



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA
CAMPUS TUXTEPEC

"Subclonación y expresión del antígeno recombinante TSA-1 de
Trypanosoma cruzi fusionado al dominio de unión a maltosa"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Ingeniera en Biotecnología

PRESENTA:

MARÍA FERNANDA GARCÍA GONZÁLEZ

Director: Dr. Julián Peña Castro

Co-Director: Dr. Jaime Ortega López

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA

2020



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

CAMPUS TUXTEPEC

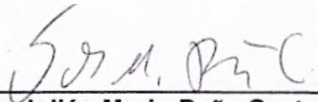
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, el día 10 de febrero de 2020 a las 13 hr, los miembros de la comisión revisora de tesis designada por la Jefatura de Carrera de la Ingeniería en Biotecnología se reunieron en la sala de juntas del Instituto de Biotecnología de la Universidad del Papaloapan, con la finalidad de examinar la tesis titulada "**Subclonación y expresión del antígeno recombinante TSA-1 de *Trypanosoma cruzi* fusionado al dominio de unión a maltosa**" presentada por la alumna **María Fernanda García González**, con número de matrícula 12090353, aspirante al título de **Licenciatura**.

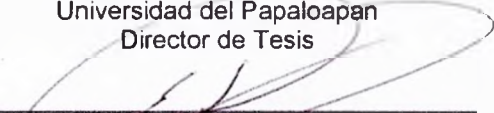
Después de intercambiar opiniones, los miembros de la comisión manifestaron que la tesis **satisface** los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes, otorgando su **aprobación** para que la aspirante pueda proceder con el proceso de titulación.

Tuxtepec, Oaxaca, a 10 de febrero de 2020

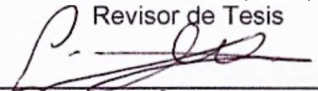
ATENTAMENTE
LA COMISIÓN REVISORA



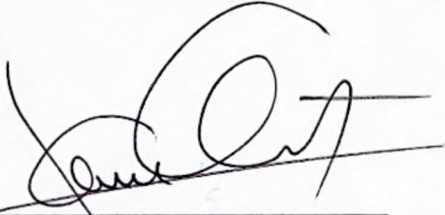
Dr. Julián Mario Peña Castro
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Director de Tesis



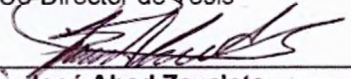
Dr. Edgar García López
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



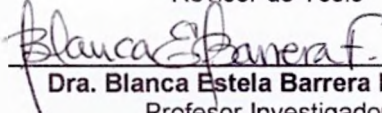
Dr. Miguel Angel Peña Rico
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



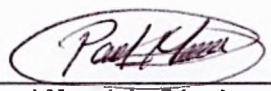
Dr. Jaime Ortega López
Investigador
CINVESTAV-IPN
Co-Director de Tesis



Dr. José Abad Zavaleta
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo
Profesor Investigador
Universidad del Papaloapan
Revisor de Tesis



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN CAMPUS TUXTEPEC

Tuxtepec, Oaxaca, a 13 de febrero de 2020
Oficio No. JCIB/009/02/2020

Lic. Yesenia Barrientos Arenal
Jefe de Servicios Escolares
Universidad del Papaloapan

Con base en el dictamen de la comisión revisora, se autoriza la impresión del trabajo de tesis de la alumna **María Fernanda García González** titulado "**Subclonación y expresión del antígeno recombinante TSA-1 de *Trypanosoma cruzi* fusionado al dominio de unión a maltosa**". Para ser presentado como trabajo de tesis para obtener el título de Licenciado en **Ingeniería en Biotecnología**, toda vez que cumple satisfactoriamente con la reglamentación establecida para tal fin.

El Jurado de Examen Profesional estará compuesto por los siguientes profesores:

Dr. Edgar García López (Presidente, Universidad del Papaloapan)
Dr. Miguel Ángel Peña Rico (Secretario, Universidad del Papaloapan)
Dr. Paul Mauricio Sánchez Ocampo (Vocal, Universidad del Papaloapan)
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa (Primer Suplente, Universidad del Papaloapan)
Dr. José Abad Zavaleta (Segundo Suplente, Universidad del Papaloapan)

Sin más por el momento le envío un cordial saludo.

Atentamente
Terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

M.C. Héctor López Arjona
Vice Rector Académico
Universidad del Papaloapan



**VICE-RECTORIA
ACADEMICA**

c.c.p. Dr. Julián Mario Peña Castro. Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. Dr. Jaime Ortega López. Co-Director de tesis, Para su conocimiento
c.c.p. María Fernanda García González, Alumno, Para su conocimiento
c.c.p. Archivo

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, así como al jefe del Laboratorio de Ingeniería de Proteínas el Dr. Jaime Ortega López por su aceptación para la realización de mis actividades correspondientes a mi trabajo de tesis, a la técnico encargada del laboratorio M. en C. Ivonne Flores Pucheta por su dirección y apoyo durante todo el proceso de trabajo en la investigación, a los integrantes del laboratorio por su apoyo y coordinación, especialmente al Dr. Gerardo Reséndiz por su ayuda y consejos. A la Fundación Carlos Slim por la beca que me permitió realizar mis actividades para crear este trabajo y al Dr. Julián Peña Castro por su guía, paciencia y ayuda para concretar la finalización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mi director de tesis, codirector y personas cercanas que me apoyaron durante mi trabajo, enseñándome y guiándome. A mis padres que permitieron que yo concretaré esta fase de mi vida apoyándome y alentándome a nunca rendirme. A todos los amigos que me apoyaron durante este proceso. A un gran amigo, el Dr. Ruslán, por su ayuda para que encontrar el camino adecuado para finalizar esta etapa y comenzar otra etapa de mi vida. A todos mis profesores que fueron parte del desarrollo de mi aprendizaje durante esta travesía.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA.....	VI
ÍNDICE DE CONTENIDOS	VII
RESUMEN	X
ABREVIATURAS	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS.	1
1.2. ENFERMEDAD DE CHAGAS EN AMÉRICA LATINA.	1
1.3. PROCESO DE INFECCIÓN.....	2
1.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.	3
1.5. TRATAMIENTOS ACTUALES.	5
1.6. VACUNAS.....	6
1.7. EL DESARROLLO DE VACUNAS TERAPÉUTICAS.	9
1.8. DESARROLLO DE UNA VACUNA PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.	9
1.9. LAS TRANS-SIALIDASAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	11
1.10. PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	14
1.11. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN <i>E. COLI</i>	14
1.12. VECTORES DE CLONACIÓN.	15
1.13. ETIQUETA DE DOMINIO DE UNIÓN A MALTOSA (MBP).	16
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVO GENERAL.....	19
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.	20
6.2. VECTORES DE CLONACIÓN pET-41.	20
6.3. VECTORES DE CLONACIÓN pCRI.	22
6.4. SUBCLONACIÓN DE LA SECUENCIA rTSA-1.	23
6.5. INDUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA rTSA-1-MBP.	25
6.6. CEPAS <i>E. COLI</i> BL21 (DE3), C43 (DE3) Y C41 (DE3).	26
6.7. OBTENCIÓN DE VECTORES PURIFICADOS pCRI-1B Y pET-41A rTSA-1.	26
6.8. OBTENCIÓN DE INSERTO rTSA-1 Y EL VECTOR pCRI-1B PURIFICADOS.	26
6.9. LIGACIÓN VECTOR pCRI-1B CON EL INSERTO rTSA-1.	27

6.10.	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE COMPETENTES CON EL VECTOR pCRI-1B rTSA-1-MBP.....	27
6.11.	INDUCCIÓN, EXPRESIÓN Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	27
	<i>a.</i> EN CONDICIONES BÁSICAS.	27
	<i>b.</i> EN CONDICIONES CONTROLADAS DE TEMPERATURA.	27
	<i>c.</i> CINÉTICA POR HORAS.....	28
	<i>e.</i> EN GENOTIPOS <i>E. COLI</i> C41 (DE3) Y C43 (DE3).....	28
	<i>f.</i> PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN COLUMNA DE NI-SEFAROSA.....	29
6.12.	WESTERN BLOT.....	29
6.13.	AMPLIFICACIÓN DEL GEN TSA.	30
7.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	31
7.1.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.	31
7.2.	SUBCLONACIÓN DEL INSERTO rTSA-1 AL VECTOR pCRI-1B.	33
7.3.	ENSAYOS DE INDUCCIÓN, EXPRESIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA rTSA-1.	36
7.4.	ENSAYOS DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN CON LOS GENOTIPOS <i>E. COLI</i> C41 Y C43.....	39
7.5.	ENSAYOS DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS.....	41
7.7.	CINÉTICA DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN.	46
7.8.	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR COLUMNA DE AFINIDAD NI-SEFAROSA.....	48
7.9.	WESTERN BLOT.....	50
7.10.	AMPLIFICACIÓN DEL GEN TSA-1.	53
8.	CONCLUSIONES.....	54
9.	RECOMENDACIONES.....	55
10.	REFERENCIAS.....	56
11.	ANEXOS.....	61
11.1.	ANEXO 1. GEL DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SDS-PAGE:	61
11.2.	ANEXO 2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES:	61
11.3.	ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE VECTOR:	62
11.4.	ANEXO 4: ELECTROFORESIS DE ADN:	62
11.5.	ANEXO 5. PURIFICACIÓN DE ADN:	64
11.6.	ANEXO 6. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA:.....	65
11.7.	ANEXO 7. DESFOSFORILACIÓN CON FOSFATASA ALCALINA:	66
11.8.	ANEXO 8. REACCIÓN DE LIGACIÓN:	66
11.9.	ANEXO 9. PREPARACIÓN DE CRIO VIALES:	67
11.10.	ANEXO 10. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES:	67
11.11.	ANEXO 11. PROTOCOLO DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN CON IPTG:.....	68
11.12.	ANEXO 12. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA CON BUGBUSTER:	68
11.13.	ANEXO 13. WESTERN BLOT:.....	68

11.14.	ANEXO 14. REVELADO DE LA MEMBRANA DE WESTERN BLOT POR HRP:.....	70
11.15.	ANEXO 15. REVELACIÓN MEMBRANA DE WESTERN BLOT POR SUPERSIGNAL DE BIORAD:	70
11.16.	ANEXO 16. PCR PARA AMPLIFICACIÓN DE ADN:.....	71
11.17.	ANEXO 17. MEDIO DE CULTIVO LB (1L):.....	71
11.18.	ANEXO 18. MEDIO DE CULTIVO 2TY (1L):.....	72

RESUMEN

En el presente trabajo se dan a conocer los resultados del proceso de subclonación y expresión de la proteína recombinante TSA-1 del parásito *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad del Chagas en América Latina y el resto del mundo. El antígeno TSA-1, es una glicoproteína de superficie de tripomastigote del protozoo *Trypanosoma cruzi*. En pruebas farmacológicas ha demostrado ser un fuerte elicitador de linfocitos T CD8+, generando altos niveles de respuesta inmunogénica en pacientes infectados. El antígeno TSA-1 fue seleccionado para formar parte de la composición de una vacuna terapéutica capaz de tratar la enfermedad del Chagas en fase aguda y grave. Anteriormente, el antígeno de origen recombinante rTSA-1 se expresó en el vector pET-41a; la expresión fue altamente eficiente, sin embargo, la proteína se encontraba en cuerpos de inclusión. Por ello, con la implementación de técnicas de ingeniería genética y biología molecular, rTSA-1 se fusionó a la etiqueta de unión MBP (rTSA-1-MBP) con el objetivo de facilitar su expresión en forma soluble. Se subclonó el inserto rTSA-1 en un nuevo vector de expresión de la serie comercial pCri, el vector pCri-1b, que permite la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. Se implementaron diferentes estrategias de expresión para la síntesis de la proteína rTSA-1-MBP en *E. coli*, usando distintos genotipos *E. coli*, cambios de temperaturas en el crecimiento celular, suplementación del medio de crecimiento con glucosa y cromatografía de afinidad Ni-Sefarosa para purificar la proteína rTSA-1-MBP de los extractos celulares. Finalmente se utilizaron técnicas de Western blot para la identificación de la proteína rTSA-1-MBP y amplificación por PCR para verificar que el nuevo vector (pCri-1b TSA-1-MBP) tuviera presente el gen que expresa la proteína rTSA-1-MBP. Se confirma la expresión de la proteína recombinante rTSA-1-MBP en concentraciones debajo de los femto gramos tras visualizarse en un análisis de Western blotting. A pesar de que no se pudo expresar la proteína en las concentraciones requeridas, esta investigación indicó que es necesario mejorar la estrategia de producción mediante la modificación estructural de la proteína como su reducción de tamaño al mínimo antígeno, entre otras.

ABSTRACT

The present research, show the results of the subcloning and express process of the TSA-1 recombinant protein of the *Trypanosoma cruzi* parasite, causes Chagas disease in Latin America and the rest of the world. The TSA-1 antigen is a trypomastigote surface glycoprotein of the *Trypanosoma cruzi* protozoan. In pharmacological tests it has proven to be a strong elicitor of CD8 + T cells, generating high levels of immunogenic response in infected patients. TSA-1 antigen was selected to be part of the composition of a therapeutic vaccine capable of treating of treating acute and severe Chagas disease. Previously, the antigen of recombinant origin TSA-1 (rTSA-1) was expressed in vector pET-41a; The expression was highly efficient however, the protein was found in inclusion bodies. Therefore, with the implementation of genetic engineering and molecular biology techniques, rTSA-1 was merged into the maltose binding tag (rTSA-1-MBP) in order to facilitate the expression in soluble form. In addition, the rTSA-1 insert was subcloned into a new expression vector of the commercial series of pCri, the vector pCri-1b, which allows the over-expression of recombinant proteins on *E. coli*. In this work, different expression strategies implemented for the synthesis of rTSA-1-MBP protein on the *E. coli* platform, using different genotypes of *E. coli* cells, implementing temperature changes in cell growth, media supplementation strategies of growth with glucose and Ni-Sepharose affinity chromatography to purify rTSA-1-MBP from cell extracts. Finally, Western blot techniques were used for the identification of rTSA-1-MBP and PCR amplification to verify that the new construct (pCri-1b TSA-1-MBP) had in mind the gene that expresses the rTSA-1-MBP, the rTSA-1-MBP protein was not qualitatively visualized by denaturing electrophoresis by any of the aforementioned expression strategies, the expression of TSA-1 recombinant protein at concentrations below the femto grams was confirmed after visualization in a Western blotting analysis. By a PCR amplification, the presence of the TSA-1 gene in the vector pCri-1b rTSA-1-MBP was confirmed. Although the protein could not be determined in the required variables, this research indicates that it is necessary to improve the production strategy by structurally modifying the protein as its size reduction to the minimum antigen, among others.

