concentraciones inductor en cultivo *E. coli* BL21 (DE3)- pBAD/His A- *bont/HcC2*. (1) Fracción insoluble obtenida de la lisis celular, de izquierda a derecha se observa el marcador de peso molecular (PM), las muestras de los cultivos celulares con las diferentes condiciones de inductor 0,00002%, 0,002%, 0,2% en los carriles del 1 al 3. En el carril 5 se encuentra en control sin inductor. (2) Fracción soluble obtenida de la lisis celular de las mismas muestras, de izquierda a derecha se observa el marcador de peso molecular (PM), las diferentes condiciones de inductor en los carriles del 1 al 3 y el control sin inductor en el carril 4.

La proteína HcC2, tiene un peso de 50 kDa aproximadamente, en el caso de la fracción insoluble, se observó una banda de sobreexpresión para los carriles 2 y 3 (Figura 10), que corresponden con las concentraciones de L-arabinosa 0,002 % y 0,2 %. En el caso de la fracción insoluble, sucedió lo mismo que para la proteína HcC1, se puede llegar a considerar que hubo expresión basal de la proteína de interés, pero no se sobre expreso, ya que no hubo diferencias entre los carriles inducidos y el carril del control sin inducir.

Un dato no menor, es que también se observó (Figura 10) la sobreexpresión de una proteína de menor tamaño, aproximadamente 30 kDa.

Este análisis arrojó resultados importantes. Primero que nada, se detectó cuál de las estrategias de clonado funciona, y fue la número 2. También se observó que, en esta estrategia, la proteína se expresa en forma de cuerpos de inclusión, por lo que es necesario establecer un protocolo de solubilización de la proteína.

También nos permite determinar la concentración óptima de inductor, al ser dos las variantes, y parecer que no influyen en la cantidad de proteína obtenida, se decide utilizar una concentración de arabinosa intermedia. Es decir, la menor concentración a la que hubo inducción fue 0,002% y la mayor testeada y con la que hubo inducción de la expresión fue 0,2%, entonces se decidió trabajar con una concentración de L-arabinosa de 0,02%.

4.7 Curva de crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3)- pBAD/His A- *bont/HcC2*

Una vez que se obtuvo la cepa de expresión recombinante, confirmada su transformación y confirmada la expresión de la proteína de interés, se procedió a evaluar el crecimiento de esta, con y sin inductor.

Para ello se realizó una curva de crecimiento celular en matraz, la cual consistió en el cultivo de las células, durante aproximadamente 10 h, tomando medidas de la OD a 600 nm, cada 30 min. La curva de crecimiento se realizó en tres matraces, dos de ellos sin ser inducidos, y uno inducido a OD 600 nm igual a 0,4, con 0,02% de L-arabinosa.

