



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Sobreproducción de la proteína viral HN-RVP
en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*.**

Tesis que para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA:

JUAN ADRIÁN FLORES GONZÁLEZ

Directora de tesis:

**Dra. IRMA HERRERA CAMACHO
Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular.
CQ-ICUAP**

Junio 2015



La parte experimental de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular del Centro de Química del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla bajo la dirección de la Dra. Irma Herrera Camacho.

Un reconocimiento especial a la Dra. Nora Hilda Rosas Murrieta por su apoyo académico y técnico a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Un reconocimiento especial al estudiante de doctorado MC. José Luis Cerriteño Sánchez por su apoyo académico y técnico a lo largo del desarrollo de esta tesis.

Este trabajo fue parte de un proyecto de investigación, el cual fue apoyado financieramente por:

Programa de apoyo a Proyectos de Investigación. VIEP-BUAP

Proyectos: HECI-NAT 2014 y 2015

Redes Temáticas-PROMEPE-SEP. CA: Bioquímica y Biología Molecular.

Proyecto: 2013-2014.

Para la realización de este trabajo tuve los siguientes apoyos:

- Beca Programa Jóvenes Investigadores- BUAP: otoño 2014 y primavera 2015

A mi asesora la Dra. Irma Herrera Camacho por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, así como por bríndame su confianza y apoyo a lo largo de mi estancia. Realizar este trabajo bajo su asesoría me ha permitido crecer como persona, de tal forma que sus conocimientos, su orientación, su persistencia y su paciencia han sido fundamentales para mi formación.

A mi compañero y amigo José Luis Cerriteño Sánchez por su gran apoyo a lo largo de este trabajo, le agradezco de corazón por todo lo que me enseñó y por permitirme robarle todo este tiempo de amistad. Él ha representado para mí un ejemplo a seguir que me motiva para continuar desempeñándome en la ciencia.

A mi familia fuente de apoyo constante e incondicional a lo largo de toda mi vida y más aún en mis años de carrera profesional, con su ejemplo me han enseñado a ser una mejor persona y han formado lo mejor de mí.

A todos mis amigos por compartir la licenciatura, que mutuamente nos hemos motivado y generado en nosotros ganas de aprender.

RESUMEN

El virus del *Rubulavirus porcino* (RVP) es el responsable de la enfermedad de los ojos azules, causando un cuadro respiratorio severo junto a meningoencefalitis en cerdos lactantes y alteraciones reproductivas en adultos, por lo que produce pérdidas importantes en la industria pecuaria del país. La Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN) es una glicoproteína de membrana involucrada en el inicio de la infección, destacando por ser la más inmunogénica. Las proteínas recombinantes de sistemas de expresión como las levaduras, son una excelente opción para producir diversas proteínas, por lo que siendo la HN la proteína más inmunogénica del RVP, representa ser la mejor candidata para la elaboración de un recurso preventivo como vacuna recombinante. *Schizosaccharomyces pombe* ha mostrado ser un sistema de expresión eficiente para la producción de proteínas heterólogas por generar modificaciones post-transcripcionales parecidas a organismos superiores.

El objetivo del presente trabajo fue obtener cepas de *S. pombe* productoras de la HN recombinante de RVP. Se obtuvo por PCR el marco de lectura abierto (ORF) del ectodominio de la HN (eHN) de la cepa PAC1 del RVP usando como plantilla el vector pPIC2 α B-HN. El fragmento de PCR se resguardó en un vector obteniendo así el pJET-HNhm. Posteriormente se construyó el vector para levadura, para ello, se obtuvo el vector pRSP linearizado mediante la digestión del vector PMO82 con las enzimas *NotI* y *BamHI*, con estas mismas enzimas se digirió el vector pJET-HNhm obteniendo el fragmento del ORF del eHN. Se ligaron los productos digeridos, se amplificó y se purificó el vector recombinante para levadura. La construcción de éste vector pRSP-HNhm fue corroborada mediante patrones de digestión y por secuenciación, mostrando que el sistema de expresión es óptimo y viable para la producción del eHN del RVP. Se incorporó el vector recombinante a diferentes cepas de levadura mediante transformación, obteniendo las cepas sobreproductoras de *S. pombe* 826HN (diploide), 3DHN (haploide) y 4XHN (haploide) con el vector de expresión pRSP-HNhm, lo cual se corroboró por PCR en colonia. Al crecer las cepas en medio de expresión (medio sin tiamina) sus cinéticas de crecimiento fueron lentas comparadas con las cepas originales. Se visualizó la producción de la proteína recombinante eHN de la cepa 3DHN mediante Western-blot. Sin embargo, el ensayo de actividad neuraminidasa no presentó resultados positivos.

Con este trabajo se obtuvo la construcción del vector de expresión pRSP-HNhm que codifica para el eHN del RVP de PAC1, la cepas de *S. pombe* 826HN, 3DHN y 4XHN sobreproductoras del eHN recombinante y se visualizó el eHN en la cepa 3DHN.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Rubulavirus porcino</i> .	2
1.2. Estructura viral.	3
1.3. Infección sistémica.	4
1.4. La proteína Hemaglutidina-Neuraminidasa (HN) del RVP.	6
1.5. Función biológica de la proteína HN.	7
1.6. La levadura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .	8
1.7. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> como sistema de expresión.	9
2. JUSTIFICACIÓN.	11
3. OBJETIVOS.	12
4. DISEÑO EXPERIMENTAL.	13
5. MATERIAL Y MÉTODOS.	14
5.1. Material biológico.	14
5.2. Material y reactivos.	14
5.3. Soluciones y medios de cultivo.	14
5.4. Herramientas informáticas.	14
5.5. Obtención del ORF de eHN por PCR.	15
5.6. Purificación de bandas a partir de geles de agarosa.	16
5.7. Resguardo del eHN en el vector pJET1.2/Blunt.	16
5.8. Generación de células competentes de <i>E. coli</i> TOP10.	17
5.9. Transformación de Células competentes <i>E. coli</i> TOP10.	18
5.10. Extracción de ADN plasmídico de células <i>E. coli</i> transformadas.	18
5.11. Pruebas por patrones de restricción para el vector pJET-HNhm.	19
5.12. Generación de cultivos permanentes de <i>E. coli</i> Top10 y cepas de <i>S. pombe</i> transformadas	21
5.13. Construcción del vector de expresión pRSP-HNhm.	21
5.14. Pruebas por patrones de restricción para el vector de expresión pRSP-HNhm.	23
5.15. Verificación del vector recombinante pRSP-HNhm.	24
5.15.1. Secuenciación del vector recombinante pRSP-HNhm.	
5.15.2. PCR del vector recombinante pRSP-HNhm.	

	24
	25
5.16. Transformación de <i>S. pombe</i> con vector recombinante.	26
5.17. PCR en colonia de las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN.	26
5.18. Sobreexpresión del eHN del RVP en <i>S. pombe</i> .	28
5.19. Extracto soluble de levaduras.	28
5.20. Determinación de proteínas totales.	29
5.21. Preparación de geles de Poliacrilamida para SDS-PAGE	29
5.22. Preparación de las muestras.	31
5.23. Tinción de gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (PAGE- SDS).	31
5.24. Western Blot	31
5.25. Actividad neuraminidasa.	32
5.26. Ensayo fluorométrico de la neuraminidasa.	34
5.27. Caracterización de curva de crecimiento celular.	34
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	35
6.1. Amplificación del fragmento codificante del ectodominio de la Hemaglutinina-Neuraminidasa (eHN) mediante PCR.	36
6.2. Clonación y ligación del ORF del eHN en vector de resguardo pJET1.2/Blunt.	37
6.3. Amplificación y purificación del vector de resguardo pJET-HNhm.	38
6.4. Verificación del vector de resguardo pJET-HNhm.	39
6.5. Construcción del vector recombinante pRSP-HNhm.	41
6.6. Obtención del vector de expresión pRSP.	42
6.7. Construcción del vector expresión pRSP-HNhm.	43
6.8. Transformación de células <i>E. coli</i> Top 10 con el vector pRSP-HNhm.	43
6.9. Verificación del vector de expresión pRSP-HNhm por patrones de restricción.	44
6.10. Análisis de la secuencia del vector recombinante pRSP-HNhm.	46
6.10.1. Secuenciación del plásmido pRSP-HNhm.	48
6.11. Obtención de cepas de <i>S. pombe</i> sobreproductoras del HN-RVP.	51

6.12. Confirmación de la presencia del plásmido pRSP-HNhm en cepas transformadas de <i>S. pombe</i> , mediante PCR en colonia.	53
6.13. Cinética de crecimiento de las cepas sobreproductoras del eHN.	55
6.14. Cinética de crecimiento de cepas productoras de eHN en condiciones de expresión.	58
6.15. Condiciones de sobreproducción del eHN recombinante detectado por western-blot y por actividad enzimática.	61
7. CONCLUSIONES.	67
8. BIBLIOGRAFÍA.	69
9. ANEXOS.	73

1. INTRODUCCIÓN

El *Rubulavirus porcino* (RVP) es el agente causal de la enfermedad de los ojos azules en cerdos. El agente etiológico fue identificado por poseer características similares a los virus de la familia *Paramyxoviridae*, y fue nombrada como virus la Piedad Michoacán (LPMV), por ser el primer sitio donde se reportó en 1980 (Stephano *et al.*, 1988), más tarde fue clasificado como *Rubulavirus porcino* (RVP). En pocos años se difundió a 16 estados, principalmente en la región del bajío mexicano. En años recientes se documentaron brotes en ocho estados del país, principalmente en las regiones del centro y centro-occidental, siendo esta la región nacional más importante de producción porcina (Bobadilla *et al.*, 2010). Ésta enfermedad se manifiesta con alteraciones neurológicas, reproductivas y respiratorias acompañadas por una opacidad azul de la córnea. Los signos clínicos varían con la edad del animal; en cerdos lactantes se presenta con alteraciones respiratorias y una meningoencefalitis progresiva fatal con 90% de mortalidad, mientras que los cerdos adultos desarrollan alteraciones reproductivas, donde las hembras muestran disminución de la fertilidad, abortos y en algunos casos fetos momificados, mientras que en machos manifiestan signos como epididimitis, orquitis, atrofia testicular y una sensible pérdida de fertilidad (Stephano *et al.*, 1988; Reyes *et al.*, 2004; Escobar *et al.*, 2011). La opacidad de la córnea se presenta de 1 a 10% de los casos (Figura 1).

La enfermedad del ojo azul es considerada una de las cuatro enfermedades más importantes que afectan a la industria porcina mexicana, generando pérdidas económicas por la alta mortalidad en neonatos e infertilidad en animales adultos en granjas con pie de cría (Escobar *et al.*, 2011).



Figura 1. Desarrollo de una opacidad azul en la córnea de cerdos infectados con *Rubulavirus porcino*. Se muestra una hembra de remplazo con 3 partos, proveniente de una granja persistentemente infectada en Zumpango estado de México (Dra. Sandra Cuevas Romero, INIFAP México DF).

1.1 *Rubulavirus porcino*.

La etiología viral de la enfermedad de los ojos azules fue demostrada por Stephano y col., en 1981, donde aislaron un virus hemaglutinante con morfología similar a los paramixovirus del tejido cerebral de lechones con meningoencefalitis durante un brote en 1980 en el estado de Michoacán, México. Por su similitud estructural, funcional y genética con los virus de la parotiditis humana (VPH), parainfluenza humana 2 y 4 y parainfluenza símico (Reyes *et al*, 2004; Moreno *et al.*, 1986), este virus fue clasificado en el género *Rubulavirus*, subfamilia *Paramyxovirinae*, familia *Paramyxoviridae*, orden *Mononegavirales* (Rima *et al.*, 1995).

El RVP se divide en tres subgrupos basados en la secuenciación del gen HN, el cual codifica para la proteína Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN). El grupo 1 comprende LPMV y PAC-4/1993; el grupo 2 comprende PAC-2/1990, el PAC-3/1992 y IC-IV; y el grupo 3 comprende PAC-6/2001, el PAC-7/2002, el PAC-8/2002 y PAC-9/2003. Los grupos se clasifican de esta manera debido a alteraciones en la secuencia de aminoácidos del gen que codifica HN, que confiere virulencia y está asociada con signos clínicos de afectación neurológica en los animales adultos y en líneas de engorde comerciales (Reyes *et al.*, 2002).

Todos los virus aislados hasta ahora producen un cuadro similar de alteraciones respiratorias y nerviosas en cerdos neonatos infectados experimentalmente. Sin embargo, los virus PAC1, PAC4 y PAC5 son más virulentos ya que fueron aislados de brotes de la enfermedad con alta mortalidad (Reyes *et al.*, 2002).

1.2 Estructura viral.

El genoma del RVP está formado por una sola molécula de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad negativa no segmentado. Éste posee seis genes organizados en la siguiente manera: 3'-NP-P-MF- HN-L-5' (Figura 2) y codifica 10 proteínas con funciones estructurales, reguladoras y enzimáticas. Su genoma es similar en todos los miembros del género *Rubulavirus*. Cada gen codifica una proteína, excepto el gen F, que codifica el polipéptido F0 que es hidrolizado por una proteasa celular en las proteínas F1 y F2, y el gen P que codifica las proteínas P, I, V y C, que se expresan por edición del ARN mensajero (Santos *et al.*, 2004). Las proteínas codificadas son: la polimerasa o proteína de gran peso molecular L (52 Kb), la nucleoproteína NP (68 Kb), la fosfoproteína P (52 Kb), la proteína de matriz M (42 Kb) y dos glicoproteínas, la hemaglutinina-neuraminidasa (HN) (66 Kb) y la proteína de fisión F (71 Kb) la cual está formada por los polipeptidos F1 y F2 (Reyes *et al.*, 2002).

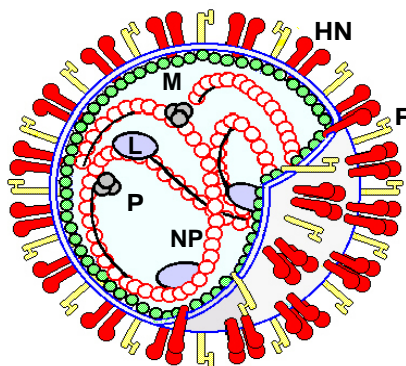


Figura 2. Esquema del RVP y proteínas que lo constituyen. En la superficie de la membrana se encuentran las glicoproteínas HN y F, en la parte interna se halla la proteína de matriz M. En el interior se ligan al ARN las nucleoproteínas (NP) que conforman la nucleocápside helicoidal y las proteínas P y L que constituyen el complejo con actividad polimerasa del virus (Reyes *et al.*, 2002).

Las proteínas HN y F son transmembranales, la mayor parte de su estructura se encuentran expuestas en la superficie del virión, y el segmento intraviral hace contacto con la proteína M, la cual se encuentra en la parte interna de la membrana. La proteína M posee características electrostáticas que sirven como puente entre la nucleocápside y las proteínas HN y F, por lo que participa en el ensamblaje del virion. Las NP se unen al ARN genómico mediante interacciones hidrofóbicas para dar origen a la nucleocápside, brindándole protección al genoma. La polimerasa viral se conforma por un complejo entre las proteínas P₃ y L. Otras proteínas no tienen un papel estructural del virion, como las proteínas V y C que tienen una actividad inhibitoria sobre el complejo de la polimerasa viral (Santos *et al.*, 2004).

1.3 Infección sistémica.

La glicoproteína HN da inicio a la infección al reconocer el receptor específico de membrana de la célula hospedera NeuAc α 2,3Gal y adherirse a las células huésped. Un cambio conformacional de la proteína HN activa la proteína F, la cual es responsable de fusionar la membrana viral con la célula huésped, de la lisis de eritrocitos y de la formación de sincicios en cultivos celulares. De este modo se vierte el material genético viral y la maquinaria replicativa al interior de la célula, donde se llevara a cabo todo el ciclo viral. Una vez en el medio citoplasmático, la polimerasa viral lleva a cabo la síntesis del genoma y transcribe los ARN mensajero (ARNm) para cada proteína. Gracias a la polaridad negativa del virus se lleva a cabo la síntesis de intermediarios positivos (antigenomas) que sirven de molde para la síntesis del genoma. Además se sintetizan proteínas como C y V que no forman parte de la estructura infectante del virión y, al parecer, están implicadas en la regulación de la transcripción y replicación del genoma viral (Santos *et al.*, 2000). Las proteínas traducidas se dirigen a su sitio de ensamble; NP, L y P se acoplan al ARN recién sintetizado y M se ubica en la parte interna de la membrana celular. HN y F se sintetizan en el retículo endoplasmático y se modifican en el aparato de Golgi y posteriormente se acoplan a la membrana plasmática (en contacto íntimo con M) (Reyes *et al.*, 2002).

La afinidad de las proteínas NP, L y P con la proteína M, y esta última con las proteínas HN y F, es determinante para el ensamble del virión, el cual se libera por exocitosis. La expresión de las proteínas virales en la membrana de la célula infectada, genera la fusión con las células vecinas, dando lugar a la formación de sincicios, lo cual le permite al virus infectar otras células sin la dispersión del virus en el medio extracelular (Santos *et al.*, 2004) (Figura 3).

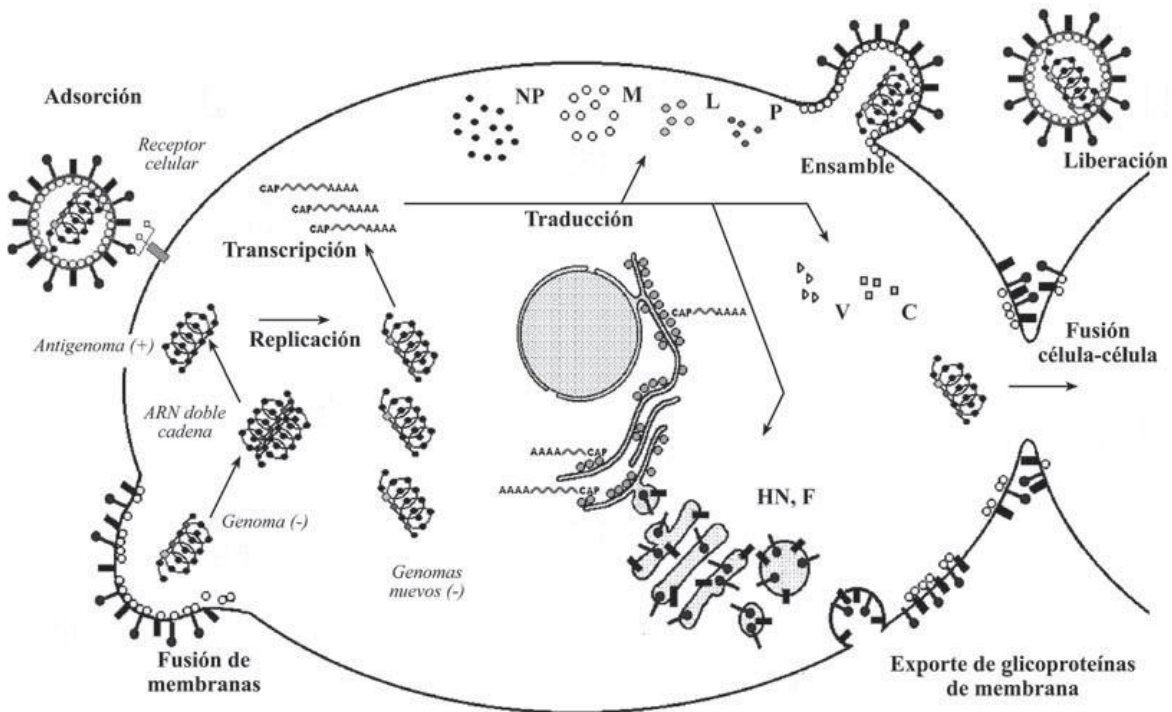


Figura 3. Representación gráfica del ciclo de replicación de los Paramixovirus. En el texto se explican los pasos de la replicación del virus (Santos *et al.*, 2004).

Estudios de infección experimental en cerdos lactantes han demostrado la multiplicación inicial del RVP en la mucosa nasofaríngea y tejido linfático asociado; posteriormente el virus se disemina por vía aérea a los bronquios y pulmones donde se replica abundantemente y, donde al parecer se disemina al resto del organismo (Santos *et al.*, 2000). Durante la fase de viremia el virus se transporta en eritrocitos y monocitos, lo que le permite infectar órganos linfáticos y reproductores (Reyes *et al.*, 2002; Reyes *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2004).

El RVP tiene afinidad por tejido nervioso de cerdos neonatos y lactantes, por células germinativas testiculares y de los conductos epididimarios en individuos pospúberes, por tejido glandular como las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, ovarios e hígado, además de órganos linfoides y hematopoyéticos (Stephano, 1993). El ingreso del RVP al sistema nervioso central, parece ocurrir en el bulbo olfatorio y posteriormente se disemina al hipocampo, cerebro medio y cerebelo donde se replica abundantemente (Santos, 2000; Reyes *et al.*, 2002).

1.4 La proteína Hemaglutidina-Neuraminidasa (HN) del RVP.

La HN se considera la principal proteína involucrada en el inicio de la infección y la más inmunogénica (Santos *et al.*, 2004; Borraz *et al.*, 2008). El marco de lectura abierto de la HN del RVP posee 1731 pb que codifica una proteína de 576 residuos de aminoácidos. Es una proteína integral de membrana de tipo II de aproximadamente 63 kDa en su forma monomérica, con cuatro sitios potenciales de N-glicosilación, un pequeño dominio hidrofóbico cercano a la región amino terminal con el que se ancla a la membrana viral y un dominio extraviral más grande donde se encuentran los sitios activos de reconocimiento y catálisis (Doms *et al.*, 1993). En trabajos realizados por Sánchez Betancourt y col., predijeron la estructura tridimensional de la proteína HN del RVP, encontrando que conserva la conformación típica de paramixovirus, la cual consiste en una estructura simétrica formada por seis hojas- β antiparalelas, cuatro α -hélices, organizadas como un barril con el sitio activo en la región central (Figura 4). Se encuentra en la envoltura viral en forma de tetrámeros constituidos por dímeros unidos por enlaces no covalentes cuyo dominio intraviral está en contacto con la proteína M. La proteína madura posee cadenas de oligosacáridos unidos mediante enlaces N-glicosídicos, los cuales proporcionan estabilidad, solubilidad, protección, cooperación en el plegamiento y en el transporte de la proteína a la membrana celular (Crennell *et al.*, 2000).

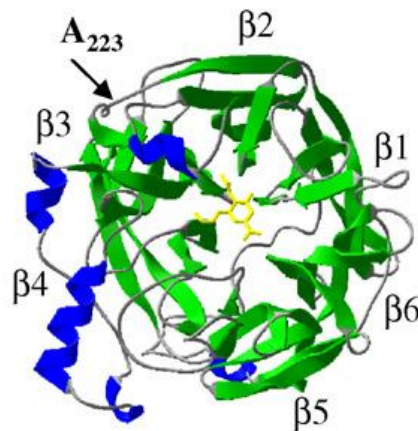


Figura 4. Predicción de la estructura tridimensional de la proteína HN. Vista superior de la proteína, donde se observa superpuesta una molécula de ácido siálico (amarillo) en el sitio activo ubicado en el centro (Sánchez *et al.*, 2008).

