



# Expresión heteróloga de la versión trunca de enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2)

Guillermo Almanza Rodríguez<sup>1,2\*</sup> , Domingo Ezequiel Tobón Pérez<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Estudiante de Ingeniería Bioquímica. <sup>2</sup>Tecnológico Nacional de México en Celaya, Guanajuato, México.

\*Email: [gamarod@gmail.com](mailto:gamarod@gmail.com)

14 de octubre de 2023

DOI: <http://doi.org/10.5281/zenodo.10005131>

**Editado por:** Jesús Muñoz-Rojas (Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).

**Revisado por:** Vianey Marín-Cevada (Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México).

## Colección de ESMOS

### Resumen

La pandemia de COVID-19, causada por el virus SARS-CoV-2, ha impulsado la realización de numerosos estudios y experimentos con el objetivo de comprender mejor la enfermedad y desarrollar estrategias para su control. En este sentido, se han llevado a cabo investigaciones



dirigidas a entender el funcionamiento del virus y su interacción con el huésped. Estos esfuerzos han permitido avanzar en el desarrollo de vacunas y fármacos para hacer frente a la enfermedad.

Una de las estrategias iniciales y más importantes es el estudio de la interacción con el receptor del virus. Se sabe que la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2, por sus siglas en inglés) es la molécula receptora del virus. Por su parte el SARS-CoV-2 interactúa por medio de un dominio de unión a receptor (RBD, por sus siglas en inglés) el cuál, es el responsable de la interacción con el receptor. Comprender esta interacción es fundamental para el diseño de fármacos que puedan prevenir la unión entre el virus y su receptor. Para ello, se han utilizado diferentes enfoques, que incluyen el estudio tanto de versiones completas del receptor como de versiones truncadas, las cuales representan formas parciales o modificadas del receptor.

En el presente reporte se describe el procedimiento de expresión y purificación de una versión truncada del receptor ACE2, producida de manera recombinante en células *E. coli*. Se generó la construcción pET28b(+)-tACE2 al insertar una porción del gen del receptor ACE2 en el plásmido pET-28b(+), y posteriormente se clonó este vector en células *E. coli* DH5 $\alpha$ . La expresión de la proteína tACE2 se realizó en células *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3). Posteriormente, se emplearon técnicas de desnaturalización con urea y cromatografía de columna de afinidad con resina de níquel, seguidas de técnicas de diálisis para el replegamiento de la versión truncada del ACE2 (tACE2).

**Palabras clave:** COVID-19; SARS-CoV-2; angiotensina 2; RBD, ACE2 recombinante.

## Introducción

La enfermedad COVID-19 provocada por el virus del SARS-CoV-2 originó una pandemia a nivel global, para la que ha sido necesaria la investigación profunda de este virus y proponer estrategias para combatir la enfermedad. Los estudios realizados en el mecanismo de infección han sido de suma importancia para entender cómo el virus infecta al huésped, se sabe que la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) está implicada en el mecanismo de infección del virus. La

interacción entre el virus y el receptor *ACE2* se lleva a cabo a través de la proteína de espícula, conocida como “Spike” en inglés (se utilizará este nombre en el presente trabajo). Esta interacción implica 13 enlaces de hidrógeno, dos puentes salinos y fuerzas de Van der Waals [1]. Como resultado de esta interacción, se produce un cambio conformacional de la proteína Spike, provocando la fusión de la membrana viral con la membrana celular. Esta fusión permite la introducción del genoma viral en la célula y posteriormente el uso de la maquinaria de la célula huésped.

A partir de estos estudios, se han propuesto inhibidores que impidan la unión de la proteína Spike con el receptor *ACE2*, con el objetivo de prevenir la enfermedad. La producción controlada de ambas estructuras proteicas y el análisis de su interacción representan uno de los principales retos para los laboratorios con poca infraestructura. Una estrategia prometedora es la producción de estas proteínas en células procariotas, como las bacterias, debido a su manejo sencillo y su bajo costo. Estas células pueden sintetizar la proteína *ACE2* y permitir futuras pruebas de inhibición mediante ensayos moleculares. En este proyecto, se propone un método mediante el cual sea posible la producción de la proteína *ACE2* en su versión truncada “*tACE2*” por medio del sistema pET. Las bacterias *E. coli* han sido ampliamente estudiadas y se producen a nivel industrial, lo que las convierte en una excelente opción para la producción de proteínas recombinantes con el propósito mencionado.

Se emplearon cepas quimiocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3), para llevar a cabo la clonación del plásmido y expresión de la proteína *tACE2*, respectivamente. Los cuerpos de inclusión se obtuvieron mediante la inducción con IPTG y se extrajeron mediante sonicación. Posteriormente, la proteína desnaturalizada fue purificada utilizando cromatografía de columna de afinidad con resina de níquel. Luego, se procedió a su replegamiento mediante el uso de buffers con concentraciones decrecientes de urea. Finalmente, se concentró la proteína utilizando ultrafiltración.

## Descripción de la organización y del área en que trabajó el estudiante

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos. Laboratorio de Bioquímica Estructural de Proteínas a cargo del investigador: Dr. Enrique Rudiño Piñera. Asesor externo encargado de este proyecto de residencias, estudiante de doctorado: M.C. Domingo Ezequiel Tobón Pérez. Este trabajo se presentó como Memorias de Residencias Profesionales en el Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Celaya. Asesor interno: Dr. Humberto Ramírez Medina.

## Planteamiento del Problema

La expresión de proteínas recombinantes en organismos no relacionados es útil para su producción a gran escala, usar bacterias como organismos de producción se ha vuelto una práctica común en la industria y ha favorecido los análisis en diversos ensayos moleculares, como las pruebas de inhibición. Sin embargo, esta técnica de expresión de genes heterólogos se enfrenta a diversas complicaciones, a nivel genómico, la mayoría de las bacterias no cuentan algunos tRNAs (RNAs de transferencia) necesarios para la correcta traducción de mRNAs (RNAs mensajeros) de organismos eucariontes. Además, una vez traducida la proteína, debe mantenerse su estabilidad evitando ser degradada, las técnicas para su extracción y purificación deben de ser cuidadosas. Finalmente, la proteína debe volver a su forma original o lo más cercana a ella, el proceso de replegamiento es fundamental para que las pruebas de inhibición sean eficientes, mientras más simple sea la estructura proteica, el replegamiento será más sencillo.

En el presente trabajo se detalla la producción heteróloga de la proteína truncada de ACE2, el interés de una versión truncada funcional de este receptor del virus SARS-CoV-2 es importante para su producción a gran escala y para realizar pruebas de inhibición para la propuesta de nuevos fármacos contra el virus. Este trabajo se basó en la investigación de Gao *et al.*, (2021) [2]. Nuestra metodología y resultados son comparaciones de su trabajo original.

## Objetivos

### Objetivo general:

Desarrollar un método para expresar de manera heteróloga la versión trunca del receptor *ACE2* en células de *E. coli*.

### Objetivos específicos:

- a) Diseñar los cebadores necesarios para amplificar la porción específica del gen *ACE2* de interés y llevar a cabo la amplificación del gen. Posteriormente, insertar el gen amplificado en el vector pET-28b(+) para generar la construcción pET28b(+)-*tACE2*.
- b) Realizar la transformación de células *E. coli* DH5 $\alpha$  con el vector pET-28b(+)-*tACE2* para llevar a cabo la clonación del mismo. Asimismo, transformar células *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) con el vector pET-28b(+)-*tACE2* para permitir la expresión de la proteína *tACE2*.
- c) Llevar a cabo la purificación de la proteína *tACE2* y evaluar su producción mediante el uso de SDS-PAGE. Comparar los resultados obtenidos con el estudio realizado por Gao *et al.* en 2021 [2], para verificar la calidad y cantidad de la proteína producida.

## Justificación

La enzima convertidora de angiotensina 2 (*ACE2*) desempeña un papel crucial como receptor en la interacción con el dominio de unión al receptor *RBD* del coronavirus SARS-CoV-2. Desde el inicio de la pandemia, el estudio de la interacción entre estas proteínas ha sido fundamental para proponer estrategias de inhibición y desarrollar opciones farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad COVID-19. Por ello tanto, es de suma importancia poder expresar la enzima *ACE2* de manera rápida, económica y confiable.

Normalmente, la producción de *ACE2* se realiza en células eucariotas, ya que las glicosilaciones desempeñan un papel importante en la interacción con el *RBD*. Sin embargo, la mayoría de las interacciones ocurren entre residuos específicos. Por lo tanto, tener la versión

truncada de ACE2 (*tACE2*) sin glicosilaciones, pero conservando el sitio de unión al RBD podría ser muy útil para realizar análisis estructurales de la interacción. En este proyecto, se explora la viabilidad de producir *tACE2* en células procariontas, específicamente en *E. coli*, como una alternativa prometedora.

## Capítulo I. Antecedentes

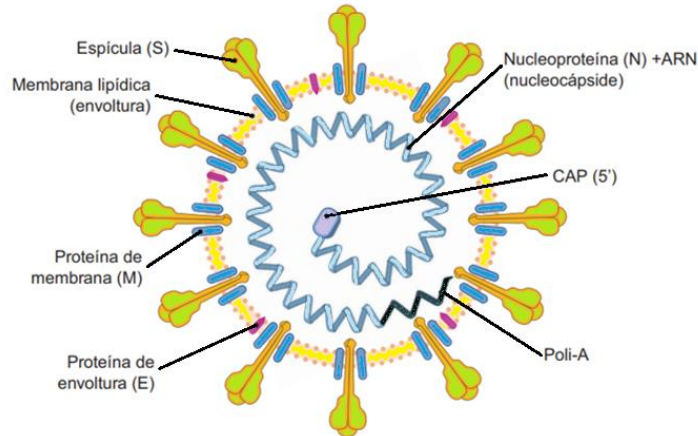
### 1.1. Historia del SARS-CoV-2

Los coronavirus son miembros de la subfamilia *Coronavirinae* de la familia *Coronaviridae* y del orden *Nidovirales* (Comité Internacional de Taxonomía de Virus), causan infecciones intestinales y respiratorias en animales y humanos [3]. Dentro de los coronavirus humanos (HCoV), se incluyen el HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 y HCoV-HKU1, los cuales están asociados con resfriados comunes, pero también pueden ocasionar enfermedades graves como neumonía y bronquiolitis con altas tasas de morbilidad [4]. Además, existen dos coronavirus que han causado preocupación a nivel mundial. El primero es el síndrome respiratorio agudo severo (SARS)-CoV, que pertenece al género *Betacoronavirus* y al subgénero *Sarbecovirus*. Este virus fue detectado en la provincia de Guangdong, China, entre los años 2002 y 2003, y se considera altamente peligroso [3]. El segundo es el síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS-CoV), que también pertenece al género *Betacoronavirus* y al subgénero *Merbecovirus*. Fue detectado por primera vez en Arabia Saudita en 2012 y ha causado un brote importante en Corea del Sur en 2015, con un total de 2494 muertes [5]. A finales de 2019, la Organización Mundial de la Salud emitió una alerta de pandemia global debido a la aparición de un nuevo virus identificado como SARS-CoV-2, originado en la ciudad de Wuhan, China [6].