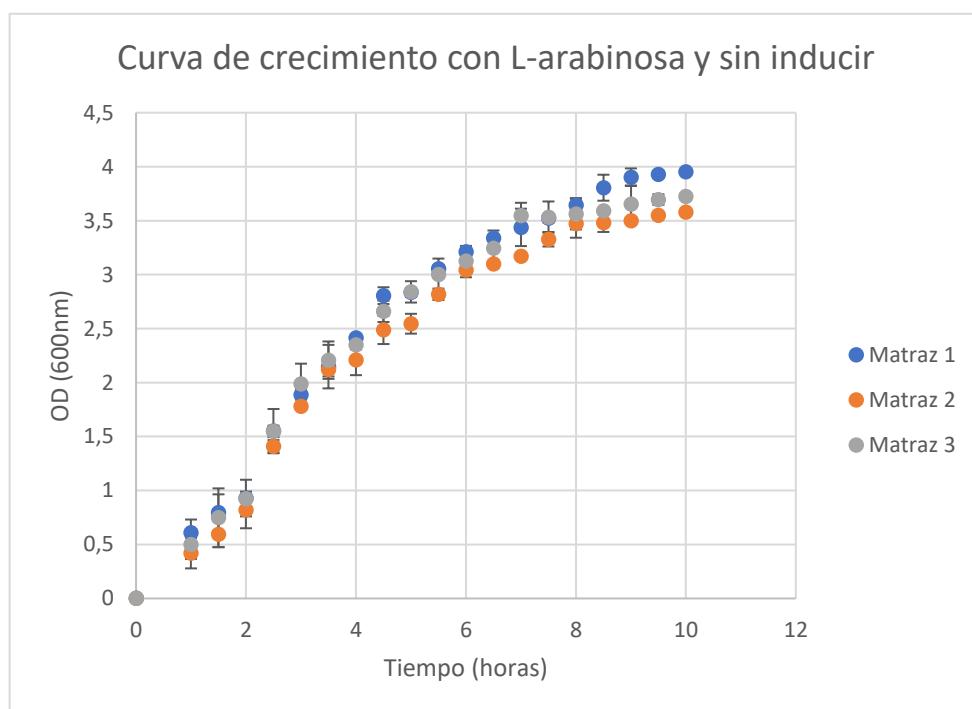


Figura 11: Curva de crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3)- pBAD/His A- *bont/HcC2*, con la adición de inductor y sin el mismo. Se tomaron medidas de OD 600 nm cada media hora, hasta llegar a la fase de meseta. Los matraces 1 y 3 no tienen inductor, mientras que el matraz 2, fue inducido con el agregado de L-arabinosa.

Las tres curvas que se pueden ver en la Figura 11, se comportan de la misma forma, lo que nos da la pauta de que la adición del inductor, no modificó el comportamiento de su crecimiento, tampoco lo hizo el trabajo extra que está realizando al expresar la proteína HcC2.

4.8 Western Blot anti His-tag de HcC2.

El Western Blot, es una técnica sencilla que sirve para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas.

En este caso, se buscó identificar la proteína HcC2, por el reconocimiento de esta con un anticuerpo primario anti-His-tag. Este reconocimiento no es de los más específicos, ya que pueden existir otras proteínas que naturalmente se expresen con histidinas que puedan ser reconocidas por el anticuerpo. De igual manera es lo suficientemente específico para el ensayo en cuestión.

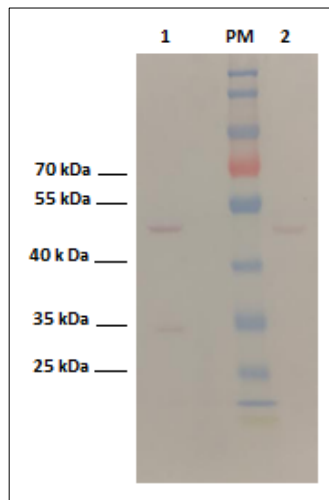


Figura 12: Western Blot con anti-His-tag para el reconocimiento de la His-tag de HcC2. En el carril 1 se sembró una muestra de la fase insoluble de la lisis celular de *E. coli* BL21 (DE3)- pBAD/His A- *bont/HcC2*, inducida con 0,02%. En el carril 2, se sembró la fase soluble de la lisis celular de la misma muestra que el carril 1.

El Western Blot fue útil como método de confirmación de que la proteína que se está sobre expresando en la fase insoluble es HcC2 (50 kDa). Además, hubo reconocimiento de la proteína más pequeña (30 kDa) que se había sobre expresado anteriormente, lo que indica que puede traer problemas al momento de la purificación.

De igual manera, se puede tratar de un producto de degradación de HcC2, un fragmento de esta que no completo su síntesis, en este caso, por más que no se pueda purificar completamente HcC2, puede no afectar la pureza de la muestra.

5 CONCLUSIONES

En este trabajo se logró obtener construcciones del plásmido pBAD/His A, con el gen *bont/HcC* en sus dos variables dependiendo de las estrategias propuestas.

También fue posible estudiar la expresión en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, dependiendo de la construcción que contenía y la mejor concentración de inductor para la expresión. Se pudo determinar cuál de las estrategias planteadas fue la efectiva.

Se estudio el comportamiento de las células ante la presencia/ ausencia del L- Arabinosa, útil para la optimización de los tiempos de producción.

En cuanto al desarrollo de un proceso simple, seguro y eficiente de expresión de Hc recombinante, se considera que el proyecto no pudo concluir en este aspecto, pero los avances son sustancialmente prometedores.