ABREVIATURAS

- **MBP**

Maltose-binding-protein; Proteína de unión a maltosa.

- **IPTG**

Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido.

- **GST**

Glutathión-S-transferasa esquistosomal.

- **CGMP**

Current Good Manufacturing Practice; Buenas prácticas de manufacturación.

- **FDA**

Food and Drug Administration.

- **GFP**

Green Fluorescent Protein; Proteína verde fluorescente.

- **WHO**

World Health Organization; Organización Mundial de la Salud

- **NIH**

National Institutes of Health; Institutos Nacionales de la Salud

- **PCR**

Polymerase chain reaction; Reacción en cadena de la polimerasa

- **SDS-PAGE**

Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis; electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS.

La enfermedad de Chagas, también se conoce como tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria potencialmente mortal, causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (WHO Chagas Disease American Trypanosomiasis, 2018). Se considera endémica del continente americano donde se estima que 10 millones de personas están infectadas (WHO Neglected tropical diseases, 2019).

Fue descubierta en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, que encontró un protozoo homoflagelado en el intestino de los triatomas chupadores de sangre (*Triatoma infestans*) que denominó primero *Schizotrypanum cruzi*, para después volver a incluir a la especie en el género *Trypanosoma* (Körbele, 1968).

La enfermedad de Chagas resulta en pérdidas de \$1.2 billones de dólares anuales. La mayor parte de las discapacidades y las muertes causadas son por cardiomiopatía crónica que se desarrolla en aproximadamente 20-30% de los individuos infectados con *Trypanosoma cruzi*, enfermedades de megaesófago y megacolon son también secuelas clínicas importantes de la infección crónica por *Trypanosoma cruzi* (Dumonteil *et al.*, 2012).

La enfermedad de Chagas está diseminada en América Latina y el Caribe (WHO Chagas Disease American Trypanosomiasis, 2018), sin embargo, en las últimas décadas se ha logrado observar con mayor frecuencia en Estados Unidos de América, Canadá, el continente europeo y países del Pacífico Occidental, esto debido a la gran movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo, este fenómeno es denominado “Globalización del Chagas” (Dumonteil *et al.*, 2012).

1.2. ENFERMEDAD DE CHAGAS EN AMÉRICA LATINA.

Actualmente, por las condiciones precarias y de pobreza, la enfermedad de Chagas amenaza la vida de millones de personas en América Latina y el Caribe. La diseminación

de la enfermedad se da por los flujos activos de inmigración hacia países fronterizos y del mundo. Los tratamientos actuales son agresivos para el paciente y al no ser suministrados en etapas tempranas de infección, rara vez logran erradicar al parásito del hospedero. En el mundo existe un compendio de organizaciones sin fines de lucro involucradas en el desarrollo de una vacuna terapéutica ambivalente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. El uso de herramientas de ingeniería genética y de la tecnología del ADN recombinante está permitiendo la producción de las proteínas que compondrán esta vacuna (Dumonteil *et al.*, 2012). A la par, es necesario cumplir con el CGMP, que exige que un producto sea seguro para su uso, así como en el proceso de fabricación, procesamiento y envasado sea adecuado, para obtener la aprobación de la aplicación una vacuna por parte de la Agencia Federal de Alimentos y Medicamentos, la FDA (Quijano-Hernández *et al.*, 2011). Estos procesos de producción se están desarrollando en Estados Unidos: Baylor College of Medicine y Texas Children Hospital Center for Vaccine Development, y en México: Universidad Autónoma de Yucatán y el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Fundación Carlos Slim, 2016).

1.3. PROCESO DE INFECCIÓN.

La Infección se da través de las heces contaminadas del vector, los tres insectos más importantes son: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata*. Después de chupar la sangre en las regiones expuestas del cuerpo, el insecto expulsa heces contaminadas cerca de la herida de la mordedura, que contienen la forma metacíclica del protozoo. A medida que la herida causa comezón, el huésped rasca la herida y las heces contaminadas se internan en la pequeña punción, llegando a los tejidos subcutáneos (Rassi *et al.*, 2010). En el huésped, los tripomastigotes metacíclicos penetran las células cerca del sitio de la picadura del insecto, donde se diferencian en amastigotes. Los amastigotes se multiplican, se diferencian en tripomastigotes y se liberan de la célula al torrente sanguíneo (CDC American Tripanosomiasis, 2019). Los tripomastigotes infectan todas las células de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares en otros sitios de infección. Se considera que cualquier célula nucleada es un potencial objetivo de infección (Rassi *et al.*, 2010). Otros medios de contagio también son: El consumo de alimentos contaminados, transfusiones de sangre, trasplantes de

órganos o transmisión vertical de madre a hijo (Dumonteil *et al.*, 2012). En el Figura 1 se presenta el de ciclo de vida del parásito dentro del insecto y el cuerpo humano.

La enfermedad de Chagas posee dos fases diferenciadas, la fase aguda y la crónica. La fase aguda tiene una duración de aproximadamente dos meses después de contraerse la infección. En esta fase gran cantidad de parásitos circulan por el torrente sanguíneo y la enfermedad se presenta asintomática en la mayor cantidad de casos. Algunos de los síntomas que se presentan son: fiebre, dolor de cabeza, palidez, inflamación de ganglios linfáticos, dolor muscular, dificultad para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico (Rassi *et al.*, 2010).

La fase crónica, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardiaco y digestivo (Körbele, 1968). Un 30% de los pacientes sufren trastornos cardiacos y aproximadamente un 10% presentan alteraciones digestivas, neurológicas o ambas. Con el paso del tiempo, esta infección al no ser controlada puede causar insuficiencia cardiaca por la destrucción progresiva del músculo cardiaco y muerte súbita (Rassi *et al.*, 2010).

1.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.

El diagnóstico de la enfermedad se realiza después de considerar los hallazgos clínicos del paciente, así como tomar en cuenta la probabilidad de estar infectado, y haber vivido en un país endémico. Existen tres métodos para hacer el diagnóstico: el morfológico, el serológico y el molecular (Bern *et al.*, 2007).

En el método morfológico el diagnóstico se puede realizar por el hallazgo de tripomastigotes en sangre circulante o líquido cefalorraquídeo. Los amastigotes pueden encontrarse en muestras de biopsia teñidas con hematoxilina-eosina, todo esto mediante métodos de microscopia (Bern *et al.*, 2007).

ESTADIOS EN EL INSECTO

ESTADIOS EN EL CUERPO HUMANO

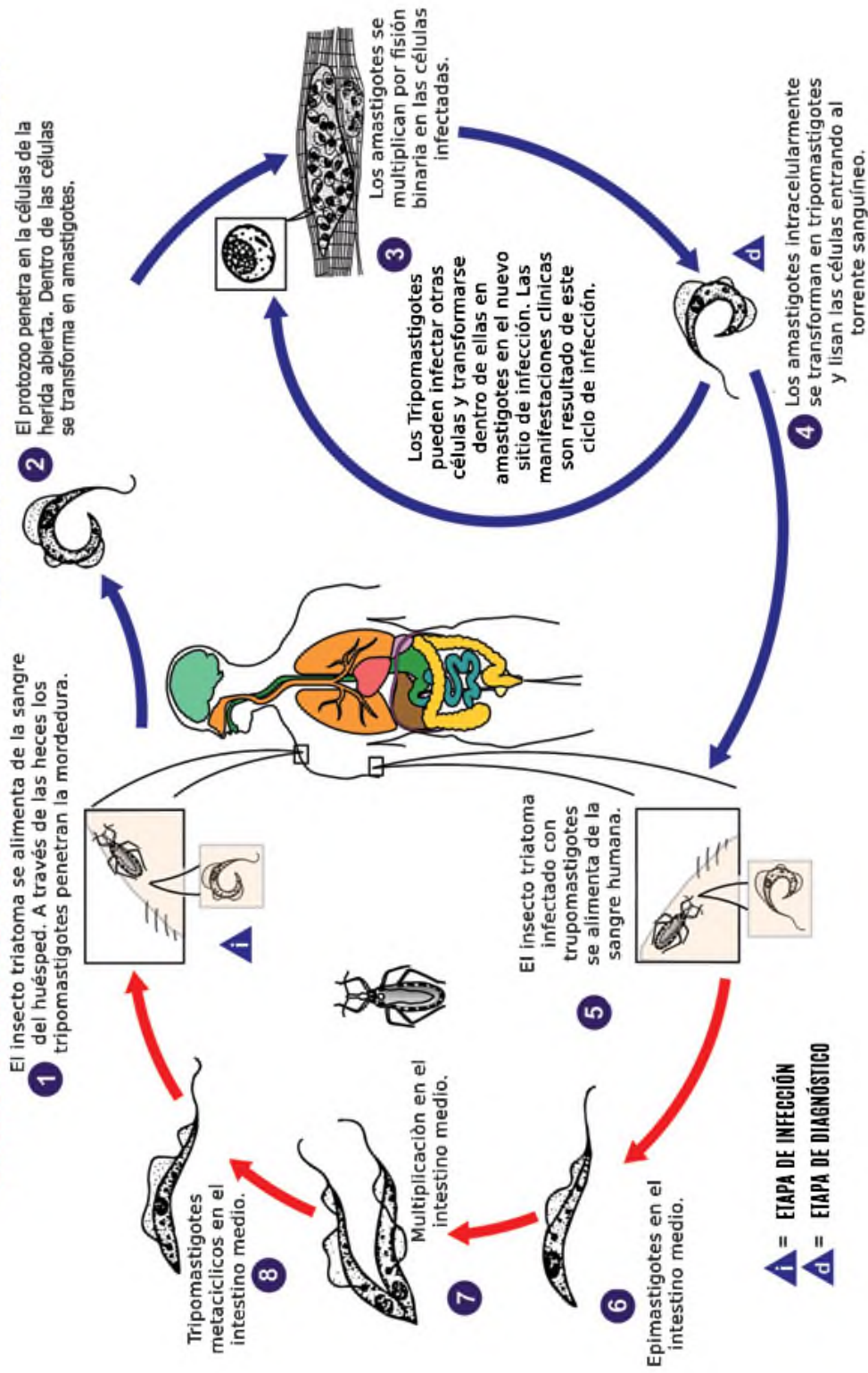


Figura 1: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Estadios de vida del parásito *Trypanosoma cruzi* en el vector y hospedero. Modificado de original: Centro de Control de Enfermedades (CDC American Trypanosomiasis, 2019).

En la fase crónica de la infección, se usa el método serológico pues la parasitemia es baja y el inmunodiagnóstico es una técnica útil para determinar si el paciente está infectado. El diagnóstico se realiza generalmente con al menos dos pruebas serológicas diferentes. La prueba de anticuerpos fluorescentes indirectos y un inmunoensayo enzimático comercial. Pero cuando se usa esta prueba, puede ocurrir una reactividad cruzada con sueros de pacientes con leishmaniasis, una enfermedad protozoaria que se produce en algunas de las mismas áreas geográficas que *Trypanosoma cruzi* (CDC American Tripanosomiasis *et al.*, 2019).

Finalmente, está el método molecular que sólo es apropiado cuando se espera que la parasitemia sea alta, como en la fase aguda de la infección o en la reactivación de la enfermedad debido a la inmunosupresión (CDC American Tripanosomiasis, 2019). Se realiza la detección del ADN de *Trypanosoma cruzi* utilizando una combinación de tres ensayos de PCR en tiempo real. Los tipos de muestra aceptables son sangre con EDTA, tejido de biopsia de corazón (en solución salina o incrustada en parafina) y, en casos donde se sospecha de afectación cerebral, fluido cerebroespinal (Bern *et al.*, 2007).

1.5. TRATAMIENTOS ACTUALES.

El tratamiento antiparasitario está indicado para todos los casos de enfermedad de Chagas aguda o reactivada y para la infección crónica en pacientes menores de 18 años. Cuando la enfermedad es congénita, se considera enfermedad aguda. El tratamiento es recomendable para adultos de hasta 50 años con infección crónica que no tienen cardiomiopatía chagásica avanzada. La decisión de tratar con antiparasitarios a los adultos mayores de 50 años que ya tienen cardiomiopatía debe ser individualizada, ponderando los posibles beneficios y riesgos para el paciente. Al iniciar un tratamiento los médicos consideran factores como la edad, estado clínico y salud en general (CDC Chagas Disease American Trypanosomiasis, 2018).

Los dos fármacos utilizados en las quimioterapias antitriposomales son Nifurtimox (tratamiento de 60 días) y Benznidazol (tratamiento de 60-90 días). Estos tratamientos están contraindicados a embarazadas, personas con cardiomiopatías y daño avanzado en el hígado. Se ha reportado también baja eficacia e intolerancia, así como efectos

secundarios. Los efectos secundarios del tratamiento con Benznidazol incluyen, dermatitis alérgica, neuropatía periférica, anorexia, pérdida de peso e insomnio. Los efectos secundarios del Nifurtimox son pérdida de peso, polineuropatía, náuseas, vómito, dolor de cabeza y mareos (CDC Chagas Disease American Trypanosomiasis, 2018). Dado que no se ha documentado la seguridad de los neonatos expuestos a través de la lactancia materna, también se recomienda retener el tratamiento durante la lactancia. Finalmente, los costos de estas quimioterapias son bastante elevados, en México está estimado un costo anual entre \$3,000-\$145,800 dólares por paciente (Dumonteil *et al.*, 2012).

1.6. VACUNAS.

La OMS define vacuna como: “Cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos” (OMS Vacunas, 2016). Actualmente, existen varios tipos de vacunas según la composición. A continuación, se muestra la clasificación (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de las vacunas con base a su composición. Información extraída y sintetizada de la Organización Mundial de la Salud (WHO Types of Vaccine, 2019) y el Instituto Nacional de Salud (NIH Vaccine Types, 2012).