1.5 Función biológica de la proteína HN.

La glicoproteína HN de los paramixovirus es responsable de reconocer el receptor y de la adhesión a las células blanco en la infección. Se considera una proteína multifuncional por presentar actividad hemaglutinante, neuraminidasa y promover la fusión de la membrana viral con la célula huésped (Santos *et al.*, 2004). Tiene la capacidad de hidrolizar ácido siálico celular (actividad neuraminidasa) presente en su receptor específico NeuAc α 2,3Gal (disacárido sialil α 2,3galactosa), que se encuentra como componente terminal de diversos glicolípidos y glicoproteínas celulares (Figura 5) (Reyes *et al.*, 1999). Por ello el ácido siálico del disacárido sialil α 2,3 lactosa es determinante para la infección. La actividad de neuraminidasa consiste en la remoción de residuos de ácido siálico de la progenie viral de la célula hospedera para evitar agregados virales y facilitar la diseminación viral (Colman *et al.*, 1993).

En el sistema nervioso central (SNC) de cerdos neonatos la mayor expresión de Neu5Ac α 2,3Gal se localiza en cerebelo, médula oblonga y tálamo, así como en las estructuras involucradas en la conducción del estímulo olfatorio: nervio, bulbo y tracto olfatorio, corteza del lóbulo piriforme e hipocampo, pero su expresión sufre modificaciones durante el proceso de maduración de los cerdos, siendo más abundantes en testículos y epidídimo en adultos (Vallejo, 2000). Estos resultados indican que la expresión de Neu5Ac α 2,3Gal en un tejido, determinan el tropismo tisular y la susceptibilidad a la infección viral.

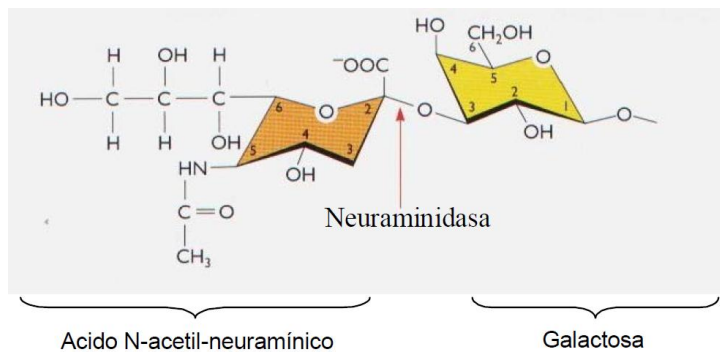


Figura 5. Estructura del disacárido sialil α 2,3galactosa. Esta molécula está formada por un residuo de ácido N-acetil-neuramínico unido en enlace glicosídico α al carbono 3 de la galactosa. Se muestra el sitio de corte de la enzima neuraminidasa (Reyes, 2002).

1.6 La levadura *Schizosaccharomyces pombe*.

Schizosaccharomyces pombe fue aislada por primera vez de la cerveza del mijo de Africa Oriental y fue descrita en 1893 por P. Lindner (Griffiths, 1998; Forsburg, 2005). El nombre de la levadura deriva de Schizo que significa rompimiento, sacaro significa azúcar, mykes es hongo y pombe significa cerveza en Swahili (Forsburg, 2005).

S. pombe es un hongo ascomiceto en forma de barra lineal que crece en sus extremos y se divide por fisión binaria (Figura 6). El genoma de *S. pombe* se encuentra totalmente secuenciado y consta de 13.8 millones de pares de bases distribuidos en tres cromosomas donde se han identificado 4,824 genes que codifican proteínas, siendo éste a la fecha el número más pequeño de genes contenido en un genoma eucarionte (Hernández, 2008).

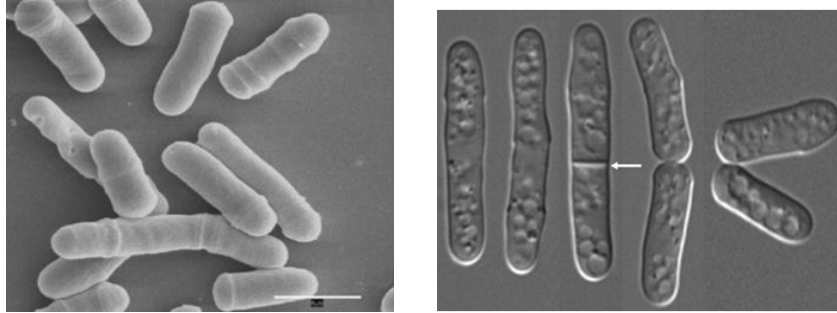


Figura 6. *Schizosaccharomyces pombe*.

Comparte muchas características con las células eucariotas superiores como la presencia de un típico ciclo celular eucariota (G1, S, G2 y M), procesamiento transcripcional del ARNm con intrones y exones, maduración y glicosilación de proteínas similar al de eucariotas superiores. Existe como dos tipos sexuales opuestos h^- y h^+ que se multiplica asexualmente por fisión binaria o sexualmente cuando ambos tipos de células están presentes (Forsburg, 2005).

1.7 *Schizosaccharomyces pombe* como sistema de expresión.

Los sistemas de expresión para la obtención de biofármacos, se basan en vectores que permiten la clonación del gen que codifica la proteína de interés en una célula hospedera como bacterias, levaduras y líneas celulares. Diversos biofármacos como factores de coagulación, hormonas, citocinas y enzimas han sido aprobados para su distribución comercial. La demanda creciente de medicamentos para el tratamiento de enfermedades está impulsando el desarrollo de biotecnologías para la producción sustentable de biofármacos inocuos, efectivos y de costo razonable (Drago *et al.*, 2006).

La expresión de proteínas recombinantes como posibles vacunas de nueva generación ha sido importante en los últimos años. Estas pueden expresarse en bacterias como *Escherichia coli*, sin embargo las bacterias no pueden expresar proteínas muy grandes oligoméricas, ricas en puentes de disulfuro y proteínas que requieren modificaciones post-traduccionales como la glicosilación (Forsburg, 2005; Drago *et al.*, 2006).

Las levaduras son capaces de glicosilar y de plegar proteínas complejas, incluyendo aquellas que tienen un número elevado de puentes disulfuro, ya que su proceso de producción es muy similar al de las células de mamífero. A diferencia de la bacteria *E. coli*, *S. pombe* provee de modificaciones post-traduccionales en proteínas que se producen en los organismos eucariotas superiores, las cuales son críticas para la estructura y función de las proteínas en eucariontes, como son la fosforilación y acetilación (Forsburg, 2005; Drago *et al.*, 2006). En el laboratorio suele mantenerse en su fase haploide, pero debido a que poseen una fase sexual (diploide), todo el ciclo de vida de las células de levadura proporciona un modelo simple para eventos que ocurren en las células humanas.

Autores como Quino Lu *et al.* en 1997 utilizaron a *S. pombe* como sistema de expresión y purificación del gen GST (Glutathione S-transferase) empleando los vectores de expresión pESP-1 y pESP-2 que usan el promotor negativo a tiamina *nmt1* para la inducción de la expresión del gen (Quino *et al.*, 1997).

Otro ejemplo del uso de *S. pombe* como sistema de expresión, es su uso para la sobreproducción de la proteína heteróloga Lipocortina 1 humana, donde se encontró un 50 por ciento de proteína soluble y se obtuvieron 150 mg de material altamente purificada a partir de 10 gramos de pasta celular húmeda. En este caso, la expresión de la Lipocortina 1 fue impulsada por el promotor de citomegalovirus humano (hCMV), donde su vector de expresión además posee un gen de resistencia a neomicina (neo) bajo el control del promotor temprano de SV40, el cual permite controlar el número de copias mediante las concentraciones del antibiótico geneticina (G418). La proteína purificada era equivalente a su homólogo nativo con respecto a la antigenicidad y propiedades bioquímicas (Giga *et al.*, 1994).

S. pombe se ha utilizado como sistema de expresión para la producción de diversas proteínas que requieren modificaciones postraduccionales, obteniendo resultados satisfactorios. Esta levadura representa ser adecuada para la sobre expresión de la proteína viral HN-RVP

2. JUSTIFICACIÓN

El *Rubulavirus porcino* (RVP) es el agente causal de la enfermedad de los ojos azules en cerdos, produce problemas respiratorios, neurológicos y de esterilidad en neonatos y adultos, posee una tasa de mortalidad del 80 al 90% por lo que genera grandes pérdidas económicas en la industria pecuaria mexicana. Esto hace necesario generar nuevos tratamientos preventivos de bajo costo, más seguros y adaptables a las nuevas variedades de RVP. Estudios recientes muestran que la región centro-oeste de México posee una prevalencia serológica importante de RVP y que en un mismo estado están circulando cepas antigénicamente diferentes, sugiriendo que el uso de una vacuna con un solo antígeno puede ser deficiente para el control de la enfermedad. Sin embargo, diferentes investigaciones indican que la proteína HN del RVP es la principal proteína involucrada en el inicio de la infección, por lo que se considera la más inmunogénica del virión, además se ha reportado que la función de neuraminidasa que presenta es un factor de virulencia en los diferentes paramixovirus.

Las proteínas recombinantes provenientes de sistemas de expresión como las levaduras, pueden generar mejores resultados por su fácil manipulación para producir diversas variedades de las proteínas. Por lo anterior, la producción de HN como proteína recombinante en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*, podría otorgarnos el diseño de una posible vacuna como recurso preventivo.

En el Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular se está desarrollando una línea de investigación sobre la expresión y purificación de proteínas recombinantes virales para posibles aplicaciones como vacunas, esto en diferentes levaduras tanto *S. pombe* como *P. pastoris* para tener alternativas de producción y respuestas inmunológicas. Este proyecto que presento como tesis de licenciatura apoya algunos objetivos más amplios de la tesis doctoral del MC. José Luis Cerriteño Sánchez del Posgrado en Ciencias Químicas, área Bioquímica y Biología Molecular.

3. OBJETIVOS

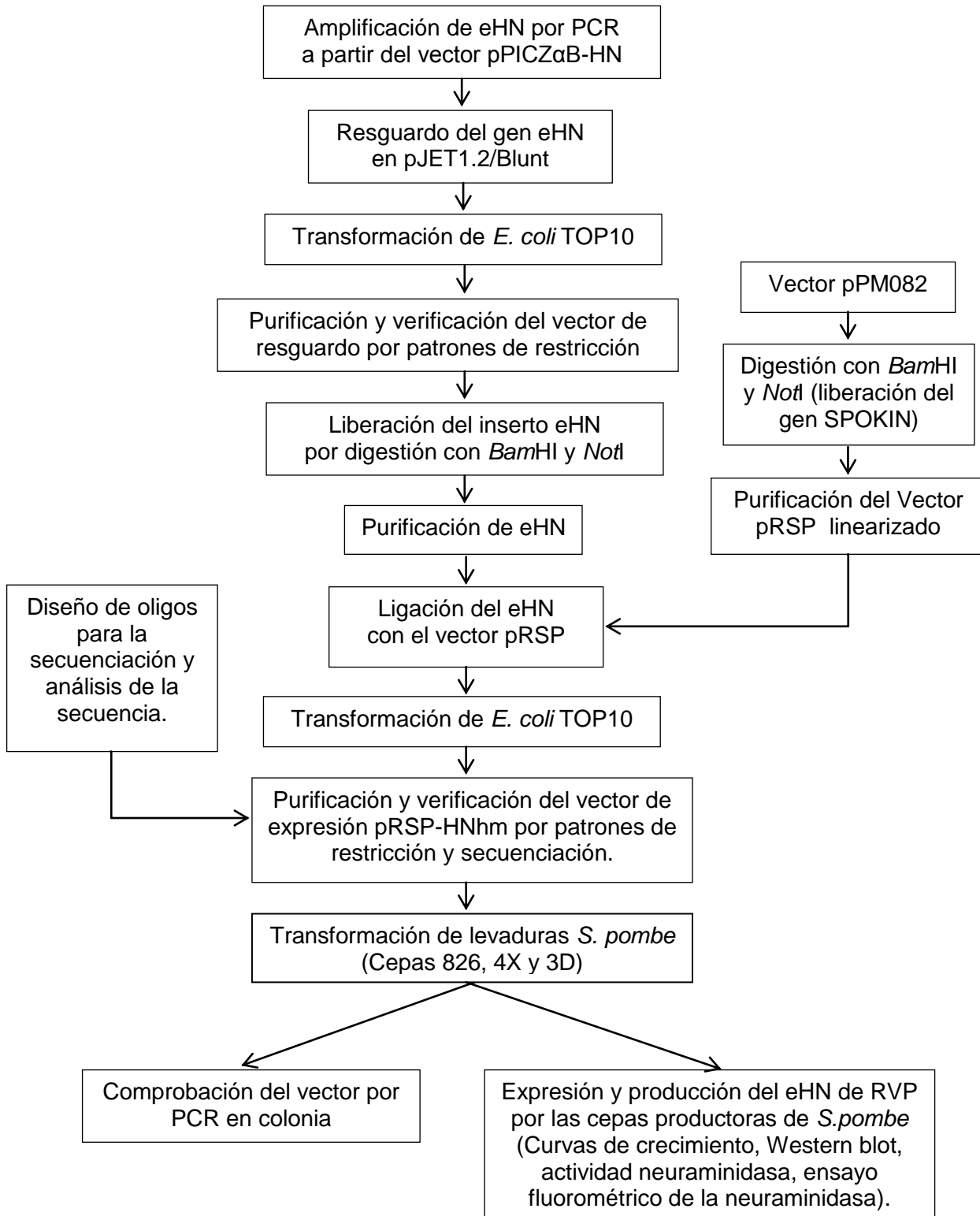
Objetivo general

Obtener cepas de *Schizosaccharomyces pombe* productoras del ectodominio de la hemaglutinina-neuraminidasa (eHN) del *Rubulavirus porcino* (RVP).

Objetivos particulares

- Obtener el marco de lectura abierto del eHN del RVP de PACI.
- Clonar el eHN en un vector de resguardo.
- Generar un sistema de expresión del eHN para la levadura *S. pombe*, mediante la obtención del vector recombinante pRSP-HNhm.
- Obtener cepas haploides y diploides de *S. pombe* transformadas con el vector recombinante pRSP-HNhm.
- Caracterizar el crecimiento celular de las cepas productoras del eHN durante la inducción de la expresión.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL



5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material biológico

Se trabajó con la cepa *Escherichia coli* One Shot Top 10 (Invitrogen), las cepas auxotróficas de levadura *S. pombe*: 826 (h^+/h^- : leu1-32/leu1-32, ade6-M210/ade6-M216, ura4-D18/ ura4-D18) y 3D ($3Dh^+$: ura4-D18, leu1-32, ade6-M210, $ape1^-$, $dpa1^-$) que presentan auxotrofías a adenina, leucina y uracilo, la cepa 4X (h^+ : ura4-D18, leu1-32, ade6-M210, his7-366) que presenta auxotrofías a adenina, leucina, uracilo e histidina. Se trabajó también con la cepa silvestre de *S. pombe* 972.

5.2 Material y reactivos

Se utilizó el kit para PCR Master Mix de Thermo Scientific y el kit para Maxiprep GeneJET Gel Extraction de Fermentas. Los oligonucleótidos para PCR se sintetizaron con la compañía IDT. Las enzimas de restricción utilizadas para el análisis de los vectores recombinantes fueron adquiridas de Fermentas y Promega. Las soluciones y medios de cultivos fueron preparados con reactivos procedentes de SIGMA-ALDRICH y BIOXON respectivamente.

5.3 Soluciones y medios de cultivo

La composición y preparación de las soluciones de trabajo y medios de cultivo aparecen en el anexo.

5.4 Herramientas informáticas

Para el diseño de oligonucleótidos se empleó la herramienta OligoANALYZER 3.1 disponible en línea en la página de la empresa IDTDNA (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>). Para el análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se utilizaron las herramientas en línea EXPASY (<http://www.expasy.org/>) y el servidor “NetNGlyc” (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Se empleó el paquete informático “Lasergene DNASTar 12.1” para analizar las secuencias nucleotídicas de los

vectores y del HN-RVP, así como para analizar las secuencias de aminoácidos de la proteína HN-RVP.

5.5 Obtención del ORF de eHN por PCR

Las secuencias y características fisicoquímicas de los oligonucleótidos Pic1 y Pic2 utilizados en la PCR para la obtención del ORF del ectodominio de la hemaglutinina-neuraminidasa (eHN) del RVP se presentan a continuación:

Secuencia nucleotídica				
Delantero (Pic1)	5'ATAGCGGCCGCATGGGTAACCTGCAGAGTACAATA3'			
Reverso (Pic2)	5'CGCCGCGCGGATCCTTATCAATGATGATGATGATG3'			
Propiedades fisicoquímicas				
Cebador	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Contenido de GC (%)	Peso molecular (g/mole)
Delantero	35	67	51.4%	10814.1
Reverso	35	65.5	51.4%	10787.0

Los componentes de la mezcla de reacción de la PCR y el programa del mismo se muestran enseguida:

Mezcla de reacción		
Compuesto de reacción	Concentración final	Volumen final
Master mix (2X)	1X	50µl
Cebador delantero (10µM)	1µM	10µl
Cebador reverso (10µM)	1µM	10µl
Vector pPICZaB-HN (136µg/mL)	≈1µg	7.5µl
Agua		22.5µl
Volumen final		100µl

Programa de PCR			
Etapas	Temperatura °C	tiempo	No. de ciclos
Pre-desnaturalización	94	2min	1
Desnaturalización	94	1min	30
Alineamiento	66	1min	
Extensión	72	2min	
Extensión final	72	6min	1

Toda la mezcla del producto de PCR (100µl) se corrió en un gel de agarosa 0.7% a 100V y se purificó a partir de banda para su posterior uso. Se corrió otro gel de agarosa al 0.7% con una muestra del purificado con el objetivo de extrapolar la concentración del mismo. Todas la PCR se realizaron en un termociclador Multigene II.

5.6. Purificación de bandas a partir de geles de agarosa.

Una vez que se corrió el gel de agarosa con la muestra a purificar, se colocó en un recipiente de plástico transparente para proteger el ADN de la luz UV, y rápidamente con ayuda de un bisturí se corta la sección de la banda a purificar. Se utilizó el Kit GeneJET Gel Extraction de Fermentas. Se añadió 1 volumen de Buffer de unión por cada volumen de gel y se incubó de 50 a 60°C hasta estar completamente disuelta la agarosa. Se transfirió a la columna de purificación, se centrifugó a 12000rpm por 1min y se descartó el permeado. Posteriormente se adicionaron 700µl de buffer de lavado y se procedió a centrifugar a 12000 rpm por 1min para transferir la columna a un tubo nuevo. Se adicionaron 50µl de agua desionizada estéril y se centrifugó dos veces por 1min a 12000rpm. Para confirmar la purificación se corrió por electroforesis un gel de agarosa al 0.7% con 1% de bromuro de etidio a 100V.

5.7. Resguardo del eHN en el vector pJET1.2/Blunt.

Se utilizó el vector de clonación pJET1.2/Blunt y el Kit CloneJET™ PCR Cloning de Fermentas, utilizando el protocolo Sticky, que permite dejar los extremos romos para una adecuada clonación en el vector. Se utilizó el ORF del eHN obtenido por PCR anteriormente.

Se calculó una relación molar aproximada de 2.5:1 (inserto:vector) para la clonación; de la siguiente manera:

Reacción molar aproximada

$$\text{Vector pJET1.2/blunt} \quad \frac{50\text{ng}/\mu\text{l}}{2974\text{pb}} = 0.0168$$

$$\text{Inserto eHN} \quad \frac{2.5\text{ng}/\mu\text{l}}{645\text{pb}} = 0.00152$$

De este modo la mezcla de reacción se llevó a cabo de la siguiente manera:

Compuesto	Volumen
Buffer de reacción (2X)	10 μ l
Inserto eHN (2.5ng/uL)	7.5 μ l
Enzima Blunting	1 μ l
Volumen final	16 μ l

Se incubó la reacción a 70°C por 5 minutos y se le aplicó un choque térmico con hielo. Para la ligación se añadió 1 μ l del vector pJET (50 ng/ μ l), 1 μ l de enzima T₄DNA ligasa (5u/ μ l) y se incubó a 22°C por 2 horas. Posteriormente se incubó toda la noche (12 horas) a 4°C. Este producto de ligación se amplificó en bacteria *E. coli* y purificó el vector de resguardo pJET-HNhm.

5.8. Generación de células competentes de *E. coli* TOP10.

Este protocolo se basa en el artículo publicado por Cohen *et al.* (1972). Se inocularon 3ml de precultivo de medio LB con una colonia de *E. coli* TOP10 y se llevó a crecimiento a 37°C toda la noche. Con ello se inoculó 25ml de medio LB y se dejó en crecimiento a 37°C a 250rpm hasta alcanzar 0.35ua (aproximadamente

3 horas). Se transfirió el caldo a un tubo de 50ml estéril, se colocó en hielo por 10 minutos y posteriormente se centrifugó a 4100rpm por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se colocó el tubo en posición invertida por 1 minutos para eliminar las trazas de cultivo. Se resuspendió el pellet en 15ml de solución MgCl₂-CaCl₂ (80mM MgCl₂, 20mM CaCl₂) frío. Posteriormente se centrifugó a 4100rpm por 10 minutos a 4°C. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y se colocó el tubo en posición invertida por 1 minuto para eliminar las trazas de la solución. Se resuspendió en 1ml de solución CaCl₂ (0.1M) fría y se transfirió a un tubo de 1.5ml. En este punto las células ya pueden ser usadas para transformarse o bien pueden mantenerse en esta solución a 4°C de 12 a 24 horas.

5.9. Transformación de Células competentes *E. coli* TOP10.

En un tubo de 1.5ml se re suspendieron en 200µl las células competentes con un volumen no mayor a 10µl (14.15ng) de ADN de transformación. El tubo se colocó en hielo 30 minutos, y posteriormente se transfirió a un baño a 42°C por 90s exactamente y rápidamente se transfirió a hielo por 1 a 2 minutos. Se adicionaron 800µl de medio LB y se dejó crecer a 37°C por 45 minutos. Subsecuentemente se transfirieron 200µl de cultivo a una placa de agar con ampicilina (100µl/ml) y se incubó a 37°C de 12 a 16 horas.