6 PERSPECTIVAS A FUTURO

En vista a la información recolectada para la realización de este trabajo, creemos que sería interesante, poder llevar a cabo esta investigación para el fragmento Hc de la subunidad HC de la BoNT/D, ya que esta, también es señalada como causante del botulismo en bovinos.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Bermúdez TJI, Franca FS, Malaquin Dutra da Silveira CA. RESPUESTA DE ANTICUERPOS EN BOVINOS VACUNADOS CONTRA *Clostridium chauvoei*, USANDO UNA VACUNA COMERCIAL" 2013:1–42.
2. Cesar D. Enfermedades Clostridiales. Bienestar y Salud Anim. 2008;30(2):48–52.
3. Gil LAF, da Cunha CEP, Moreira MSG, Salvarani FM, Assis RA, Lobato FCF, Mendonça M, Dellagostin OA, Conceição FR. Production and Evaluation of a Recombinant Chimeric Vaccine against *Clostridium botulinum* Neurotoxin Types C and D. PLoS One. 2013;8(7):1–10. doi:10.1371/journal.pone.0069692
4. Pirazzini M, Rossetto O, Eleopra R, Montecucco C. Botulinum Neurotoxins: Biology, Pharmacology, and Toxicology. Pharmacol. Rev. 2017;69(2):200–235. doi:10.1124/pr.116.012658
5. Nacional- U, Colombi DE, Andr SSAN. Boletín técnico. 1971.
6. Brüggemann H. Genomics of clostridial pathogens: Implication of extrachromosomal elements in pathogenicity. Curr. Opin. Microbiol. 2005;8(5):601–605. doi:10.1016/j.mib.2005.08.006
7. Hackett G, Moore K, Burgin D, Hornby F, Gray B, Elliott M, Mir I, Beard M. Purification and characterization of recombinant botulinum neurotoxin serotype FA, also known as serotype H. Toxins (Basel). 2018;10(5). doi:10.3390/toxins10050195
8. Kroken AR, Karalewitz APA, Fu Z, Baldwin MR, Kim JJP, Barbieri JT. Unique ganglioside binding by botulinum neurotoxins C and D-SA. FEBS J. 2011;278(23):4486–4496. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08166.x
9. Prévot V, Tweepenninckx F, Van Nerom E, Linden A, Content J, Kimpe A. Optimization of polymerase chain reaction for detection of *Clostridium botulinum* type C and D in bovine samples. Zoonoses Public Health. 2007;54(8):320–327. doi:10.1111/j.1863-2378.2007.01070.x
10. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología médica. 9th ed. Editorial Medica Panamericana, editor. 2013. doi:B. 22092 - 2013
11. Ortiz AD, Benavides E. EPIDEMIOLOGÍA, DIAGNÓSTICO Y CONTROL DEL BOTULISMO BOVINO EN COLOMBIA Autor: Diego Ortiz, Efraín Benavides Introducción. 1990;(May 2014).
12. Ferreira MRA, Moreira MSG, Da Cunha CEP, Mendonça M, Salvarani FM, Moreira ÂN, Conceição FR. Recombinant Alpha, Beta, and Epsilon toxins of *Clostridium perfringens*: Production strategies and applications as veterinary vaccines. Toxins (Basel). 2016;8(11). doi:10.3390/toxins8110340
13. Moreira C, da Cunha CEP, Moreira MSG, Mendonça M, Salvarani FM, Moreira ÂN, Conceição FR. Protective potential of recombinant non-purified botulinum neurotoxin serotypes C and D. Anaerobe. 2016;40:58–62. doi:10.1016/j.anaerobe.2016.05.012
14. Dutra IS, Döbereiner J, Rosa I V., Souza LAA, Nonato M. Surtos de botulismo em bovinos no Brasil associados à ingestão de água contaminada. Pesqui. Vet. Bras. 2001;21(2):43–48. doi:10.1590/S0100-736X2001000200002
15. Dutra IS, Döbereiner J, Souza AM. Botulismo em bovinos de corte e leite alimentados com cama de frango. Pesqui. Vet. Bras. 2005;25(2):115–119. doi:10.1590/S0100-