### 1.2. Estructura viral

La estructura del virión del SARS-CoV-2 se compone de una envoltura de membrana lipídica que alberga proteínas importantes para el proceso de infección en el organismo huésped, tales son la proteína de membrana (M), proteína de envoltura (E) y la proteína Spike (Figura 1). En el interior del virus se encuentra el material genético de tipo RNA

positivo, destacando una cola Poli-A en el extremo 3' y una estructura *cap* en el extremo 5', estos le dan la función de un RNA mensajero [6].

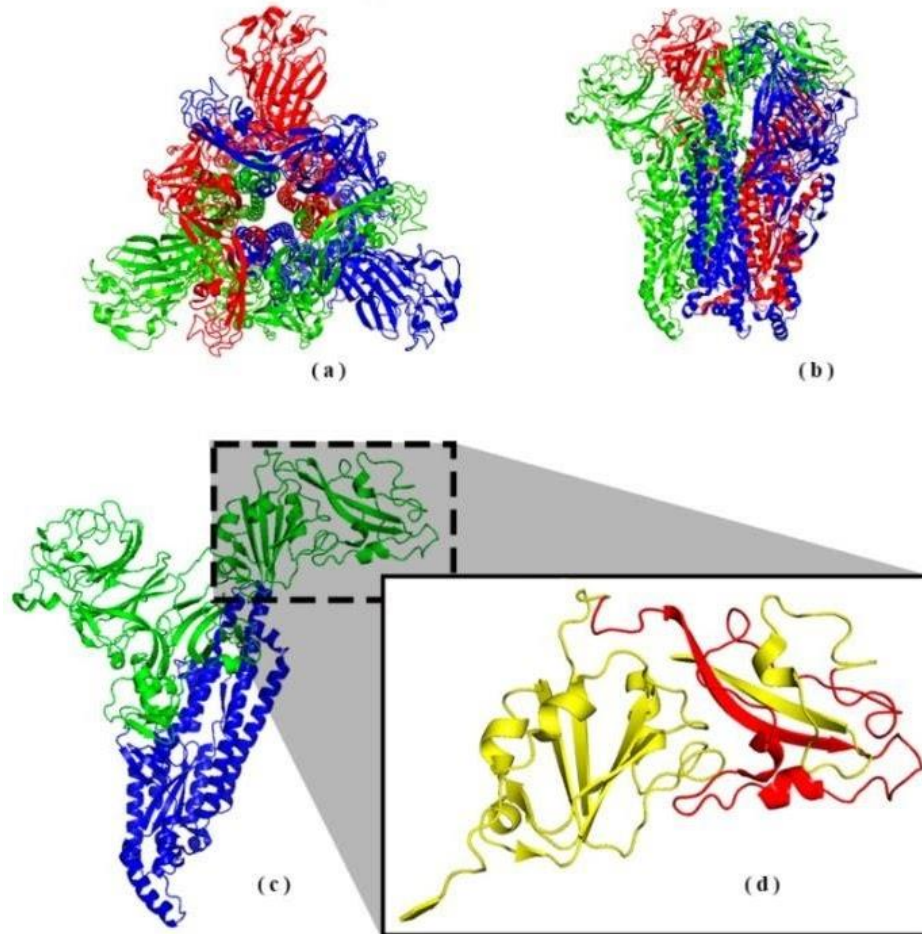


**Figura 1.** Estructura del virión de SARS-CoV-2. Extraída de Santos-López *et al.* (2021) [6].

### 1.2.1. Estructura de la proteína Spike

La proteína Spike del SARS-CoV-2 es una proteína homotrimérica donde cada monómero tiene un peso molecular de 180 kDa (Figura 2a-b), esta proteína se encuentra glicosilada en su forma nativa y posee dos subunidades S1 y S2. La subunidad S1 (residuos 14 – 685), contiene un dominio N-terminal (residuos 14 – 305), un dominio de unión al receptor conservado (*RBD*) (residuos 319 – 541) que contiene un núcleo y un motivo de unión al receptor (*RBM*, por sus siglas en inglés) (residuos 437 – 508) (Figura 2c-d), encargado de la unión al receptor de enzima convertidora de angiotensina 2 (*ACE2*) [7, 8].

La subunidad S2 (residuos 686 – 1273) posee un dominio péptido fusión (FP) (residuos 788 – 806), dominios de repetición heptapéptido-1 (HR1) (residuos 912 – 984) y heptapéptido-2 (HR2) (residuos 1163 – 1213) y un dominio transmembrana (TM) (residuos 1213 – 1273), que permiten la fusión entre la membrana viral y la membrana de la célula huésped [9, 10].



**Figura 2.** Estructura de la proteína S extraída del protein data bank (PDB) (code: 3JCL) no glicosilada. a) Vista superior del trímero de la proteína S; b) Vista lateral del trímero de la proteína S; c) Estructura del monómero de la proteína S de ~1118 aa, el dominio S1 representado de color verde y el dominio S2 de color azul; d) Estructura del dominio *RBD*, de color rojo se representa el *RBM*. Elaboración propia usando los programas Pymol y Photoshop.

### 1.3. Receptor enzima convertidora de angiotensina 2 (*ACE2*)

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es un regulador de las funciones cardiovascular y renal. La enzima convertidora de angiotensina 2, *ACE2*, está implicada en la regulación del SRAA al llevar a cabo la degradación de la angiotensina II en angiotensina 1-7 y angiotensina I en 1-9. La angiotensina II, a través del receptor de la angiotensina II tipo 1, ejerce la función de vasoconstricción y la reabsorción de sodio en el túbulo renal. En contraste, al receptor de la

angiotensina II tipo 2 se le atribuyen los efectos opuestos, entre ellos, vasodilatadores y antiproliferativos [11]. La angiotensina tipo 1-7 es un vasodilatador que puede conferir efectos cardioprotectores al oponerse a las acciones de la angiotensina II, la angiotensina 1-9 es un péptido inactivo [12].

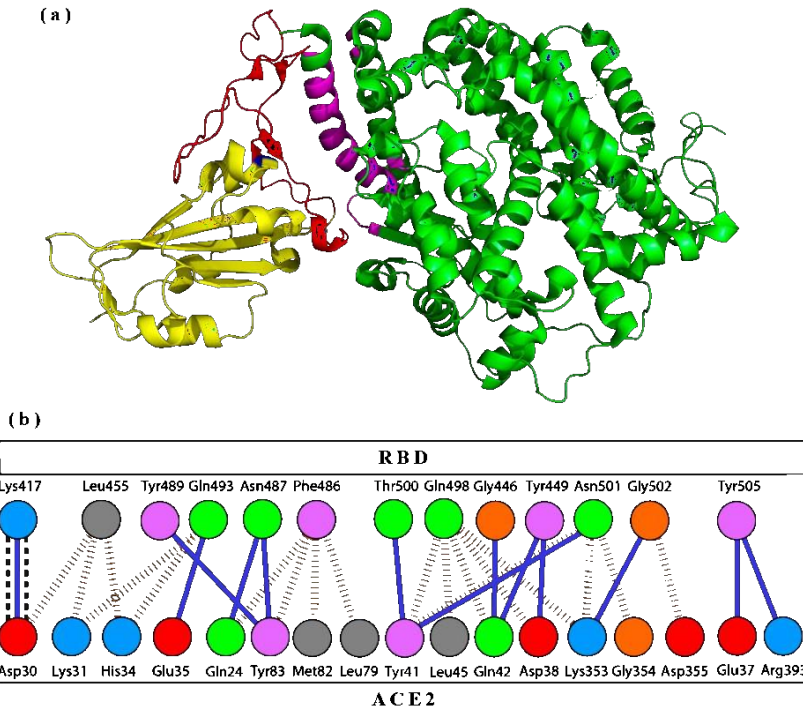
La estructura de la ACE2 se compone de aproximadamente 555 aa, predominando la estructura secundaria  $\alpha$ -hélice (Figura 3). Es una estructura glucosilada en su forma nativa, con un dominio transmembranal del residuo (2 - 20) [13]. Este receptor se encuentra en todo el tejido respiratorio, principalmente en los alveolos pulmonares, otros órganos son: corazón, riñón, estómago, vejiga, esófago e intestino [6, 14].



**Figura 3.** Estructura del receptor ACE2 humano extraída del PDB (code: 1R1X). Elaboración propia usando el programa Pymol.

### 1.3.1. Mecanismo de entrada del SARS-CoV-2 en la célula huésped

El complejo formado por el RBD con el ACE2 es el inicio del mecanismo de entrada del SARS-CoV-2 en la célula huésped (Figura 4a). Las interacciones descritas por Lan *et al.*, (2020) [1]; sugieren 2 puentes salinos de RBD con el ACE2 alejados del sitio RBM, 13 puentes de hidrógenos y 18 interacciones de Van der Waals (Figura 4b). El sitio de unión del ACE2 también se ha nombrado como (VBM, virus-binding motifs) [15]. El RBM forma una superficie cóncava que interactúa con la primera hélice larga convexa del VBM [16].



**Figura 4.** Estructura del complejo de unión del dominio RBD con ACE2. Extraída del PDB (code: 6M0J). (a) RBD, amarillo; RBM, en rojo; fuera del RBM, en azul; ACE2 en verde; VBMs, en magenta. (b) Enlaces salinos, líneas negras punteadas; puentes de hidrógeno, líneas azules; fuerzas de Van der Waals, líneas punteadas naranjas. Elaboración propia usando los programas Pymol, Photoshop e Illustrator.

La interacción entre el RBM y el receptor ACE2 desencadena un cambio conformacional en la proteína Spike, que luego promueve la fusión de la membrana entre la membrana viral y la membrana celular a través del dominio S2. El pH ácido en el entorno celular y las proteasas de cisteína endosomales ayudan a facilitar la fusión de membranas. Posteriormente se libera la nucleocápside viral en el citoplasma, el RNA genómico viral se traduce directamente en el ribosoma, comenzando con la traducción de dos marcos de lectura abiertos (ORF; por sus siglas en inglés) superpuestos, ORF1a y ORF1b, que codifican 16 proteínas no estructurales implicadas en la replicación del virus [6, 17].