CLASIFICACIÓN	COMPOSICIÓN Y ACCIÓN
Vivas, atenuadas	Se compone de una versión de microorganismos atenuados, que permiten al sistema inmune del paciente crear anticuerpos para combatir una futura infección.
Inactivadas	Contiene microorganismos inactivos por técnicas de aplicación de calor, radiación o química. Estas tienden a ser más seguras que la atenuadas y más estables.
Subunidades	Está compuesta solamente los antígenos que mejor estimulen el sistema inmune del paciente. En algunos casos se hace uso de epítomos, partes muy específicas del antígeno que los anticuerpos y células T reconocen.
Toxoides	Estas vacunas se utilizan cuando los microorganismos secretan químicos peligrosos o toxinas causantes de la

	afección, estas se inactivan con base a un tratamiento con formalina.
Conjugadas	Combaten enfermedades generadas por bacterias que poseen un revestimiento exterior de polisacáridos, esta capa oculta los antígenos provocando que el sistema inmune de los neonatos o niños no pueda responder. Encapsulando y conjugando los antígenos o toxinas en polisacáridos permite al sistema inmune inmaduro reaccionar al recubrimiento del microorganismo.
ADN	Parte de una nueva generación de técnicas de inmunización, estas vacunas contienen partículas proteicas sintetizadas por células huésped. El material genético que codifica para el componente que se usará en la vacuna es insertado mediante técnicas de ingeniería genética para su producción, purificación.
Vectores Recombinantes	Son vacunas experimentales. Se administran al huésped, virus o bacterias atenuadas como vector. El vector contiene ADN que codifica o sintetiza el compuesto para generar inmunidad.

En el Figura 2 se presentan clasificaciones de los tipos de vacunas y su relación con la implementación de las nuevas tecnologías del ADN recombinante para su uso en tratamientos de tipo terapéutico de enfermedades.

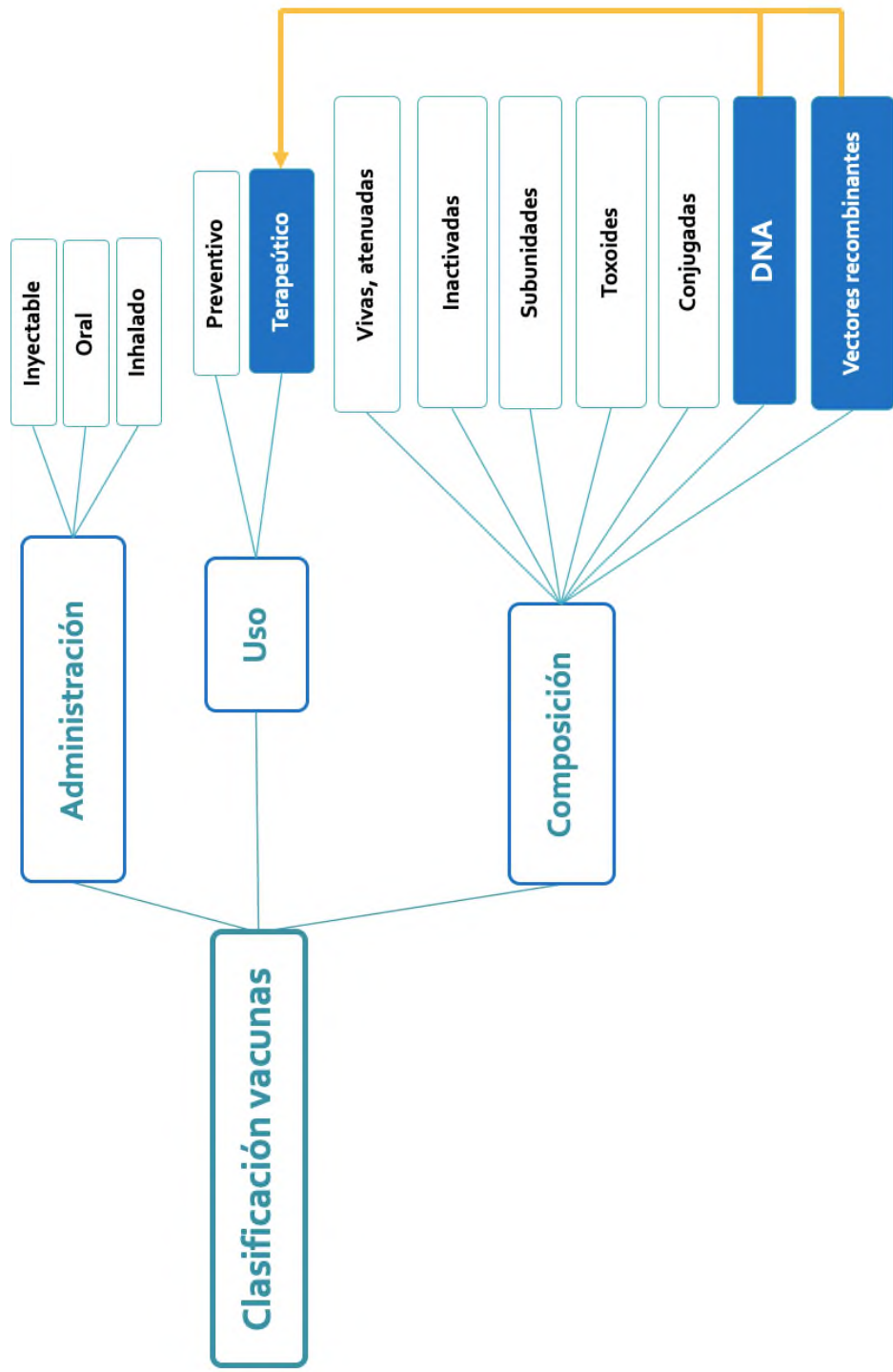


Figura 2: Clasificación de vacunas. Tipo de vacunas con base al composición, uso y administración al paciente. Marcado en amarillo la flecha que indica los tipos de vacunas de uso terapéutico para enfermedades.

1.7. EL DESARROLLO DE VACUNAS TERAPÉUTICAS.

Desde finales del siglo XIX han existido tratamientos con fármacos de compuestos sintéticos para el control de enfermedades. Actualmente, se utilizan los mismos compuestos mejorados en terapias para la diabetes, hipertensión, asma, artritis, migraña, entre otras afecciones; pero que siguen siendo solo un método de control para la enfermedad, pero no la erradican (Therapeutic Vaccines: A New Revolution, 2015).

En el año 2015 surgió un poderoso contendiente: las vacunas terapéuticas. Estas vacunas permiten, a diferencia de los fármacos o vacunas preventivas, una solución para tratar las complicaciones graves de una enfermedad, de infecciones tempranas o crónicas, pues refuerzan las defensas del paciente cuando las respuestas inmunitarias específicas son incapaces de hacerlo durante el curso natural de la enfermedad o cuando una terapia antimicrobiana convencional no es suficiente (Therapeutic Vaccines: A New Revolution, 2015). En la actualidad existen en el mercado vacunas terapéuticas para el cáncer de próstata y mieloma, y se prometen desarrollar vacunas también para afecciones como el cáncer cervical, cáncer pancreático, candidiasis vulvovaginal, hepatitis, cirrosis y otras enfermedades causadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (Autran *et al.*, 2004).

Las herramientas que permiten a las vacunas terapéuticas candidatas funcionar están estrechamente relacionadas con las respuestas de fuertes elicitores celulares: CD4+ T y CD8+ T, estos elicitores median la muerte de células infectadas y generan una memoria inmunitaria en el paciente (Laidlaw *et al.*, 2016). También, la elección de los adyuvantes correctos permiten una respuesta inmune más efectiva (Autran *et al.*, 2004).

1.8. DESARROLLO DE UNA VACUNA PARA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Se han realizado estudios preclínicos experimentales con vacunas de ADN, virus recombinantes que expresan antígenos de los parásitos y además vacunas con proteínas recombinantes con una combinación de adyuvantes (de la Cruz *et al.*, 2019). Los estudios preclínicos con estas vacunas iniciaron hace aproximadamente doce años en el Colegio de Medicina de Baylor en Estados Unidos y la Universidad Autónoma de Yucatán en México. Desde entonces solo han existido las terapias con fármacos sintéticos y no

ha existido ninguna otra vacuna como la que se pretende desarrollar para esta afección que contenga las proteínas de origen recombinante (Hotez *et al.*, 2013).

Las proteínas elegidas para el desarrollo de una vacuna bivalente fueron: Tc24 y TSA-1, debido a sus resultados positivos en las distintas pruebas preclínicas. El antígeno TSA-1 está estrechamente relacionado con la inducción de la actividad CD8+ de linfocitos T y la producción de IFN- γ para la inmunización del huésped. Se probaron anteriormente otras proteínas, como son la proteína de fusión KMP11-HSP70, y los antígenos ASP-1, ASP-2, los cuales dieron bajos resultados de antiparasitemia (Dumonteil *et al.*, 2012).

El antígeno TSA-1 y Tc24 en conjunto han demostrado niveles de reducción significativa de parasitemia en el huésped, pruebas de inmunoterapia con vacunas en ratones y canes (Limón-Flores *et al.*, 2010). En otras pruebas también se demostró que ambos antígenos podrían controlar parcialmente una infección y reducir significativamente la progresión de la enfermedad (Sánchez-Burgos *et al.*, 2007). La eficacia de la vacuna, en particular, es debido a la fracción amino terminal de la proteína TSA-1, ya que le provee mayor propiedad de inmunogenicidad, mientras que el carboxilo terminal funge como protector de los epítopos del amino terminal del antígeno (de la Cruz *et al.*, 2019).

Se busca que la expresión de la proteína recombinante TSA-1 sea sintetizada a escala suficiente, con bajos costos de producción para abastecer la demanda de las campañas de inmunización necesarias para el control y erradicación de la enfermedad (Dumonteil *et al.*, 2012). Cabe mencionar, que en las regiones más afectadas por la enfermedad del Chagas en Latino América y el Caribe, aproximadamente 100 millones de personas subsistente día a día con menos de \$2 dólares, y 46 millones de personas en Estados Unidos viven bajo condiciones de pobreza similares que no les permite acceder a atención médica y a los tratamientos que actualmente existen para la enfermedad (Rassi *et al.*, 2010).

Las características óptimas que se buscan en la producción de la proteína recombinante TSA-1 son: niveles de óptimos de expresión, obtención de una proteína recombinante soluble y alto grado de pureza e inmunogenicidad (CDC Chagas Disease American

Trypanosomiasis, 2018). Aparte los avances en las técnicas de ingeniería genética y del ADN recombinante, añadiendo y sustrayendo secuencias para obtener las construcciones de vectores para expresar las proteínas recombinantes con las características deseadas, dirigir la ubicación donde queremos que la proteína se compartimente en la célula una vez sintetizada, hasta la adición de cadenas cortas de aminoácidos a la proteína que permita un mejor rendimiento de purificación con técnicas de cromatografía (Quijano-Hernández *et al.*, 2011).

1.9. LAS TRANS-SIALIDASAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*.

Las trans-sialidasas forman parte de una súper familia de proteínas de superficie de *Trypanosoma cruzi*, esta súper familia esta dividida en cuatro grupos: I al IV. El criterio de clasificación de estas familias está basado en su similitud en la secuencia de nucleobases y en sus propiedades funcionales. Estas proteínas similares a las mucinas están distribuidas en la célula, flagelo y bolsa flagelar del parásito *Trypanosoma cruzi*. La principal función del grupo I es la transialidación (Figura 3) durante la fase de tripomastigote en el plasma sanguíneo. La proteína TSA-1 forma parte del grupo II de las trans-sialidasas que esta compuesta por las proteínas ASP-1, ASP-2, TSA-1, Tc85, SA85, GP82 y GP90. El grupo II de proteínas en la fase de amastigote del parásito están involucradas en la opsonización del parásito, que implica el marcaje del patógeno para su ingestión y destrucción por fagocitación, además de jugar un rol en la respuesta inmunogénica del hospedero. TSA-1 como antígeno de superficie en la fase tripomastigote del parásito juega un importante rol como elicitor de células T, generando una fuerte respuesta inmune en ratones y humanos (Pech-Canul *et al.*, 2017). En el Figura 4 se muestra la proteína cristalizada homóloga de TSA-1 de *Trypanosoma rangeli* (Buschiazzo *et al.*, 2002).

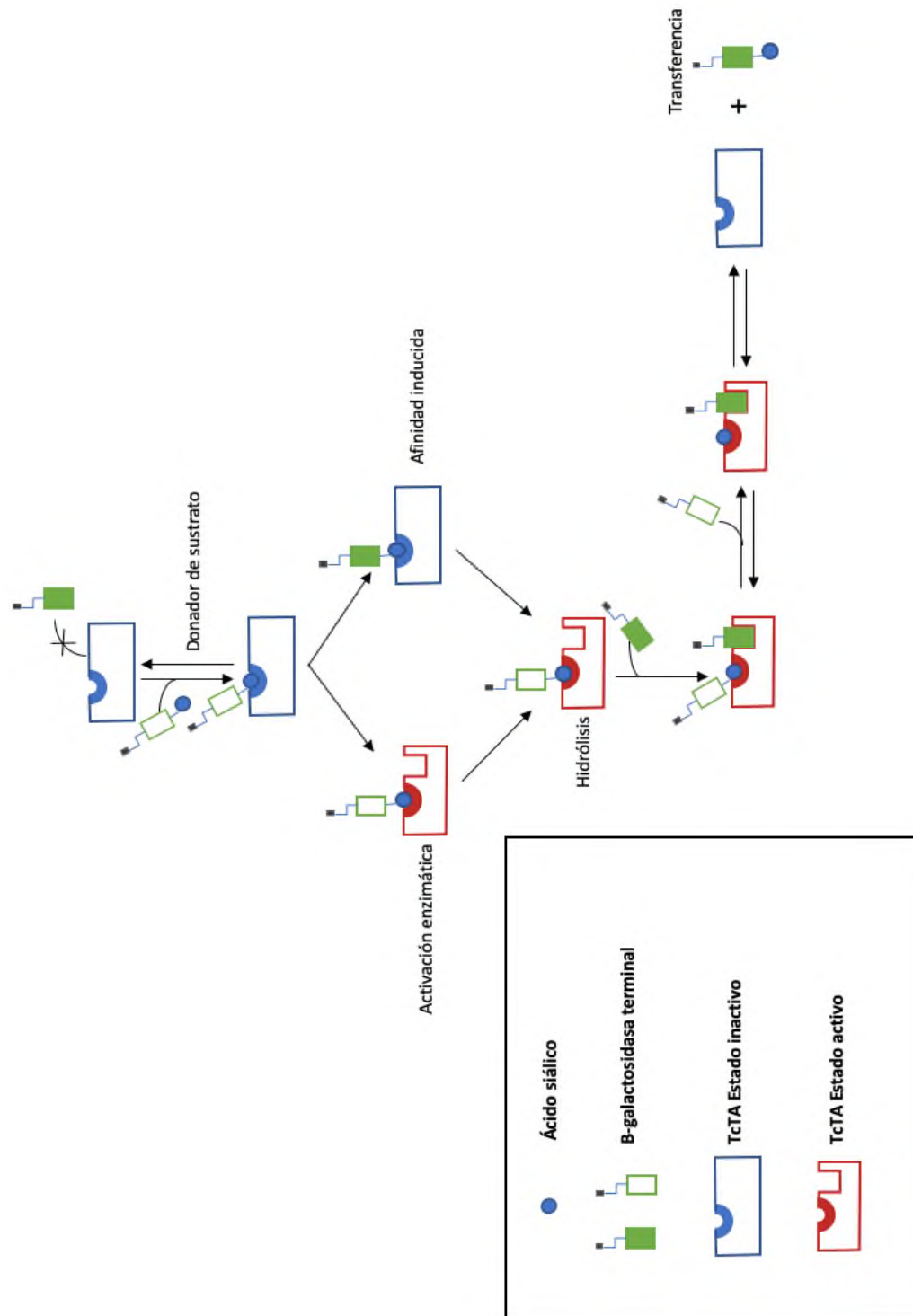


Figura 3: Mecanismo general de Trans-Sialidasa. Esquema de mecanismo propuesto de transglicosilación. (Esquema modificado de original: Buschiazzo *et al.*, 2003).