16. Botulismo ha matado 16 mil reses. Red. el tiempo. 1999.
17. Payne JH, Hogg RA, Otter A, Roest HJJ, Livesey CT. Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001 to 2009), associated with exposure to broiler litter. *Vet. Rec.* 2011;168(24):640. doi:10.1136/vr.d1846
18. Böhnel H, Neufeld B, Gessler F. Botulinum neurotoxin type B in milk from a cow affected by visceral botulism. *Vet. J.* 2005;169(1):124–125. doi:10.1016/j.tvjl.2004.01.006
19. Domínguez A, Polanco R, Cossío G. Current trends and perspectives in veterinary vaccine production. *Biotechnol. Appl.* 2012;196(3):196–203.
20. Moore RJ, Adams V, Rood JI, McClane BA, Wisniewski JA, Li J, Uzal FA. Virulence Plasmids of Spore-Forming Bacteria. *Microbiol. Spectr.* 2014;2(6):1–24. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0024-2014
21. Pittaluga L, Snoeck M. Animal vaccines in Uruguay: a truncated discovery process. 2012. doi:10.2139/ssrn.2080388
22. Smith TJ, Hill KK, Raphael BH. Historical and current perspectives on *Clostridium botulinum* diversity. *Res. Microbiol.* 2015;166(4):290–302. doi:10.1016/j.resmic.2014.09.007
23. Gifre L, Arís A, Bach À, Garcia-Fruitós E. Trends in recombinant protein use in animal production. *Microb. Cell Fact.* 2017;16(1):1–18. doi:10.1186/s12934-017-0654-4
24. Moreira GMSG, Cunha CEP, Salvarani FM, Gonçalves LA, Pires PS, Conceição FR, Lobato FCF. Production of recombinant botulism antigens: A review of expression systems. *Anaerobe.* 2014;28:130–136. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.06.003
25. Porro D, Gasser B, Fossati T, Maurer M, Branduardi P, Sauer M, Mattanovich D. Production of recombinant proteins and metabolites in yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011;89(4):939–948. doi:10.1007/s00253-010-3019-z
26. Smith LA. Botulism and vaccines for its prevention. *Vaccine.* 2009;27(SUPPL. 4):33–39. doi:10.1016/j.vaccine.2009.08.059
27. Arimitsu H, Lee J, Sakaguchi Y, Hayashi M, Nakaura M, Takai H, Lin S, Mukamoto M, Murphy T, Hayakawa Y, et al. Vaccination with Recombinant Whole Heavy Chain Fragments of *Clostridium botulinum* Type C and D Neurotoxins Vaccination with Recombinant Whole Heavy Chain Fragments of *Clostridium botulinum* Type C and D Neurotoxins. 2004;11(3):496–502. doi:10.1128/CDLI.11.3.496
28. Cunha CEP, Moreira GMSG, Salvarani FM, Neves MS, Lobato FCF, Dellagostin OA, Conceição FR. Vaccination of cattle with a recombinant bivalent toxoid against botulism serotypes C and D. *Vaccine.* 2014;32(2):214–216. doi:10.1016/j.vaccine.2013.11.025
29. Quax TEF, Claassens NJ, Söll D, van der Oost J. Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. *Mol. Cell.* 2015;59(2):149–161. doi:10.1016/j.molcel.2015.05.035
30. Menzella HG, Gramajo HC, Ceccarelli EA. High recovery of prochymosin from inclusion bodies using controlled air oxidation. *Protein Expr. Purif.* 2002;25(2):248–255. doi:10.1016/S1046-5928(02)00006-2

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1: Electrocompetent cells protocol

Day 1

Streak out frozen glycerol stock of bacterial cells (Top 10, DH5 α , etc.) onto an LB plate (no antibiotics). Grow plate overnight at 37°C.

Day 2

Autoclave: 2 L of ddH₂O 100 mL of 10% v/v glycerol (molecular biology grade) 1 L LB (or your preferred media) 4 centrifuge bottles and caps Lots of microfuge tubes.

Chill overnight at 4°C: ddH₂O 10% glycerol Centrifuge rotor.

Prepare starter culture of cells Select a single colony of E. coli from fresh LB plate and inoculate a 10 mL starter culture of LB (or your preferred media). Grow culture at 37°C in shaker overnight.

Notes: You can also substitute other media like SOB, 2xYT, etc. for LB if preferred. All glassware should be detergent free. Trace detergent residue reduces competency.

Day 3

Inoculate 1 L of LB media with 10 mL starter culture and grow in 37°C shaker. Measure the OD₆₀₀ every hour, then every 15-20 minutes when the OD gets above 0.2.

When the OD₆₀₀ reaches 0.35-0.4, immediately put the cells on ice.

Chill the culture for 20-30 minutes, swirling occasionally to ensure even cooling. Place centrifuge bottles on ice at this time. IMPORTANT NOTES: • It is important not to let the OD get any higher than 0.4. The OD should be carefully monitored and checked often, especially when it gets above 0.2, as the cells grow exponentially. It usually takes about 3 hours to reach an OD of 0.35 when using a 10 mL starter culture. • It is also very important to keep the cells at 4°C for the remainder of the procedure.