5.10. Extracción de ADN plasmídico de células *E. coli* transformadas.

Se utilizó un Maxiprep bajo las siguientes condiciones: Se sembraron 2.5ml de *E. coli* transformadas en un precultivo de LB con ampicilina toda la noche. Se inocularon 10ml de medio LB con ampicilina y se creció hasta alcanzar turbidez completa. Para recuperar las células se centrifugó a 3600rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió en 1ml de solución I, 2 ml de solución II y 1.5ml de solución III, mezclando cada vez que se agregó cada solución. Posteriormente se colocó en hielo 10min en reposo y al terminar se mezcló con ayuda de un vortex, con lo que se formó un precipitado blanco floculante que corresponde al ADN cromosomal, proteínas, ARN de alto peso molecular, membrana SDS y potasio. Posteriormente se centrifugó a 4000rpm durante 15

minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo filtrando con papel filtro. Se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol frío y se guardó 10 minutos a temperatura ambiente. Subsecuentemente se centrifugó a 5000rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente y se esperó hasta que secó. El precipitado se disolvió en 250µl de agua desionizada estéril y se agregaron 3µl de RNAsa, incubando a 37°C por 15 minutos. Se añadió 1 volumen de mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex y se centrifugó a 12000rpm durante 10 minutos. Posteriormente se recuperó el sobrenadante de la primera capa. Se añadió 1 volumen de cloroformo, se mezcló en vortex y se volvió a centrifugar a 12000rpm por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante de la primera capa, se agregaron 2.5 volúmenes de isopropanol y se dejó precipitando a -20°C durante mínimo 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 12000rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado para finalmente disolver en 500µl de agua desionizada estéril.

Se cuantificó la concentración de vector obtenido por espectrofotometría a una longitud de onda de 260nm y se determinó su pureza mediante la relación 260/280nm. Para verificar la extracción de ADN plasmídico, se corrieron por electroforesis geles de agarosa al 0.7% con 1% de bromuro de etidio a 100V.

5.11. Pruebas por patrones de restricción para el vector pJET-HNhm.

Se obtuvo el ADN plasmídico de las 6 clonas seleccionadas y se realizaron pruebas por patrones de digestión con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I. Los componentes de la reacción se muestran a continuación:

Digestión con enzima <i>Bam</i> HI	
Compuesto	Volumen
Buffer tango (2X)	1µl
Enzima <i>Bam</i> HI (1u/µl)	2µl
Vector pJET-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	2µl
Volumen final	10µl

Digestión con enzima <i>Xba</i>I	
Compuesto	Volumen
Buffer tango (2X)	0.5µl
Enzima <i>Xba</i> I (1u/µl)	1µl
Vector pJET-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	3.5µl
Volumen final	10µl

Se seleccionó una clona (4) a la que se le realizó la digestión con las enzimas de restricción *Not*I, *Bam*HI, *Not*I/*Bam*HI y *Bg*II. Los componentes de las reacciones se muestran en seguida:

Digestión con enzima <i>Bam</i>HI	
Compuesto	Volumen
Buffer tango (2X)	2µl
Enzima <i>Bam</i> HI (1u/µl)	0.5µl
Vector pJET-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	2.5µl
Volumen final	10µl

Digestión con enzima <i>Not</i>I	
Compuesto	Volumen
Buffer 0 (2X)	1µl
Enzima <i>Not</i> I (1u/µl)	0.2µl
Vector pJET-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	3.8µl
Volumen final	10µl

Digestión con enzimas <i>Bam</i>HI y <i>Not</i>I	
Compuesto	Volumen
Buffer 0 (2X)	1µl
Enzima <i>Bam</i> HI (1u/µl)	0.5µl
Enzima <i>Not</i> I (1u/µl)	0.2µl
Vector pJET-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	3.3µl
Volumen final	10µl

Digestión con enzima <i>Bgl</i>II	
Compuesto	Volumen
Buffer tango (2X)	2µl
Enzima <i>Bgl</i> II (10u/µl)	0.5µl
BSA (0.5mg/ml)	0.2µl
Vector pJET-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	12.3µl
Volumen final	20µl

Todas las mezclas de reacción se incubaron por 5 horas a 37°C en baño María. Posteriormente se tomaron 10µl del producto de las digestiones, se agregaron en geles de agarosa al 0.7% teñidos con bromuro de etidio (1%) y se corrieron a 100V usando TBE 0.5X.

5.12. Generación de cultivos permanentes de *E. coli* Top10 y cepas de *S. pombe* transformadas.

Para la obtener cepas permanentes de *E. coli* Top10 transformadas, se utilizando 750µl de cultivo en medio LB a 0.35ua y 250µl de glicerol para un volumen final de 1000µl y en seguida se guardaron a una temperatura de -70°C.

Para la obtención de cepas permanentes de *S. pombe* transformadas se utilizaron 400µl de cultivo en medio YNB a 4UA y 200µl de glicerol para un volumen final de 600µl. Se agitaron suavemente varias veces y se guardaron a una temperatura de -70°C

5.13 Construcción del vector de expresión pRSP-HNhm.

Se realizó la siguiente digestión del vector pJET-HNhm y del vector PM082 con las enzimas *Not*I y *Bam*HI para liberar el inserto eHN y la región del Spokin respectivamente, dejando de este modo extremos adhesivos:

Digestión con enzimas <i>Bam</i>HI y <i>Not</i>I	
Compuesto	Volumen
Buffer 0 (2X)	10µl
Enzima <i>Bam</i> HI (1u/µl)	6µl
Enzima <i>Not</i> I (1u/µl)	1.6µl
Vector pJET-HNhm / Vector PM082)	30µl
Agua	52.4µl
Volumen final	100µl

La mezcla de reacción se incubó por 5 horas a 37°C en baño María. Posteriormente el producto de la digestión se corrió un gel de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio (1%) a 100V con TBE. Se purificó a partir de banda tanto el inserto eHN y el vector pRSP y se estimaron sus concentraciones mediante la comparación con la intensidad de luz del marcador.

Los producto de las digestiones se ligaron calculando una relación molar de aproximada de 1:12 (vector:inserto) usando la siguiente mezcla de ligación:

Compuesto	Volumen
Buffer de reacción (2X)	2µl
Inserto eHN (2.5ng/uL)	8.5µl
Vector pRSP (0.83 ng/uL)	8.5µl
Enzima Ligasa (5u/µl)	1µl
Volumen final	20µl

Se incubó a 22°C por 2hrs y posteriormente se incubó a 4°C toda la noche (12hrs). Para la transformación de células competentes se utilizaron 10µl (14.15ng) de ADN de transformación.

5.14. Pruebas por patrones de restricción para el vector de expresión pRSP-HNhm.

Se extrajo el ADN plasmídico de 6 clonas y se sometieron a una prueba de restricción enzimática con *NotI* y *BamHI*. Los componentes de la reacción son los siguientes:

Digestión con enzimas <i>BamHI</i> y <i>NotI</i>	
Compuesto	Volumen
Buffer 0 (2X)	1µl
Enzima <i>NotI</i> (1u/µl)	0.2µl
Enzima <i>BamHI</i> (1u/µl)	0.5µl
Vector pRSP-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	3.3µl
Volumen final	10µl

Se obtuvo nuevamente el ADN plasmídico de la clona seleccionada y se realizó una prueba por patrones de restricción con las enzimas *BamHI*, *NotI*, *BamHI/NotI* y *EcoRI*, siendo la mezcla de reacción siguiente:

Digestión con enzima <i>BamHI</i>	
Compuesto	Volumen
Buffer tango (2X)	2µl
Enzima <i>BamHI</i> (1u/µl)	0.5µl
Vector pRSP-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	2.5µl
Volumen final	10µl
Digestión con enzima <i>NotI</i>	
Compuesto	Volumen
Buffer 0 (2X)	1µl
Enzima <i>NotI</i> (1u/µl)	0.2µl
Vector pRSP-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	3.8µl
Volumen final	10µl
Digestión con enzimas <i>BamHI</i> y <i>NotI</i>	
Compuesto	Volumen
Buffer 0 (2X)	1µl
Enzima <i>BamHI</i> (1u/µl)	0.5µl
Enzima <i>NotI</i> (1u/µl)	0.2µl
Vector pRSP-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	3.3µl
Volumen final	10µl

Digestión con enzima <i>EcoRI</i>	
Compuesto	Volumen
Buffer 0 (2X)	1µl
Enzima <i>EcoRI</i> (10u/µl)	0.5µl
Vector pRSP-HNhm (3.27µg/µl)	5µl
Agua	3.5µl
Volumen final	10µl

Todas las mezclas de reacción se incubaron por 5 horas a 37°C en baño María. Posteriormente se tomaron 10µl del producto de las digestiones y se corrieron en geles de agarosa al 0.7% teñido con bromuro de etidio (1%) a 100V con TBE.

5.15. Verificación del vector recombinante pRSP-HNhm.

5.15.1. Secuenciación del vector recombinante pRSP-HNhm.

Diseño de oligonucleótidos.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la amplificación del eHN en el vector recombinante pRSP-HNhm. Por recomendaciones del IBT, se diseñaron para amplificar con 50pb antes y después de la sección de interés, con la finalidad de visualizar mejor la secuencia del inserto eHN.

Las propiedades fisicoquímicas de los cebadores fueron determinadas con la herramienta informática “OligoANALYZER 3.1” disponible en línea en la página de la empresa IDTDNA (www.idtdna.com). Con ayuda del programa “Editseq” se determinó el inverso complementario de la secuencia del oligonucleótido reverso. Se utilizaron el programa “SeqBuidier” del paquete informático Lasergene para analizar la secuencia y seleccionar los sitios de corte. Utilizando la herramienta informática del NCBI se analizaron las secuencias nucleotídicas y se corroboró la posición de los cebadores en la secuencia del vector recombinante pRSP-HNhm.

5.15.2. PCR del vector recombinante pRSP-HNhm

Se realizó un Maxiprep para la extracción del ADN plasmídico de la clona seleccionada y posteriormente se purificó a partir de banda. Se calculó la concentración del vector por espectrofotometría a 260nm, así como su pureza con la relación 260/2080. La mezcla de reacción y el programa de PCR se muestran en seguida:

Mezcla de PCR		
Compuesto de reacción	Concentración final	Volumen final
Master mix (2X)	1X	12.5µl
Cebador delantero (10 µM)	1µM	2.5µl
Cebador reverso (10 µM)	1µM	2.5µl
Vector pRSP-HNhm (3170ng/ml)	≈1µg	0.2µl
Agua		7.3µl
Volumen final		25µl

Programa de PRC			
Etapas	Temperatura °C	tiempo	No. de ciclos
Pre-desnaturalización	95	2min	1
Desnaturalización	95	30s	30
Alineamiento	62	30s	
Extensión	72	2min	
Extensión final	72	6min	1

Para la secuenciación del vector pRSP-HNhn, se prepararon para cada cebador 16µl de la mezcla de reacción requerida, con 0.5µg del vector y 1µM de oligonucleótido, las cuales se mandaron a secuenciar a la “Unidad de síntesis y secuenciación de DNA” del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT). La mezcla se muestra a continuación:

Compuesto	Concentración final	Volumen
Vector pRSP-HNhm (3170ng/ml)	0.5µg	0.15µl
Cebador delantero/reverso (100µM)	1 µM	10µl
Agua		5.85µl
Volumen total		16µl

5.16. Transformación de *S. pombe* con vector recombinante pRSP-HNhm.

Se realizó un precultivo de 3ml en medio completo YE para cada cepa hasta alcanzar una D.O= 2 y se utilizó para inocular un cultivo de 10ml de medio completo YE, adicionando los requerimientos necesarios para cada cepa. Se incubó a 37°C hasta alcanzar 2ua (aproximadamente 16 horas). Las células se centrifugaron a 4000rpm por 5min y se eliminó el sobrenadante, resuspendiendo el pellet en 5ml de TE estéril (pH= 7.5). Nuevamente se centrifugó a 4000rpm por 5min y se eliminó el sobrenadante. El paquete celular se re suspendió en 4ml de acetato de litio 1M (acetato de litio preparado en TE) y se incubó a 30°C por una hora con agitación moderada (130rpm). Se centrifugó a 4000rpm por 5min y se eliminó el sobrenadante, para resuspender el paquete en 200µl de acetato de litio 1M. Se transfirió a un tubo eppendorf y se añadieron 5µl de ADN de transformación (solución 1mg/ml) mezclando suavemente. Se incubó a 30°C por 10 minutos sin agitación. Posteriormente se agregó 1ml de PEG-400 al 50%, se mezcló suavemente hasta homogenizar y se incubó a 30°C por 1h sin agitación. Subsecuentemente se aplicó un choque térmico 5min a 42°C en baño María y se centrifugó a 5000rpm por 30s. Se eliminó el sobrenadante y se lavó sin resuspender el pellet con 1ml de sorbitol 0.8M, el cual se eliminó enseguida. Se agregaron 200µl de sorbitol para resuspender el paquete celular lentamente. Se agregaron las células a una placa de agar YNB con los requerimientos necesarios para cada cepa con excepción de leucina y se sembraron por plaqueo. Se incubó a 30°C por 3 días, que fue cuando se observó presencia de colonias. Las cepas de *S. pombe* transformadas se nombraron 826HN, 3DHN y 4XHN. Se seleccionaron 6 clonas de cada cepa transformada y se sembraron en una placa de YNB para su posterior uso.

5.17. PCR en colonia de las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN.

Con las 6 clonas de 826HN, 3DHN y 4XHN anteriormente seleccionadas, se cultivaron en 3ml de medio YNB y se tomó 1ml cuando alcanzó una DO=4. Para cada muestra se centrifugó a 10,000rpm por 30s, se lavaron dos veces con 1ml de agua estéril y se recuperaron las células centrifugando a 6000rpm por 10 minutos

a 4°C. Se resuspendió el paquete celular en 24µl de solución de zimoliasa (1mg por 60µl de buffer) y se incubó a 37°C por 30 minutos. Se recuperaron las células centrifugando a 3000rpm por 5 minutos a 4°C y se adicionaron 200µl de PBS y 200µg de perlas de vidrio. Se rompieron durante 30 minutos con ayuda de un vortex, cambiando 30s en vortex y 30s en hielo. Se sometió a ebullición durante 10 minutos y se centrifugó a 12000rpm por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se midió su absorbancia por espectrofotometría a 260nm, obteniendo concentraciones similares por lo que se decidió tomar un promedio, siendo de 665µg/ml.

Para la PCR se utilizaron los cebadores Pic1 y Pic2, utilizando la mezcla de reacción y el programa que se muestran a continuación:

Mezcla de reacción		
Compuesto de reacción	Concentración final	Volumen final
Master mix (2X)	1X	5µl
Cebador delantero (10µM)	1µM	1µl
Cebador reverso (10µM)	1µM	1µl
Extracto soluble (665µg/ml)	≈1µg	0.3µl
Agua		2.7µl
Volumen final		10µl

Programa de PCR			
Etapas	Temperatura °C	tiempo	No. de ciclos
Pre-desnaturalización	94	2min	1
Desnaturalización	94	1min	30
Alineamiento	66	1min	
Extensión	72	2min	
Extensión final	72	6min	1

Todo el producto de PCR se cargó en geles de agarosa al 0.7% teñidos con bromuro de etidio (1%) y se corrieron a 100V usando TBE 0.5X.

5.18. Sobreexpresión del eHN del RVP en *S. pombe*.

Se obtuvo un precultivo en 3ml de medio YNB usando las cepa 826HN, 3DHN Y 4XHN (con requerimientos específicos) dejando crecer hasta una D.O=4 (14 horas) y posteriormente se utilizó para inocular 5ml de medio ET a una D.O=0.2 (16hrs). Después de cuatro generaciones, las células se centrifugaron (4000 rpm, 5 minutos) y se lavaron dos veces con agua estéril para inocular 25 ml de medio EMM iniciando a una D.O.= 0.2. El cultivo en medio EMM se dividió en 2 tubos y a uno de ellos se le agregó tiamina (2 μ M). Los cultivos se dejaron crecer a 30°C en agitación continua (175 rpm) hasta alcanzar una absorbancia de 2 (16hrs) y de 4ua (25hrs). Se utilizaron como controles negativos las cepas sin transformar (826, 3D y 4X), los cuales necesitan como requerimiento leucina en su medio de cultivo (anexos).

5.19. Extracto soluble de levaduras.

A partir del cultivo de levaduras en medio EMM, se tomaron 2.5×10^7 células (5ml a DO de 2) y se centrifugaron a 6000 rpm a 4°C por 10 minutos. El paquete celular se lavó dos veces con agua estéril y se centrifugó nuevamente. Las células se resuspendieron en 60 μ l de buffer de zimoliasa con 0.1 mg de Zimoliasa 20-T y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos y el paquete celular obtenido se resuspendió en una solución amortiguadora de 100 μ l de Tris/HCl 5 mM pH= 7.5 y perlas de vidrio (0.5 mm) en igual volumen al de la suspensión celular. El rompimiento celular se realizó mecánicamente auxiliándose con un vortex durante 10min en periodos de 30 segundos de agitación vigorosa y 30 segundos en hielo. Posteriormente se añadieron 200 μ l de Tris/HCl 5mM pH =7.5 y se agitó vigorosamente por 30 segundos. La mezcla se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos, separando el sobrenadante y al precipitado con las perlas se les volvió a realizar el procedimiento de ruptura mecánica con 200 μ l de Tris/HCl 5 mM pH =7.5. Ambos sobrenadantes se mezclaron, se agitaron y se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos, el sobrenadante se colocó en un tubo estéril y se guardó a -20°C hasta su uso.

5.20. Determinación de proteínas totales.

Se utilizó el método de Bradford (modificado de Sedmark y Grossberg, 1977). Esta técnica se fundamenta en la reacción que se produce entre el colorante azul de Coomasie G-250 con los grupos amino de las proteínas, con una sensibilidad de 1 a 10 μ l. Se preparó una solución al 0.06% de azul de Coomasie G-250 en ácido perclórico 3%, se tomaron 5 μ l de extracto soluble, se llevaron a 500 μ l de agua, se adicionaron 500 μ l de solución de azul de Coomasie, se agitó vigorosamente y se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente. La reacción se midió a una absorbancia de 620nm y para calcular la concentración de proteínas se interpoló los valores de absorbancia de la muestra en una curva estándar de albúmina bovina, la cual se muestra en la figura 7.

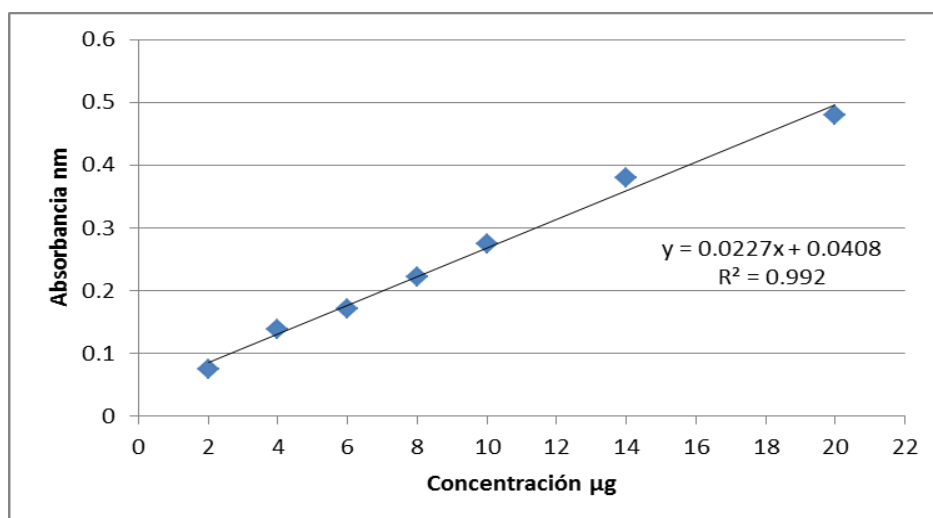


Figura 7. Curva de calibración estándar de albúmina bobina.

5.21. Preparación de geles de Poliacrilamida para SDS-PAGE.

Las soluciones utilizadas se encuentran en el anexo. Antes de realizar las mezclas de los geles, se prepara el Caster formador de geles, asegurándose que se encuentre bien sellada por los vidrios al llenarla previamente con agua destilada. Se utilizó un tubo falcon para la mezcla del gel de corrida como se muestra a continuación: el TEMED se añade unos segundos antes de vaciar a la cámara para formar el gel.

Mezcla del gel de corrida (12%)	
Reactivo	Volumen
Agua desionizada	1.022ml
Tris-HCl pH=8.8	1.88ml
Solución de monómeros	2ml
SDS 10%	50µl
PSA	50µl
Temed	5µl
Volumen total	3ml

Se mezcló suavemente y se colocaron aprox. 4.5ml de la mezcla dentro de la cámara para formar el gel. Inmediatamente se colocó sobre la mezcla una capa de metanol (puro) de aprox. 1.0cm de altura con ayuda de una pipeta. Cuando el gel polimerizo se desechó la capa de metanol y se dejó secar.

En otro tubo falcon se preparó la mezcla del gel concentrador como se muestra enseguida: el TEMED se añade unos segundos antes de vaciar a la cámara para formar el gel.

Mezcla del gel concentrador (4%)	
Reactivo	Volumen
Agua desionizada	2.21ml
Tris-HCl pH=8.8	375µl
Solución de monómeros	350µl
SDS 10%	30µl
PSA	30µl
Temed	3µl
Volumen total	3ml

Con una pipeta se vació la mezcla del gel concentrador sobre el gel de corrida hasta llenar la cámara y se colocó el peine con cuidado de no formar burbujas. Una vez polimerizado se retira el peine cuidadosamente el gel para su uso.

5.22. Preparación de las muestras.

Se precipitaron 25µg de proteína total por muestra, para lo cual se añadieron 9 volúmenes de acetona por volumen de muestra. La reacción fue incubada por 2 horas a -20°C y en seguida fue centrifugada a 10,000 rpm, 4°C por 10min. Se retiró la acetona y se dejó secar el paquete de proteína total.

La proteína precipitada fue resuspendida en 10µl de buffer de tratamiento reductor SDS 1X (anexo) y se incubaron 10min en agua hirviendo antes de ser cargada en el gel.

5.23. Tinción de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS)

Para visualizar las proteínas presentes en los geles de poliacrilamida, se utilizó una solución con 0.05% de azul de Coomasie R-250, 10% de ácido acético y 50% de metanol. Se dejó en agitación constante hasta que las bandas fueron visibles (aproximadamente 1hr). Se eliminó el exceso de colorante del gel usando una mezcla de desteñido de 10% de ácido acético y 50% de metanol hasta que el fondo del gel quedo translucido (2 horas aproximadamente). El gel se lavó con abundante agua destilada y se dejó toda una noche en una solución de glicerol (4%).

5.24. Western Blot

Las proteínas se analizaron en geles de poliacrilamida PAGE-SDS al 15% en una electroforesis a 100V por 3 horas. Las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF para su análisis en Western Blot. Brevemente, se cortó la membrana al tamaño del gel de acrilamida y se marcó la parte por donde se transferirá (cara lisa). Se cortaron 6 papeles filtro al tamaño del gel y se mojaron por capilaridad con tampón de transferencia frío. Posteriormente se sumergió la membrana por 30s en metanol, se lavó en agitación constante con agua destilada por 5min y se lavó tanto el gel como la membrana en tampón de transferencia frío por 10 minutos en agitación. Las proteínas se transfirieron en semiseco a 24V por 50 minutos con límite de amp.= 0.3. La membrana se lavó en agitación con agua

destilada por 10min y para visualizar las proteínas se tiñó con rojo de Ponceau (0.5% Ponceau-S red, 1% ácido acético) por 5min en agitación, después se lavó con agua hasta visualizar las bandas de proteínas, consecuentemente se lavó dos veces la membrana con agua destilada y se procedió a lavar con buffer tbs-tween por 10min. Se bloqueó la membrana con leche descremada (5gr/100ml en buffer tbs-tween) por 12 horas y posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-myc (1:5000) por 7 horas a 4°C en agitación lenta. Finalmente se reveló por quimioluminiscencia utilizando 500µl de una solución 1:1 de luminol y peróxido.