#### 1.4. Estrategias biotecnológicas para combatir al virus SARS-CoV-2

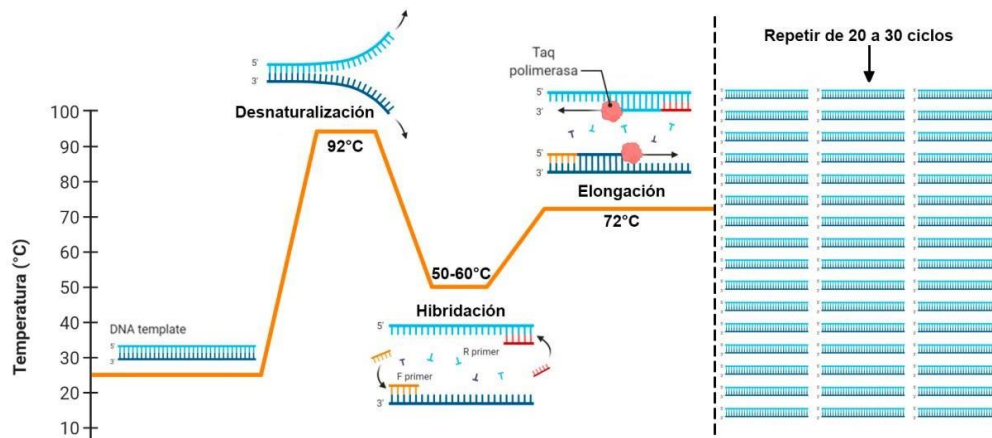
Al incrementar los estudios en la familia de virus *Coronaviridae* y conocer la complejidad del mecanismo de infección y replicación del SARS-CoV-

2, las estrategias más buscadas y desarrolladas han sido la creación de nuevas vacunas para reforzar el sistema inmunológico contra el mecanismo de infección. Uno de los enfoques principales fue el sitio *RBD*. Se ha descubierto que las vacunas basadas en *RBD* son altamente inmunogénicas, incluso cuando se expresa el sitio *RBD* en levaduras [18], lo que sugiere que se pliegan independientemente de otras partes de la proteína Spike y que el plegamiento es robusto en diferentes entornos de plegamiento. Sin embargo, es difícil establecer la cobertura a largo plazo de las vacunas [19].

### 1.5. Técnica de PCR

La técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) es una herramienta molecular utilizada para amplificar secuencias específicas de ADN en el laboratorio. Consiste en una serie de ciclos de calentamiento y enfriamiento controlados que permiten la replicación selectiva de la región de interés. En cada ciclo, se utilizan oligonucleótidos llamados cebadores, que son secuencias complementarias a regiones específicas del ADN que se desean amplificar. Esta técnica fue inventada por Kary B. Mullis, Emeryville, California, obteniendo el Premio Nobel en 1993 [20]. La técnica se conforma de ciclos repetitivos cada uno con 3 pasos; 1) Desnaturalización, 2) Hibridación y 3) Elongación o Extensión. En la etapa de extensión, una enzima llamada ADN polimerasa sintetiza nuevas cadenas de ADN utilizando los cebadores como iniciadores. Este proceso se repite varias veces, lo que resulta en una amplificación exponencial de la secuencia objetivo (Figura 5). Entre los diferentes tipos de ADN polimerasas existen las de alta fidelidad (*HF*, por sus siglas en inglés) que garantizan la correcta extensión de los fragmentos, estas se utilizan principalmente en la clonación y aquellas de baja fidelidad, comúnmente utilizadas en protocolos de verificación (PCR de colonia, por ejemplo).

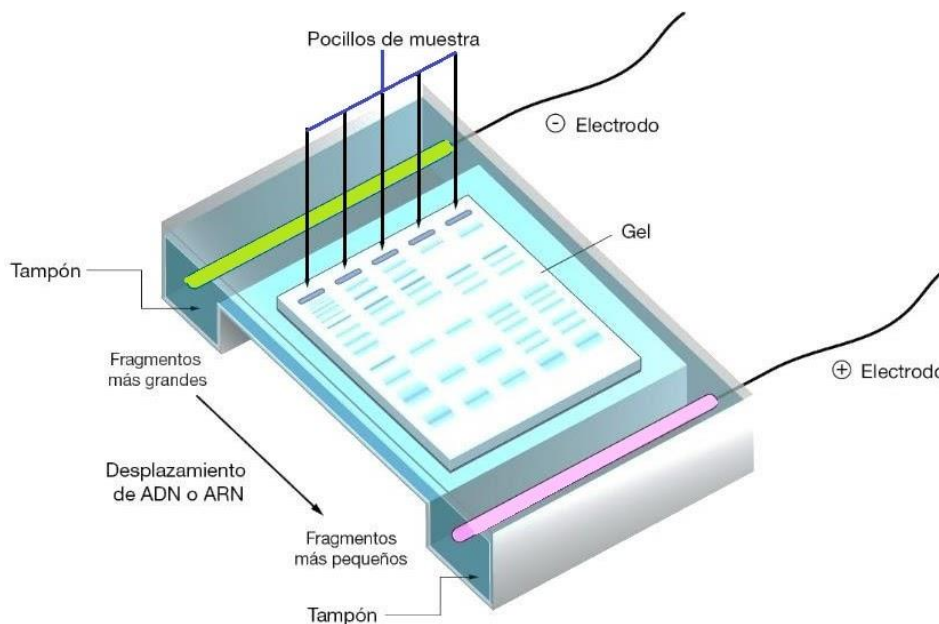
## Colección de ESMOS



**Figura 5.** Representación gráfica de los ciclos de una PCR. Elaboración propia usando el programa Photoshop.

### 1.5.1. Técnica de Electroforesis de DNA

La técnica de electroforesis de ADN es una herramienta utilizada para separar y analizar fragmentos de ADN en función de su tamaño y carga eléctrica. Consiste en la migración de los fragmentos de ADN a través de un gel de agarosa o poliacrilamida mediante la aplicación de un campo eléctrico (Figura 6). La electroforesis es excelente para la visualización de productos de PCR y cualquier fragmento de DNA que supere la cantidad de 20 pg [21].



**Figura 6.** Representación gráfica de una electroforesis de DNA. Fuente: National Human Genome Research Institute.

La técnica consiste en 4 pasos consecutivos, descrita por Fierro (2014) [21].

I) Preparación del gel de agarosa: existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican según su temperatura de disolución y solidificación, generalmente los productos estándar de agarosa se disuelven en su buffer entre los 90 – 95°C y solidifican entre 30 – 35 °C, se prepara la solución de agarosa en buffer, mientras más concentrada, mayor será la densidad del gel y los fragmentos que podrán pasar a través de ella serán de menor tamaño.

II) Preparación de las muestras, una vez purificada la muestra y separada en las alícuotas deseadas: se deben diluir con buffer de carga, este debe tener una alta densidad para que permita que la muestra se introduzca y permanezca en el pocillo del gel, además de contener colorantes que indiquen el frente de corrida de la electroforesis como medida para detener la técnica cuando el marcador vaya a salir del gel.

III) Carga de las muestras y corrida del gel: en algunos casos se recomienda calentar previamente las muestras a 65 °C durante 3-5 min y enfriarlas en hielo antes de cargarlas. Una vez solidificado el gel se coloca en la cámara de electroforesis (el DNA migra hacia el ánodo), se debe llenar la cámara con buffer de corrida hasta tapar el gel y posteriormente cargar las muestras en los pocillos.

IV) Tinción del gel y visualización del DNA: Se utiliza en una dilución en agua para el teñido del gel tras la electroforesis, existen diferentes alternativas de colorante para teñir el gel de agarosa, entre los más conocidos se encuentran el BrEt, SYBR (Gold, Green o Safe), los cuales tienen diferentes especificaciones y se clasifican principalmente por sensibilidad en la afinidad por en DNA, capacidad mutagénica y resolución. En algunos casos este paso es adicional, ya que existen protocolos de tinción donde se agrega el colorante a la solución de preparación del gel.

## 1.6. Técnicas de ingeniería genética en tratamientos contra SARS-CoV-2

Se ha mencionado previamente la importancia de desarrollar métodos de producción de proteínas recombinantes. Aunque esta técnica no es

novedosa, la creación de vectores de transformación para producir proteínas de interés en organismos competentes sigue siendo una de las opciones más rentables hasta la fecha [22].

Es crucial seleccionar un organismo competente que sea susceptible al proceso de transformación propuesto y que, idealmente, sea de bajo costo para permitir su escalado a nivel industrial. Las bacterias *Escherichia coli* pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae y al género *Escherichia*, son ampliamente conocidas y utilizadas en diversos procesos industriales para la producción de fármacos [22]. Entre las cepas de *E. coli* utilizadas para la clonación y expresión de proteínas se encuentran *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3).

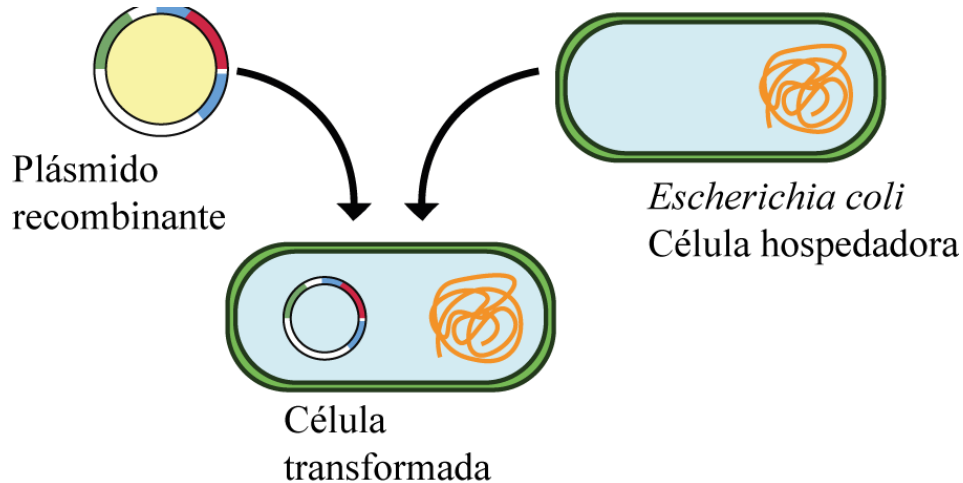
### 1.6.1. Vectores de expresión

Un vector biológico se define como un agente que transporta material infeccioso o externo desde un portador a un huésped, que puede ser un animal, insecto, bacteria o virus. Entre los vectores se encuentran los plásmidos que son elementos genéticos de ADN extracromosómicos presentes en la mayoría de las bacterias. Estos plásmidos se transfieren fácilmente entre bacterias del mismo género y familia. Además, suelen contener genes que les otorgan propiedades adaptativas y de supervivencia en condiciones ambientales adversas, como la presencia de antibióticos u otros compuestos perjudiciales para la bacteria [23].

### 1.7. Sistema pET y clonación en células DH5 $\alpha$

El sistema pET es una herramienta utilizada para clonar y expresar proteínas recombinantes en *E. coli* mediante el uso de un vector pET. En este sistema, la clonación de los genes de interés se realiza en un organismo huésped que carece de la RNA Polimerasa T7, como NovaBlue o DH5 $\alpha$ , lo que permite clonar y obtener múltiples vectores, sin expresar el gen de interés. Esto evita la intoxicación del organismo por la sobreexpresión de material externo. Además, el sistema pET utiliza un método de selección de colonias transformadas mediante la inclusión de un gen que confiere resistencia a un antibiótico determinado. En este, trabajo se utilizó el vector pET-28b(+) con resistencia a kanamicina (Figura 8). Las cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$

quimiocompetentes, que presentan una "recombinación alterada", son altamente recomendadas y se utilizaron en este estudio. Estas cepas son óptimas para la inserción y amplificación estable de material genético (Figura 7), ya que su membrana ha sido modificada para aumentar la permeabilidad mediante una solución de  $\text{CaCl}_2$  y un choque térmico posterior, lo que facilita la entrada de plásmidos recombinantes [24, 25].