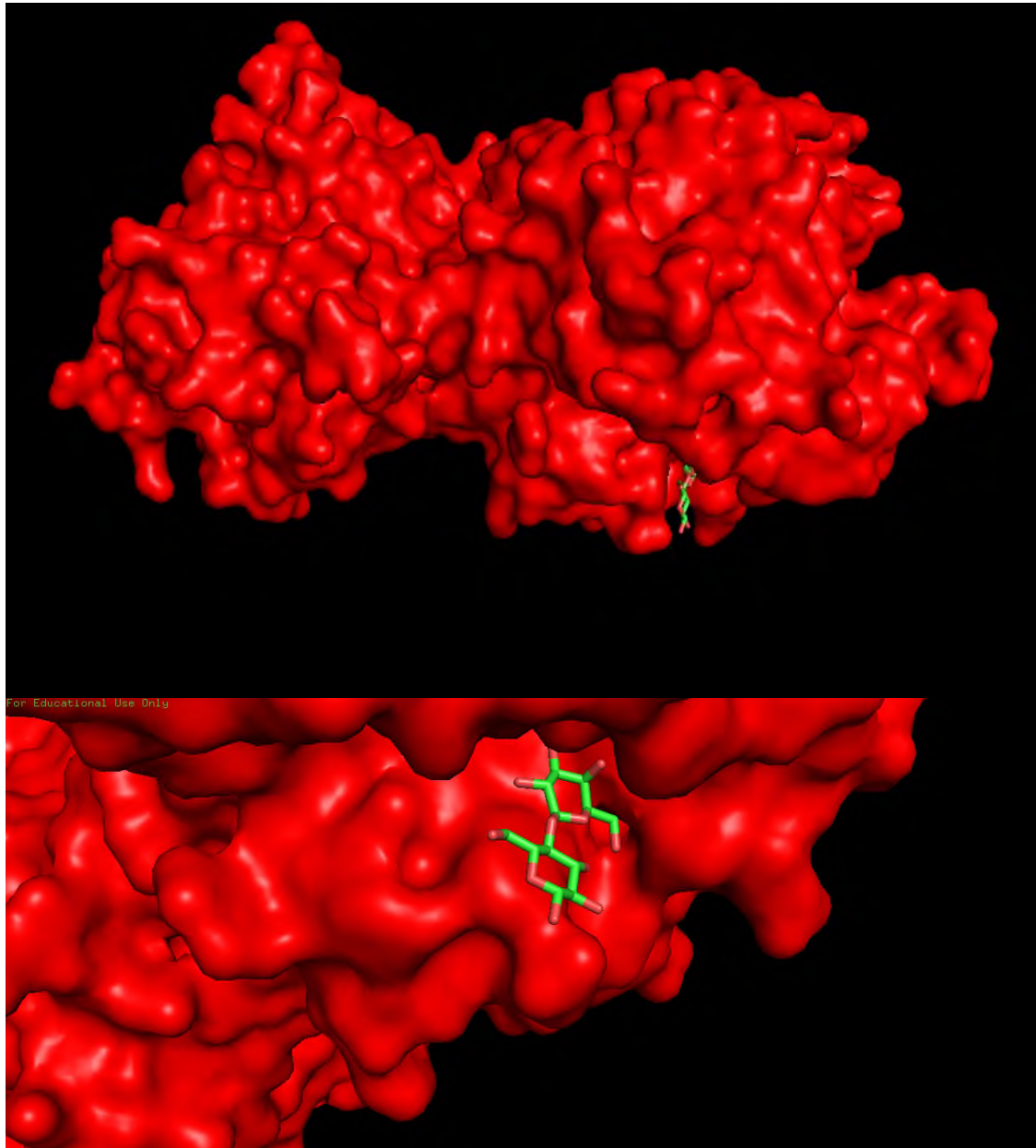


Figura 4: Estructura 3D cristalizada de la proteína homóloga TSA-1 de *Trypanosoma rangeli*.
A) Visualización de la estructura proteica completa. B) Ligando de azúcar en interacción con el sitio activo de β -lactosa.

Tabla 2: Información general de la proteína TSA-1.

DESCRIPCIÓN		INFORMACIÓN	
Gen		TSA-1 (UNIPROT: Q26971 NCBI: AAA30259)	
Nombre proteína		Trypomastigote surface glycoprotein (Glicoproteína de superficie de tripomastigote)	
Organismo origen		<i>Trypanosoma cruzi</i>	
Proceso biológico		Principalmente patogénesis. Conjunto de procesos específicos que general la capacidad de un organismo para inducir un estado anormal y generalmente perjudicial.	

1.10. PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

Se denomina proteína recombinante al producto de aminoácidos en cadena a partir de la recombinación de ADN foráneo. La secuencia de ADN codificante se introduce en un sistema de expresión: bacterias, virus, plantas, células animales, levaduras. Las proteínas recombinantes pueden tener características estructurales y funcionales muy similares a las proteínas naturales y por lo general se producen con alta eficiencia (Guevara-Hernández *et al.*, 2013).

1.11. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *E. COLI*.

La bacteria gram negativa *E. coli* se encuentra entre los sistemas de expresión de proteínas recombinantes más utilizado. Aproximadamente el 39% de las proteínas se producen en este sistema en Estados Unidos y países de Europa, sin importar la aplicación. Debido a los altos rendimientos de expresión, a los bajos costos de producción, a su facilidad de cultivo y rápido crecimiento, así como su genoma simple y muy bien caracterizado, *E. coli* es la referencia para la producción de proteínas recombinantes. Esta bacteria se considera como la opción principal para la producción de antígenos para el desarrollo de pruebas de diagnóstico, el desarrollo de proteínas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades en la industria farmacéutica y la

producción de proteínas como blancos en la investigación (Guevara-Hernández *et al.*, 2013). Las únicas desventajas que presenta este sistema es la formación de cuerpos de inclusión y las casi nulas modificaciones post traduccionales disponibles en el sistema, para lo cual se prefieren sistemas de expresión como levaduras, células de insectos o células de mamíferos para proteínas más complejas (Rosano *et al.*, 2014).

1.12. VECTORES DE CLONACIÓN.

Un vector de clonación se define como una secuencia de ADN circular, transportador de secuencias y auto replicable. Además del gen de interés, su estructura está compuesta por distintos accesorios, que le confieren ventajas de uso (Beas-Zárate *et al.*, 2009). A continuación, se muestra una tabla con los componentes básicos que posee un vector de clonación (Tabla 3).

Tabla 3: Componentes básicos que conforman un vector y su función.

COMPONENTE	FUNCIÓN
Origen de clonación	Le permite al vector ser replicado de manera independiente al genoma de la célula huésped y la obtención de un alto número de copias.
Promotor	Induce la expresión del vector en células procariotas. Comúnmente son usados promotores inducibles derivados del <i>operon lac</i> y el promotor T7 de la RNA polimerasa.
Genes de resistencia a antibióticos	Identificación del vector a la célula huésped.
Marcador de selección	Permiten el escrutinio e identificación de las clonas positivas.
Sitios de restricción	Son sitios únicos para la selección de sitios de clonación múltiple. Estos son identificables por enzimas de restricción compatibles al fragmento de ADN de interés.

Etiquetas

Son secuencias que codifican aminoácidos adheridos a la proteína de interés facilitando la recuperación y purificación de esta.

1.13. ETIQUETA DE DOMINIO DE UNIÓN A MALTOSA (MBP).

Es una etiqueta común de expresión que pesa aproximadamente 42 kDa, codificada por el gen *malE*, es responsable de la captación, descomposición y transporte de la malto dextrina (New England BioLabs, 2019). Esta etiqueta permite obtener en un solo paso de purificación a la proteína de interés usando una resina de amilosa. Adicionalmente, en *E. coli* se sabe que mejora significativamente la solubilidad de muchas proteínas, protegiendo y estabilizando las proteínas para evitar su degradación proteolítica después de su síntesis. Las proteínas fusionadas con esta etiqueta pueden dirigirse a diferentes compartimentos celulares cambiando o manipulando la secuencia de esta etiqueta (Pryor *et al.*, 1997).

Algunas ventajas de la fusión de proteínas a etiquetas de dominio a unión a maltosa son la purificación por medio de técnicas cromatografía por afinidad de bajo costo y fáciles de preparar. A diferencia de las resinas a afinidad de anticuerpos, la purificación completa tiene lugar en condiciones fisiológicas y no se produce la desnaturalización de la proteína de interés después de su elución. Por último, esta no contiene residuos de cisteína que pudieran interferir con la formación de enlaces disulfuro de la péptido diana (di Guana *et al.*, 1988).

2. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas, característica de América Latina, se encuentra entre una de las diez enfermedades tropicales más desatendidas en el mundo causando miles de muertes anualmente. En México, las poblaciones de los estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Yucatán son los más afectados por esta enfermedad. Los tratamientos disponibles son de alto costo, baja eficacia y con efectos secundarios graves para el paciente. Las soluciones para tratar al paciente cuando ya está infectado solo son viables cuando este se encuentra en etapas tempranas de la enfermedad, puesto que la enfermedad del Chagas tiende a ser similar en la primera fase sintomática de otras enfermedades tropicales que se encuentran en América Latina y el Caribe, y que posteriormente el paciente se presentará asintomático por largos periodos portando la enfermedad hasta que pase a una fase crónica con alteraciones cardiacas, neurológicas y digestivas, donde no será posible tratar al paciente, dando como resultado su deceso inminente. Sin embargo, gracias al desarrollo de las vacunas terapéuticas, se presenta una solución para poder tratar enfermedades desde etapas de infecciones tempranas hasta crónicas, pues ayudan a reforzar las defensas del paciente aún cuando las respuestas inmunitarias específicas son incapaces de hacerlo durante el curso natural de la enfermedad y cuando la terapia ya no es capaz de erradicar al parásito del hospedero. La tecnología de proteínas de origen recombinante permitirá el desarrollo de antígenos que sean componentes viables para el desarrollo de una vacuna terapéutica. TSA-1, la proteína de superficie de tripomastigote, ha demostrado ser un candidato, que tiene como características ser un fuerte elicitador de linfocitos T CD+8 para la memoria inmunitaria y para la producción de IFN- γ para la activación del sistema inmunitario, generando bajo grado de parasitemia y reducción inflamatoria de tejidos con postinfección. Por ello nace la necesidad de mejorar la expresión y purificación del antígeno rTSA-1, para obtener una expresión de alto rendimiento y bajo costo que permita el desarrollo de una vacuna terapéutica para el control y erradicación de la enfermedad del Chagas. Para esto deberá implementarse una estrategia de ingeniería genética para la subclonación del antígeno rTSA-1 en el vector de expresión pCri-1b que permita la sobreexpresión de proteínas, con la fusión de la etiqueta de dominio de unión a maltosa que ayuda a mejorar la solubilidad, protección y estabilización de la degradación proteolítica después del proceso de síntesis proteica.

3. HIPÓTESIS

La fusión del antígeno rTSA-1 al dominio de unión a maltosa facilitará su expresión en forma soluble en *E. coli*.

4. OBJETIVO GENERAL

Subclonar el gen rTSA-1 en el vector pCri-1b y expresar el antígeno recombinante rTSA-1 fusionado al dominio de unión a maltosa en *E. coli*.

5. Objetivos específicos

1. Clonar la secuencia que codifica para el fragmento N-terminal del antígeno TSA-1 de *Trypanosoma cruzi* fusionado al dominio de unión a maltosa.
2. Expresar el fragmento N-terminal del antígeno rTSA-1 de *Trypanosoma cruzi* en *E. coli*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

En el software ProtParam Tool de la página en línea de herramientas bioinformáticas ExPASy se realizó un análisis complementario con el código FASTA de aminoácidos de la proteína nativa TSA-1 (UniProt, Q26971). Este análisis se realizó con la finalidad de investigar las características moleculares de la proteína como su peso molecular, punto isoeléctrico, tiempo de vida media, composición de aminoácidos y otras características para el proceso de la producción de su forma recombinante.

6.2. VECTORES DE CLONACIÓN pET-41.

El vector utilizado anteriormente para la expresión de la proteína rTSA-1 fue pET-41a, parte de la serie de vectores pET-41, que están diseñados para técnicas de clonación y altos niveles expresión de secuencias peptídicas. Este vector comercial esta fusionado con la etiqueta GST en el N terminal (Addgene Vector Database pET-41a(+), 2019). EL vector pET41-a TSA-1 que expresa la proteína recombinante TSA-1 (rTSA-1), esta modificada en la secuencia y se no posee la etiqueta de fusión GST, además se le añadió una etiqueta de 6 histidinas en el carboxilo terminal (de la Cruz *et al.*, 2019). Las etiquetas de histidinas en la proteína permiten la purificación de la proteína mediante técnicas de purificación cromatográficas por afinidad de níquel. En la Figura 5 se presenta un mapa simplificado del vector pET-41a, que fungirá como vector parental en la subclonación del gen rTSA-1.