5.25. Actividad neuraminidasa.

Para determinar la actividad enzimática, las proteínas del extracto soluble fueron analizadas según el método del ácido tiobarbitúrico (ATB), Aminof modificado (Aminoff D., 1961). En seguida se muestra la mezcla de reacción utilizada para el ensayo de actividad neuraminidasa:

Mezcla de reacción para actividad neuraminidasa	
Reactivo	Volumen
Buffer de acetatos de sodio 0.4M pH=4	50µl
Fetaina (10mg/ml)	50µl
Muestra	100µl
Volumen final	200µl

La mezcla se incubó a 37°C por 2hrs 30min y por 3hrs. Posteriormente se sometió a ebullición por 2min, se agregaron 50µl de Ac. Periódico (5.7mg/MI de Ácido periódico en HCl 125Mm, preparar en el momento) y se incubó a 37°C por 30min. Pasando este tiempo se agregaron 40µl de arsenito de sodio al 2% en HCl 0.5M, 200µl de ácido tiobarbiturico 0.1M pH9 y se sometió a ebullición 10min y enseguida se colocó en hielo por 2min. En breve se regresó a ebullición unos segundos y se volvió a colocar en hielo hasta que la mezcla tomara un color base.

Subsecuentemente se agregaron 500µl de n-butanol en HCl 0.5M, se centrifugó a 1000g por 5min, se tomaron 250µl de la fase superior para colocar en una placa de Elisa y se leyó a 550nm en un lector de Elisa.

Para el cálculo de los parámetros de la actividad neuraminidasa se utilizó una curva estándar de ácido siálico liberado, la cual se muestra en la figura 8.

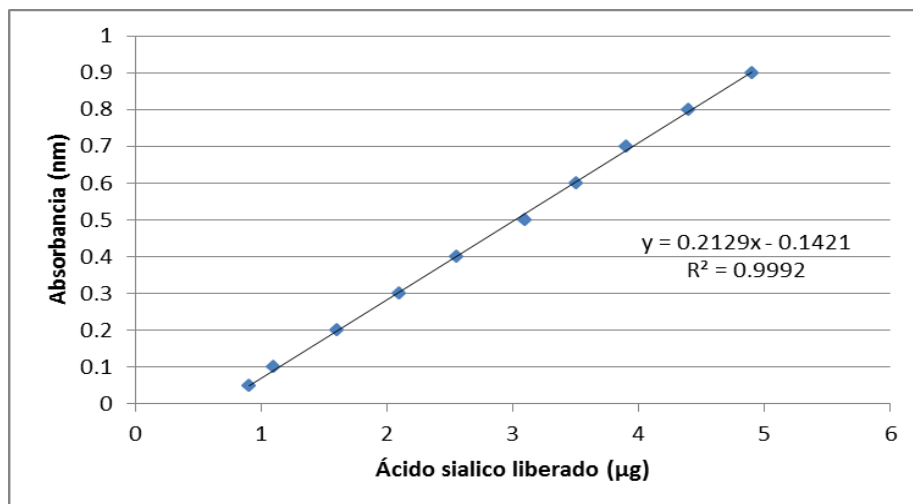


Figura 8. Curva estándar de ácido siálico liberado.

Calculando la ecuación de la recta de esta curva anterior se despejó X para determinar la concentración de ácido neuramínico, y consecuentemente se determinaron los siguientes parámetros como se muestra a continuación:

$\mu\text{g de ácido neuramínico} = \frac{0.1421 + Y}{0.2129}$
$\text{nmoles liberados de ácido neuramínico} = \frac{\mu\text{g de ácido neuramínico}}{0.267233 \text{ g/nmoles}}$
$\text{Unidades de actividad} = \frac{\text{nmoles de ácido neuramínico}}{\text{Tiempo de incubación}}$
$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Unidades de actividad}}{\text{Concentración de proteínas}}$

El valor 0.26733 corresponde al peso molecular del ácido neuramínico en nmoles.

5.26. Ensayo fluorométrico de la neuraminidasa.

La mezcla de reacción se colocó en una microplaca de 96 pozos de fondo oscuro, la cual se incubó a 37°C por 20min. Se llevó a excitación a 375nm y finalmente se leyó la fluorescencia transmitida a 405nm. La mezcla de reacción fue la siguiente:

Compuesto	Volumen
Agua	15µL
Extracto soluble	50µL
Buffer de acetatos 0.4 M pH 4	25µL
MUNANA (1µg/µL)	10µL
Volumen final	100µL

El reporte de los resultados se realiza en unidades de actividad relativa.

5.27. Caracterización de curva de crecimiento celular.

La cepa de *S. pombe* creció bajo el modelo de Monod de crecimiento expresado en la ecuación 1. El modelo fue integrado a su modelo logístico obteniendo la ecuación 2. Mediante el uso de la herramienta “solver” de Excel se iteraron los valores experimentales partiendo de un mínimo. Para calcular el tiempo de duplicación se integró la ecuación 3 de crecimiento. Se substituyó la igualdad $x=2x_0$ y el tiempo fue despejado, finalmente el tiempo fue obtenido de la ecuación 4. De esta forma se obtuvieron los parámetros cinéticos de la levadura (Tabla 10).

Tabla 10. Ecuaciones para la obtención del modelo de crecimiento.

1 $\mu = \mu_{\max} * (1 - X/X_{\max})$	2 $\frac{dx}{dt} = \mu x$
3 $x = \frac{x_0 \times e^{\mu_{\max} \times t}}{1 + \frac{x_0}{x_{\max}} (e^{\mu_{\max} \times t} - 1)}$	4 $t = \frac{\ln 2}{\mu}$

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En trabajos previos en este laboratorio realizados por el estudiante de doctorado MC. José Luis Cerriteño Sánchez, se obtuvo el marco de lectura abierto (ORF) del eHN de la cepa PAC1 a partir del triplete codificante para el aminoácido 62 al 576, el cual se clonó en el vector de expresión de *P.pastoris* pPICZ α B, obteniendo así el vector recombinante pPICZ α B-HN. A la secuencia del eHN se le agregó en el extremo N-terminal el epítipo “c-myc” con la finalidad de ser identificada por con anticuerpos anti-myc en el western-blot y un motivo de 6 histidinas (6xHis) que facilita su futura purificación. Además posee dos sitios de paro que aseguran el término de la síntesis del inserto. Por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos específicos para el eHN, nombrados Pic1 y Pic2. En la figura 9 se observa que el cebador Pic1 (delantero) posicionado del 1220 pb al 1240 pb d y el cebador Pic2 (reverso) posicionado del 2816pb al 2833pb del vector, los cuales generan un producto de 1645pb correspondiente al ORF del ectodominio de la Hemaglutinina-Neuraminidasa (eHN).

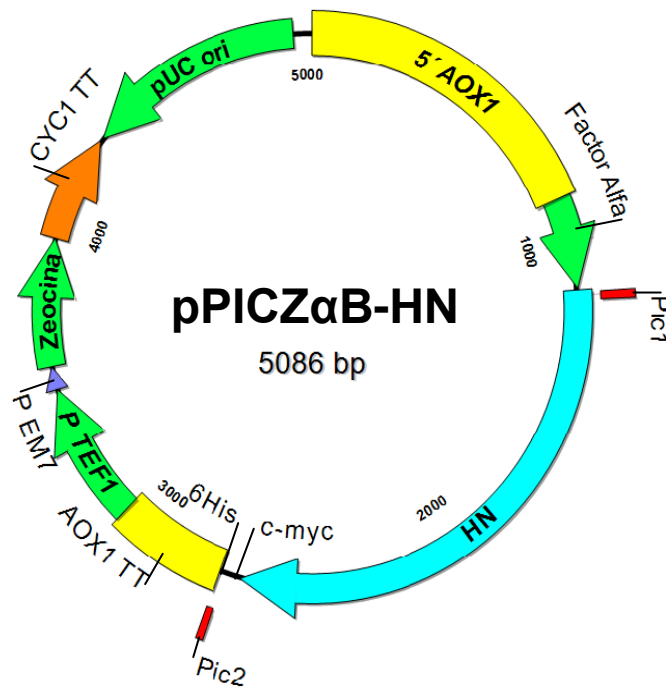


Figura 9. Esquema del vector pPIC2 α B-HN.

Este vector de expresión y los oligonucleótidos Pic1 y Pic2 fueron usados en este trabajo para obtener el marco de lectura abierto del eHN.

6.1. Amplificación del fragmento codificante del ectodominio de la Hemaglutinina-Neuraminidasa (eHN) mediante PCR.

Se realizó una PCR en un volumen de 100µl tomando como plantilla el vector recombinante pPIC2αB-HN y los oligonucleótidos Pic1 y Pic2. El producto de PCR se corrió en un gel de agarosa mostrado en el carril A de la figura 10, posteriormente se purificó a partir de banda y se corrió en otro gel como se muestra en el carril B. En ambos geles se obtuvo el peso molecular esperado de 1645 pb. Se estimó la concentración del purificado de banda (2.5 ng/µl) mediante la comparación de la intensidad de ésta con las concentraciones establecidas para las intensidades de las bandas del marcador (1Kb).

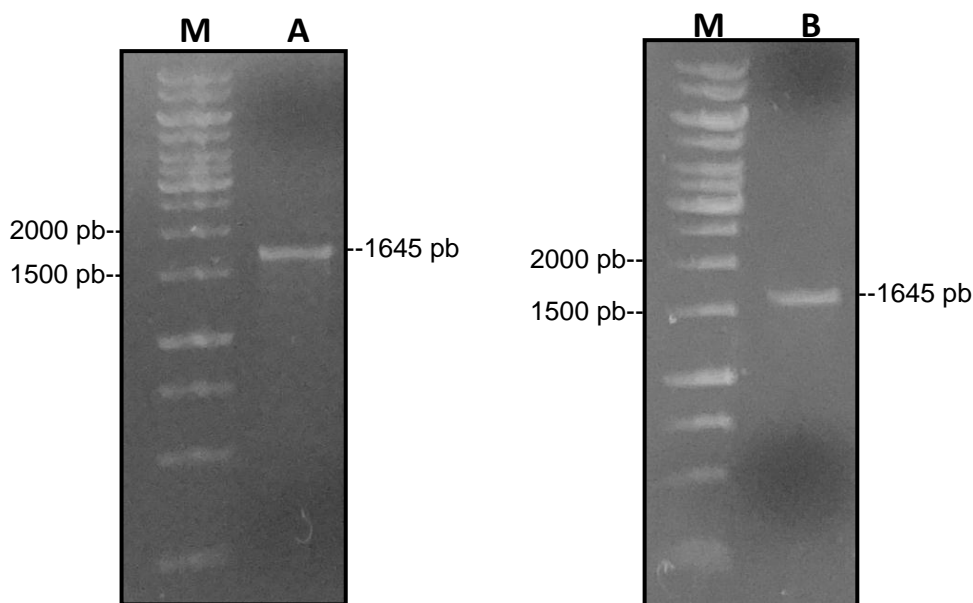


Figura 10. Obtención del fragmento codificante del ectodominio de la Hemaglutinina-Neuraminidasa (eHN).
Geles de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio (1%) en TBE a 100V.
M: marcadores 1kb.
Carril A) PCR del eHN a partir de pPIC2αB-HN.
Carril B) Purificado del producto de PCR a partir de agarosa.

6.2. Clonación y ligación del ORF del eHN en vector de resguardo pJET1.2/Blunt.

El producto de PCR purificado (ORF eHN) se ligó en el vector de resguardo pJET1.2/Blunt (con un peso molecular de 2974 pb), obteniendo así el vector pJET-HNhm (con un peso molecular de 4619 pb). En la figura 11 se muestra el vector pJET1.2/Blunt así como el vector pJET-HNhm junto con sus sitios de restricción enzimática utilizados para las posteriores pruebas de restricción.

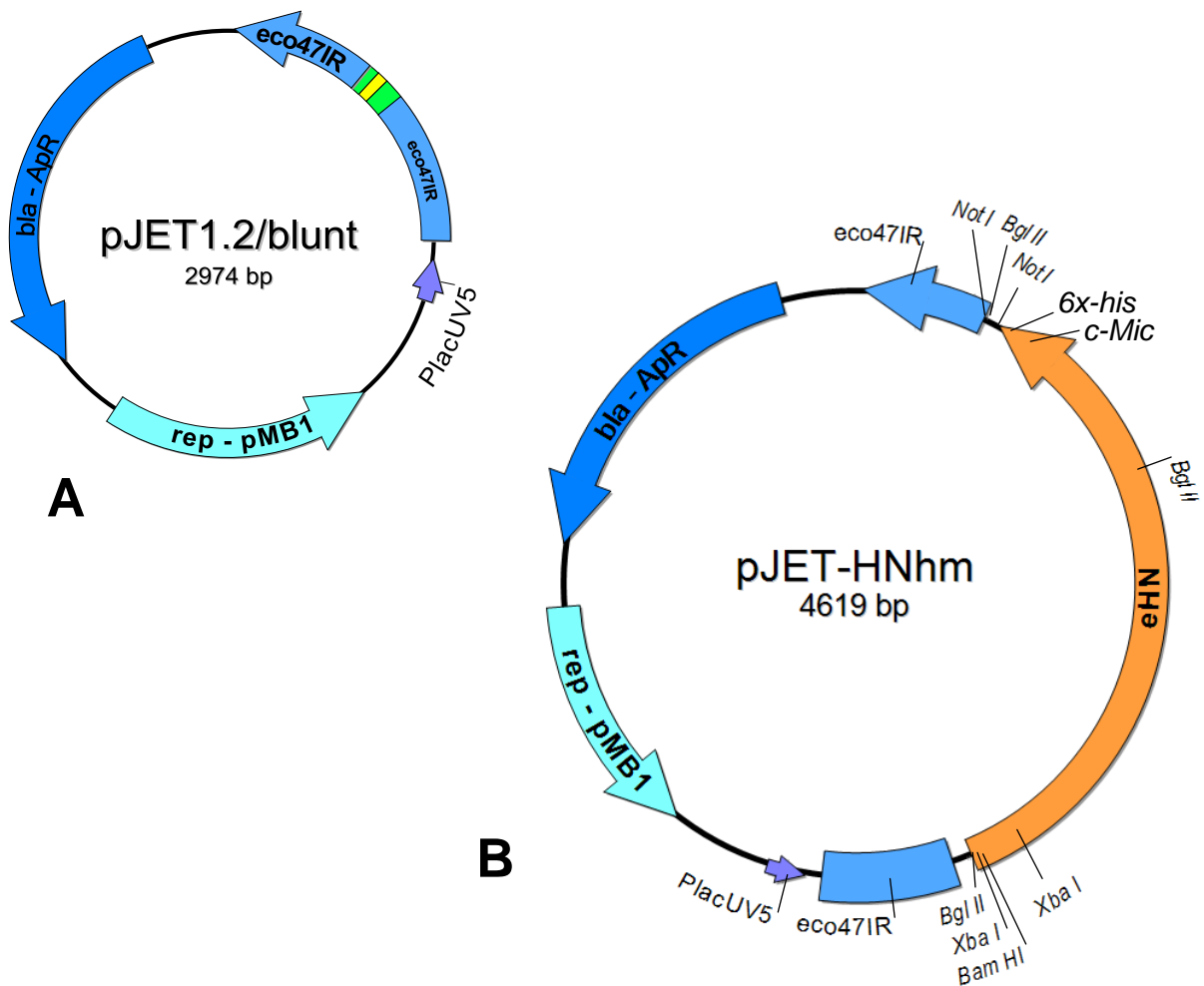


Figura 11. Vectores de resguardo.

A) Esquema del vector pJET1.2/Blunt

B) Esquema del vector de resguardo pJET-HNhm. Se indican el motivo de 6 histidina y el antígeno myc, así como los sitios de corte *Bam*HI, *Xba*I, *Bgl* II y *Not*I.

6.3. Amplificación y purificación del vector de resguardo pJET-HNhm.

Se obtuvieron células competentes de *E. coli* (cepa TOP 10) usando cloruro de calcio y se transformaron con el vector pJET-HNhm. En la figura 12 se muestra el resultado de la transformación usando el vector pJET-HNhm (A), el control positivo usando el vector pPM082 (B) y el control negativo donde solo se adicionaron células competentes sin ADN de transformación (C). Se obtuvieron colonias en la transformación con el vector pJET-HNhm y en el control positivo, ya que ambos vectores cuentan con el gen de selección con resistencia a ampicilina.

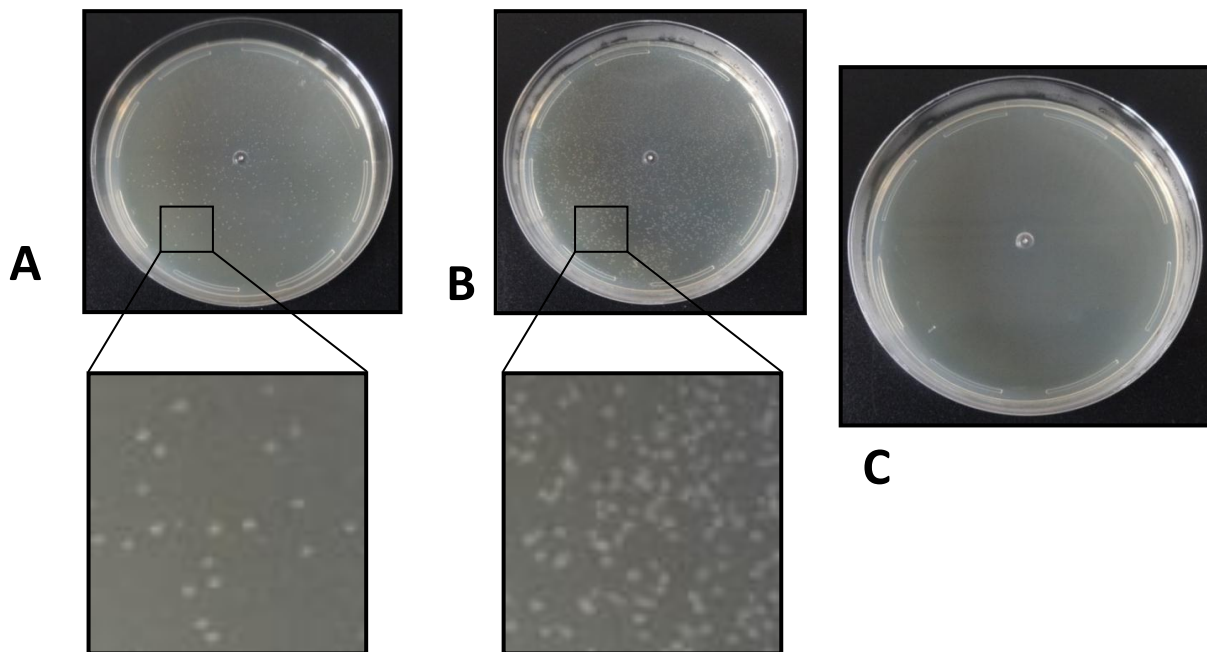


Figura 12. Resultado de transformación de células competentes *E. coli* TOP con la ligación pJET y eHN.

- A)** Transformación con pJET-HNhm.
- B)** Control positivo con pPM082.
- C)** Control negativo (sin transformar)

Se escogieron 6 colonias y se resembraron en una placa nueva para su posterior análisis.

6.4. Verificación del vector de resguardo pJET-HNhm

Para determinar la correcta construcción del vector de resguardo, se realizaron pruebas de restricción a los vectores purificados de seis colonias positivas con la enzima *Bam*HI y *Xba*I y posteriormente se corrieron en geles de agarosa. La figura 13 muestra la electroforesis de los geles de agarosa de la restricción del vector de resguardo pJET-HNhm, observando que la enzima *Bam*HI lineariza el vector por ser sitio único de corte, teniendo una banda de 4619pb (A, carril 4), mientras que la enzima *Xba*I posee dos sitios de corte muy cercanos en el vector, por lo que se ve solo una banda de 4527 pb (B, carril 4). Se determinó que únicamente la clona 4 tienen el vector de resguardo pPJET-HNhm correcto, ya que en la digestión hecha con *Bam*HI muestra el vector linearizado es de 4619pb, y en la digestión con *Xba*I presenta una banda esperada de 4527pb. Las demás clonas se determinaron como falsos positivos ya que se obtuvo bandas a 2945 pb, lo que significa que no se clonó correctamente el inserto eHN en esos vectores.

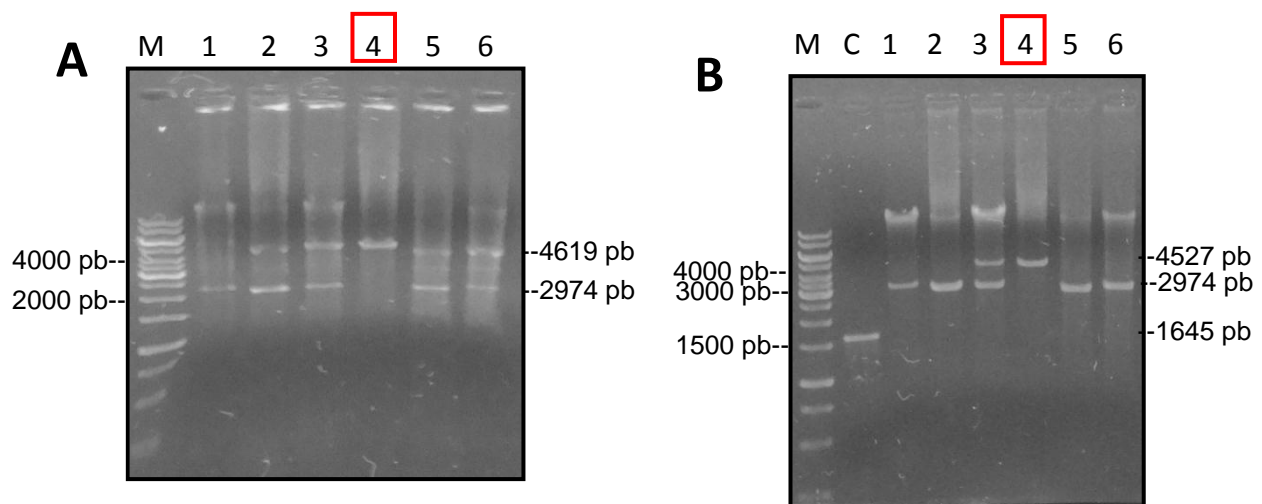


Figura 13. Digestión del vector pPJET-HNhm de 6 clonas positivas. Geles de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio (1%) en TBE a 100V.

M) marcador 1Kb,

C) control banda eHN purificada,

Carriles 1, 2, 3, 4, 5 y 6) muestras-clonas positivas

A) Digestión con enzima *Bam*HI.