**Figura 7.** Descripción gráfica del proceso de transformación en *E. coli* DH5 $\alpha$ . Fuente: Imagen extraída de [26] y modificada con el programa Illustrator.

### 1.8. Construcción de vectores recombinantes

Los vectores de transformación, como los utilizados en el sistema pET, disponen de múltiples sitios de corte de restricción mediante endonucleasas para insertar el gen de interés entre uno o más cortes. Los métodos para la preparación de vectores transformantes fueron descritos por Russel y Sambrook (2001) [27]. A continuación, se enumeran:

I) Adición de sitios de corte de endonucleasas al gen diana por medio de PCR: a los oligos del gen de interés se le adicionan las secuencias de reconocimiento y restricción tanto en el extremo 5' como en el 3', para flanquear el fragmento con las endonucleasas seleccionadas.

II) Digestión del vector y del fragmento de DNA: los sitios de restricción deben ser compatibles para la unión del vector y el fragmento, pueden digerirse con las mismas endonucleasas. En caso de

ser diferentes enzimas los extremos digeridos deberán empatar tanto en tipo (romos o cohesivos) y en secuencia, los extremos cohesivos han demostrado tener una mayor afinidad por sus extremos complementarios.

III) Ligación del fragmento de DNA en el vector de expresión: se lleva a cabo con una enzima de tipo Ligasa y moléculas donadoras de fosfatos, el adenosín trifosfato (ATP) es por excelencia la molécula universal donadora de este grupo con mayor estabilidad en su conformación trifosfatada y difosfatada.

### 1.9. Expresión en células *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)

Para introducir el vector construido en células adecuadas para la expresión de la proteína objetivo, se requiere utilizar células que contengan una copia cromosómica de la RNA Polimerasa T7 controlada por el promotor lacUV5. Este promotor, una variante mutada del promotor Lac, presenta una mayor afinidad por la RNA Polimerasa. Además, estas células contienen el gen *lacI*, que codifica el represor lacI [28]. Las células quimiocompetentes *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) son adecuadas para el fin descrito cuando el gen diana no está optimizado para su expresión en *E. coli*, ya que esta cepa contiene los genes para los tRNA de los codones AGG, AGA, AUA, CUA y CCC, que no son comunes en *E. coli* [29]. Una vez que se insertó el vector en las células BL21-CodonPlus (DE3) se induce la expresión de la proteína, en el caso del sistema pET se utiliza el IPTG, molécula análoga a la allolactosa, la cual compete con el represor lacI para inducir la expresión. La expresión de la proteína puede verificarse a través de la técnica de SDS-PAGE (véase el subtema 4.1), en el caso de la tACE2 debería mostrar una banda en el gel de SDS en el peso de 39 kDa según descrito por Gao *et al.*, (2021) [2].

### 1.10. Técnicas de extracción y purificación de proteínas recombinantes

Muchas de las proteínas recombinantes requieren modificaciones de plegamiento postraduccionales que no pueden llevarse a cabo en organismos procariontes, la expresión de estas proteínas en algunos casos resulta en su acumulación en forma insoluble, dando origen a los

llamados “cuerpos de inclusión”. Los cuerpos de inclusión son agregados citoplásmicos de proteínas, la solubilización de estos consiste en tratamientos con detergentes y agentes caotrópicos como la urea e hidrocloreto de guanidina. En pasos posteriores la L-arginina, se utiliza para ayudar al replegamiento y estabilizar las proteínas plegadas [30].

Un agente caotrópico es una sustancia que desorganiza la red tridimensional del agua, influyendo en la organización de sus moléculas a través de sus enlaces de hidrógeno y la interacción con otras macromoléculas tales como proteínas, DNA o RNA, tendiendo a desnaturalizarlas o disolverlas. Después de separar los cuerpos de inclusión del resto de la biomasa bacteriana, se someten a desnaturalización y posterior repliegue de la proteína para lograr una conformación lo más similar posible a la original [31].

Una de las alternativas más utilizadas para la purificación de estas proteínas es la cromatografía. La cromatografía es un método de separación de sustancias que viajan por una fase móvil a través de una columna que contiene una fase estacionaria con afinidad específica. Una técnica ampliamente utilizada es la purificación por marcadores de afinidad, que implica la adición de una etiqueta o tag, siendo uno de los más comunes una cadena de polihistidinas en el extremo carboxilo-terminal de la proteína. Esto permite la purificación por afinidad a iones metálicos (IMAC, por sus siglas en inglés). Entre las columnas de resina de níquel, que son comunes y comerciales, se encuentra la más utilizada [32].

### 1.10.1. Electroforesis SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés), es una técnica de laboratorio ampliamente utilizada para la identificación de proteínas de acuerdo con su peso molecular expresado en kDa. Esta técnica es similar a la electroforesis de ADN, donde la migración de las proteínas está influenciada por el pH de la solución y del punto isoeléctrico de la proteína. Además, el grado de desplazamiento de las proteínas en el gel depende de su carga eléctrica [33].

Existen diversos protocolos para llevar a cabo esta técnica, el método más utilizado está descrito por el Instituto Nacional de la Salud en su “Manual de procedimientos de electroforesis para proteína y ADN” [34]. A continuación, se enumeran:

I) Preparación del gel por sistema discontinuo desnaturalizante: se le considera de esta manera porque está conformado por dos geles de poliacrilamida (carga y corrida) que presentan diferente concentración, composición y pH. Aunque ambos geles terminan unidos, es visible su separación y debido a que pueden mezclarse fácilmente, deben prepararse por separado. El gel de carga se situará en la parte superior del gel, el cual contendrá los pocillos de carga de las muestras de proteína. El gel de corrida en la parte inferior es por donde migrarán y separarán las proteínas.

II) Carga de las muestras y corrida del gel: las muestras deben prepararse con un colorante de carga, el azul de bromofenol es de los más utilizados por su color azul-violeta intenso que permite visualizar la frontera de corrida del gel y detener a tiempo la técnica. Una vez diluido el colorante con las alícuotas que contienen la proteína de interés, se lleva a cabo un proceso de desnaturalización con temperatura a 90°C aproximadamente.

III) Teñido de las bandas: al terminar la corrida de las muestras por el gel, es necesario teñirlo para visualizar las bandas por algún método de foto-visualización bajo luz UV. El colorante más conocido para teñir geles de poliacrilamida es el azul de coomassie, generalmente se disuelve en una mezcla de agua, ácido acético y metanol o isopropanol. El recipiente donde se dejará remojado el gel debe ser de teflón o vidrio, dejándolo sumergido con un movimiento rotatorio suave por 15 o 20 minutos. Posterior a su teñido debe desteñirse el gel, una forma efectiva es usar agua hirviendo y dejar remojando el gel en ella durante 30 min, aproximadamente.

IV) Visualización de las bandas en un foto-documentador: el foto-documentador es un equipo diseñado para dejar un registro digital de la imagen de los geles de agarosa o SDS, tienen sensibilidad para diferentes indicadores como azul de Coomassie, nitrato de plata o bromuro de etidio (etBR), con luminiscencia y fluorescencia. Una vez desteñido el gel se coloca dentro del foto-documentador y con un

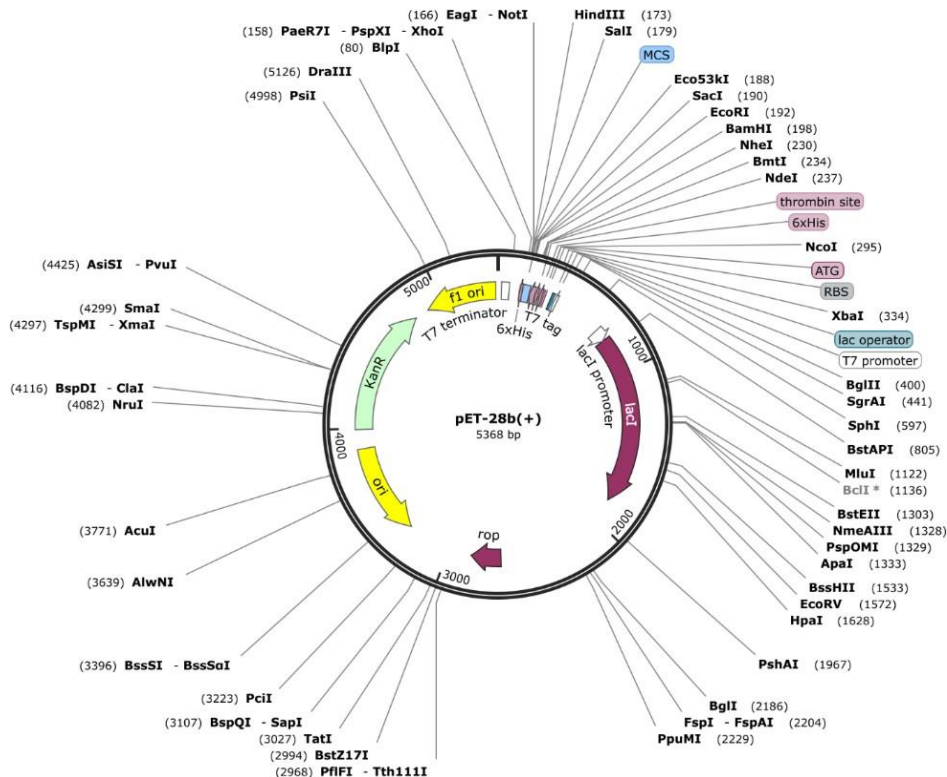
software dedicado para el equipo se pueden visualizar la intensidad y posición de las bandas.

## Capítulo II. Metodología

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Mapa del vector pET-28(+)

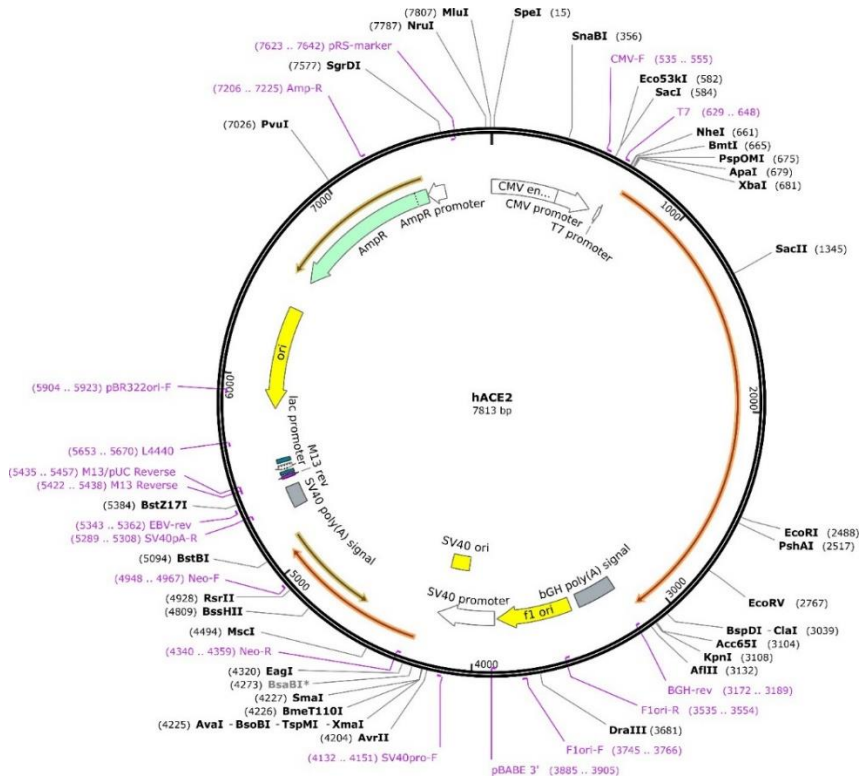
Los vectores comúnmente se analizan mediante mapas, estos contienen información básica e importante para conocer mejor el vector. El vector pET-28(+) tiene una longitud aproximada de 5268 pb y cuenta con diferentes sitios de corte en toda su secuencia. Se mencionó anteriormente que cuenta con un operón *lacI*, gen de resistencia a kanamicina y por supuesto el origen de replicación para que se lleve a cabo la transcripción dentro del organismo huésped (Figura 8).