The cells, and any bottles or solutions that they come in contact with, must be pre-chilled to 4°C.

(Spin #1) Split the 1 L culture into four parts by pouring about 250 mL into ice cold centrifuge bottles. Harvest the cells by centrifugation at 1000g (~2400 rpm in the Beckman JA-10 rotor) for 20 minutes at 4°C. Decant the supernatant and resuspend each pellet in 200 mL of ice cold ddH₂O.

(Spin #2) Harvest the cells by centrifugation at 1000g (~2400 rpm in the Beckman JA-10 rotor) for 20 minutes at 4°C. Decant the supernatant and resuspend each pellet in 100 mL of ice cold ddH₂O.

(Spin #3) Combine resuspensions into 2 centrifuge bottles (so each contains about 200 mL of cell suspension). Harvest the cells by centrifugation at 1000g (~2400 rpm in the Beckman JA-10 rotor) for 20 minutes at 4°C. At this step, rinse two 50 mL conical tubes with ddH₂O and chill on ice.

Decant the supernatant and resuspend each pellet in 40 mL of ice cold 10% glycerol. Transfer each suspension to a 50 mL conical tube. Harvest the cells by centrifugation at 1000g (~2100 rpm in the Beckman GH-3.8 rotor) for 20 minutes at 4°C.

Start putting 1.5 mL microfuge tubes on ice if not already chilled.

Carefully aspirate the supernatant with a sterile Pasteur pipette (pellets lose adherence in 10% glycerol).


Resuspend each pellet in 1 mL of ice cold 10% glycerol by gently swirling. The final OD₆₀₀ of the resuspended cells should be ~ 200-250.

Aliquot into sterile 1.5 mL microfuge tubes and snap freeze with liquid nitrogen. Store frozen cell in the -80°C freezer.

8.2 Anexo 2: Protocolo de inducción de expresión pBAD/His A

Pilot Expression

Remember to include the appropriate negative and positive controls to evaluate your expression experiment.

1. For each transformant or control, inoculate 2 ml of SOB or LB medium containing 50 µg/ml ampicillin with a single recombinant *E. coli* colony.
If you are using LMG194 as a host, use RM medium containing glucose and 50–100 µg/ml ampicillin.
2. Grow overnight at 37°C with shaking (225–250 rpm) to OD₆₀₀ = 1–2.
3. The next day, label five tubes 1 through 5 and add 10 ml of SOB or LB containing 50 µg/ml ampicillin. 
4. Inoculate each tube with 0.1 ml of the overnight culture.
5. Grow the cultures at 37°C with vigorous shaking to an OD₆₀₀ = ~0.5 (the cells should be in mid-log phase).
6. While the cells are growing, prepare four 10-fold serial dilutions of 20% L-arabinose with sterile water and aseptic (e.g., 2%, 0.2%, 0.02%, and 0.002%).
7. Remove a 1 ml aliquot of cells from each tube, centrifuge at maximum speed in a microcentrifuge for 30 seconds, and aspirate the supernatant.
8. Freeze the cell pellet at –20°C. This is the zero time point sample.
9. Add L-arabinose to the five 10 ml cultures as follows:

Tube	Volume (ml)	Stock Solution	Final Concentration
1	0.1	0.002%	0.00002%
2	0.1	0.02%	0.0002%
3	0.1	0.2%	0.002%
4	0.1	2%	0.02%
5	0.1	20%	0.2%

10. Grow at 37°C with shaking for 4 hours.
11. Take 1 ml samples at 4 hours and treat as in Step 7 and 8.

Figura 13: Protocolo de expresión de pBAD/His A. Proporcionado por el fabricante.

8.3 Anexo 3: Tratamiento de muestras para SDS-PAGE

Para el caso de las muestras líquidas se toman 20 µL de muestra, se agregan 5µL de buffer de carga reductor de proteínas 6 x y se incuba durante 10 min a 95 °C, la muestra queda pronta para sembrarse.

A una punta de espátula de pellet, se le colocan 100 µL de SDS 10 % y se incuba 10 min a 95 °C. De esta solución se tomaron 20 µL y se le agregó 5µL de buffer de carga de proteínas 6x. Se calienta nuevamente durante 10 min a 95°C y la muestra queda pronta para sembrarse.