B) Digestión con enzima *Xba*I.

Para corroborar la dirección del inserto eHN del vector pJET-HNhm de la clona 4, se sometió a una prueba de patrones de restricción con las enzimas *Bam*HI, *Not*I, *Xba*I y *Bg*II. La figura 14 muestra los resultados, observando, una banda a 4619 pb del vector linearizado con la enzima *Bam*HI (carril 1) y con la enzima *Not*I (carril 2), con la doble digestión de las enzimas *Bam*HI y *Not*I se tienen dos bandas, el inserto eHN liberado a 1627 pb y el vector pJET a 2992 pb (carril 3) y con la digestión con *Bg*II tenemos 3 bandas del vector a 2928, 1156 y 535 pb (carril 4), correspondientes a los tres sitios de corte que tienen el vector (figura 11). Se determinó que la clona 4 presentaba correctamente el inserto eHN clonado en el vector pJET-HNhm.

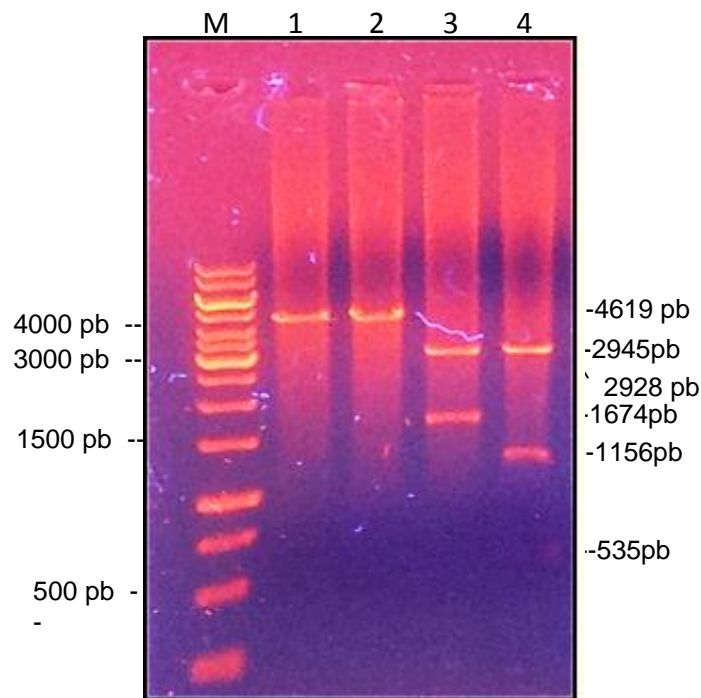


Figura 14. Digestion del vector pJET-HNhm de la clona 4.
Gel de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio (1%) en TBE a 100V.

M) marcado 1Kb

1) Digestión con la enzima *Bam*HI.

2) Digestión con la enzima *Not*I.

3) Digestión con las enzimas *Bam*HI y *Not*I.

4) Digestión con la enzima *Bg*II.

6.5. Construcción del vector recombinante pRSP-HNhm.

Para la clonación y ligación del vector pRSP con el inserto eHN, es necesario obtener en el vector y el inserto los mismos cortes cohesivos, estos cortes se hicieron con las enzimas de restricción *NotI* y *BamHI*.

Para el inserto eHN, se extrajo nuevamente el ADN plasmídico de la clona 4 y se liberó el inserto eHN mediante la digestión con las enzimas de restricción *NotI* y *BamHI*, esto con el fin de crear los extremos adhesivos. En la figura 15 A se observa una banda a 1627 pb que corresponde al inserto eHN digerido y una banda de 2992 pb correspondiente con el vector pJET linearizado. Subsiguientemente se purificó a partir de gel de agarosa. En la figura 15 B se observa una banda a 1627 pb que corresponde al inserto eHN purificado a partir de agarosa. Se estimó una concentración estimada de 2.5ng/ μ l.

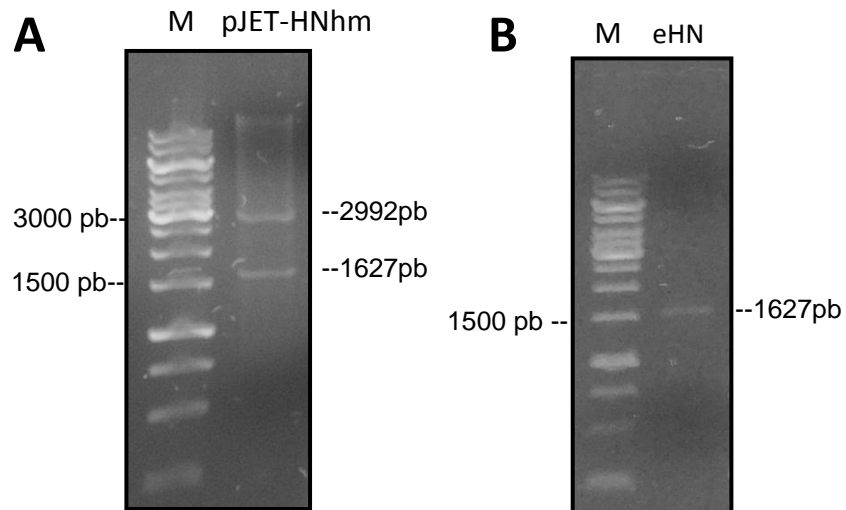


Figura 15. Digestión y purificación del eHN de la clona 4.

Geles de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio (1%) en TBE a 100V.

M) marcadores.

A) Digestión de pJET-HNhm con *NotI* y *BamHI*.

B) Purificación a partir de agarosa del inserto digerido eHN.

6.6. Obtención del vector de expresión pRSP.

Para la obtención del vector de expresión pRSP, se usó el vector PM082, el cual tiene el vector base pRSP con el gen *spokin* de levadura. Se digirió con las enzimas de restricción *NotI* y *Bam*HI para eliminar el ORF del gen *spokin* y liberar el vector pRSP linearizado con extremos adhesivos. En la figura 16 A se observa el vector pPM082 linearizado de 9727pb al ser digerido con la enzima *NotI*, en la figura 16 B se muestra la digestión con las enzimas *NotI* y *Bam*HI, donde se aprecia una banda a 944 pb que corresponde a la región del gen *spokin* y la banda de 8783pb correspondiente al vector solo pRSP. En la figura 16 C se muestra el vector pRSP linearizado y purificado a partir de agarosa, en donde se ve una banda de 8783 pb. Se estimó una concentración del vector igual a 83 ng/uL.

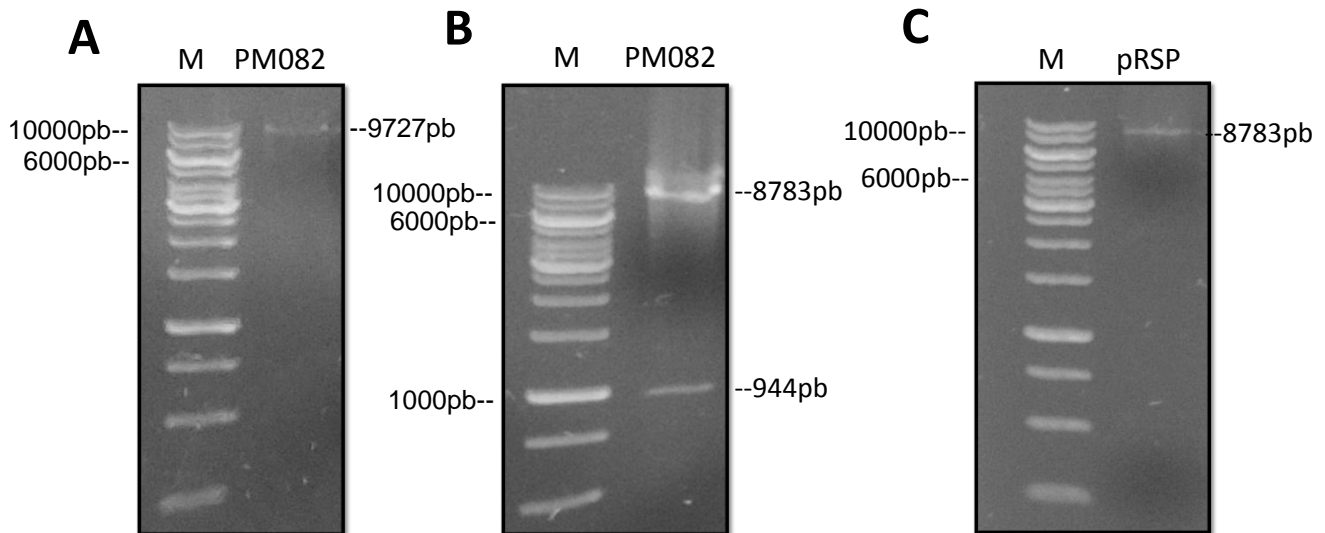


Figura 16. Obtención del vector pRSP linearizado.
Geles de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio (1%) en TBE a 100V.

M) marcadores

A) Digestión del PM082 con enzima *NotI*.

B) Digestión de PM082 con *NotI* y *Bam*HI.

C) Purificación del vector pRSP linearizado.

6.7. Construcción del vector de expresión pRSP-HNhm

Utilizando el inserto eHN (1627pb) y el vector pRSP (8783pb) digeridos con las enzimas *NotI* y *BamHI*, se ligaron para obtener el vector recombinante pRSP-HNhm. En la figura 17 se observa el esquema del vector pRSP-HNhm que esperamos con un peso molecular de 10,410pb, donde se muestran en el extremo C-terminal secuencias que codifican para un motivo de histidina-6X y el antígeno myc. Además se aprecian los sitios de corte *NotI* y *BamHI* en los extremos del inserto eHN, así como los sitios de restricción *EcoRI* para verificar su construcción.

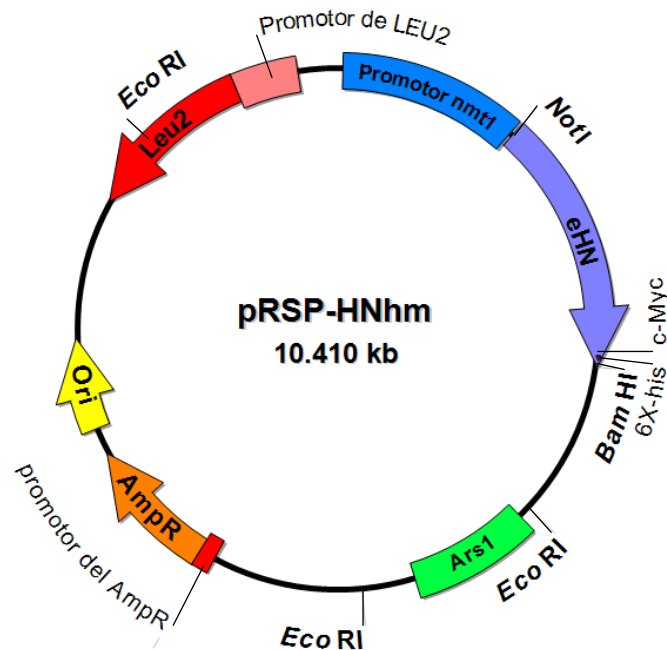


Figura 17. Esquema del vector de expresión pRSP-HNhm donde se muestran sus componentes y los sitios de restricción *NotI*, *BamHI* y *EcoRI*.

6.8. Transformación de células *E. coli* Top 10 con el vector pRSP-HNhm.

Se transformaron células competentes de *E. coli* Top 10 con el producto de la reacción de ligación pRSP y eHN. En la figura 18 se observa en A las células transformadas con el vector pRSP-HNhm, en B el control positivo donde se usó el vector pJET-HNhm y en C se aprecia el control negativo sin ADN de transformación. Solo crecieron colonias en las placas con células transformadas con el vector pRSP-HNhm y con el vector pJET-HNhm, ya que ambos cuentan con el gen de selección a ampicilina.

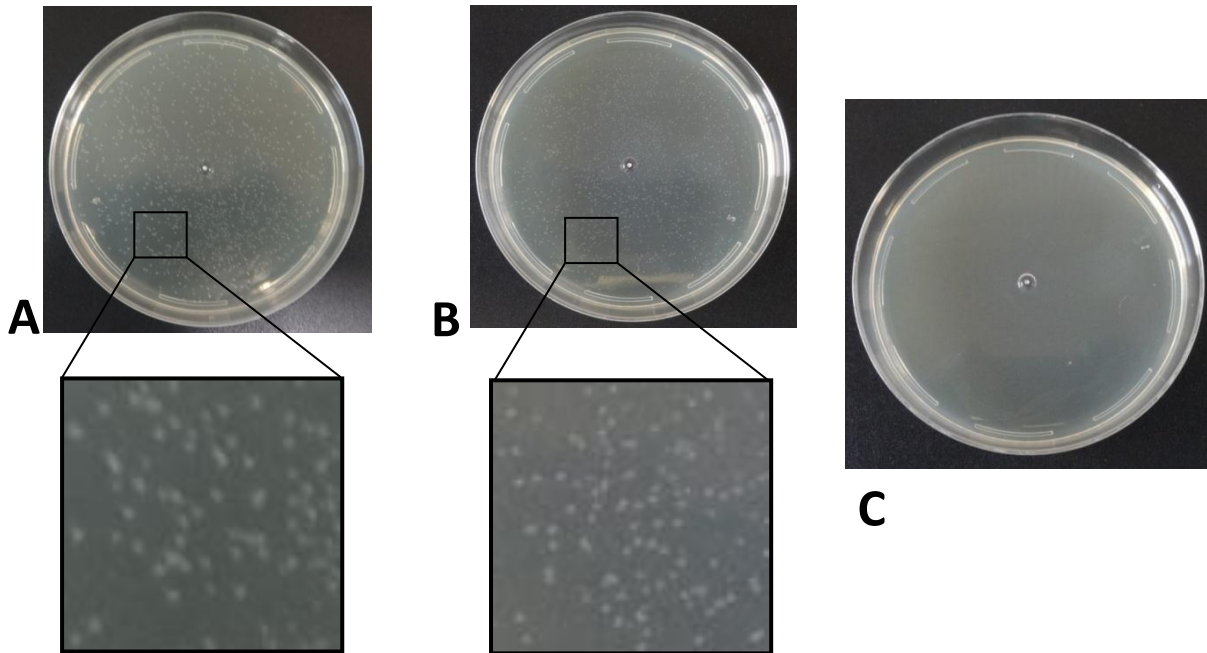


Figura 18. Transformación de células competentes *E. coli* TOP 10.

- A)** Transformación con vector pRSP-HNhm.
- B)** Control positivo con vector pJET-HNhm.
- C)** Control negativo sin ADN de transformación.

Se escogieron 6 colonias y se resembraron en una placa nueva para su posterior análisis.

6.9. Verificación del vector de expresión pRSP-HNhm por patrones de restricción.

La verificación de la construcción del vector pRSP-HNhm, se obtuvo mediante la extracción y purificación del ADN plasmídico de seis colonias transformadas con este vector y la digestión con las enzimas *NotI* y *BamHI*.

En la figura 19 se muestra los resultados, donde las clonas 1, 2, 3 y 6 presentan una banda de 8783pb correspondiente al vector vacío pRSP linealizado y otra banda de 1627pb correspondiente al inserto eHN. Se seleccionó la clona 1 para los posteriores análisis.

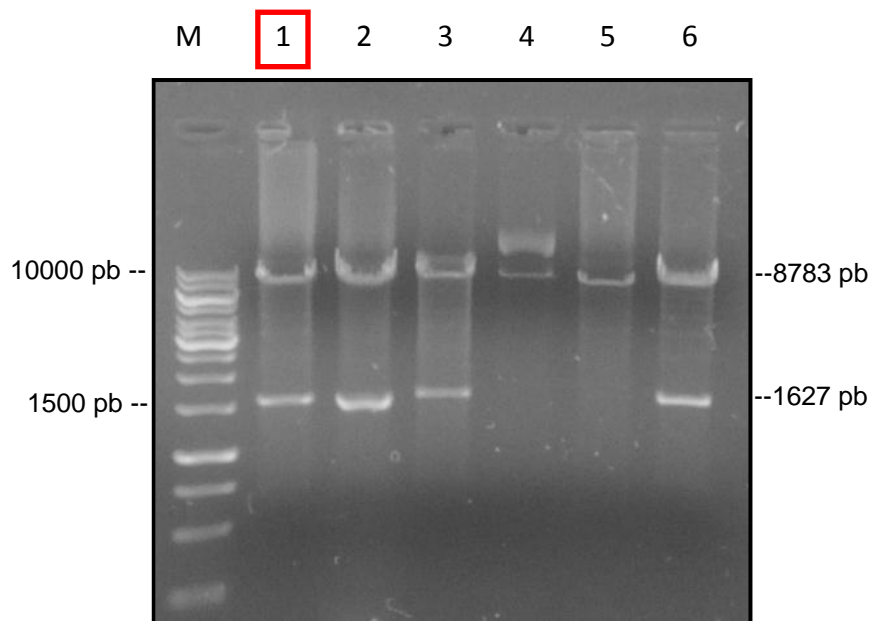


Figura 19. Digestión de 6 clonas transformadas con el vector de expresión pRSPHNhm usando las enzimas *NotI* y *BamHI*. Geles de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio (1%) en TBE a 100V. M) marcador. Carril 1-6: Digestión del ADN plasmídico de 6 clonas

Para confirmar nuevamente la presencia del eHN se digirió el vector de la clona 1, con las enzimas *BamHI*, *NotI*, *BamHI/NotI* y *EcoRI*. Los sitios de corte de estas enzimas se muestran en la figura 17. En la figura 20 se muestra el vector linearizado con la digestión de la enzima *BamHI* (carril 1) y *NotI* (carril 2) a un peso de 10,410pb, además, con la digestión doble de las enzimas *BamHI* y *NotI* se observa el inserto eHN liberado en una banda de 1627 pb y el vector vacío en otra banda de 8783pb (carril 3), mientras que en la digestión con la enzima *EcoRI* se ven tres bandas a 5158pb, 4052pb y 1200pb. Con esto confirmamos la construcción correcta de vector (figura 17).

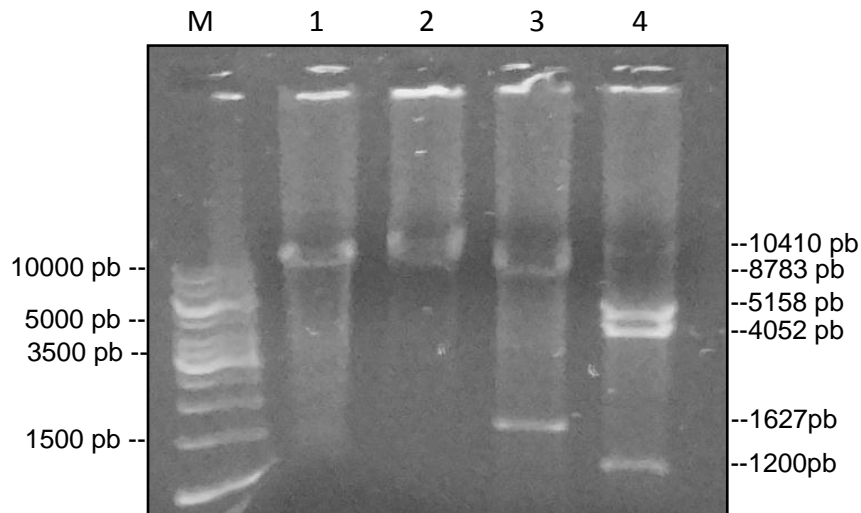


Figura 20. Prueba por patrones de restricción del vector pRSP-HNhm. Geles de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio (1%) en TBE a 100V.

- M)** Marcador de 1Kb.
- 1)** Digestión con *Bam*HI.
- 2)** Digestión con *Not*I.
- 3)** Digestión con *Bam*HI/*Not*I.
- 4)** Digestión con *Eco*RI.

6.10. Análisis de la secuencia del vector recombinante pRSP-HNhm

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para la secuenciación del ORF del eHN en el vector pRSP-HNhm.

El cebador delantero se posiciona del 1153 pb al 1176pb del vector de expresión y el cebador reverso se posiciona del 2906 pb al 2934pb, generando un producto de 1828pb. Al cebador delantero se agregó en el extremo 5' la secuencia GCGCGC para que cumpliera con el porcentaje GC requerido. En la figura 21 las secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos y sus propiedades fisicoquímicas se muestran enseguida, así como el sitio de acoplamiento de los oligonucleótidos sobre el vector pRSP-HNhm para amplificar el ORF del eHN.

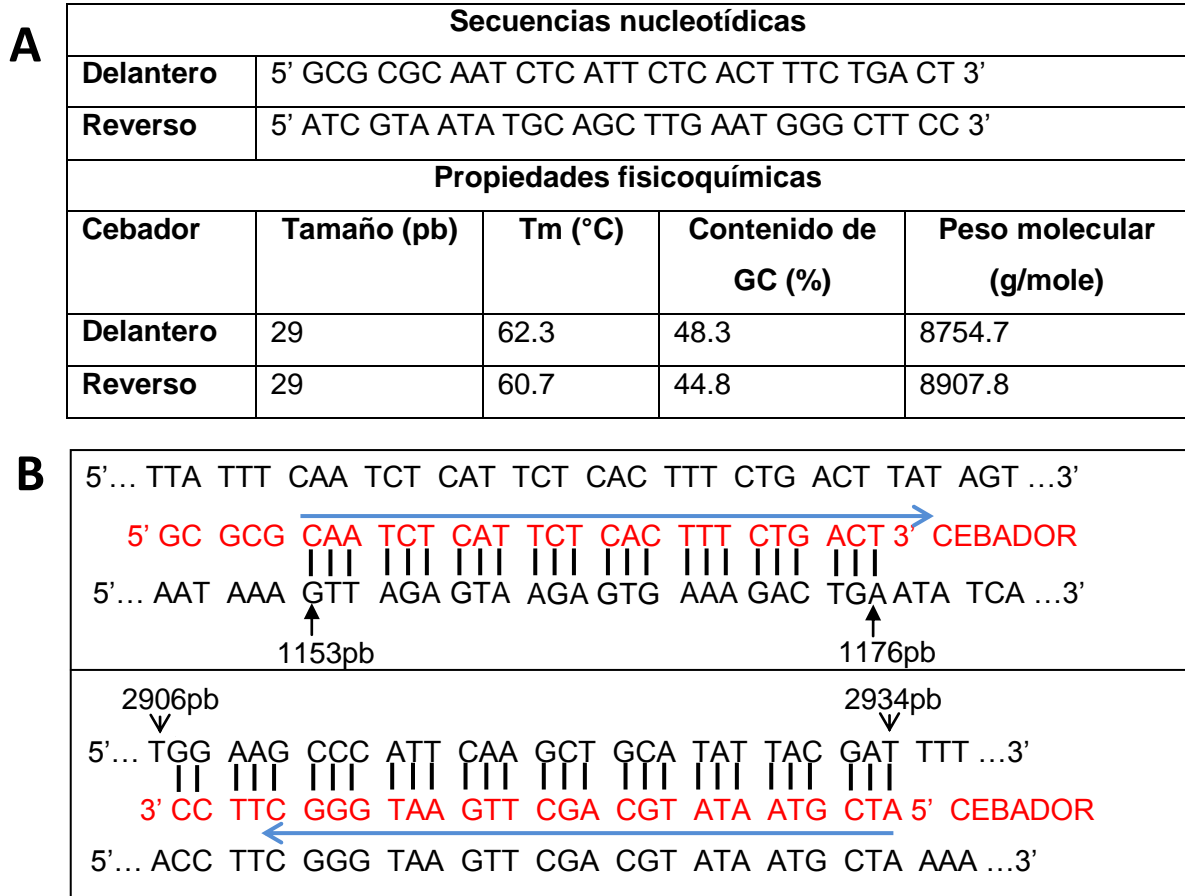
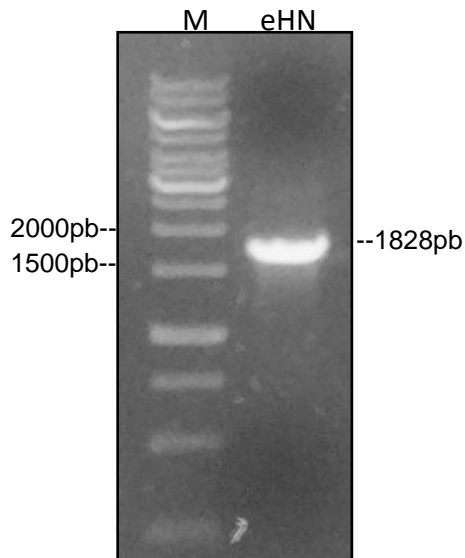


Figura 21. Secuencias nucleotídicas de los oligonucleótidos.