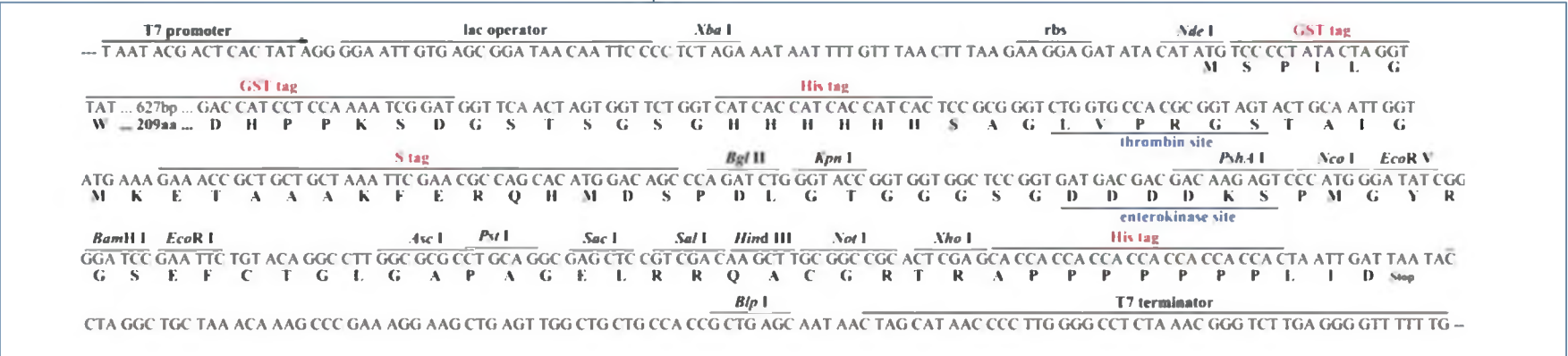
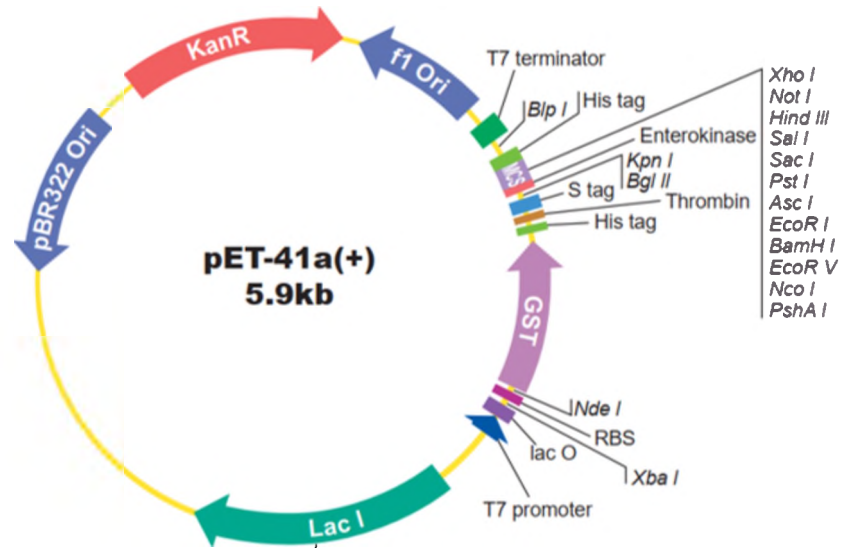


Figura 5. Mapa del vector pET-41a (Genscript pET-41a, 2019).

6.3. VECTORES DE CLONACIÓN pCri.

Los vectores de clonación pCri están diseñados para la sobreexpresión de proteínas recombinantes del citoplasma y periplasma extracelular de *E. coli*. El vector está fusionado con las etiquetas de histidinas en el extremo N y C terminal, así como con una etiqueta MBP. Las múltiples etiquetas de fusión facilitan la expresión, solubilidad y detección de las proteínas heterólogas expresadas por el vector. Además, posee la secuencia del gen que expresa la proteína fluorescente GFP unido a la etiqueta de solubilización MBP. El vector que se utilizó en este trabajo para la subclonación y expresión del gen rTSA-1, fue el pCri-1b. Éste vector posee una longitud total 7200 pb y se expresa en cepas bacterianas resistentes al antibiótico kanamicina (Goulas *et al.*,2014). En la Figura 6 se muestra un mapa simplificado del vector pCri-1b que funge como vector destino en la subclonación del gen rTSA-1.

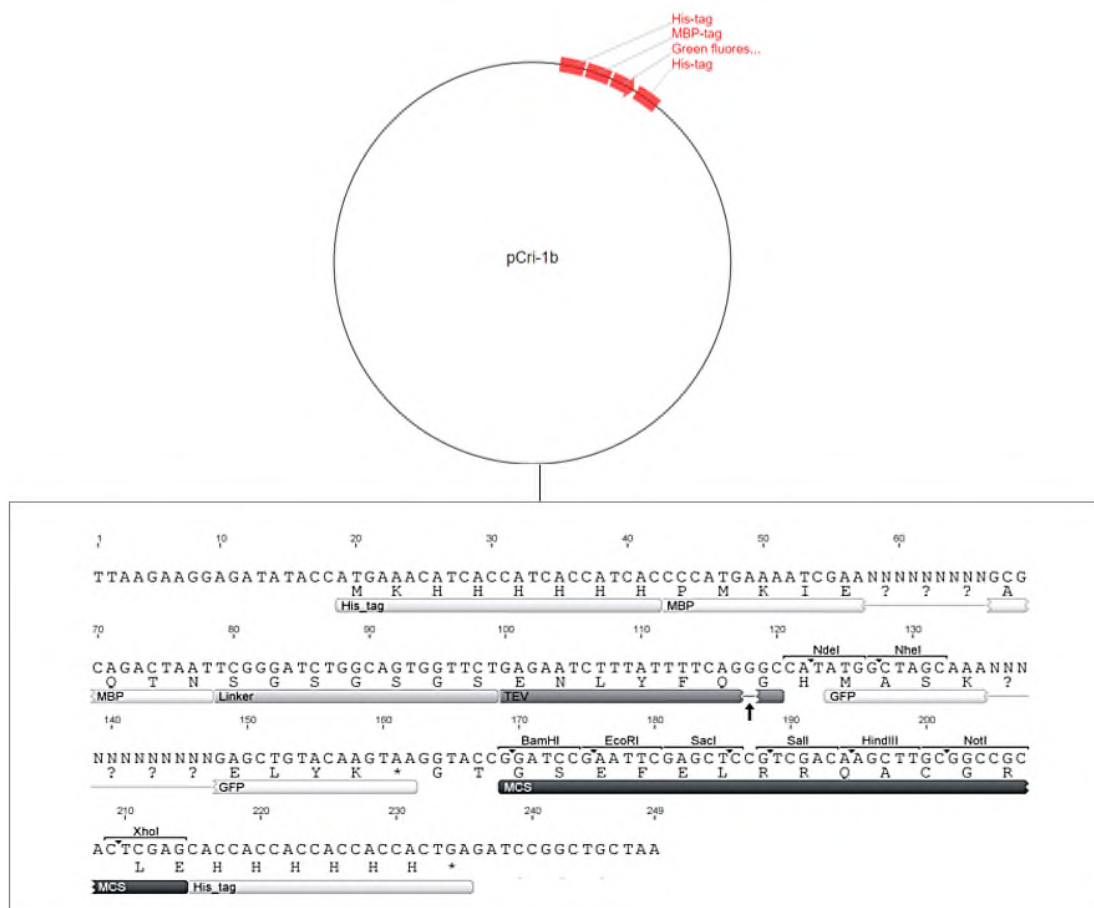


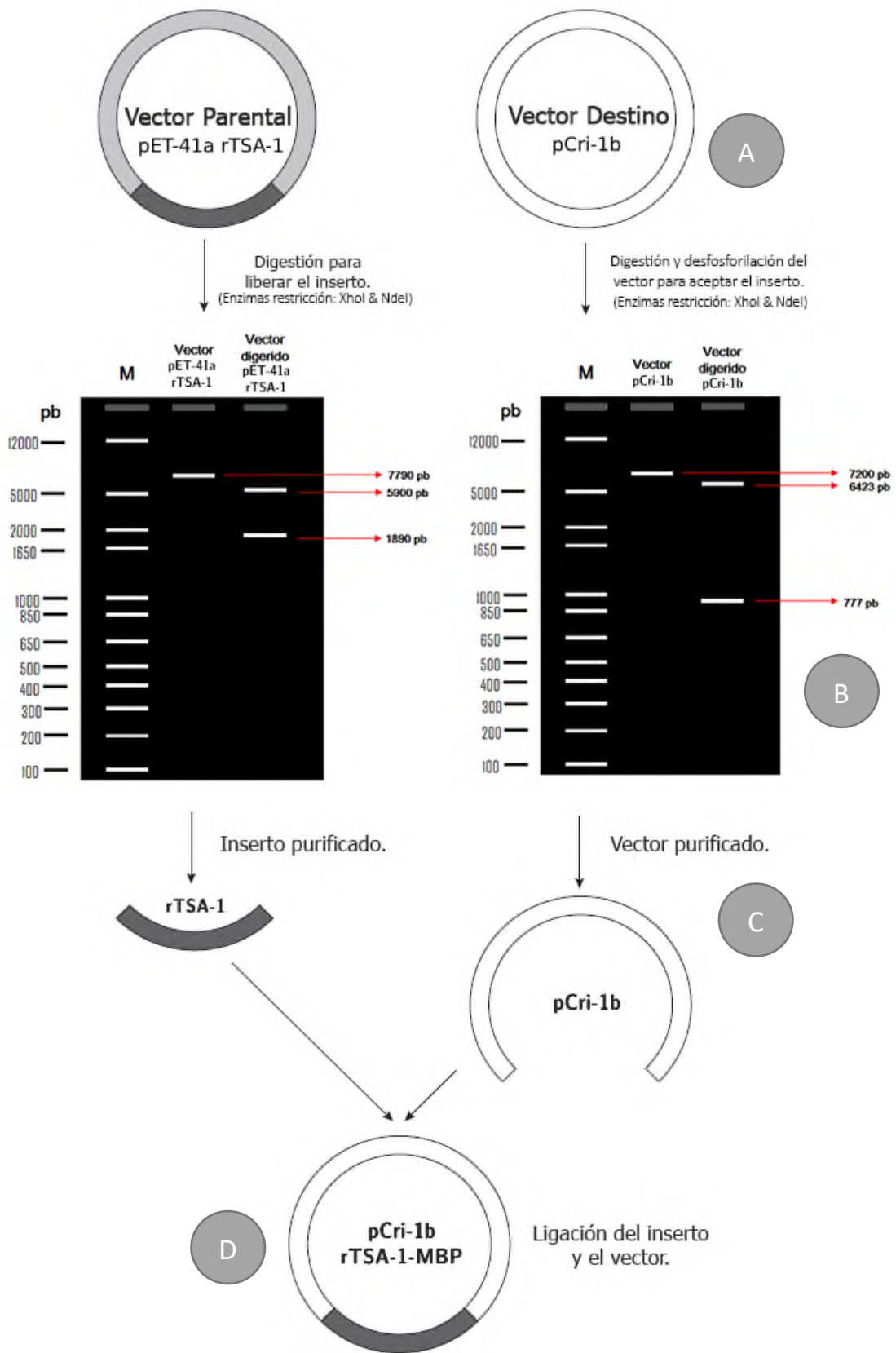
Figura 6: Mapa del vector pCri-1b (Addgene pCri, 2014).

6.4. SUBCLONACIÓN DE LA SECUENCIA rTSA-1.

Se transformaron células competentes *E. coli* DH5 α (Anexo 2) con ADN plásmidico pET-41a rTSA-1 y pCri-1b (Figura 7, A). Se extrajo el ADN plásmidico de las células (Anexo 3), se purificó (Anexo 5) y cuantificó.

Posteriormente mediante una reacción de digestión enzimática en termociclador (Anexo 6), se cortó con las enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI* de los vectores pCri-1b y pET-41-a rTSA-1 (Figura 7, B). El vector parental pET-41a rTSA-1-MBP con una longitud de 7790 pb se cortó con las enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI* para liberar el inserto rTSA-1 con una longitud de 1890 pb (Figura 7, B). El vector destino pCri-1b con una longitud de 7200 pb se cortó con las enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI* (Figura 7, B) para obtener el vector abierto para la subclonación del gen rTSA-1. El gen rTSA-1 esta optimizado para la plataforma *E. coli*.

Los fragmentos rTSA-1 y pCri-1b se purificarón (Anexo 5) (Figura 7, C) mediante una reacción de ligación con DNA ligasa (Anexo 8) (Figura 7, D), posteriormente se transformaron células competentes *E. coli* DH5 α (Anexo 2) con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP (Figura 7, E), se extrajo y purifico el ADN de las clonas positivas para realizar un ensayo de restricción enzimática con las enzimas *XhoI* y *NdeI*, y confirmar la liberación del inserto rTSA-1 con un peso de 1890 pb (Figura 7, F).