**Figura 8.** Mapa completo del vector pET-28b(+). Imagen extraída y modificada de SnapGene.

### 2.1.2. Mapa del vector hACE2

Se utilizó el vector hACE2 de Addgene de aproximadamente 7813 pb, se analizó su secuencia para identificar el fragmento del vector donde se encuentra el gen ACE2, posteriormente se crearon los oligos para la amplificación del fragmento trunco tACE2 (Figura 9).



**Figura 9.** Mapa completo del vector hACE2. Extraído de Addgene ID: 275247.

### 2.1.3. Enzimas utilizadas para la preparación del vector

Se empleó la Taq polimerasa de HF Thermo para la amplificación de los fragmentos mediante PCR. Para las PCR de colonias, se utilizó la Taq polimerasa de 5'BIO. Para la digestión del vector y del fragmento de ADN, se utilizaron las enzimas NcoI (NEB) y XhoI (Thermo). El fabricante proporciona una tabla que contiene información sobre estas endonucleasas. En la tabla, se resaltan en color anaranjado los sitios de corte de las enzimas y se indican las secuencias de reconocimiento a ambos lados para una catálisis más eficiente (ver Tabla 1). Para el proceso de ligación del vector linealizado y del fragmento de DNA digerido, se utilizó la DNA T4 Ligasa de ThermoFisher.

Tabla 1. Fragmento de la tabla informativa de endonucleasas de NEB, NcoI y XhoI.

Enzima	Secuencia de Oligos	Cadena Longitud	% Escisión	
			2 h	20 h
NcoI	<b>CCCATGGG</b>	8	0	0
	<b>CATGCCATGGCATG</b>	14	50	75
XhoI	<b>CCTCGAGG</b>	8	0	0
	<b>CCCTCGAGGG</b>	10	10	25
	<b>CCGCTCGAGCGG</b>	12	10	75

## 2.2. Metodología

### 2.2.1. Síntesis de oligos (oligonucleótidos)

Se utilizaron los oligos propuestos por Gao *et al.*, (2021) [2] para obtener la versión trunca del tACE2. A los oligos Forward y Reverso se les adicionaron las secuencias de reconocimiento (en verde) y corte (en naranja) de NcoI y XhoI, respectivamente:

- NcoI Fwd 5' **CAT GCC ATG GAC** AAG TTT AAC CAC GAA GCC G 3'
- XhoI Rev 5' **CCG CTC GAG** GAA GTC GCC CTT CCC CAG GTC CCA AG 3'

Se verificó *in silico* el correcto diseño de los oligos con el programa SerialCloner, arrojando un posible producto de 999 pb (Figura 10).

hACE2	TGTTGCTGTAACCTGCTCAGTCCACCATTGAGGAACAGGCCAAGACATTTTGGACAA	780	hACE2	AAGAGCAATCATTATGAGGACTATGGGATTATTGGAGAGGAGACTATGAAGTAAATGG	1320
tACE2	-----CATGCCATGGACAA	14	tACE2	AAGAGCAATCATTATGAGGACTATGGGATTATTGGAGAGGAGACTATGAAGTAAATGG	554
hACE2	GTTTAAACCACGAAGCCGAAAGACCTGTTCTATCAAAGTTCACCTGCTTCTTGGAAATTATAA	840	hACE2	GGTAGATGGCTATGACTACAGCCGGCCAGTTGATTGAAGATGTGGAACATACCTTTGA	1380
tACE2	-----	74	tACE2	GGTAGATGGCTATGACTACAGCCGGCCAGTTGATTGAAGATGTGGAACATACCTTTGA	614
hACE2	CACCAATATTACTGAAGAGAATGTCCAAAACATGAATAATGCTGGGGACAAATGGTCTGC	900	hACE2	AGAGATTAACCATATATGAACATCTTCATGCTATGTGAGGGCAAGTTGATGAATGC	1440
tACE2	-----	134	tACE2	AGAGATTAACCATATATGAACATCTTCATGCTATGTGAGGGCAAGTTGATGAATGC	674
hACE2	CTTTTAAAGGAACAGTCCACACTTGGCCAAATGTATCCACTACAAGAAATTCAGAATCT	960	hACE2	CTATCCTTCCATATCAGTCCAATTGGATGCTCCCTGCTCATTGCTTGGTATATGTG	1500
tACE2	-----	194	tACE2	CTATCCTTCCATATCAGTCCAATTGGATGCTCCCTGCTCATTGCTTGGTATATGTG	734
hACE2	CACAGTCAAGCTTCAGCTGCAGGCTCTCAGCAAAATGGGTCTTCAGTGTCTCAGAAGA	1020	hACE2	GGGTAGATTTGGACAAATCTGTACTTTGACAGTTCCTTTGGACAGAAACCAAAAT	1560
tACE2	-----	254	tACE2	GGGTAGATTTGGACAAATCTGTACTTTGACAGTTCCTTTGGACAGAAACCAAAAT	794
hACE2	CAAGAGCAAAACGGTTGAACAATTTAAATACAATGAGCACCATCTACAGTACTGGAAA	1080	hACE2	AGATGTTACTGATGCAATGGTGGACCAGGCCTGGGATGCACAGAGAATATCAAGGAGGC	1620
tACE2	-----	314	tACE2	AGATGTTACTGATGCAATGGTGGACCAGGCCTGGGATGCACAGAGAATATCAAGGAGGC	854
hACE2	AGTTTGTAAACCCAGATAATCCACAAGAATGCTTATTACTTGAACAGGTTTGAATGAAT	1140	hACE2	CGAGAAGTCTTTGTATCTGTTGGTCTTCCAAATGACTCAAGGATTCGGGAAAATTC	1680
tACE2	-----	374	tACE2	CGAGAAGTCTTTGTATCTGTTGGTCTTCCAAATGACTCAAGGATTCGGGAAAATTC	914
hACE2	AATGGCAAAACAGTTTAGACTACAATGAGAGGCTCTGGGCTTGGGAAAGCTGGAGATCTGA	1200	hACE2	CATGCTAACGGACCAGGAAATGTTCCAGAAAGCAGTCTGCCATCCACAGCTTGGGACCT	1740
tACE2	-----	434	tACE2	CATGCTAACGGACCAGGAAATGTTCCAGAAAGCAGTCTGCCATCCACAGCTTGGGACCT	974
hACE2	GGTCGGCAAGCAGTGAAGCCATTATGAAGAGTATGTGGTCTTGAATAAGATGATGGC	1260	hACE2	GGGAAAGGGCGACTTCAGGATCCTTATGTGCACAAGGTCACAATGGACACTCTCTGAC	1800
tACE2	-----	494	tACE2	GGGAAAGGGCGACTTCAGGATCCTTATGTGCACAAGGTCACAATGGACACTCTCTGAC	999

Figura 10. Alineamiento de la secuencia de tACE2 comparada con el gen ACE2 del vector hACE2. Captura obtenida de SnapGene.



### 2.2.2. PCR de los fragmentos tACE2

Se prepararon las alícuotas para la reacción de PCR según las indicaciones del fabricante (Tabla.2).

**Tabla 2.** Protocolo para la reacción de PCR con HF de Thermo.

Volumen de Reacción	20 $\mu$ L	50 $\mu$ L	Concentración Final
Agua	Hasta 20 $\mu$ L	Hasta 50 $\mu$ L	
5X Phusion HF Buffer	4 $\mu$ L	10 $\mu$ L	1X
10 mM dNTPs	0.4 $\mu$ L	10 $\mu$ L	200 $\mu$ M
Fwd primer	X $\mu$ L	X $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
Rev primer	X $\mu$ L	X $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
DNA plantilla	X $\mu$ L	0.125 $\mu$ L	
(DMSO, opcional)	(0.6) $\mu$ L	(1.5) $\mu$ L	-3%
Phusion HF DNA Polimerasa	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L	0.02 U/ $\mu$ L

Se determinó la temperatura de fusión ( $T_m$ ) de los oligos utilizando la herramienta "Tm calculator" de ThermoFisher en su página oficial, [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com). Los resultados mostraron una  $T_m$  de 73.6 °C para el Forward (Fwd) y 81.9 °C para el oligo Reverse (Rev). Sin embargo, dado que la temperatura de alineamiento no puede exceder los 72 °C, se definió que la temperatura de  $T_m$  óptima es de 59 °C, como se indica en el estudio de Gao et al., (2021) [2]. Se llevaron a cabo 32 ciclos de amplificación bajo las condiciones descritas en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Condiciones de los ciclos de PCR.

Paso de reacción	Temperatura	Tiempo
Pre-desnaturalización	95°C	5 min
Desnaturalización	95°C	30 seg
Alineamiento	59°C	30 seg
Extensión	72°C	45 seg
Extensión final	72°C	5 min

### 2.2.3. Purificación de productos de PCR

Los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit "Thermo Scientific GeneJET PCR Purification Kit #K0701", siguiendo las instrucciones detalladas en su manual de usuario.

### 2.2.4. Digestión de productos de PCR y vector pET-28b(+)

Para establecer el protocolo de la digestión enzimática, se siguieron las indicaciones del fabricante de las enzimas de restricción, NEB. Esta herramienta "Restriction Digest" se encuentra disponible en la página <https://nebcloner.neb.com>. A partir de la información obtenida, se estableció el siguiente protocolo detallado en la Tabla 4. La digestión se realizó a una temperatura de 37 °C en un termobloque durante 2 horas, seguida de un paso adicional a 60 °C durante 20 minutos para desactivar las enzimas de restricción.

**Tabla 4.** Protocolo de reacción para la digestión de tACE2 y pET-28b(+) con NcoI y XhoI de NEB.

Componente	Vol. final (40 µL)	Componente	Vol. final (40 µL)
Producto PCR	3.72 µL	pET-28b(+)	16.4 µL
10X NEBuffer	4 µL	10X NEBuffer	4 µL
XhoI	1 µL	XhoI	2 µL
NcoI	0.8 µL	NcoI	0.8 µL
ALN	30.48 µL	ALN	16.8 µL

### 2.2.5. Purificación de productos de digestión

Se llevó a cabo una purificación mediante electroforesis en gel, donde las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% en pocillos más amplios (se unieron tres pocillos mediante el uso de cinta adhesiva). Se incluyeron los controles correspondientes. Para la purificación, se utilizó el kit "Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit", siguiendo las instrucciones detalladas en su manual de usuario.