A) Propiedades fisicoquímicas.

B) Alineamiento de los cebadores con la secuencia nucleotídica blanco del vector pRSP-HNhm. La flecha indica la dirección de la replicación del ORF de la eHN.

Se corroboró la fidelidad de los oligonucleótidos utilizándolos en una PCR del vector recombinante pRSP-HNhm. En la figura 22 se aprecia el gel de agarosa donde se corrió el producto de PCR, donde se observa una banda al peso molecular esperado de 1828pb correspondiente al ORF eHN.



**Figura 22. PCR de vector pRSP-HNhm con oligos diseñados para la secuenciación del inserto eHN.
Gel de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio (1%) a 100V con TBE.**

6.10.1. Secuenciación del vector pRSP-HNhm.

Se extrajo el ADN plasmídico de la clona 1 (transformada con el vector recombinante pRSP-HNhm) mediante un Maxiprep. Se calculó una concentración de 3170 μ g/ml y se determinó una relación 280/260 igual a 1.85, indicando que el extracto de ADN poseía una buena pureza para su secuenciación.

La secuenciación fue realizada por el Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT de Cuernavaca) utilizando los cebadores previamente diseñados. La figura 23 muestra algunos fragmentos del electroferograma de la secuencia nucleotídica del inicio y final del eHN presente en vector pRSP-HNhm.

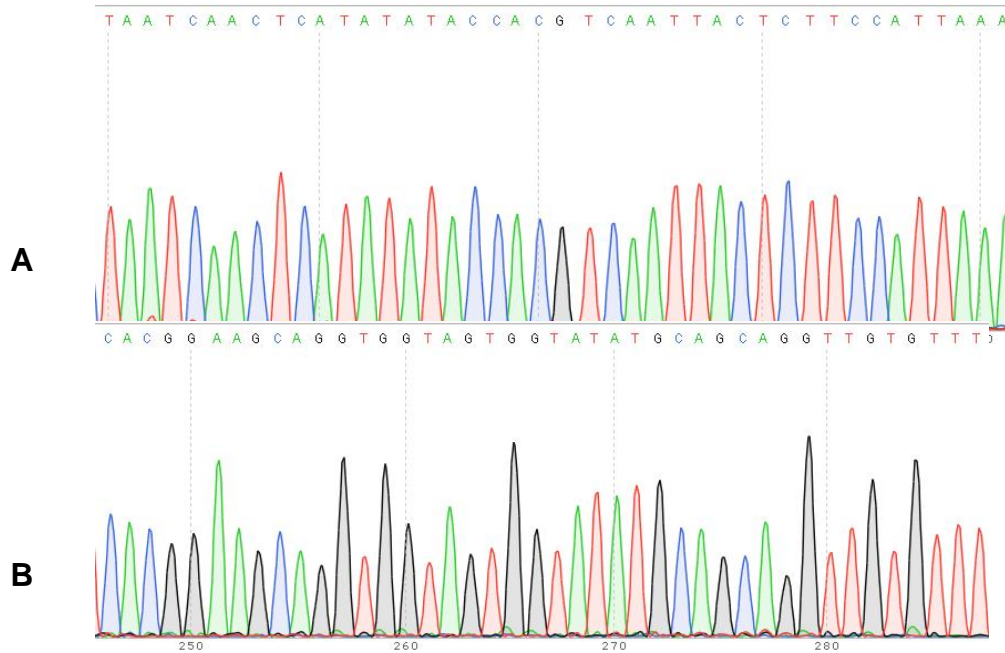


Figura 23. Fragmentos del electroferograma de la secuencia nucleotídica del eHN del vector recombinante pRSP-HNhm.

A) Inicio del eHN.

B) Final del eHN.

Para el alineamiento del producto de la secuenciación con el vector pRSP-HNhm , las secciones visibles de la secuenciación que corresponde al inicio de la sección del eHN es del 1198pb al 1608pb, mientras que la sección usada para el final del eHN fue de 2507pb a 2868pb. En la tabla 1 se muestra el alineamiento de la secuencia esperada para el vector pRSP-HNhm con la sección del inicio de la secuenciación, mientras que en la tabla 2 se muestra usando la sección del final de la secuenciación. Se obtuvo un 100% de identidad en el inicio del ORF del eHN con 411pb y en el final con 362 pb. Además el inserto eHN se encuentra clonado en dirección 5'-3'.

Tabla 1. Alineamiento de la secuencia nucleotídica reportada y la experimental para las regiones que codifican para el eHN del vector recombinante pRSP-HNhm, usando el oligonucleótido delantero.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
760 bits(411)	0.0	411/411(100%)	0/411(0%)	Plus/Plus
Query 1198	ACTAGTCGCGACTCGAGGCGGCCGCATGGGT AACCTGCAGAGTACAAT AACCTCGTGGAA			1257
Sbjct 2	ACTAGTCGCGACTCGAGGCGGCCGCATGGGT AACCTGCAGAGTACAAT AACCTCGTGGAA			61
Query 1258	CCCGGATGTGCAGGCTATGTTGAGCATTCTAATCAACTCATATATACCACGTCAATTAC			1317
Sbjct 62	CCCGGATGTGCAGGCTATGTTGAGCATTCTAATCAACTCATATATACCACGTCAATTAC			121
Query 1318	TCTTCCATTAAAAATCTCAACTACAGAAATGTCTATTCTCACCGCCATTGAGATCACTG			1377
Sbjct 122	TCTTCCATTAAAAATCTCAACTACAGAAATGTCTATTCTCACCGCCATTGAGATCACTG			181
Query 1378	TCACTGCCCTGATTGTT CATCTGCCTGCCCCACCAGACAAATGCTACTCAATGATCCACG			1437
Sbjct 182	TCACTGCCCTGATTGTT CATCTGCCTGCCCCACCAGACAAATGCTACTCAATGATCCACG			241
Query 1438	ATATATGAGTGGTGTCAATCAGTTTATTGGGGCCCCAACAGAGAGCATAAATATCACATT			1497
Sbjct 242	ATATATGAGTGGTGTCAATCAGTTTATTGGGGCCCCAACAGAGAGCATAAATATCACATT			301
Query 1498	TGGACCTTTGCTCGGTATCCAAGCTTTATCCCTACATCAACAACACACAAGGATGTAC			1557
Sbjct 302	TGGACCTTTGCTCGGTATCCAAGCTTTATCCCTACATCAACAACACACAAGGATGTAC			361
Query 1558	TCGGATACCATCATTTGCTCTAGGACCAAGCCACTGGTGTACACACATAA 1608			
Sbjct 362	TCGGATACCATCATTTGCTCTAGGACCAAGCCACTGGTGTACACACATAA 412			

Tabla 2. Alineamiento de la secuencia nucleotídica reportada y la experimental para las regiones que codifican para el eHN del vector recombinante pRSP-HNhm, usando el oligonucleótido reverso.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
669 bits(362)	0.0	362/362(100%)	0/362(0%)	Plus/Minus
Query 2507	ACCTCACTTGTTCGCGCAGGAGGGCTAGATAGCACCTCCGAAAGAATGGCACCTGTCAAC			2566
Sbjct 362	ACCTCACTTGTTCGCGCAGGAGGGCTAGATAGCACCTCCGAAAGAATGGCACCTGTCAAC			303
Query 2567	TATCTCGCGATTGGGGAATCCTTATTGTCAAAGACATATCTTCTCTCCAAAACACAACCT			2626
Sbjct 302	TATCTCGCGATTGGGGAATCCTTATTGTCAAAGACATATCTTCTCTCCAAAACACAACCT			243
Query 2627	GCTGCATATACCACTACCACCTGCTTCCGTGATACGGATACAGGGAAAATCTATTGCATT			2686
Sbjct 242	GCTGCATATACCACTACCACCTGCTTCCGTGATACGGATACAGGGAAAATCTATTGCATT			183
Query 2687	ACAATAGCTGAATTAGGGAAAGTGCTACTTGGTGAATTTAGATTGTACCCCTTCTACGA			2746
Sbjct 182	ACAATAGCTGAATTAGGGAAAGTGCTACTTGGTGAATTTAGATTGTACCCCTTCTACGA			123
Query 2747	GAGATT AAGATTCAATCACGCTATCTAGAACA AAAA ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT			2806
Sbjct 122	GAGATT AAGATTCAATCACGCTATCTAGAACA AAAA ACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAAT			63
Query 2807	AGCGCCGT CGACcatcatcatcatcatcatT GAT AAGGATCCCGGGTAAAAGGAATGTC			2866
Sbjct 62	AGCGCCGT CGACCATCATCATCATCATCATTGAT AAGGATCCCGGGTAAAAGGAATGTC			3
Query 2867	TC 2868			
Sbjct 2	TC 1			

6.11. Obtención de cepas de *S. pombe* sobreproductoras del eHN-RVP.

Las cepas de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* que se van a utilizar son cepas con diferentes auxotrofias y algunas mutaciones de genes de proteasas:

Cepa <i>S. pombe</i>	Genotipo	Auxotrofias y proteasas mutadas
826 diploide	h+/h-: leu1-32/leu1-32, ade6-M210/ade6-M216, ura4-D18 / ura4-D18	Leucina, adenina, uracilo
3D haploide	h+: ura4-D18, leu1-32, ade6-M210, ape1-, dpa1-	Leucina, adenina, uracilo, LAPI, DAP1
4X (201399) haploide	h+: ura4-D18, leu1-32, ade6-M210, his7-366	Leucina, adenina, uracilo, histidina, lisina

En la figura 24 se observan las cepas recuperadas 826, 3D y 4X, presentando su morfología alargada característica de *S. pombe*.



Figura 24. Células de levaduras *Schizosaccharomyces pombe*.

- A) Cepa 3D.
- B) Cepa 826.
- C) Cepa 4X.

A las células se les incorporó el vector recombinante pRSP-HNhm por el método de transformación con acetato de litio. En la figura 25 se muestra el resultado de la transformación junto a su control negativo donde se usaron células sin ADN de transformación. En todos los casos se obtuvieron varias colonias bien definidas.

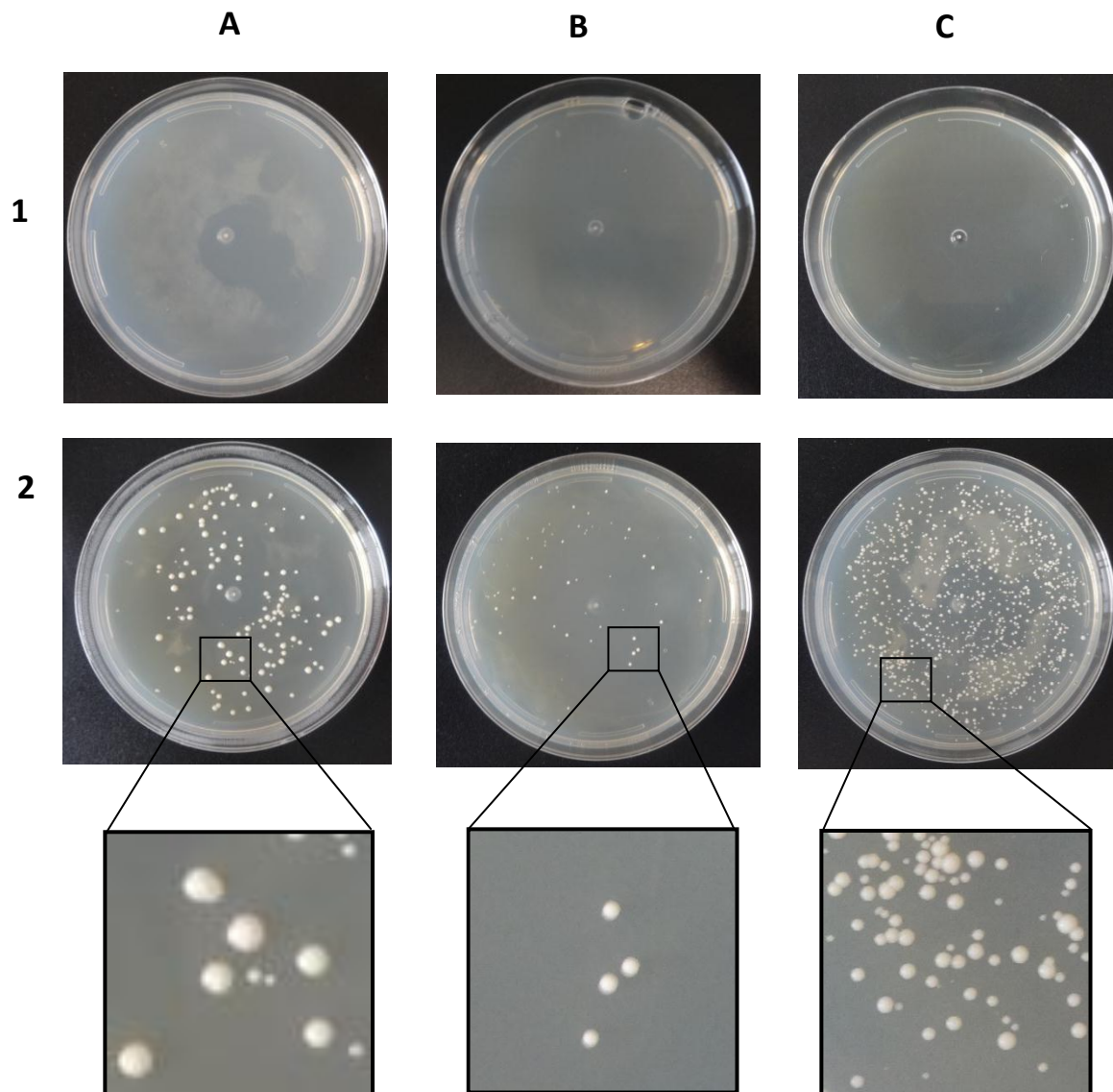


Figura 25. Obtención de colonias sobreproductoras de eHN por transformación de células de *S. pombe* con el vector pRSP-HNm.

1) Control negativo (cepas sin ADN plasmidico).

2) Transformación.

A) Cepa 3D.

B) Cepa 826.

C) Cepa 4X.

Las clonas obtenidas contienen el vector recombinante pRSP-HNhm por lo que en principio son cepas sobreproductoras del eHN por lo que se nombraron 826HN, 3DHN y 4XHN respectivamente.

En la figura 26 se muestra la selección de seis clonas por cada cepa transformada y se sembraron en placas de medio YNB para su posterior análisis.

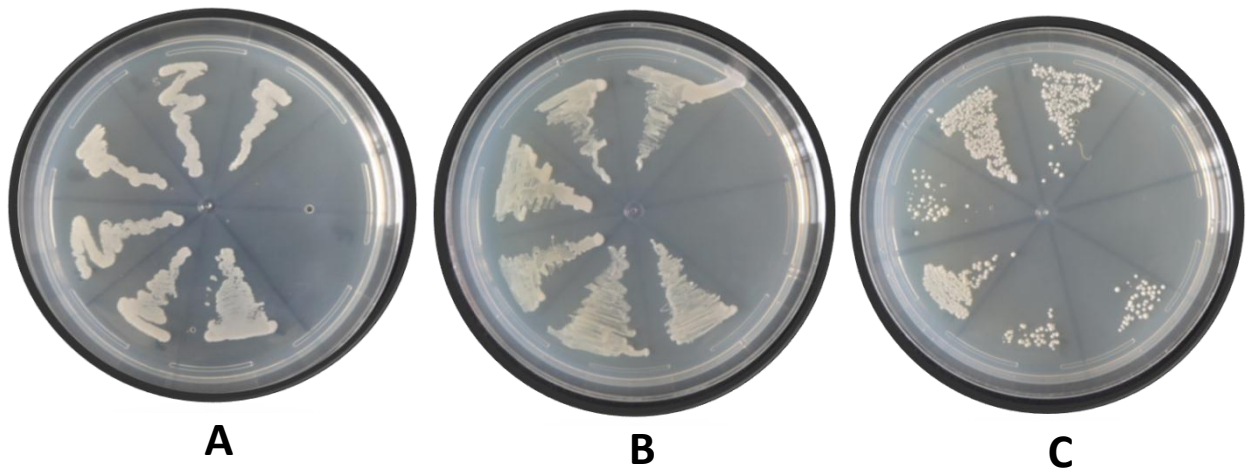


Figura 26. Obtención de seis colonias transformadas con el vector pRSP-HNhm.

- A)** Cepa 3DHN.
- B)** Cepa 826HN.
- C)** Cepa 4XHN.

6.12. Confirmación de la presencia del vector pRSP-HNhm en cepas sobreproductoras de *S. pombe*, mediante PCR en colonia.

Se realizó una PCR en colonia de cinco clonas para cada cepa utilizando los oligonucleótidos Pic 1 y Pic 2. El producto se corrió en geles de agarosa al 0.7% a 100V, los cuales se muestran en la figura 27 (carriles 3, 4, 5, 6 y 7) de cada cepa 826HN, 3DHN y 4XHN respectivamente, donde se usó como control positivo el vector pRSP-HNhm puro (carriles 2) y como controles negativos las colonias de las cepas 826, 3D y 4X (carriles 3). En todas las colonias de las muestras analizadas se obtuvieron bandas con el peso esperado de 1828pb, que corresponden al inserto eHN. En los controles negativos (carril 2, no hubo banda

porque las cepas son las originales y en el control positivo (carril1) si está la banda porque se hizo la PCR del vector pRSP-HNhm.

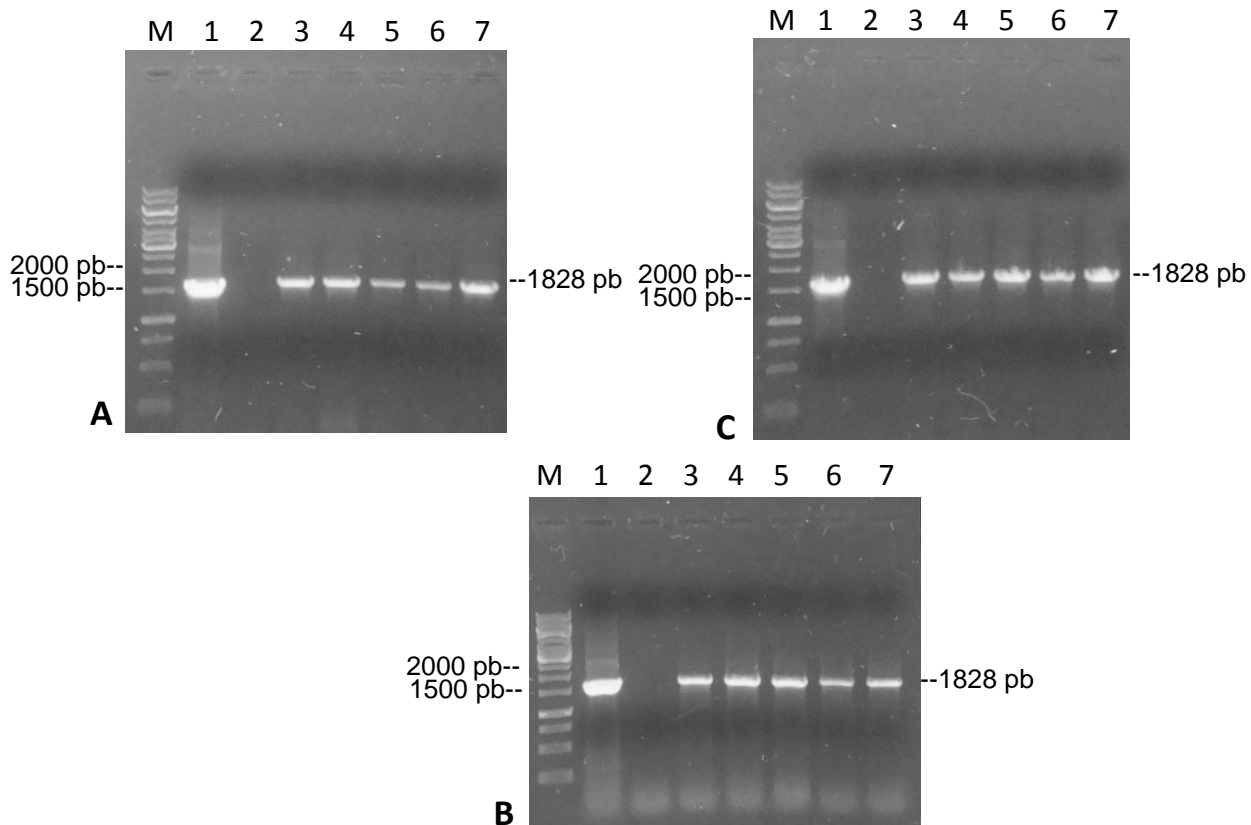


Figura 27. PCR en colonia de cepas de *S. pombe* con el vector pRSP-HNhm. Geles de agarosa al 0.7% con bromuro de etidio (1%) en TBE a 100V.

A) Cepas 3D-HN

B) Cepas 826-HN

C) Cepa 4XHN.

M marcador 1Kb

Carril 1: Control positivo (vector pRSP-HNhm puro)

Carril 2: Control negativo (cepas 826, 3D y 4X respectivamente)

Carriles 3, 4, 5, 6,7: muestras, 5 colonias de cada cepa con el vector pRSP-HNhm.

Las PCR en colonia indican que el vector de expresión pRSP-HNhm se encuentra en las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN.

Para cada cepa sobreproductora de eHN se eligió la clona 1 (carril 3) para los siguientes ensayos de expresión.