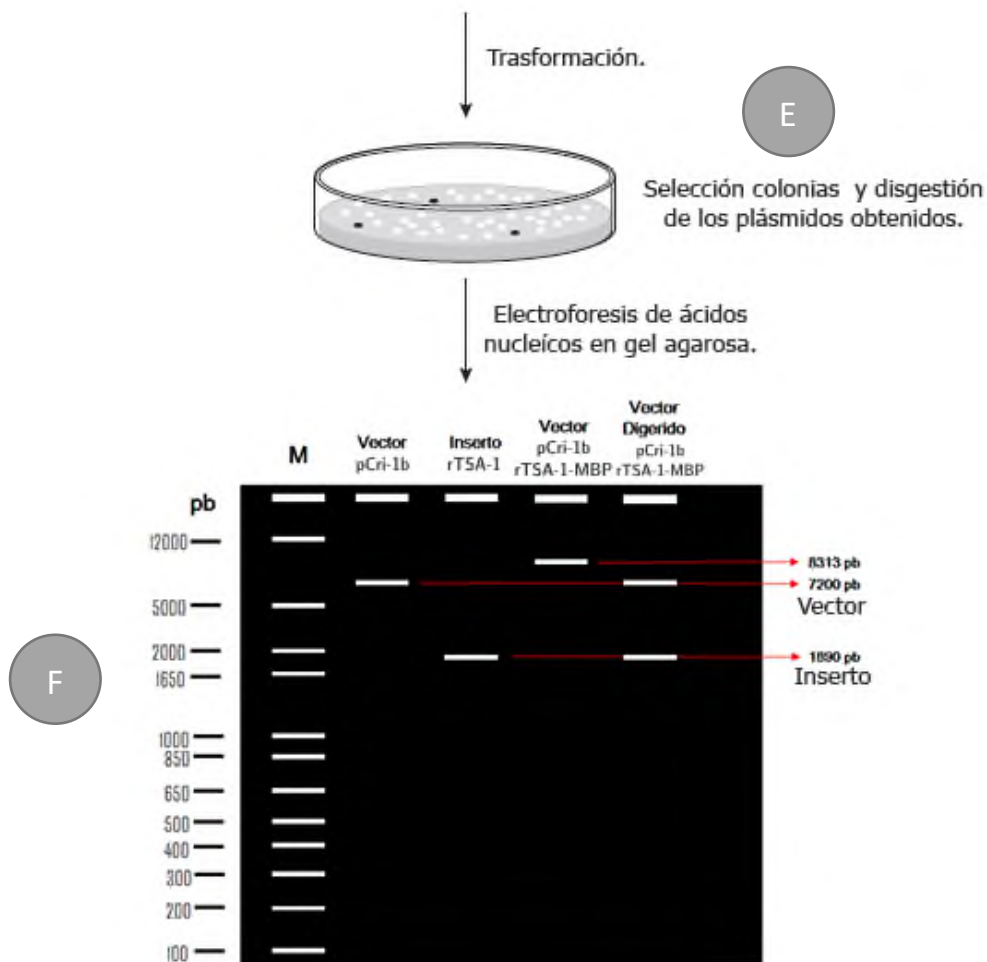


Figura 7: Subclonación del rTSA-1 al vector pCri-1b. Subclonación del inserto rTSA-1 desde el vector parental pET41-a al vector destino pCri-1b, desde los pasos de la digestión enzimática de los vectores hasta la transformación de células competentes. Modificado de original de "Promega Subcloning Notebook" (Promega Corporation, 2019).

6.5. INDUCCIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA rTSA-1-MBP.

En los cultivos celulares se realizaron ensayos de inducción con IPTG, que actuó como un inductor para iniciar los factores de transcripción del operon *lac* permitiendo la expresión del gen de rTSA-1 y la síntesis de la proteína rTSA-1-MBP (Daber *et al.*, 2007). Posteriormente con el reactivo BugBuster (Novagen, 70584) mediante una lisis alcalina se extrajeron las proteínas de la fracción soluble presentes en el periplasma y citoplasma de las células transformadas con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP. Los extractos se corrieron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Anexo 1).

6.6. CEPAS *E. COLI* BL21 (DE3), C43 (DE3) Y C41 (DE3).

Las células competentes BL21 (DE3), C43 (DE3) y C41 (DE3) son utilizadas para la expresión de proteína heterologas, por ser altamente efectivas para la expresión de proteínas “tóxicas” para un abanico de sistemas de expresión, incluyendo bacterias eucariotas, levaduras, virus y animales (Dumon-Seignover *et al.*, 2004). Las células competentes BL21 (DE3) resguardadas en crio-génesis a -80° C se utilizaron en los ensayos de expresión e inducción de la proteína recombinante rTSA-1-MBP. Las células competentes C421 (DE3) y C43 (DE3) resguardadas en crio-génesis a -80° C se utilizaron en los ensayos específicos de expresión de la proteína recombinante TSA-1.

6.7. OBTENCIÓN DE VECTORES PURIFICADOS pCri-1b Y pET-41a rTSA-1.

Se obtuvieron las unidades de ADN plasmídico necesarias para generar los fragmentos del inserto rTSA-1 y el vector pCri-1b mediante la transformación de células competentes de *E. coli* DH5α (Anexo 2), con los vectores pCri-1b y pET-41a rTSA-1. La extracción de los vectores en las células transformadas se llevó a cabo con un kit de extracción comercial “ADN Fast-n-Easy Mini-Prep Kit” de Jena Bioscience (Anexo 3). Posteriormente se corrió el DNA extraído de las células en una electroforesis de agarosa al 1% (Anexo 4) y purificó con el kit comercial “Agarose Gel Extraction” de Jena Bioscience (Anexo 5).

6.8. OBTENCIÓN DE INSERTO rTSA-1 Y EL VECTOR pCri-1b PURIFICADOS.

Se digirieron ambos vectores con las enzimas restricción *XhoI* y *NdeI* (Anexo 6) en un termociclador (Thermo Fisher Scientific). Se llevó a cabo una desfosforilación con la enzima fosfatasa alcalina (Anexo 7) para evitar su plegamiento sobre sí mismo en los extremos terminales 3' y 5'. Posteriormente, se corrieron los productos de PCR en una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se purificaron los fragmentos extraídos del gel con el kit de purificación “Agarose Gel Extraction” de Jena Bioscience (Anexo 5). Se realizaron los cálculos para realizar la ligación del inserto y vector (Anexo 8), estos cálculos toman en cuenta la cantidad necesaria vector e inserto a utilizar para que sea proporcional en la reacción, en este caso la relación en nucleobases del inserto TSA-1 y vector pCri-1b fue de 3:1. Además se realizaron cálculos para determinar la cantidad de

enzima ligasa necesaria para llevar a cabo la reacción en U por ng de ADN presentes en el volumen de la reacción.

6.9. LIGACIÓN VECTOR pCri-1b CON EL INSERTO rTSA-1.

La unión de los fragmentos purificados de vector e inserto se realizó mediante una reacción de ligación con la enzima ligasa T4 (Anexo 8) a 37° C e inactivación enzimática a 65° C por 20 minutos en un termociclador de Bio-Rad. Se confirmó la unión de ambos fragmentos de ADN mediante un gel de electroforesis de agarosa al 1%.

6.10. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE COMPETENTES CON EL VECTOR pCri-1b rTSA-1-MBP.

Se procedió a realizar la transformación de las células competentes (Anexo 2) con la reacción de ligación en los distintos genotipos de plataforma de expresión *E. coli*: BL21 (DE3), C43 (DE3) y C41 (DE3). Las cepas bacterianas transformadas con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP obtenidas se preservarán en crio viales de larga duración a bajas temperaturas de -80° C en soluciones de glicerol (Anexo 9) para su posterior uso.

6.11. INDUCCIÓN, EXPRESIÓN Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

a. EN CONDICIONES BÁSICAS.

Se realizaron lecturas de densidad del cultivo en crecimiento a 37° C en un espectrofotómetro (SmartSpec Plus) hasta alcanzar los niveles de densidad de crecimiento a una longitud de onda de 600 nm con diluciones 1/10 (cultivo celular/agua estéril). Se indujo la expresión génica (Anexo 11) con el análogo no hidrolizable de la alolactosa, IPTG (Affymetrix, 17886). La extracción de proteínas se realizó con una preparación del ensayo con el reactivo BugBuster (Anexo 12). Se analizaron las fracciones extraídas mediante electroforesis de proteínas desnaturizante SDS-PAGE al 10% (Anexo 1).

b. EN CONDICIONES CONTROLADAS DE TEMPERATURA.

Se realizaron lecturas de densidad del cultivo en crecimiento a 25° C y 37° C en un espectrofotómetro (SmartSpec Plus) hasta alcanzar los niveles adecuados de

crecimiento a una longitud de onda de 600 nm con diluciones 1/10 (cultivo celular/agua estéril). Se indujo la expresión génica (Anexo 11) con el análogo no hidrolizable de la alolactosa, IPTG (Affymetrix, 17886). La extracción de proteínas se realizó con una preparación del ensayo con el reactivo BugBuster (Anexo 12). Se analizaron las fracciones extraídas mediante electroforesis de proteínas desnaturizante SDS-PAGE al 10% (Anexo 1).

c. CINÉTICA POR HORAS.

Se realizaron lecturas de densidad del cultivo en crecimiento a 37° C en un espectrofotómetro (SmartSpec Plus) hasta alcanzar los niveles adecuados de crecimiento a una longitud de onda de 600 nm con diluciones 1/10 (cultivo celular/agua estéril). Se indujo la expresión génica (Anexo 11) con el análogo no hidrolizable de la alolactosa, IPTG (Affymetrix, 17886), se tomaron cosecharon muestras del cultivo a las 2, 4 y 6 horas posterior de la inducción. La extracción de proteínas se realizó lisando las células con buffer de Laemmli y centrifugando a 200 RPM a 25° C por 5 minutos. Se analizaron las fracciones extraídas mediante electroforesis de proteínas desnaturizante SDS-PAGE al 10% (Anexo 1).

d. EN CÉLULAS CULTIVADAS EN MEDIO LB ENRIQUECIDO CON GLUCOSA.

Se inocularon las células competentes en medio LB enriquecido con glucosa al 0.5%. Se realizaron lecturas de densidad del cultivo en crecimiento 37° C en un espectrofotómetro (SmartSpec Plus) hasta alcanzar los niveles adecuados de crecimiento a una longitud de onda de 600 nm con diluciones 1/10 (cultivo celular/agua estéril). Se indujo la expresión génica (Anexo 11) con el análogo no hidrolizable de la alolactosa, IPTG (Affymetrix, 17886). La extracción de proteínas se realizó con el reactivo BugBuster (Anexo 12). Se analizaron las fracciones extraídas mediante electroforesis de proteínas desnaturizante SDS-PAGE al 10% (Anexo 1).

e. EN GENOTIPOS *E. COLI* C41 (DE3) Y C43 (DE3).

Se realizaron lecturas de la densidad en un espectrofotómetro (SmartSpec Plus) del crecimiento de los cultivos celulares C41 (DE3) y C43 (DE3), incubados a 37° C hasta alcanzar los niveles adecuados de crecimiento en lecturas a una longitud de onda de 600

nm con diluciones 1/10 (cultivo celular/agua estéril). Se indujo la expresión génica (Anexo 11) con el análogo no hidrolizable de la alolactosa, IPTG (Affymetrix, 17886). La extracción de proteínas se realizó lisando las células con buffer de Laemmli y centrifugando a 200 RPM a 25° C por 5 minutos. Se analizaron las fracciones extraídas mediante electroforesis de proteínas desnaturizante SDS-PAGE al 10% (Anexo 1).

f. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN COLUMNA DE NI-SEFAROSA.

Se resuspendieron las células inducidas con el análogo no hidrolizable de la alolactosa, IPTG (Affymetrix, 17886), en una proporción 1/40 del volumen original de cultivo cosechado. Posteriormente se lisaron las células mediante ultrasonicación en frío por periodos de 30 segundos y 30 segundos de reposo por 8 ciclos. Se empacó la resina Ni-Sefarosa (GE Healthcare, 17526801) en un tubo eppendorf para obtener un volumen de empacado de 100 uL dentro del tubo. Se lavó la columna con un volumen de 100 uL de agua estéril 5 veces, se centrifugó por 3 minutos a 6,000 RPM a una temperatura de 4° C. Se pasó el extracto de proteínas obtenidos por la lisis alcalina con BugBuster por las columnas empacadas dejando interaccionar por 1 hora. Se centrifugó y tomaron muestras del sobrenadante obtenido. Se lavaron las columnas con un volumen de 100 uL de Buffer 50 Mm Imidazol, dejando interaccionar por 3 minutos a 6,000 RPM a 4° C, este paso se repitió 5 veces. Se eluyó finalmente la columna con Buffer de 500 Mm de Imidazol, eluyendo las proteínas unidas a la resina.

6.12. WESTERN BLOT.

Se utilizó la técnica Western blotting para la detección indirecta de la proteína rTSA-1-MBP y las etiquetas de Histidinas en el –N y –C terminal de la proteína inmovilizada en membranas de nitrocelulosa (Anexo 13). Las muestras de proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa, seguido del bloqueo y la adición de anticuerpos primarios: anti-tsa y anti-histidinas. Después de subsecuentes lavados a la membrana para eliminar residuos de anticuerpos y solución PBS-Tween, se incubó la membrana con los anticuerpos secundarios tsa que se anclaron al anticuerpo primario anti-tsa. Se siguió un paso de revelado con solución HRP (Bio-Rad, 170-6534) y peróxido (Anexo 14) para visualizar la presencia de la proteína rTSA-1-MBP. Se realizó esta técnica con anticuerpos policlonales de conejo contra proteínas

recombinantes producidos en DBB-CINVESTAV en el Laboratorio 11 de DIPM. Se implementó, además, una técnica de detección por quimioluminiscencia para bajas concentraciones en rango de femto gramos con el reactivo comercial SuperSignal West (Bio-Rad, 34580). Se añadió directamente a la membrana de nitrocelulosa hasta recubrirla y posteriormente se visualizó en el fotodocumentador (Anexo 15).

6.13. AMPLIFICACIÓN DEL GEN TSA.

Se realizó una amplificación mediante PCR para confirmar la presencia del gen que expresa la proteína rTSA-1-MBP en el vector pCri-1b rTSA-1-MBP (Anexo 16), mediante la amplificación del fragmento de 1000 pb del gen que codifica el dominio amino de rTSA-1. Se usaron los oligos anexados (Tabla 4) y como templados el vector pCri-1b rTSA-1-MBP obtenido de la extracción y purificación de la primera transformación positiva de células *E. coli* DH5 α . Se corrieron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio (Anexo 4).

Tabla 4: Oligos directo y reverso para la amplificación del dominio amino del gen que codifica la proteína rTSA-1.

OLIGO	SECUENCIA
TSA-1 directo	CGCCATATGGAACGTAACAGTGGCGATCTGC
TSA-1 reverso	CCGCTCGAGCAGACGAGCCAGACTC

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

Los resultados condensados en la Tabla 5 del análisis en el software bioinformático ProtParam indican que la proteína TSA-1 está compuesta por 835 aminoácidos, con un peso molecular promedio de 90.437 kDa y un punto isoeléctrico teórico de 4.77, así como un periodo de vida media teórica estimada mayor a 10 horas en *E. coli*. Esta proteína está clasificada como estable, con índice de estabilidad II. Se muestra el código FASTA de la proteína TSA-1 de la secuencia de aminoácidos en la Tabla 5. La información fue extraída de la base de datos de UniProt (Q26971).