### 2.2.6. Ligación con DNA T4 Ligasa

Tras purificar ambos productos de digestión, se procedió a preparar la reacción de ligación utilizando la DNA T4 Ligasa de ThermoFisher, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Los detalles de la reacción se encuentran especificados en la Tabla 5.

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 20 minutos. A bajas temperaturas, los extremos cohesivos se estabilizan, pero la eficiencia de la enzima se reduce. Por otro lado, a temperaturas superiores a la temperatura ambiente, se potencia la actividad de la enzima, pero se desestabilizan los extremos cohesivos.

**Tabla 5.** Protocolo de reacción para la T4 DNA Ligasa.

Componente	Vol. Final (20 $\mu$ L)
2x React. Buffer	10 $\mu$ L
Inserto DNA	3.3 $\mu$ L (90 ng)
pET-28b(+)	2 $\mu$ L (30 ng)
Agua libre de nucleasas	1.7 $\mu$ L
T4 DNA ligase	1 $\mu$ L
ATP's	2 $\mu$ L (10 nmol/ $\mu$ L)

### 2.2.7. Transformación por choque térmico

El protocolo para la transformación de bacterias *E. coli* DH5 $\alpha$  fue el siguiente:

- I) Descongelar bacterias *E. coli* (en el laboratorio se tienen muestras congeladas a menos 80 °C de 100  $\mu$ L) pasar las alícuotas con bacterias en tubos Eppendorf de 1.5 mL y añadir en cada uno de ellos 10  $\mu$ L de la solución de ligación del vector pET- 28b+tACE2,
- II) Se procura dejar un vial con bacterias *E. coli* sin el vector como control negativo.
- III) Dejar los tubos en hielo por 20 minutos.
- IV) Pasarlos a un termobloque a 42 °C por 1 minuto.
- V) Volver a poner en hielo por 5 minutos.
- VI) Adicionar 900  $\mu$ L de medio LB (esto ayuda a que la célula se recupere por el choque térmico y ayuda a su crecimiento).
- VII) Pasarlos de nuevo al termobloque a 37 °C y 500 rpm por 56 minutos.

Posteriormente sembramos las cepas transformadas en cajas Petri con agar LB agarosa y kanamicina, siguiendo los siguientes pasos:

- I) Añadir 100  $\mu$ L de bacterias transformadas en cada caja Petri con Kanamicina.

- II) Sembrar el control negativo en una caja Petri con antibiótico y marcarla.
- III) Dejar incubando las cajas a 37 °C por no más de 16 horas.

### 2.2.8. Purificación del vector pET-28b+tAEC2 y transformación de *E. coli* BL21- CodonPlus (DE3)

Pasadas 14 horas de incubación, se escogieron aquellas colonias más grandes que sobrevivieron y se realizó un PCR de colonia con la Taq polimerasa de 5'BIO, con el protocolo del fabricante (Tabla 6).

**Tabla 6.** Protocolo para la reacción de PCR con Taq DNA polimerasa de 5'BIO.

Volumen de Reacción	50 µL	25 µL
Buffer 10X	5 µL	2.5 µL
Cebador Fwd (10µM)	1 µL (0.2 µM)	0.5 µL (0.2 µM)
Cebador Rev (10µM)	1 µL (0.2 µM)	0.5 µL (0.2 µM)
MgCl <sub>2</sub>	4 µL (1-4 µM)	2 µL (1-4 µM)
DNA plantilla	10 pg - 1 µg	10 pg - 1 µg
Taq DNA polimerasa	0.250 µL (1.25 U)	0.125 µL (1.25 U)
Mezcla de dNTPs (10mM)	1 µL (0.2 µM c/u)	0.5 µL (0.2 µM c/u)
Agua libre de nucleasas	Llevar a: 50 µL	Llevar a: 25 µL

Para confirmar la correcta inserción del fragmento de tACE2 en el vector, se llevó a cabo una reacción utilizando las mismas condiciones descritas previamente. Sin embargo, en este caso, se obtuvo la muestra de ADN mediante la recolección de una parte de las colonias al picarlas con una punta de micropipeta estéril. Sobrevivieron un total de 6 colonias. Las muestras amplificadas fueron enviadas a la unidad de secuenciación del IBT UNAM, Cuernavaca, y la secuencia obtenida coincidió con el fragmento esperado.

A continuación, las colonias seleccionadas se inocularon en tubos que contenían 5 mL de medio LB y 5 µL de kanamicina (30 mg/mL), y se incubaron a 200 rpm a 37 °C durante 14 horas. Posteriormente, se

extrajo el plásmido pET-28b+tACE2 utilizando el kit “Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit”.

El protocolo de transformación utilizado para las bacterias *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3) quimiocompetentes fue el mismo que se describió previamente para las *E. coli* DH5 $\alpha$ . Las cajas Petri se incubaron a 37 °C durante 14 horas en una incubadora.

### 2.2.9. Expresión por medio de la inducción con IPTG

Se seleccionó una de las colonias de BL21-CodonPlus (DE3) y se preparó un preinóculo en un tubo de cultivo. Se añadieron 5 mL de medio LB con 5  $\mu$ L de Kanamicina, y se transfirió una pequeña porción de la colonia seleccionada al tubo de ensayo utilizando una punta de micropipeta. El cultivo se incubó durante 14 horas a 37 °C con agitación constante a 200 rpm.

Al día siguiente, se inoculó 200 mL de medio LB en un matraz Erlenmeyer de 1 L, asegurándose de dejar un espacio de aire 4 o 5 veces mayor que el volumen de LB (considerando una densidad de 1 g/cm<sup>3</sup>). Se añadieron 200  $\mu$ L de Kanamicina y el 1% del volumen del cultivo que se dejó en crecimiento el día anterior. Todas estas operaciones se llevaron a cabo dentro de una campana de esterilidad.

Se tomó una muestra de 1 mL de medio LB como blanco y otra muestra de 1 mL del cultivo inoculado, que se transfirieron a las celdas de espectrofotometría para medir la densidad óptica a 600 nm. Siguiendo el trabajo de Gao et al., 2021 [2], se monitoreó el crecimiento bacteriano hasta que alcanzó una absorbancia entre 0.4 y 0.6. El matraz se dejó incubando a 37 °C con agitación a 250 rpm, y se tomó una alícuota de 1 mL para realizar lecturas de absorbancia cada 45 min. Los resultados de las lecturas de absorbancia se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Lecturas de absorbancia de crecimiento de colonia de BL21-CodonPlus (DE3).

Lectura	Abs
Blanco	0.0507
1	0.0922
2	0.3308
3	0.6674

La expresión del tACE2 se llevó a cabo añadiendo 200 uL de IPTG al cultivo para alcanzar una concentración final de 1 mM. El cultivo se mantuvo en la incubadora bajo las mismas condiciones durante 6 horas.

Después de las 6 horas de incubación, se tomó una alícuota no mayor de 2 mL y se centrifugó junto con la primera muestra de lectura del espectro antes de la inducción. Se corrió un SDS-PAGE como control para verificar que la expresión haya resultado. Con el fin de verificar la expresión, se realizó un SDS-PAGE como control. La concentración de la muestra inducida para cargarla en el gel fue de aproximadamente 1:20, lo que significa que se utilizó 1 uL de muestra por cada 20 uL de tampón de carga.

### 2.2.10. Extracción de cuerpos de inclusión por sonicación

Después de las 6 horas, todo el medio se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en un buffer de fosfato salino (PBS) a pH 7.4, en una proporción de 1:10 (por cada gramo de pellet se añadieron 10 mL de PBS). A continuación, se realizó la sonicación de ultrasonido, utilizando las siguientes condiciones: 20 segundos de ultrasonido, 20 segundos de reposo, y se repitió este ciclo durante 2 minutos. Este proceso se llevó a cabo en 6 intervalos de 20 segundos. Posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min y se eliminó el sobrenadante. Se reservó una parte del sobrenadante para realizar una electroforesis SDS- PAGE en pasos posteriores con el objetivo de verificar el proceso de purificación de la proteína. La biomasa resultante se lavó con la solución compuesta por: PBS + 0.1% Tritón X-100 por triplicado, utilizando la misma proporción 1:10. Después de cada lavado, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. También se guardó cada sobrenadante para su análisis en los diferentes pasos de purificación.

A continuación, se realizó un lavado del sedimento con agua destilada en una proporción de 1:10. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos y se guardó el sobrenadante resultante. A partir de este punto, se logró separar los cuerpos de inclusión de los residuos celulares, y el siguiente paso consistirá en la desnaturalización de los cuerpos de inclusión y su unión a la resina de Niquel.

### 2.2.11. Purificación de tACE2 por columna de afinidad

Para llevar a cabo la purificación en columna de níquel, se prepararon tres buffers con las siguientes especificaciones:

#### I) Buffer de unión a la resina

- a) 50 mM de buffer de fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), pH 8.0
- b) 500 nM de cloruro de sodio (NaCl).
- c) 0.5% Tritón X-100
- d) 10% glicerol
- e) 5 mM de imidazol
- f) 8 M de urea

#### II) Buffer de lavado

- a) 50 mM de buffer de fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), pH 8.0
- b) 500 nM de cloruro de sodio (NaCl).
- c) 0.5% Tritón X-100
- d) 10% glicerol
- e) 5 mM de imidazol

#### III) Buffer de elución

- a) 50 mM de buffer de fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), pH 8.0
- b) 500 nM de cloruro de sodio (NaCl).
- c) 0.5% Tritón X-100
- d) 10% glicerol
- e) 200 mM de imizadol
- f) 8 M de urea

Buffer de lavado: Se utilizó para lavar la columna antes y después de su uso. Se agregaron 20 mL de este buffer y se dejó lista para su utilización.

Buffer de unión: Se utilizó en dos etapas. En la primera etapa, se empleó para resuspender el pellet de los cuerpos de inclusión y pasarlos a través de la columna de níquel, permitiendo que la proteína se adhiera a la resina. En la segunda etapa, se utilizó para enjuagar la muestra unida a la resina y arrastrar cualquier proteína no deseada. Se utilizaron 10 mL de buffer en cada etapa.

Buffer de elución: Se utilizó para desplazar la proteína unida a la resina utilizando una alta concentración de imidazol. La proteína se recolectó en un tubo Falcon. Se recomendó guardar todas las muestras obtenidas durante esta etapa para su posterior verificación. Se utilizó una cantidad de 10 a 20 mL de buffer en cada corrida.

Es importante destacar que todas las corridas de buffer fueron guardadas para su posterior análisis y verificación según el protocolo establecido.

### 2.2.12. Replegamiento de la proteína tAEC2

Después de la última corrida en la columna de níquel, se procedió a realizar un último lavado de la columna con el buffer de lavado y se guardó la columna para su posterior uso. El último filtrado recolectado en esta etapa final fue dializado con cuatro buffers diferentes durante un periodo de 24 horas a una temperatura de 4 °C, utilizando cada buffer de forma secuencial.