6.13. Cinética de crecimiento de las cepas sobreproductoras del eHN.

Se realizó un cultivo celular en medio YNB de las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN, así como de las cepas control 826, 3D y 4X para determinar las diferencias en sus parámetros cinéticos usando el modelo de crecimiento de Monod. Para ello se tomó la absorbancia de los cultivos a 600nm en intervalos de 2 hrs, en medio YNB con los requerimientos auxotróficos de cada cepa. Por ello es importante mencionar que las levaduras 826HN, 3DHN y 4XHN al crecer en medios ausentes de leucina, muestran que las células fueron transformadas exitosamente, ya que todas las cepas auxotróficas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo cuentan con delección en el gen necesario para la producción de leucina, siendo el vector de expresión el que cuenta con el gen *leu* (*LEU2*) el que les confiere a las cepas sobreproductoras la capacidad de sintetizar este requerimiento.

En las figuras 28, 29 y 30 se muestran las curvas de crecimiento en función del tiempo de los cultivos de las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN con sus controles (cepas 826, 3D, 4X). También se muestran las curvas de crecimiento ajustadas con el modelo de crecimiento para cada una de las cepas mencionadas. Se observa que las cepas 3DHN y 4XHN (fig.28 y 29) tienen una curva de crecimiento muy parecida en sus etapa de fase logarítmica y fase exponencial, no hay diferencias significativas entre las cepas sobreproductoras de la eHN y sus controles. Sin embargo, la curva de crecimiento de la cepa 826HN y la curva de 826 son muy diferentes, teniendo la cepa 826 una fase logarítmica muy lenta a partir de 12 horas de crecimiento hasta 28 hrs.

Cabe aclarar que en estos experimentos de curvas de crecimiento se realizaron en medio YNA donde hay tiamina presente por lo que no se está sintetizando la proteína eHN ya que el ORF del gen está bajo el promotor negativo de tiamina.

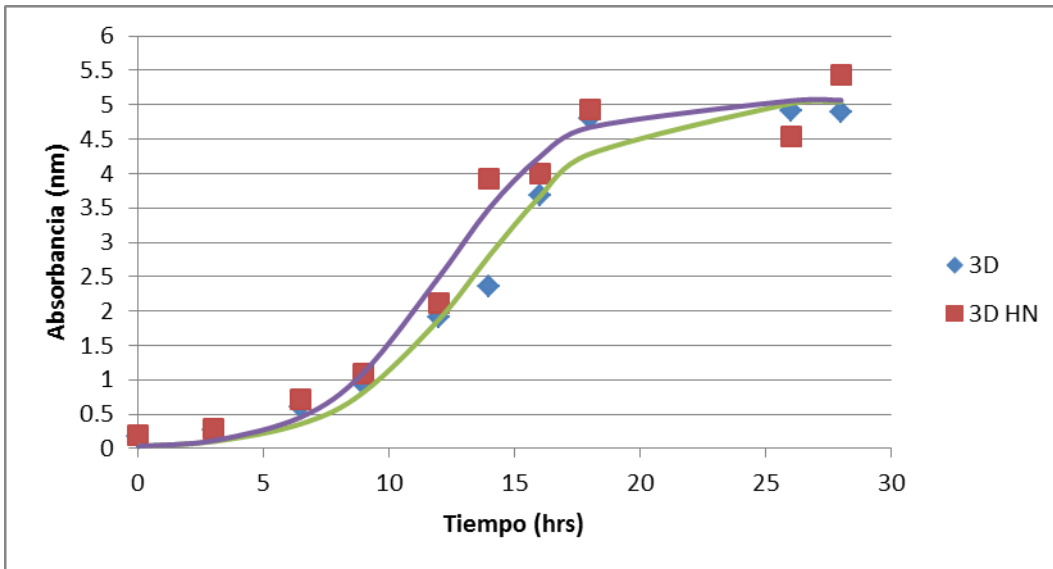


Figura 28. Curvas de crecimiento de la cepa 3DHN y su control (3D) en medio YNB (con sus auxotrofias). La curva dibujada esta predicha con el modelo de Monod. El valor de la suma de cuadrados fue menor a 1, lo que indica que los datos estadísticos son representativos del crecimiento celular de las levaduras.

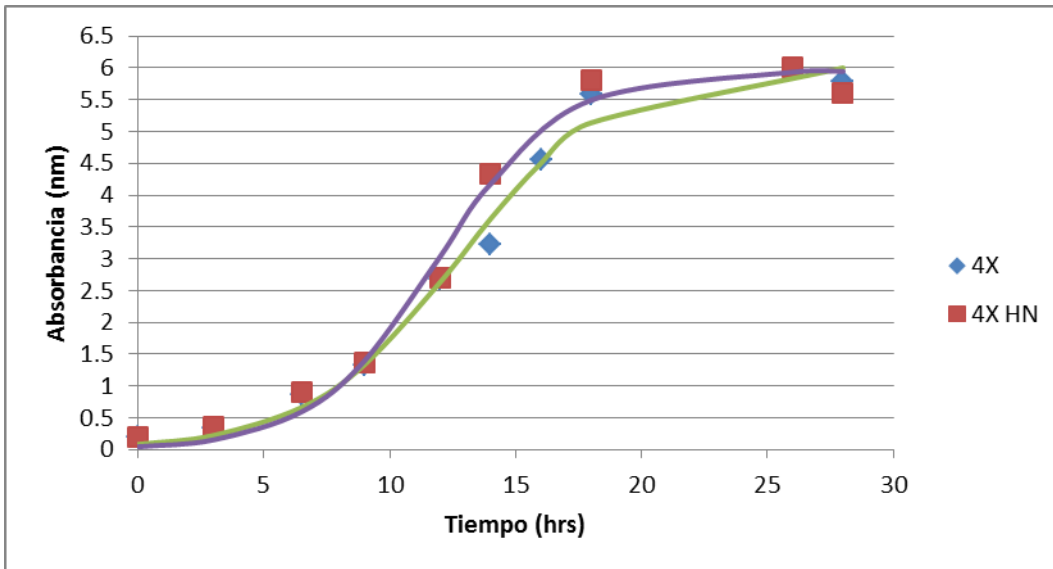


Figura 29. Curvas de crecimiento de la cepa 4XHN y su control (4X) en medio YNB (con sus auxotrofias). La curva dibujada esta predicha con el modelo de Monod. El valor de la suma de cuadrados fue menor a 1, lo que indica que los datos estadísticos son representativos del crecimiento celular de las levaduras.

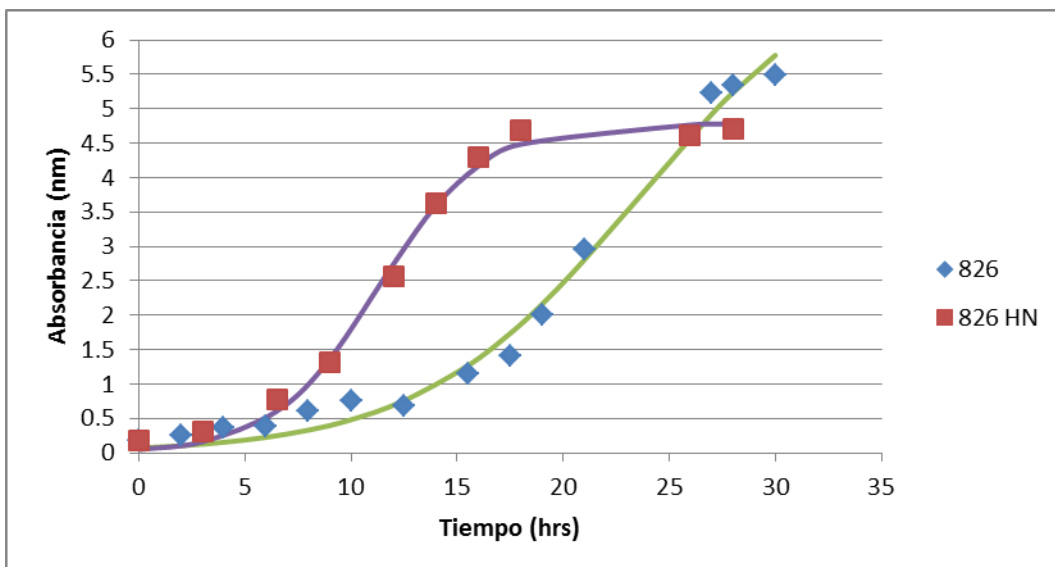


Figura 30. Curvas de crecimiento de la cepa 826HN y su control (826) en medio YNB (con sus auxotrofias). La curva dibujada esta predicha con el modelo de Monod. El valor de la suma de cuadrados fue menor a 1, lo que indica que los datos estadísticos son representativos del crecimiento celular de las levaduras.

Los parámetros cinéticos de cada cepa se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas de *S. pombe* sobreproductoras de eHN y sus controles, en cultivo de no expresión (YNB).

PARAMETRO	CEPA					
	3D HN	3D	4X HN	4X	826 HN	826
X0	0.0341	0.0345	0.0466	0.0845	0.0494	0.0709
Xmax	5.0750	5.0664	5.9542	6.0396	4.7799	7.3659
μmax	0.4139	0.3714	0.4067	0.3331	0.4051	0.1975
Tiempo de duplicación (hrs)	1.6745	1.8664	1.7043	2.0808	1.7112	3.5089

Al comparar los parámetros cinéticos de la cepa 3DHN con su control 3D, se observa que son muy parecidos en la masa mínima para inocular (X0), la masa

máxima alcanzada (X_{max}) y los tiempos de duplicación. Esto mismo se observa cuando comparamos la cepa 4XHN con su control 4X, con la excepción que su X_0 es mayor en 4X (0.0845). Sin embargo, al comparar estos parámetros de la cepa 826HN con la 826, se obtienen valores muy diferentes. No obstante, al comparar la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) de las cepas 3DHN, 4XHN y 826HN (0.4139, 0.4067 y 0.4051 respectivamente) con sus controles 3D, 4X y 826 (0.3714, 0.3331 y 0.1975 respectivamente), vemos que es ligeramente menor en los controles.

De la misma forma, cuando comparamos las cepas 3DHN, 4XHN y 826HN, se observan valores parecidos para la X_0 (0.0341, 0.0466 y 0.0494 respectivamente), μ_{max} (0.4139, 0.4067 y 0.4051 respectivamente) y los tiempos de duplicación (1.6745, 1.7043 y 1.7112 respectivamente), mientras que para la X_{max} , es parecido entre las cepas 3DHN y 826HN (5.0750 y 4.7799 respectivamente) y la cepa 4XHN es ligeramente más alto (5.9542), lo que nos indica que la cepa 4XHN crece un poco más rápido.

6.14. Cinética de crecimiento de cepas productoras de eHN en condiciones de expresión.

Para activar la expresión del ORF del gen eHN y obtener la sobreproducción del eHN, es necesario que las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN se cultivaran en medio ausente de tiamina (EMM), para activar el promotor negativo de tiamina que es el que antecede al ORF del gen eHN. Para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas se partió de un precultivo en medio con tiamina (YNB), posteriormente se utilizó un cultivo en medio mínimo con tiamina (ET), y finalmente se sometieron a condiciones de expresión en medio mínimo sin tiamina (EMM).

En las figuras 31, 32 y 33 se muestran las curvas de crecimiento de las cepas productoras de eHN (826HN, 3DHN y 4XHN) en función del tiempo en el

medio de expresión, así como las cepas controles (cepas 826, 3D, 4X). También se muestran las curvas de crecimiento ajustadas con el modelo de Monod para cada una de las cepas mencionadas.

Las curvas de crecimiento de las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN muestran un crecimiento más lento cuando se comparan con las curvas de las cepas control.

Se observa que las curvas de crecimiento de las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN crecen más lento a partir de la fase logarítmica cuando se comparan con las curvas de las cepas control, manteniéndose esta diferencia a lo largo de los cultivos de crecimiento. Lo anterior sugiere que las cepas transformadas tardarán más tiempo en llegar a la fase estacionaria. Esta diferencia puede deberse a la presencia de una proteína extraña a la levadura como lo es la eHN recombinante en el medio intracelular así como por el uso de la maquinaria necesaria para la expresión del vector pRSP-HNhm.

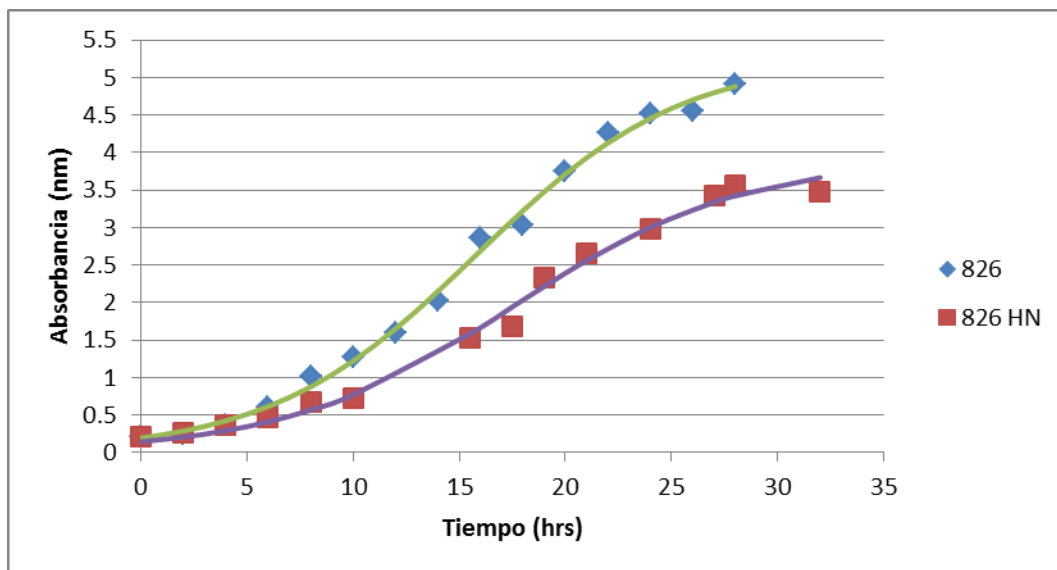


Figura 31. Curvas de crecimiento de la cepa 826HN y su control (826) en medio de expresión (EMM con sus auxotrofias). La curva dibujada esta predicha con el modelo de Monod. El valor de la suma de fue menor a 1, lo que indica que los datos estadísticos son representativos del crecimiento celular de las levaduras.

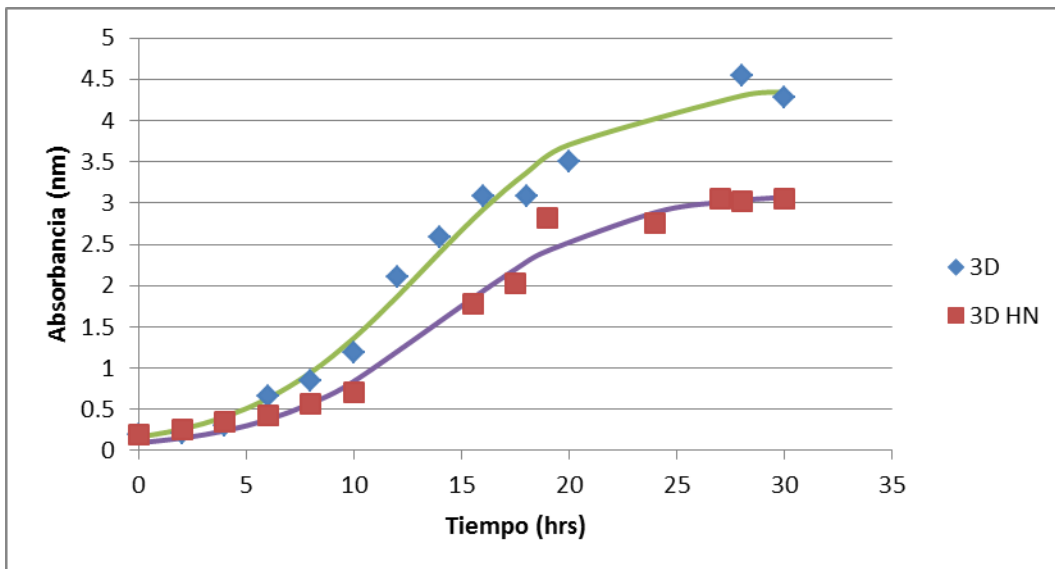


Figura 32. Curvas de crecimiento de la cepa 3DHN y su control (3D) en medio de expresión (EMM con sus auxotrofias). La curva dibujada esta predicha con el modelo de Monod. El valor de la suma de cuadrados menor a 1, lo que indica que los datos estadísticos son representativos del crecimiento celular de las levaduras.

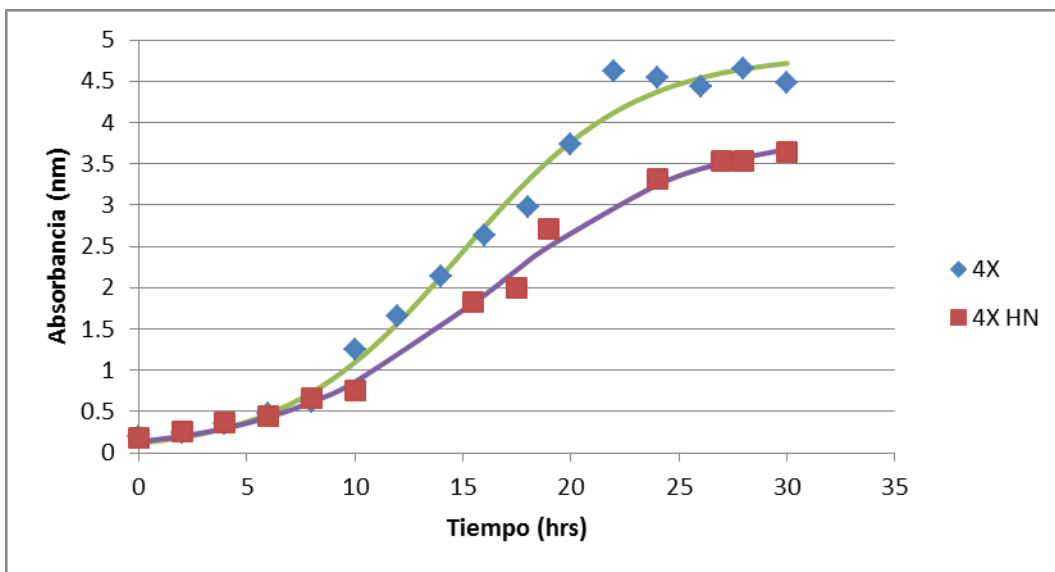


Figura 33. Curvas de crecimiento de la cepa 4XHN y su control (4X) en medio de expresión (EMM con sus auxotrofias). La curva dibujada esta predicha con el modelo de Monod. El valor de la suma de cuadrados fue menor a 1, lo que indica que los datos estadísticos son representativos del crecimiento celular de las levaduras.

Los parámetros cinéticos de cada cepa se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas de *S. pombe* transformadas y mutantes, en cultivo EMM.

PARAMETRO	CEPA					
	826 HN	826	3D HN	3D	4X HN	4X
X0	0.1454	0.1940	0.0937	0.1625	0.1365	0.1145
Xmax	3.9222	5.2764	3.1324	4.4152	3.8892	4.8285
μmax	0.1851	0.2066	0.2478	0.2462	0.2055	0.2493
Tiempo de duplicación (hrs)	3.7445	3.3543	2.7967	2.8148	3.3735	2.7805

Al comparar los parámetros cinéticos de las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN con sus controles, se observa que son muy parecidos la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}) y los tiempos de duplicación. Al comparar la masa mínima para inocular (X_0) y la masa máxima alcanzada (X_{max}), se observa que tienen valores un poco más bajos las cepas 826HN y 3DHN, con la excepción que en 4XHN tiene un valor más alto en X_0 .

De la misma forma, al compararnos entre si las cepas 3DHN, 4XHN y 826HN, se observa que 3DHN y 4XHN presentan valores parecidos en la X_0 (0.1454 y 0.1365 respectivamente), mientras que para la cepa 3DHN, estos valores son más bajos con respecto a las otras dos cepas, con excepción de la μ_{max} (0.2478), la cual es más alta que las otras.

6.15. Condiciones de sobreproducción del eHN recombinante detectado por western-blot y por actividad enzimática.

Con el fin de conocer las condiciones de sobreproducción del eHN-RVP, las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN se sometieron a expresión cultivándolas en medio sin tiamina (EMM). Se partió de un precultivo en medio YNB, después el cultivo en medio mínimo con tiamina (ET-tiamina 2 μ M) hasta una DO=2 y posteriormente en

el medio de expresión sin tiamina (EMM) poniendo las células en muy baja densidad para que iniciará la primera etapa de crecimiento la fase log. Como control negativo se utilizaron las cepas 826, 3D y 4X y la cepa nativa de *S. pombe* 972. Se tomaron muestras a DO=2 y 4 correspondientes a las etapas media y final logarítmica. De estas muestras se obtuvo el extracto soluble de proteínas, y se analizaron por Western-blot.

No se obtuvieron resultados positivos con las cepas 826HN y 4XHN.

Los resultados positivos se obtuvieron únicamente con la cepa 3DHN, los cuales se muestran en la figura 34.

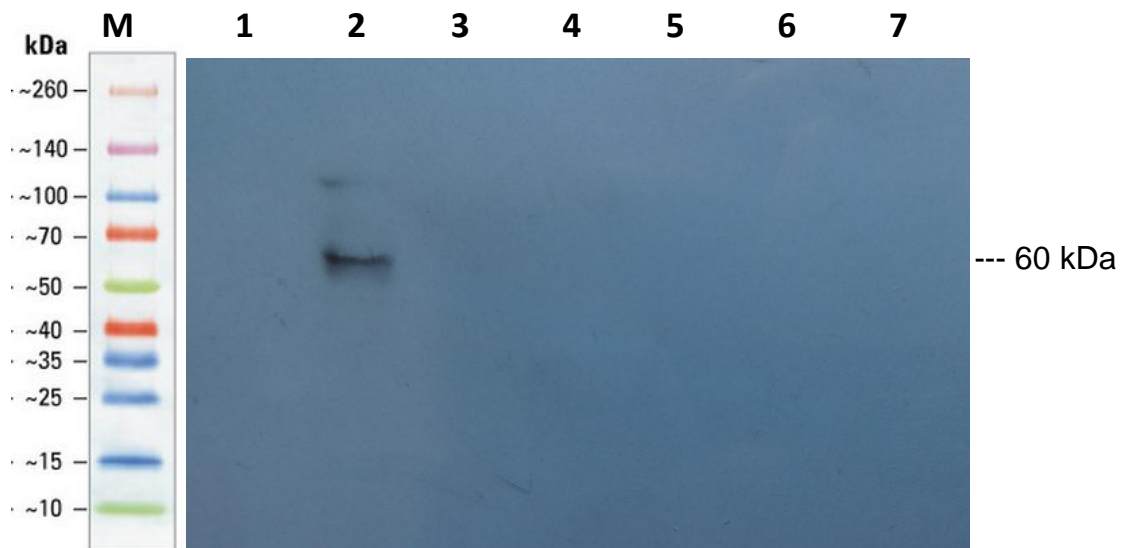


Figura 34. Western blot de la cepa 3DHN. Revelado con anti-myc

- 1) Cepa 3D HN en medio EMM (DO=2).
- 2) Cepa 3D HN en medio EMM (DO=4).
- 3) Cepa 3D HN en medio ET.
- 4) Buffer de carga 1X.
- 5) Cepa 3D en medio ET (DO=2).
- 6) Cepa 3D en medio ET (DO=4).
- 7) Cepa 972 en medio ET.