Tabla 5: Secuencia de aminoácidos de la proteína TSA-1. Composición de aminoácidos de la base de datos UniProt. Subrayado en amarillo la secuencia de aminoácidos que compone el dominio amino de la proteína, la zona que amplifican los oligos TSA-1 directo y TSA-1 reverso (TSA-1 Trypomastigote Surface Glycoprotein Trypanosoma Cruzi Gene & Protein, 2019).

<p>>tr Q26971 Q26971_TRYCR <u>Trypomastigote surface glycoprotein</u> OS=Trypanosoma cruzi OX=5693 GN=TSA-1 PE=2 SV=1</p>
<p>MSRRHFYSAVLLLLLVVMVCGGSGAAHAVERNSGDLQLPQEIAMLVFNKTQVVPKSGGEG KVKDIFASPALVRAGGVMIAFVEGRTKNKLFPEVIDLSSSDIVAGYIKAPETWQSLVAEV TKEYWQAHTVLESANNSNHRVGVARLPTGITRGNKVFLVGSYEERREIDDIWKAEAWN IKVIEGEATQSTEVEQPTQPINWSEPKPLFQTDSPNNKGDLEFLGGGGSGIVMGNGTLVF PLTAKDESINKVFLITYSTDDGQKWEIPGGVSSVACRSPRVTEWEEGTLMLMVTYCEDGRK VFESRDMGKTWTEAFGTLPGVWLKSGPELPEVSLRVDALITATIEGRKVMLYTQKVRHFL EVDEPNALHLWVTDNNRTFHLGPFSVDCAENKTFANTLLYSDDALHLLQAKGDHSTAVS LARLTELNTINSVLSTWVQLDASFESSIPTAGLVGFLSNTTSSGDTWIDGYRCMNATV TKAAKVENGFKFTGPGSRATWPVNSRWDIKQYGFVDYNFTIVAMATIHQVPSESTPLLGA SLRGNKRTKLIGLSYGAGGKWETVYDGTQTVQGGTWEPGREYQVALMLQDGNKGFVYVDG VLVGNPAMLPTPEERWTEFSHFYFGGDEGDSGSDATLTDVFLYNRPLSVGELKMIKEVED KKEKSGDSEDKKESGDSEDKKESGDSEDKKESGDSEDKKESGDSEDKKESGDSEDKKESG GDGAFTPAVSNATHTAAEETVNQASGTFSTIDSTEGDVSSDENGETTGGADGQEEDIQ PQDGEANAAALGLALKSSLGTSQWDGVSAGTMRESRVLLPSLFLLLGLWGFAAL</p>

Tabla 6: Resultados de análisis ExPASy ProtParam. Composición de aminoácidos, número de aminoácidos, peso molecular, punto isoeléctrico teórico, vida media estimada en distintas células, índice de inestabilidad, índice alifático y promedio de hidropatía (Gasteiger *et al.*, 2005).

Composición de aminoácidos:

Ala	(A)	57	6.8%
Arg	(R)	29	3.5%
Asn	(N)	33	4.0%
Asp	(D)	53	6.3%
Cys	(C)	5	0.6%
Gln	(Q)	23	2.8%
Glu	(E)	69	8.3%
Gly	(G)	87	10.4%
His	(H)	12	1.4%
Ile	(I)	27	3.2%
Leu	(L)	71	8.5%
Lys	(K)	51	6.1%
Met	(M)	14	1.7%
Phe	(F)	30	3.6%
Pro	(P)	33	4.0%
Ser	(S)	76	9.1%
Thr	(T)	64	7.7%
Trp	(W)	19	2.3%
Tyr	(Y)	18	2.2%
Val	(V)	64	7.7%

Número de aminoácidos: 835

Peso molecular: 90436 Da

Punto isoeléctrico: 4.77

**La vida media estimada es: 30 horas (células animales, in vitro)
>20 horas (levaduras, in vivo)
>10 horas (*Escherichia coli*, in vivo)**

Índice de inestabilidad:

**El índice de inestabilidad (II) es de 39.21
Esto lo clasifica como una proteína estable.**

Índice alifático: 74.83

Promedio de hidropatía: - 0.406

7.2. SUBCLONACIÓN DEL INSERTO rTSA-1 AL VECTOR pCri-1b.

Para la ligación del inserto rTSA-1 al vector destino pCri-1b, se cortaron con las enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI* (Anexo 6) a los vectores pCri-1b y pET41-a rTSA-1, extraídos (Anexo 3) y purificados (Anexo 5) de células *E. coli* DH5 α . Como se observa en la Figura 8, se visualizaron los fragmentos de peso esperado correcto para el inserto rTSA-1 de 1890 pb y para el vector abierto pCri-1b de 6423 pb, por lo que se confirmó la obtención del corte correcto en los sitios de restricción del vector parental pET41-a rTSA-1 y el vector destino pCri-1b.

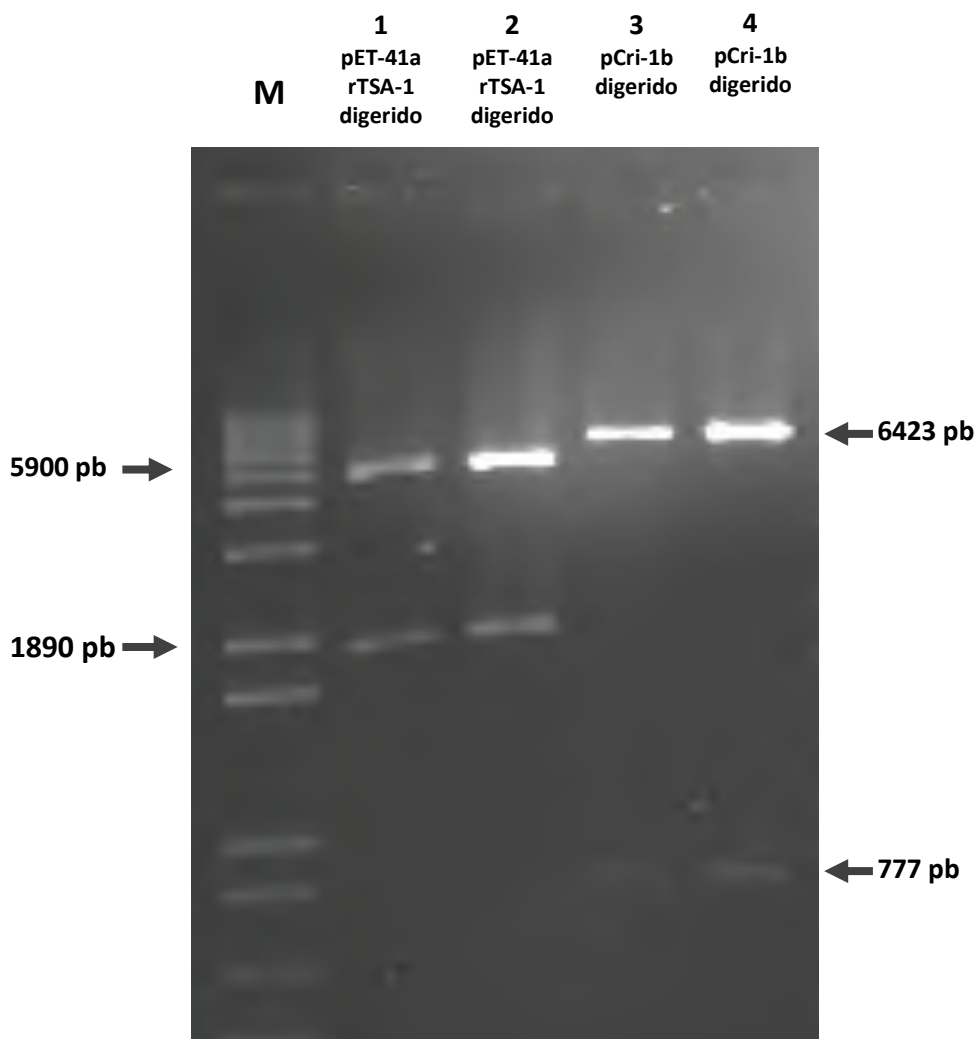


Figura 8: Visualización de fragmentos de restricción del vector pET-41a y pCri-1b con enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI*. Carril 1, 2 doble digestión del vector parental pET-41a rTSA-1. Carril 3, 4 doble digestión del vector destino pCri-1b. Electroforesis de ADN en agarosa al 1.0% teñido con BrEt.

Posteriormente, con el producto de la ligación del inserto rTSA-1 y el vector pCri-1b se transformaron células *E. coli* DH5 α (Anexo 2), en la Figura 9 se muestra la placa con las clonas positivas obtenidas (Figura 9, A) y el control de religación (Figura 9, B). El control de religación confirmó la eficacia de la reacción de desfosforilación, ya que permitió que se minimizará la obtención de vectores auto ligados.

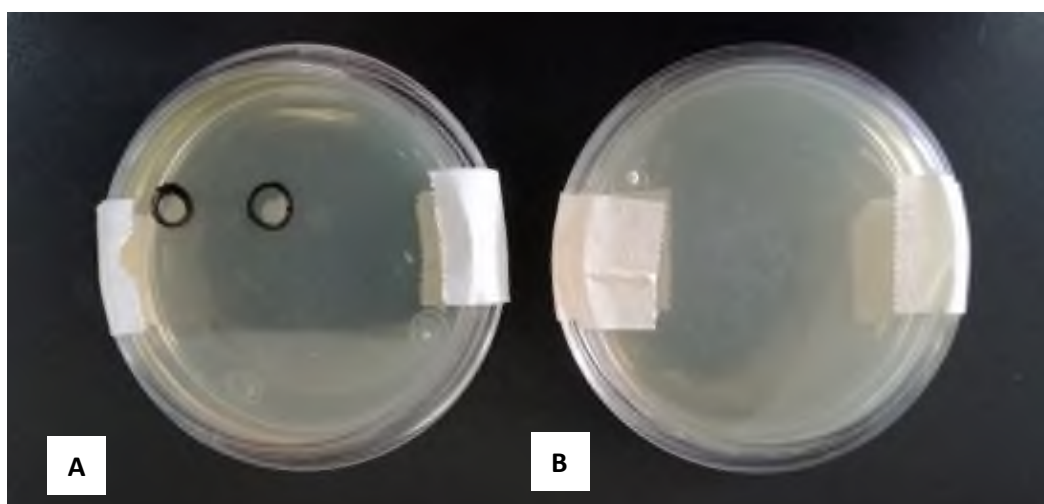


Figura 9: Clonas transformadas con reacción de ligación. A. Colonias de células *E. coli* DH5 α obtenidas de la transformación con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP. B. Células control *E. coli* DH5 α de religación. Medio de cultivo LB con 100 μ L de kanamicina, incubadas por 16 horas a 37° C.

Para confirmar la presencia del nuevo vector pCri-1b rTSA-1-MBP en las dos clonas obtenidas (Figura 9, A), se llevó a cabo una extracción y purificación de ADN. El ADN plásmidico obtenido se procesó en una reacción de digestión con las enzimas de restricción *Xho*I y *Nde*I. El análisis de restricción enzimática (Figura 10) reveló la presencia del inserto rTSA-1-MBP del peso esperado de 1890 pb, liberado por el vector pCri-1b rTSA-1-MBP de 6423 pb.

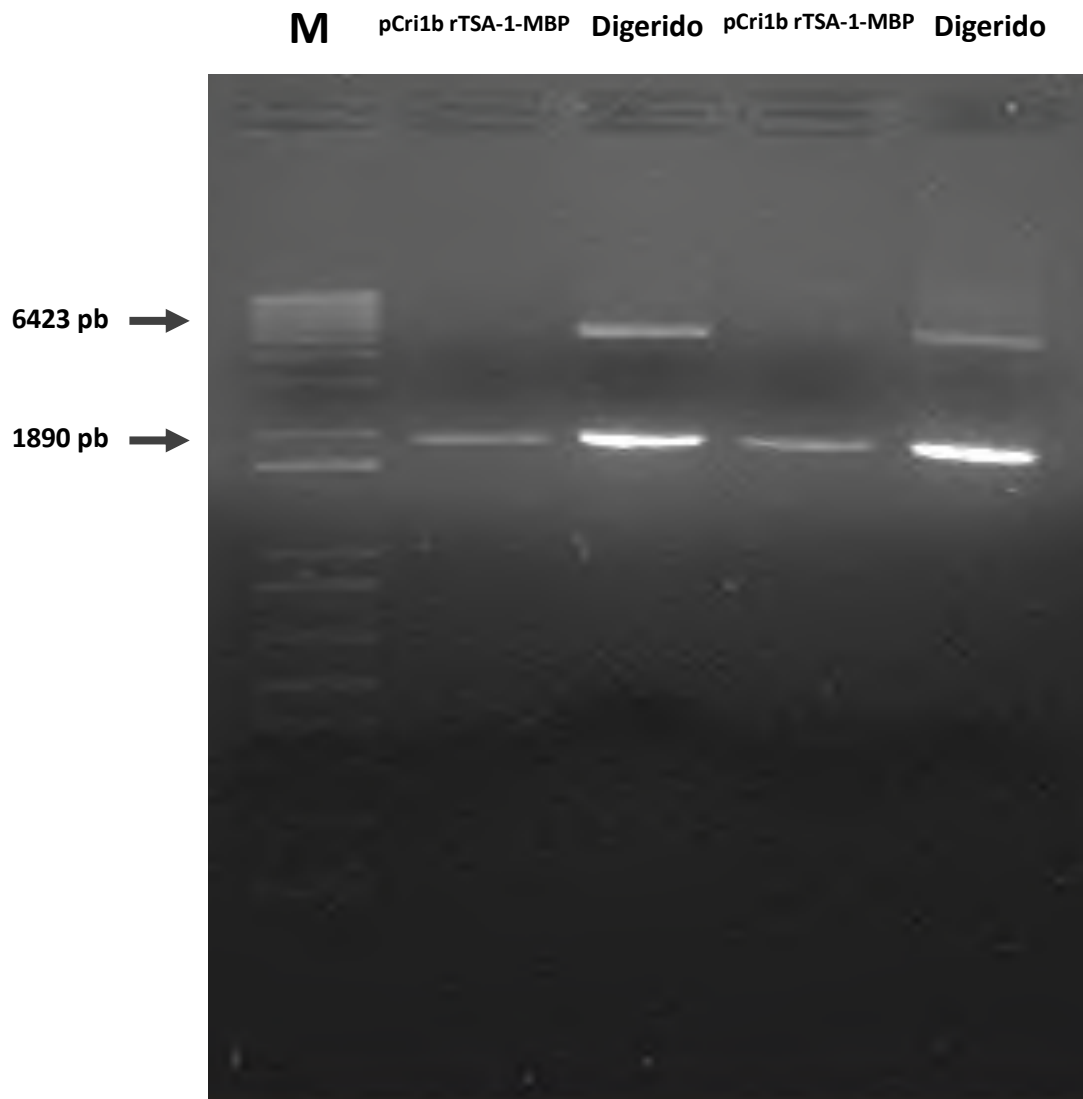


Figura 10: Visualización de fragmentos de restricción del vector pCri-1b rTSA-1-MBP con enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI*. Carril 1, 3 vector sin linealizar pCri-1b rTSA-1-MBP extraído de la clona *E. coli* DH5α A y B. Carril 2, 4 doble digestión del vector pCri-1b rTSA-1-MBP con las enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI*. Electroforesis de ADN en agarosa al 1.0% teñido con BrEt.