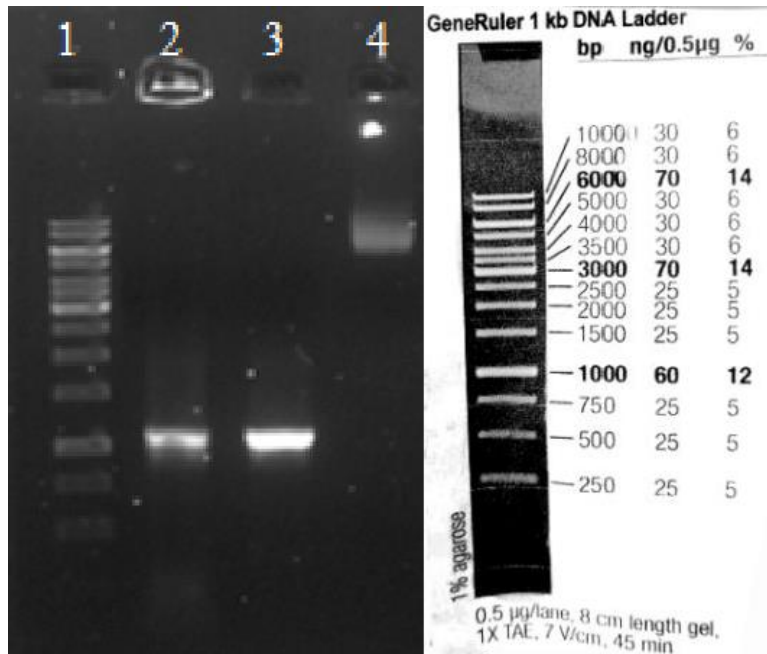
- 1) Buffer NTA + 4 M de urea.
- 2) Buffer NTA + 2 M de urea.
- 3) Buffer NTA + 0 M de urea.
- 4) Buffer PBS pH 7.4

Al finalizar las cuatro diálisis, se tomaron dos enfoques diferentes según las condiciones de la muestra. Si se observaba algún precipitado dentro de la bolsa de celulosa, se realizó una centrifugación de toda la muestra a 4 °C, a 13000 rpm durante 30 minutos. Posteriormente, se colectó todo el sobrenadante en un tubo Falcon y se almacenó en refrigeración. En

caso de que no se observara ningún precipitado dentro de la bolsa, se procedió a coleccionar directamente la muestra en un tubo Falcon y se almacenó en refrigeración. Finalmente, se realizó un SDS-PAGE con las muestras tanto antes como después de su paso por la columna de afinidad de níquel. Además, se midió la concentración de proteína en la muestra final filtrada.

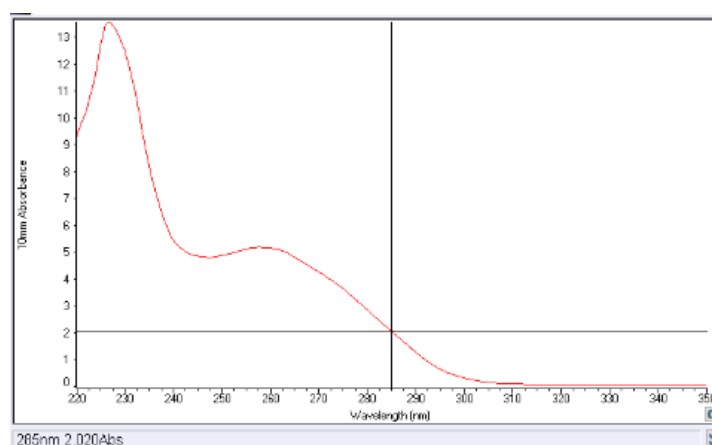
### Capítulo III. Resultados

Los oligos que se diseñaron con el software de SerialCloner se mandaron a la unidad de secuenciación y síntesis del IBT UNAM. Una vez sintetizados se preparó una PCR con las condiciones descritas anteriormente. Finalizada la PCR se corrieron sus productos en un gel de agarosa al 1% mediante la técnica de electroforesis, durante 60 min a 80 V (volts). Al finalizar se digitalizó el gel en un foto-documentador, el resultado se observa en la Figura 11.



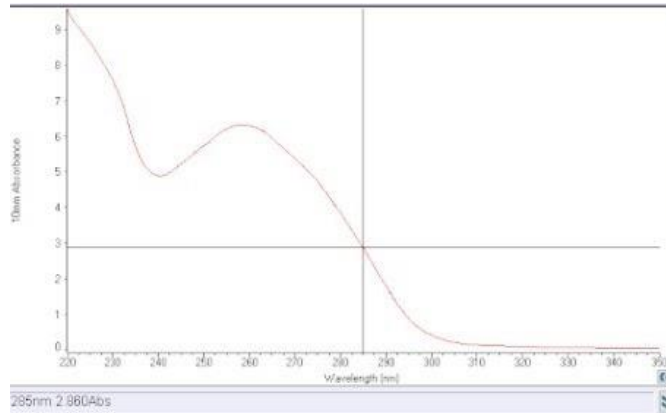
**Figura 11.** Gel de agarosa 1% de los productos de PCR del tACE2. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, muestra de producto de PCR; carril 3, control positivo; carril 4, control negativo.

Se observó que la amplificación de la fracción *tACE2* fue correcta y coincidió con la longitud esperada del fragmento. Una vez confirmada que la amplificación del gen *tACE2* fue exitosa, se procedió a purificar los productos de PCR, con la intención de excluir cualquier residuo proteico y de oligos del fragmento *tACE2*. Después de usar el kit de purificación mencionado anteriormente, se midió la concentración de DNA de los fragmentos *tACE2* puros, usando el espectrómetro NanoDrop 2000 de ThermoFisher, se obtuvo una concentración de 255.5 ng/μL de DNA (Figura 12).



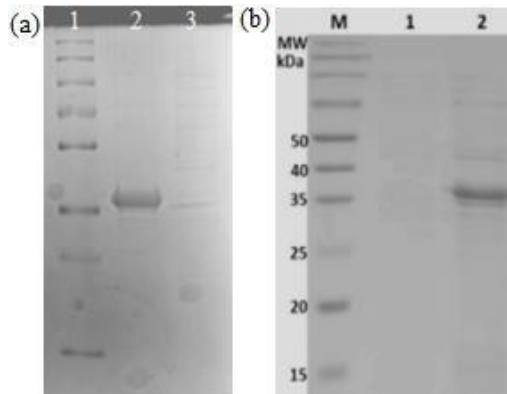
**Figura 12.** Cuantificación de concentración de DNA de la purificación de productos de PCR de *tACE2*.

El vector pET-28b(+) se purificó al igual que el fragmento *tACE2*. Después, se realizó la digestión del fragmento *tACE2* y del vector pET-28b(+) con las enzimas antes descritas, seguida de una purificación por separado de ambos componentes, posteriormente se realizó la ligación entre el pET-28b(+) y el fragmento *tACE2*, obteniendo el constructo pET-28b(+)-*tACE2* que fue cuantificado usando el mismo espectrómetro, se obtuvo una concentración de 314.1 ng/μL de DNA (Figura 13).



**Figura 13.** Cuantificación de concentración de DNA del vector pET-28b(+)-tACE2.

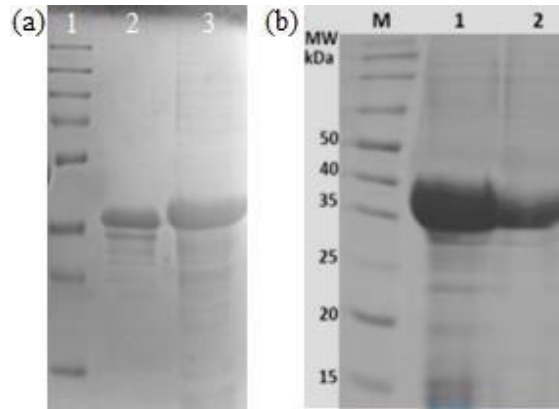
Siguiendo con el protocolo, se realizó la clonación del constructo pET-28b(+)-tACE2 en células de *E. coli* DH5 $\alpha$ , después se realizó la purificación del constructo y con él se transformaron células de *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3). Una vez transformadas las bacterias de *E. coli* BL21, se tomaron muestras del medio donde se inocularon, antes y después de inducir la expresión del gen tACE2 con IPTG, las muestras se corrieron en una electroforesis de proteínas mediante la técnica de SDS PAGE (Figura 14).



**Figura 14.** SDS-PAGE de las muestras de BL21-CodonPlus (DE3) vs los resultados de Gao *et al.*, 2021 [2]. (a) carril 1, marcador de peso; carril 2, lisado de BL21-CodonPlus (DE3) después de la inducción; carril 3, lisado de BL21-CodonPlus (DE3) antes de la inducción. (b) Carril 1, lisado bacteriano no inducido; carril 2, lisado bacteriano inducido con IPTG 1 mM durante 6-7 h.

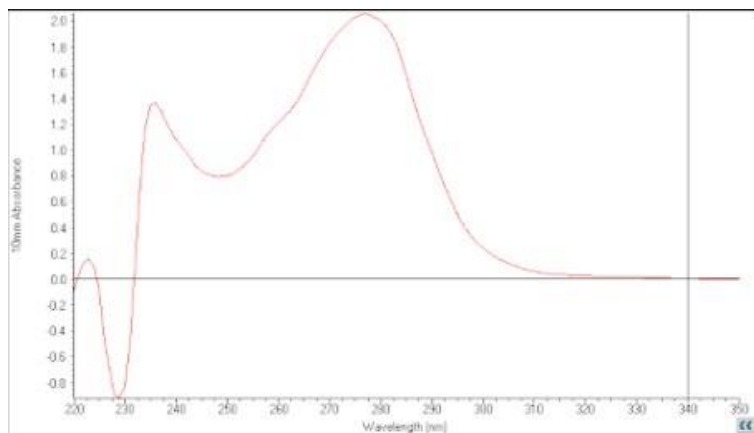
Después de confirmar que la proteína recombinante tACE2 fue expresada mediante la inducción con IPTG, se procede a purificar

mediante la técnica de cromatografía de columna de afinidad con resina de níquel. Se tomaron muestras de la proteína *tACE2* antes y después de pasar por la columna para ser visualizados en PAGE-SDS (Figura 15).



**Figura 15.** SDS-PAGE de las muestras de *tACE2* vs los resultados de Gao *et al.*, 2021 [2]. (a) carril 1, marcador de peso; carril 2, última corrida de la muestra por la columna de afinidad con el buffer de elución; carril 3, muestra cruda. (b) carril 1, muestra cruda; carril 2, última corrida por columna de Níquel.

Finalmente, purificada la proteína recombinante *tACE2*, se hizo una cuantificación de la concentración de proteína, medida por el espectrómetro mencionado anteriormente (Figura 16), se obtuvo una concentración de 2.001 mg/mL de proteína de *tACE2*.