En la muestra 3DHN cultivada en condiciones de expresión a DO de 4, se observa una banda alrededor de 60 kDa (carril 2), la cual corresponde a la proteína recombinante eHN (59kDa). Los controles negativos de las cepas nativas y silvestre no mostraron ninguna señal (carriles 5,6 y 7).

Con estos resultados podemos decir que la cepa 3DHN está expresando la proteína recombinante eHN a DO de 4, siendo esta en la fase final logarítmica.

La actividad enzimática de la proteína recombinante eHN se midió en los extractos enzimáticos de las cepas 826 HN, 3 HN y 4X HN cultivadas en medio de expresión y tomadas a DO= 2 y 4. Se empleó un control negativo (sin extracto soluble de proteínas) y como control positivo la proteína recombinante eHN de *P. pastoris* obtenida en trabajos previos en la tesis doctoral del MC. José Luis Cerriteño Sánchez del Posgrado en Ciencias Químicas, área Bioquímica y Biología Molecular.

La actividad neuraminidasa se determinó por dos métodos, uno colorimétrico utilizando fetuina como sustrato (método del ácido tiobarbitúrico, Aminof modificado) que determina la cantidad de ácido siálico liberado y el otro método fue un ensayo fluorométrico utilizando al sustrato munana (2 '2' - (4-Methylumbelliferyl), el cual es cortado por la proteína HN para producir 4-methylumbelliferone libre y el incremento cuantitativo de la fluorescencia es una medida de la actividad neuraminidasa.

Con ninguno de los dos métodos logramos detectar actividad enzimática de las muestras de las cepas sobreproductoras.

En el caso de las cepas 826 HN y 4X HN tampoco logramos ver la proteína en western-blot, por lo que podríamos decir que en las condiciones experimentales utilizadas no se está expresando la proteína recombinante eHN.

En el caso de la 3DHN si observamos a la eHN en western-blot (fig.34 carril 2), por lo que el hecho que no presente actividad enzimática puede ser consecuencia de la falta de cambios postraduccionales de la proteína, como

pueden ser las glicosilaciones y el plegamiento adecuado. Cabe recordar que no se está expresando toda la proteína HN, sino únicamente el ectodominio, el cual le faltan los primeros 62 aminoácidos de la parte N-terminal con la cual se ancla en la membrana viral.

A pesar que *S. pombe* es capaz de realizar glicosilaciones, son necesarios más ensayos que nos permitan elucidar la presencia de estos cambios en eHN, como pueden ser el uso de enzimas glicosilasas para remover los carbohidratos, geles en condiciones nativas y espectrometría de masas (MALDI tof). Mediante estos ensayos se puede determinar la similitud que existe con la proteína proveniente del virus.

Sin embargo otros autores al expresar la proteína E7 del virus del papiloma humano en *S. pombe* (Tommasino et al., 1992) encontraron la proteína con los cambios postraduccionales necesarios para presentar actividad enzimática, al igual que Quinn et al. en 1997 al expresar la glutatión S-transferasa (GST) proveniente del parásito *S. japonicum*, la cual presentó los cambios postraduccionales necesarios para presentar actividad enzimática; por lo tanto la expresión de proteínas heterólogas con cambios postraduccionales necesarios para la presencia de actividad en el sistema de *S. pombe* ha generado buenos resultados, por lo que sería necesario realizar más ensayos de actividad neuraminidasa cambiando algunos parámetros como pueden ser la cantidad de proteína usada, temperatura, pH y el tiempo de incubación de la reacción para descartar finalmente la presencia o ausencia de actividad.

Por otro lado, la ausencia de actividad puede ser resultado de expresar únicamente el ectodominio de la HN y no toda la proteína HN. Sin embargo, Yongkiettrakul et al. 2009, al expresar el ectodominio de la neuraminidasa de influenza aviar A/H5N1 en levadura, encontraron una proteína con actividad enzimática similar a la nativa, por lo tanto expresar únicamente el ectodominio no afectó a sus características estructurales.

Lo importante es ver si esta proteína recombinante conserva sus propiedades antigénicas, para lo cual es necesario saber si es reconocida por sueros de cerdos infectados por el RVP, como los ensayos realizados por Hartwig

et al. en el 2010, donde probaron en sueros de humanos infectados con Leptospirosis la capacidad de reconocer a las proteínas LigA y LipL32 expresadas en levaduras mediante western blot, concluyendo que las proteínas recombinantes conservaban su antigenicidad.

Por otro lado se puede evaluar la capacidad de la proteína eHN de producir anticuerpos neutralizantes contra el RVP usando modelos animales como el murino y evaluando la capacidad neutralizante por ensayos de sero-neutralización. Se ha encontrado que la glicosilación de glicoproteínas virales influye en la gama de huéspedes y en la patogenicidad viral (Rademacher et al., 1988).

Sería conveniente en futuros estudios explorar con más detalle las condiciones óptimas de la sobreproducción de eHN a lo largo de toda la curva de crecimiento, dado que posiblemente como es una proteína extraña a la levadura se pueda estar produciendo pero se esté señalizando para su degradación. En nuestro caso nosotros la logramos ver únicamente en la cepa 3DHN, esta cepa tienen la característica genética de que aparte de tener sus auxotrofías (*leu-*, *ade-* y *ura-*), tiene mutados los genes de dos proteasas, la aminopeptidasa *yspl* y la dipeptidil aminopeptidasa *yspl*, lo cual posiblemente le confiere a la cepa una degradación de proteínas señalizadas más lenta.

Sería factible determinar las células viables a lo largo de toda la curva de crecimiento, ya que encontramos que el tiempo de duplicación de las cepas 826HN, 3DHN y 4XHN (3.7445, 2.7967 y 3.3735 respectivamente) es similar al de las cepas 826, 3D y 4X (3.3543, 2.8148 y 2.7805 respectivamente) y que es menor la biomasa máxima alcanzada de las cepas sobreproductoras (3.9222, 3.1324 y 3.8892 respectivamente) con respecto a los controles (5.2764, 4.4152, 4.8285 respectivamente). Esto puede deberse a que la HN al ser una proteína extraña para la levadura ocasiona un estrés metabólico que afecta directamente a la cantidad de células viables, bajando los rendimientos de biomasa respecto a las cepas no productoras. La sobreproducción de una proteína heteróloga puede abrumar la maquinaria de la célula para la manipulación de la proteína, causando

que una porción significativa de ésta sea mal plegada o no se procese (Brierley R. A., 1998). Además la regulación del ciclo celular posee un punto de restricción y tres puntos de control. Estos pueden retrasarse por la presencia de una proteína extraña como la HN. Autores como Vanz et al. 2012 al expresar el antígeno de superficie de la hepatitis B en levadura observaron una respuesta de estrés que fue descrito por cambios en el crecimiento celular y un incremento en el número y tamaño de mitocondrias, así como cambios drásticos en el proteoma de la célula.

También para seguir buscando las condiciones óptimas de expresión, sería importante un ensayo de RT-PCR para la detección del ARNm proveniente de la proteína eHN a lo largo de toda la curva de crecimiento, ya que la velocidad de degradación de los ARNm provenientes de algunos genes heterólogos es muy alta, siendo muy bajos o nulos los niveles de síntesis de las proteínas recombinantes (Bechhofer D., 1993). Mediante este ensayo se puede determinar el punto óptimo en el cual se encuentra mayor cantidad de mensajero en la curva de crecimiento celular, que puede ser un indicativo de la cantidad de proteína producida y por otro lado se puede determinar si existe degradación del mensajero en alguna fase de la curva de crecimiento.

Finalmente, gracias a la presencia de una etiqueta de histidinas de en la región C-terminal de la proteína podemos purificarla por cromatografía de afinidad, y así facilitar el desarrollo de todos los ensayos propuestos, como son la presencia de cambios postraduccionales y la capacidad de generar anticuerpos neutralizantes con el RVP.

7. CONCLUSIONES

Se obtuvo la construcción del vector de expresión pRSP-HNhm que codifica para el eHN del RVP de PACI.

Se obtuvieron cepas de *Schizosaccharomyces pombe* 826HN, 3DHN y 4XHN, que tienen el vector recombinante pRSP-HNhm para producir el eHN-RVP de PACI.

Se logró expresar y detectar por western-blot la proteína recombinante eHN en la cepa 3DHN a DO de 4, siendo esta en la fase final logarítmica.

No se logró obtener actividad neuraminidasa con las condiciones usadas.

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Para descartar la presencia o ausencia de actividad de la proteína recombinante eHN, sería necesario realizar cambiando en algunos parámetros de los ensayos de actividad neuraminidasa como pueden ser la cantidad de proteína usada, temperatura, pH y el tiempo de incubación de la reacción.

Son necesarios más ensayos que nos permitan elucidar la presencia de cambios postraduccionales en eHN. Para ello se propone el uso de enzimas glicosilasas para remover los carbohidratos y espectrometría de masas (MALDI tof).

Se propone explorar con más detalle las condiciones óptimas de la sobreproducción de eHN a lo largo de toda la curva de crecimiento, dado que posiblemente como es una proteína extraña a la levadura se pueda estar produciendo pero se esté señalizando para su degradación.

Además sería importante un ensayo de RT-PCR para conocer la expresión del gen del eHN, con la determinación del ARNm a lo largo de toda la curva de crecimiento con el fin de conocer si existe degradación del ARNm.

Sería factible determinar las células viables a lo largo de toda la curva de crecimiento ya que la eHN al ser una proteína extraña para la levadura puede ocasionar un estrés metabólico que afecta directamente a la cantidad de células viables.

Para averiguar si la proteína recombinante eHN conserva sus propiedades antigénicas, es necesario determinar si es reconocida por sueros de cerdos infectados por el RVP. Por otro lado se puede evaluar la capacidad de la proteína eHN de producir anticuerpos neutralizantes contra el RVP usando modelos animales como el murino y evaluando la capacidad neutralizante por ensayos de sero-neutralización.

8. BIBLIOGRAFÍA:

Aminoff D. (1961). Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem J.* 81, 384–392.

Bechhofer D. (1993). 5' mRNA stabilizers. Control of messenger RNA stability. (En Belasco JG, Brawerman G, eds.). Academic Press. p. 31-52.

Brierley R. A. (1998). Secretion of recombinant human insulin-like growth factor I (IGF-I). *Methods Mol Biol.* 103:149-77.

Bobadilla S. E., Espinoza O. A., y Martínez C. F. (2010). Dinámica de la producción porcina en México de 1980 a 2008. *Rev. Mex. de Cien. Pecu.* 1(3): 251–268.

Borraz A. M., Santos L. G., Vallejo R. V., Herrera C. I. y Reyes L. J. (2008) Caracterización biológica de tres aislamientos naturales del Rubulavirus porcino (México). *Rev. de Bio. Trop.* 56 (2): 487-499.

Colman P. M., Hoyne P. A. y Lawrence M. C. (1993). Sequence and Structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J. Virol.* 67(6):2972-80.

Crennell S., Takimoto T., Portner A y, Taylor G. (2000). Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat. Struct. Biol.* 7(11):1068-74.

Doms R. V., Lamb R. A., Rose J. K. y Helenius A. (1993). Folding and assembly of viral membrane proteins. *Virology* 193(2):545-62.

Drago S. M., Sainz E. T. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. México, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37(1):38-44.

Escobar L. A., Rivera B. J., Castillo J. H., Ramírez M. H., Trujillo O. M. y Sánchez Betancourt J. I., (2011). Identification of Antigenic Variants of the Porcine Rubulavirus in Sera of Field Swine and their Seroprevalence. *Transboundary and Emerging Diseases.* *Transbound Emerg Dis.* 59(5):416-20.

Forsburg S. L. (2005). The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research. *Gravitational and Space Biology* 18(2): 3-10.

Giga H. Y, Tohda H., Okada H., Owada M. K., Okayama H. y Kumagai H. (1994). High-level expression of human lipocortin I in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* using a novel expression vector. *Biotechnology (N Y)* 12(4):400-4.

Griffiths D. y Carr M., (1998). DNA repair in *Schizosaccharomyces pombe*. In DNA damage and repair. Volume 1. Edited by Nickloff, A. and M. Hoekstra. Humana Press. Pp.449-475.

Hartwig D. D., Oliveira T. L., Seixas F. K., Forster K. M., Rizzi C., Hartleben C. P., McBride J. A., Dellagostin O. A. (2010). High yield expression of leptospirosis vaccine candidates LigA and LipL32 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 98: 1-9.

Hernández S. P. (2008). Expresión de eIF3f en *Schizosaccharomyces pombe*. Tesis para obtener el título de Maestra en Ciencias en Biología Experimental. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de investigaciones Químico-Biológicas

Moreno L. J., Correa G. P., Martínez A. y Ericsson A., (1986). Characterization of a paramyxovirus isolated from the brain of a piglet in Mexico. *Arch Virol.* 91(3-4):221-231.

Quino Lu, C. Bauer J. y Greener A., (1997). Using *Schizosaccharomyces pombe* as a host for expression and purification of eukaryotic proteins. *GENE* 200(1-2):135-144.

Rademacher T.W., Parekh R.B. and Dwek R.A. (1988). *Glycobiology.* Annu. Rev. Biochem. 57(1), 785-838.

Reyes L. J, Espinosa B., Santos G., Zenteno R., Hernández J., Vallejo V. y Zenteno E. (1999). Purification and characterization of the hemagglutinin-neuraminidase of Porcine Rubulavirus LPMV. *Glycoconj. J.* 16(9):517-22.

Reyes L. J., García M. O., Santos L. G., Vallejo V., Ramírez M. H. y Hernández J., (2004). Detección de viremia en la infección experimental por *Rubulavirus porcino*. Arch. Med. Vet. 36(1):39-47.

Reyes L. J., Santos G., Hernández J., Espinosa B., Borraz A. M., Humberto R. M., Vallejo V., Zenteno E., (2002). Mecanismos moleculares de la patogenia viral: estudios con el *Rubulavirus porcino*. UNAM Mensaje Bioquímico, 26: 99-127.

Rima B., Alexander D. J., Billeter M. A. (1995). Family Paramyxoviridae. En: Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL et al. (Eds). Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses Springer-Verlag. Viena Nueva York. pp. 265-274.

Sánchez B. J., Santos L. G., Alonso R., Doporto J. M., Ramírez M. H., Hernández J., Reyes L. J. y Trujillo M. E., (2008). Molecular characterization of the hemagglutinin-neuraminidase gene of porcine rubulavirus isolates associated with neurological disorders in fattening and adult pigs. Res. Vet. Sci. 85(2):359-67.

Santos L. G., Hernandez J., Borraz A. M., Ramirez M. H., Vallejo V. y Reyes L. J., (2004). Estructura, función e implicaciones patológicas de las proteínas del *Rubulavirus porcino*. Arch. Med. Vet. 36(2):119-136.

Santos L. G. (2000). Purificación parcial y estudio de las actividades de hemaglutinación y neuraminidasa de la proteína HN de cepas del *Rubulavirus porcino* de virulencia variable. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias. Centro de Investigaciones en ciencias Microbiológicas. Puebla, México.

Sedmak J. J., Grossberg S. E. (1977) A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using coomassie brilliant blue G250. Analytical Biochemistry. 79(1-2):544-552.

Stephano H.A., Gay G. M. y Ramírez T. C. (1988). Encephalomyelitis, reproductive failure and corneal opacity (blue eye) in pigs associated with a paramyxovirus infection. Vet. Rec. 122(1):6-10.

Stephano H. A., Ramírez T. C., Gay G. M. y Maqueda J. J. (1981). Estudios de un brote de encefalitis en lechones por un virus hemaglutinante. Memorias de la XVII Convención AMVEC. Ixtalapa, Zih., México; 44-51.

Stephano, H.A. (1993). Blue eye disease. En: Mengelin W.L., Ed. Diseases of swine. 6a. edición. Ames, Iowa State University Press, US; 237.

Vallejo V, Reyes L. J., Hernández J., Ramírez H., Delannoy P., Zenteno E. (2000). Differential expression of sialic acid on porcine organs during maturation process. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 126(3):415-24.

Vanz A. L., Heinrich Lünsdorf², Ahmad Adnan^{2,3}, Manfred Nimtz², Chandrasekhar Gurramkonda^{2,4}, Navin Khanna⁴ Y Rinas U.(2012) Physiological response of *Pichia pastoris* GS115 to methanol-induced high level production of the Hepatitis B surface antigen: catabolic adaptation, stress responses, and autophagic processes. *Microb Cell Fact.*11: 11-103.

Yongkiettrakul S., Boonyapakron K., Jongkaewwattana A., Wanitchang A., Leartsakulpanich U., Chitnumsub P., Eurwilaichitr L., Yuthavong Y. (2008). Avian influenza A/H5N1 neuraminidase expressed in yeast with a functional head domain. *J Virol Methods.* 156: 44-51.

9. ANEXOS

Soluciones y Medios de cultivo

Buffer de zimoleasa

Reactivo	Concentración
Ácido cítrico	50 mM pH 5.6
Na ₂ HPO ₄	50 mM pH 5.6
EDTA	40 mM pH 8.0
Sorbitol	1.2 M

TE 5X pH 7.5

Reactivo	Concentración
Tris/HCL	50 mM pH 7.5
EDTA	5 mM pH 7.5

Vitaminas 1000X para medio EMM

Reactivo	Concentración
Ácido pantoténico	10 mg/10 ml
Ácido nítrico	100 mg/10 ml
Inositol	100 mg/10 ml
Biotína	1 mg/10 ml

Vitaminas 1000X para medio YNB

Ácido cítrico	50mg/50ml
Ácido nicotínico	500mg/50ml
n-inositol	500mg/50ml

Minerales 10000X

Reactivo	Concentración
Ácido bórico	50 mg/10 ml
MnSO ₄	45 mg/10 ml
ZnSO ₄	72 mg/10 ml
FeCl ₂ .6H ₂ O	17 mg/10 ml
Ácido molibdico	16 mg/10 ml
KI	10 mg/10 ml
CuSO ₄ .5H ₂ O	4 mg/10 ml
Ácido cítrico	1 g/10 ml

Tiamina 1000X

Reactivo	Concentración
Tiamina	5 mM/10ml de H ₂ O

Sales 50X

Reactivo	Concentración
MgCl ₂ .6H ₂ O	5.35 g/100 ml
CaCl ₂ .6H ₂ O	75 mg/100 ml
KCl	5 g/100 ml
Na ₂ SO ₄	200 mg/100 ml

Los complejos vitamínicos 1000X, los minerales 10 000X, Tiamina (1000X) y las sales 50X se esterilizan por filtración (Millipore 0.2 µl) usando campana de flujo laminar y se almacenan a 4°C y se protegen de la luz.

Aminoácidos 100X

Reactivo	Concentración
L-Leucina100X	1.25 g/100 ml de H ₂ O
L-Adenina 100X	1.25 g/100 ml de NaOH 0.1N
L-Uracilo 100X	1.25 g/100 ml de HCl 0.1 N
L-Histidina 50X	1.125 g/100 ml de H ₂ O
L-Lisina 50X	1.125g/100 ml de HCl 0.1 N

Glucosa (Dextros) 10 X

Solución al 20 %

La glucosa 10X y los aminoácidos 100X se esterilizan en autoclave vertical a 10 libras por 20min y se guardan en frío.

Solución I

Reactivo	Concentración
Glucosa	45gr/L
EDTA	9.03gr/L

Solución II

Reactivo	Concentración
NaOH 0.2N	8 mg/ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	10 mg/ml

Solución III

Reactivo	Concentración
Acetato de potasio 5M	600ml/L
Ácido acético glacial	115ml/L

Medios de cultivo

Medio completo LB (Luria-Bertani) pH=7.5

Reactivo	Concentración
Extracto de levadura	0.5 %
Triptona	1 %
NaCl	1 %

Medio completo YE

Reactivo	Concentración
Extracto de levadura	2.5%
Glucosa	2.0%

Medio mínimo YNB

YNB (yeast nitrogen base)	6.7gr/l
Acetato de sodio	1gr/l
KCL	0.9gr/l

Los medios sólidos LB, YE y YNB se preparan añadiendo agar al 2 %. La esterilización de los medios de cultivo se lleva a cabo en una autoclave vertical a 10 libras de presión por 20 minutos. Las cepas transformadas con plásmido pJET-HNhm se les adicionó al medio ampicilina a 100 µg/ml y para las cepas de levadura no transformadas con el plásmido pRSP-HNhm se les adiciona al medio leucina.

Medio EMM (minimo mineral edimburgo)

Reactivo	Concentración
Ácido ftálico	3 g/l
Na ₂ HPO ₄	2.8 g/l
NH ₂ CL	5 g/l
Sales 50X	20 g/l

El volumen se ajusta a 900 ml. La esterilización se realiza en una autoclave vertical a 10 libras de presión por 20 minutos. Una vez estéril el volumen se ajusta a 1L añadiendo 50 ml de glucosa al 20%, 0.5 ml de vitaminas al 1000X y 50 ml de minerales al 10000X, así como los requerimientos (50X) necesarios previamente preparadas.

Para que el medio EMM que requiere agregar tiamina (2mM) se nombra ET.

Soluciones para Western blot

Buffer de corrida

Reactivo	Concentración
Tris-base	3.028gr/l
Glicina	14.413gr/l
SDS	1gr/l

Buffer de transferencia

Reactivo	Concentración
Tris base	3.03gr/l
Glicina	14.4gr/l
Metanol	200ml/l
SDS	1gr/l

Buffer tbs-tween

Reactivo	Concentración
Tris base	0.02M
NaCl	0.15M

Buffer tris 5mM, pH=6.8

Reactivo	Concentración
Tris base	60.57mg/100ml

Buffer de tratamiento reductor SDS 4X

Reactivo	Concentración
Glicerol	3ml/10ml
Buffer tris-HCl 0.5M pH=6.8	2.5ml/10ml
SDS 10%	4ml/10ml
DDT	0.62gr/10ml
Azul de bromofenol	0.2mg/10ml

El Buffer de tratamiento reductor SDS 4X se afora a 10ml con agua desionizada. Alicuotar en volúmenes de 0.5ml y almacenar hasta por 12 meses a -20°C.

Para la preparación del Buffer tris 5mM, se disuelven 60.57mg en 50 ml agua desionizada, se ajusta a pH a 6.8 (± 0.1) con HCl 1.0N y posteriormente se afora a 100ml con agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente hasta por un mes. El buffer TBS-Tween se ajusta a pH=8 usando HCl.

Buffer de acetatos 5mM, pH=4.5

Reactivo	Concentración
Acetato de sodio	241.67mg/L
Ácido acético	0.1845ml/L