**Figura 16.** Cuantificación de proteínas de *tACE2* purificada por columna con resina de níquel.

## CONCLUSIONES

La amplificación exitosa de la región del gen *tACE2* se verificó mediante la simulación precisa en SerialCloner y se confirmó mediante la electroforesis de DNA, lo cual respalda la obtención de los productos de PCR deseados. La clonación del vector pET-28b+tACE2 en *E. coli* DH5α se validó de manera satisfactoria mediante la PCR de colonia en las colonias sobrevivientes, lo que se evidenció por la presencia de una banda similar al control positivo de tACE2. Esto demuestra que se logró la introducción exitosa del vector en las células bacterianas.

Se logró la expresión de la proteína tACE2 en *E. coli* BL21 Codon Plus (DE3) inducida por IPTG, lo cual se confirmó mediante la técnica SDS-PAGE mostrando una banda de aproximadamente 36 kDa, consistente con los resultados obtenidos en el estudio de Gao et al., 2021 [2].

En el proceso de purificación por columna de afinidad de resina de níquel, se debe de procurar usar una cantidad suficiente de resina y que se encuentre en excelentes condiciones. En caso de que surgieran problemas con la resina, se recomendó repetir los pasos de purificación utilizando los "residuos" de las purgas consecutivas de cada lavado de la columna, a fin de maximizar el rendimiento de las proteínas de interés.

Al obtenerse la proteína tACE2 concentrada y purificada, se sugirió realizar pruebas de estabilidad para asegurar su capacidad de unirse al sitio de unión con el RBD de manera similar a las proteínas nativas. Además, se mencionó la posibilidad de escalar el protocolo a volúmenes mayores y concentraciones más altas para evaluar su eficiencia en producciones a gran escala.

## COMPETENCIAS DESARROLLADAS

A continuación, se detallan las competencias y técnicas desarrolladas durante el proyecto:

- I) Diseño de oligos de DNA para amplificar región de DNA de interés y su posterior amplificación a través de reacciones de PCR. Utilización del software SerialCloner para simular la reacción de amplificación.

- II) Establecimiento de condiciones de reacción de PCR óptimas y preparación adecuada de las reacciones utilizando manuales de proveedores de la enzima de DNA Polimerasa Taq.
- III) Preparación de geles de agarosa y poliacrilamida, uso de técnicas de electroforesis para separar y analizar muestras de DNA y proteínas.
- IV) Utilización de métodos de purificación de productos de PCR, fragmentos de DNA y plásmidos.
- V) Aplicación de protocolos para la transformación y expresión de proteína en diferentes cepas de *E. coli*.
- VI) Obtención y procesamiento de cuerpos de inclusión, agregados proteicos presentes en el citoplasma de las células bacterianas.
- VII) Purificación de proteínas mediante cromatografía de columna de afinidad utilizando resina de níquel.
- VIII) Replegamiento y concentración de proteínas mediante técnicas de diálisis utilizando diferentes buffers de amortiguación.

<https://sites.google.com/view/esmosbuap/esmos-2023/esmos-60>

## Referencias

- [1]. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, *et al.* Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020; 581(7807): 215–220. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41586-020-2180-5>
- [2]. Gao X, Liang K, Mei S, Peng S, Vong EG, Zhan J. An efficient system to generate truncated human angiotensin converting enzyme 2 (hACE2) capable of binding RBD and spike protein of SARS-CoV2. *Protein*

Expression and Purification. 2021; 184: 105889. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592821000723?via%3Dihub>

[3]. Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2019; 17(3): 181–192. doi: Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41579-018-0118-9>

[4]. Matoba Y, Abiko C, Ikeda T, Aoki Y, Suzuki Y, Yahagi K, *et al.* Detection of the human coronavirus 229E, HKU1, NL63, and OC43 between 2010 and 2013 in Yamagata, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2015; 68(2): 138–141. Disponible en: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/68/2/68\\_JJID.2014.266/article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yoken/68/2/68_JJID.2014.266/article)

[5]. Munasinghe TS, Edwards MR, Tsimbalyuk S, Vogel OA, Smith KM, Stewart M, *et al.* MERS-CoV ORF4b employs an unusual binding mechanism to target IMP $\alpha$  and block innate immunity. *Nature Communications*. 2022; 13(1): 1–14. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8956657/>

[6]. Santos-López G, Cortés-Hernández P, Vallejo-Ruiz V, Reyes-Leyva J. SARS-CoV-2: generalidades, origen y avances en el tratamiento. *Gaceta de México*. 2021; 157(1): 88–93. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0016-38132021000100088](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-38132021000100088)

[7]. Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nature Communications*. 2020; 11(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7100515/>

[8]. Xia S, Zhu Y, Liu M, Lan Q, Xu W, Wu Y, *et al.* Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cellular and Molecular Immunology*. 2020; 17(7): 765–767. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7075278/>

[9]. Ortega Pérez CA, Rivera NR, Sandoval López X, Hernández Ávila CE. Análisis de la mutación D614G encontrada en secuencias del genoma completo de SARS-CoV-2 en El Salvador. *Alerta, Revista Científica Del*

Instituto Nacional de Salud. 2021; 4(1): 72–77. Disponible en: <https://revistas.ues.edu.sv/index.php/launiversidad/article/view/2660>

[10]. Lam Cabanillas ER, León Risco AO, León Risco KB, Llamo Hoyos GL, López Zavaleta RM, Luzuriaga Tirado E del R, *et al.* Molecular basis of COVID-19 pathogenesis and *in silico* studies of potential pharmacological treatment. Revista de La Facultad de Medicina Humana. 2021; 21(2): 417–432. Disponible en: <https://inicib.urp.edu.pe/rfmh/vol21/iss2/22/>

[11]. Villanueva Bendek I, Ramírez Marmolejo R, Montejo JD, Rodelo Ceballos J, Puello González L, Vélez-Verbel M, *et al.* COVID-19 e hipertensión arterial: ¿existe evidencia para suspender antagonistas del sistema renina-angiotensina-aldosterona? Revista Colombiana de Nefrología. 2020; 7(2): 211–220. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2500-50062020000300211](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2500-50062020000300211)

[12]. Soler MJ, Lloveras J, Batlle D. Enzima conversiva de la angiotensina 2 y su papel emergente en la regulación del sistema renina-angiotensina. Medicina Clínica. 2008; 131(6): 230–236. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025775308716531>

[13]. Prabakaran P, Xiao X, Dimitrov DS. A model of the ACE2 structure and function as a SARS-CoV receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2004; 314(1): 235–241. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X03026792?via%3Dihub>

[14]. Pastrian-Soto G. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. International Journal of Odontostomatology. 2020; 14(3): 331–337. [https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-381X2020000300331](https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-381X2020000300331)

[15]. Lubbe L, Cozier GE, Oosthuizen D, Acharya KR, Sturrock ED. ACE2 and ACE: structure-based insights into mechanism, regulation and receptor recognition by SARS-CoV. Clinical Science (London, England: 1979). 2020; 134(21): 2851–2871. Disponible en: <https://doi.org/10.1042/CS20200899>

- [16]. Zhang W, Shi K, Geng Q, Ye G, Aihara H, Li F. Structural basis for mouse receptor recognition by SARS-CoV-2 omicron variant. PNAS. 2022; 1-7. Disponible en: [https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2206509119?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub++0pubmed](https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.2206509119?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed)
- [17]. Lim Y, Ng Y, Tam J, Liu D. Human Coronaviruses: A Review of Virus-Host Interactions. Diseases. 2016; 4(4): 26. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-9721/4/3/26>
- [18]. Chen WH, Du L, Chag SM, Ma C, Tricoche N, Tao X, *et al.* Yeast-expressed recombinant protein of the receptor-binding domain in SARS-CoV spike protein with deglycosylated forms as a SARS vaccine candidate. Human Vaccines and Immunotherapeutics. 2014; 10(3): 648-658. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/hv.27464>
- [19]. Xia X. Domains and functions of spike protein in SARS-CoV-2 in the context of vaccine design. Viruses. 2021; 13(1): 1-16. <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/1/109>
- [20]. Rodríguez Sánchez IP, Barrera Saldaña Ha. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. 2004; VII: 323-335. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/1584/>
- [21]. Fierro F. Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos. En: Cornejo-Romero MG, Serrato-Díaz A, Rendón-Aguilar B, editores. Extracción y purificación de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. 2014; 1:1-20 . Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/296695965\\_Microarreglos\\_de\\_DNA\\_Fabricacion\\_Proceso\\_y\\_Analisis](https://www.researchgate.net/publication/296695965_Microarreglos_de_DNA_Fabricacion_Proceso_y_Analisis)
- [22]. Lara AR. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 2011; 10(2): 209-223. Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-27382011000200006](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006)
- [23]. Chávez-Jacobo VM, Ramírez-Díaz MI, Silva-Sánchez J, Cervantes C. Resistencia bacteriana a quinolonas: determinantes codificados en plásmidos. Revista de Educación Bioquímica (REB). 2015; 34(1).

Disponible en: [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1665-19952015000100004](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952015000100004)

[24]. Gómez Arias LY, Gómez Daza S, Núñez Zarantes V. Estandarización de protocolos de transformación genética en *Escherichia coli* y para la generación de una colección de constructos génicos. *Ciencia En Desarrollo*. 2018; 9(2): 9–16. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-74882018000200009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-74882018000200009)

[25]. Kostylev M, Otwell AE, Richardson RE, Suzuki Y. Cloning should be simple: *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ -mediated assembly of multiple DNA fragments with short end homologies. *PLoS ONE*. 2015; 10(9): e0137466. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0137466>

[26]. Galván Cejudo A, Tejada M, Camargo A, Higuera J, Fernández Reyes E. Transformación de *Escherichia coli* con un plásmido recombinante. Universidad de Córdoba. *Prácticas Generales de Bioquímica y Biología Molecular*. 2006. Disponible en: <https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/48%20TRANSFORMACION%20E%20COLI%20CON%20PLASMIDO%20RECOMBINANTE.pdf>

[27]. Russel D, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3th edition. 1989. [https://books.google.com.mx/books?id=Bosc5JVxNpkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=Bosc5JVxNpkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)

[28]. Novagen. *pET System Manual*. 11th Edition. Novagen. Disponible en: <https://vdocument.in/pet-system-manual-11th.html?page=1>

[29]. González A, Fillat M. Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica (REB)*. 2018; 37(1): 14–27. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2018/reb181c.pdf>

- [30]. Rudolph R, Lilie H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1996; 10(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8566547/>
- [31]. Yurany Moreno L, Arturo Guerrero C, Acosta O. Expresión y purificación de las proteínas estructurales VP5\* y VP8\* de rotavirus en bacterias *E. coli* BL21(DE3). Rev. Colomb. Biotecnol. 2013; XV(1): 82-97. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77628609009.pdf>
- [32]. García J, Santana Z, Zumalacárregui L, Quintana M, González D, Furrázola G, et al. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. VacciMonitor. 2013; 22(2): 30-39. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203427535006>
- [33]. Campuzano Maya G. La electroforesis de proteínas: más que una prueba de laboratorio. Laboratorio. 2006; 12(6): 47-70. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8741827>
- [34]. Yábar Varas CA. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE ELECTROFORESIS PARA PROTEÍNAS Y ADN. Serie de Normas Técnicas N°38. Instituto Nacional de Salud - Lima. 2003; 38(2); 1-15. Disponible en: <https://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual%20Electroforesis%2038.pdf>

Esmos 60