7.3. ENSAYOS DE INDUCCIÓN, EXPRESIÓN Y EXTRACCIÓN DE LA PROTEÍNA rTSA-1.

Para probar la expresión del vector pCri-1b rTSA-1-MBP, se usaron las células *E. coli* BL21 (DE3) que contenían el vector pCri-1b rTSA-1-MBP. Se realizaron ensayos de inducción y expresión con IPTG. Se utilizaron como control el vector parental pET-41a rTSA-1 que expresó la proteína rTSA-1-MBP y el vector destino pCri-1b que expresó la proteína GFP-MBP, con el objetivo de verificar el estado funcional correcto del vector destino pCri-1b y comparar las condiciones de expresión de la proteína rTSA-1 con el vector parental pET-41a rTSA-1. Se observó una baja cantidad de células posterior a la cosecha del cultivo de las células con el vector pCri-1b TSA-1-MBP en comparación con las células transformadas con los otros vectores (Figura 11, B).

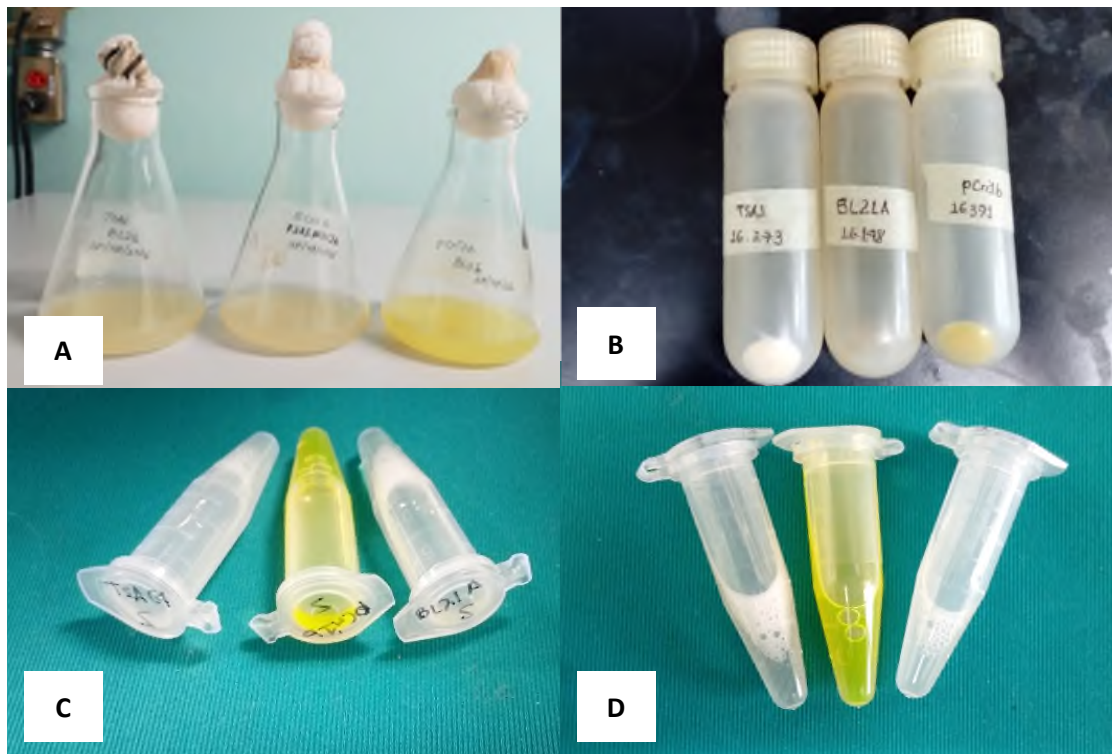


Figura 11: Inducción y expresión de proteínas. A. Matraces con un volumen de 50 mL de Medio LB + 50 uL de kanamicina, de izquierda a derecha: células *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET-41a rTSA-1, vector comercial pCri-1b, vector pCri-1b rTSA-1-MBP. B. Fase insoluble posteriores al tratamiento de lisis alcalina con BugBuster, de izquierda a derecha: extracto células *E. coli* BL21 (DE3) con la vector pET-41a rTSA-1, vector comercial pCri-1b, vector pCri-1b rTSA-1-MBP. C y D. Fase soluble con proteínas intracelulares, de izquierda a derecha: proteínas de la vector pET-41a rTSA-1, vector comercial pCri-1b, vector pCri-1b rTSA-1-MBP.

Las proteínas intermembranales extraídas por lisis alcalina se corrieron para visualizarse en un gel de electroforesis. El análisis electroforético de las proteínas no reveló la presencia de rTSA-1-MBP en los 114 kD (Figura 12). Esto indicaría que no existe expresión o síntesis de la proteína en el periodo de 16 horas incubación, posterior a la inducción con IPTG. El funcionamiento del vector destino pCri-1b es correcta, pues se expresa la proteína GFP-MBP con el peso de 70 kDa (Tabla 6). Sin embargo, se observó que la proteína control GFP-MBP se comienza a expresar antes de la inducción con IPTG, y posterior a la inducción la concentración es equivalentemente más baja. La proteína control rTSA-1, se expresó correctamente del vector parental pET-41a en las mismas condiciones de expresión.

A pesar de que BL21 (DE3) es una plataforma de alto rendimiento de expresión, comúnmente este subtipo celular de *E. coli* utiliza métodos de autorestricción de expresión, reduciendo los niveles de transcripción de las proteínas heterologas (Narayanan *et al.*, 2010). Esto podría explicar el hecho de que no se obtuviera la proteína rTSA-1-MBP. También esta reportado que la sobreproducción en BL21 (DE3) de proteínas heterologas esta limitada por la muerte celular temprana (Miroux *et al.*, 1996).

VECTOR	PROTEÍNA EXPRESADA
pCri-1b rTSA-1-MBP	rTSA-1-MBP Peso molecular: 114 KDa
pET-41a rTSA-1	rTSA-1 Peso molecular: 70 kDa
pCri-1b	GFP-MBP Peso molecular: 70 kDa

Tabla 6: Información de vectores y pesos moleculares estimados de las proteínas expresadas en los gels de electroforesis SDS-PAGE.

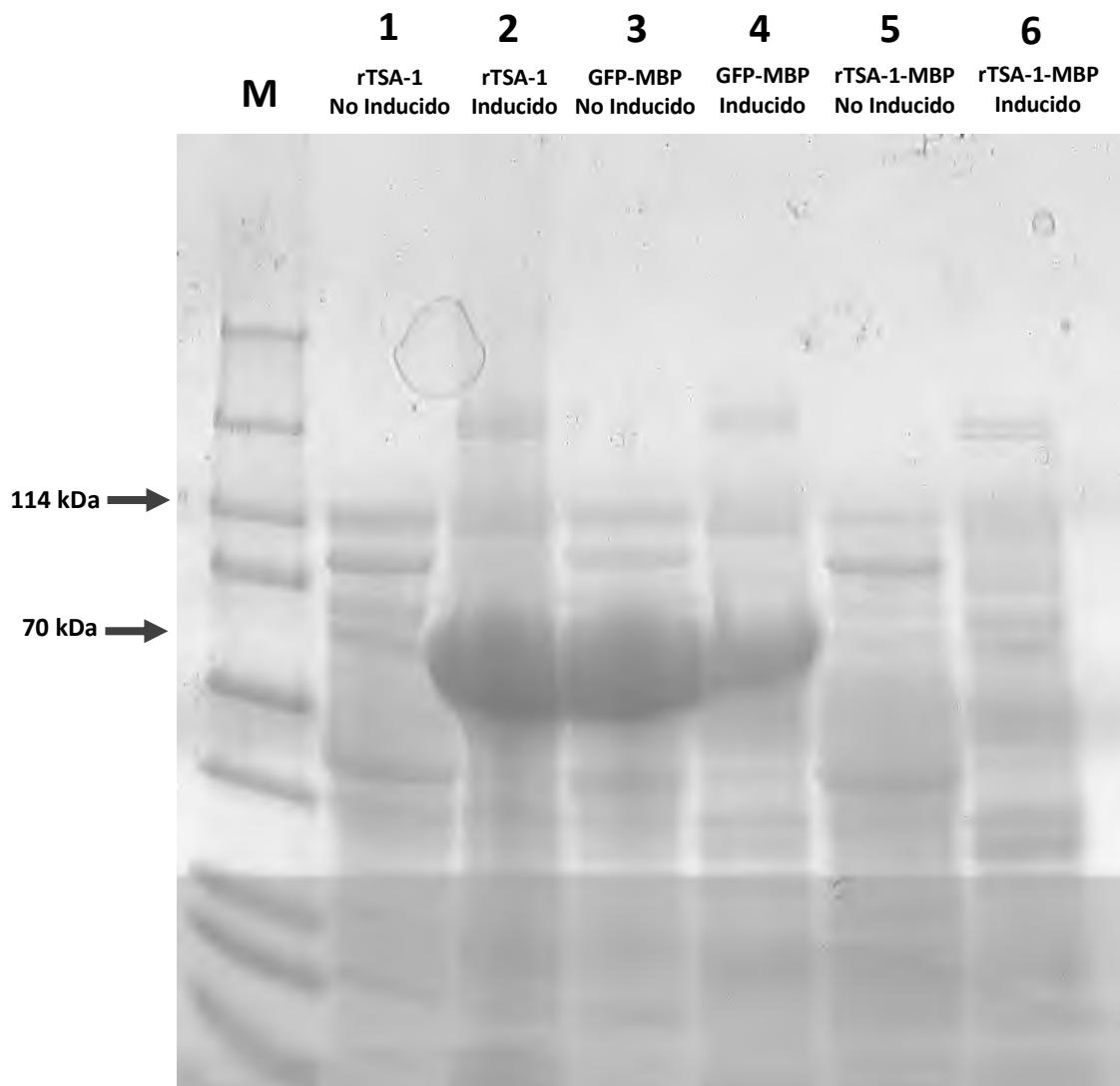


Figura 12: Patrón de corrimiento de proteínas de células tratadas reactivo BugBuster. Extractos 1,2 Proteína rTSA-1 del vector pET-41a rTSA-1, fase soluble e insoluble. Extractos 3,4 Proteína control GFP-MBP del vector comercial pCri-1b, fase soluble e insoluble. Carril 5,6 Proteínas de las células con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP. Electroforesis SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomasie. La flecha de 114 kDa indica donde debería visualizarse la proteína rTSA-1-MBP. La flecha de 70 kDa indica donde se visualiza la proteína GFP-MBP y la proteína rTSA-1 expresada por el vector pET-41a rTSA-1-MBP.

7.4. ENSAYOS DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN CON LOS GENOTIPOS *E. COLI* C41 Y C43.

Como siguiente estrategia, para lograr la expresión, se optó por probar el reemplazo de los genotipos celulares BL21 (DE3) con los genotipos C41 (DE3) y C43 (DE3), con base a los resultados del anterior experimento, donde se observó un paquete celular de menor tamaño en los cultivos con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP con células BL21 (DE3), en comparación con los cultivos que poseían los vectores pET-41a rTSA-1 y pCri-1b con células BL21 (DE3), sugiriendo que las células estaban muriendo antes de lograr sintetizar la proteína rTSA-1-MBP, causado por la probable inestabilidad del plásmido pCri-1b rTSA-1-MBP en BL21 (DE3).

La literatura indica, que al identificar una célula como inestable o tóxica un plásmido, las células que pierden el plásmido crecen por sobre las que si logran retenerlo, al no poseer las células el plásmido con la resistencia al antibiótico añadido en el medio de cultivo de crecimiento, las células mueren (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004).

La expresión de proteínas heterólogas en *E. coli* C41 (DE3) y C43 (DE3), tienen la ventaja de que se siguen produciendo sin generar efectos tóxicos al sistema de expresión, gracias a la presencia de locus específicos en los genotipos C41 (DE3) y C43 (DE3), que ayudan a minimizar el efecto toxicidad en las células, sin provocar su muerte temprana (Dumon-Seignovert *et al.*, 2004). De tal manera, se transformaron células *E. coli* del subtipo C41 (DE3) y C43 (DE3) con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP. Una vez que los nuevos genotipos se transformaron, se crecieron en medio de cultivo y se indujeron con IPTG. A partir de las células cosechadas se obtuvieron fracciones solubles e insolubles. La fase insoluble, fue tratada para la extracción de las proteínas intracelulares (Anexo 12) que posteriormente se corrieron en un gel de electroforesis (Figura 13). Como resultado del análisis electroforético, no fue posible visualizar en el patrón de bandas a la proteína rTSA-1-MBP. De tal manera, se rechazó la posibilidad de que el sistema de expresión este desechando el vector pCri-1b rTSA-1-MBP por inestabilidad. Entonces, se hipotetizó que la expresión se estaba inhibiendo por las altas demandas energéticas que puede requerir la síntesis de una proteína rTSA-1-MBP por su tamaño. A partir de estos resultados, se procedió a implementar técnicas de manipulación del metabolismo celular de *E. coli* para la expresión de la proteína rTSA-1-MBP.

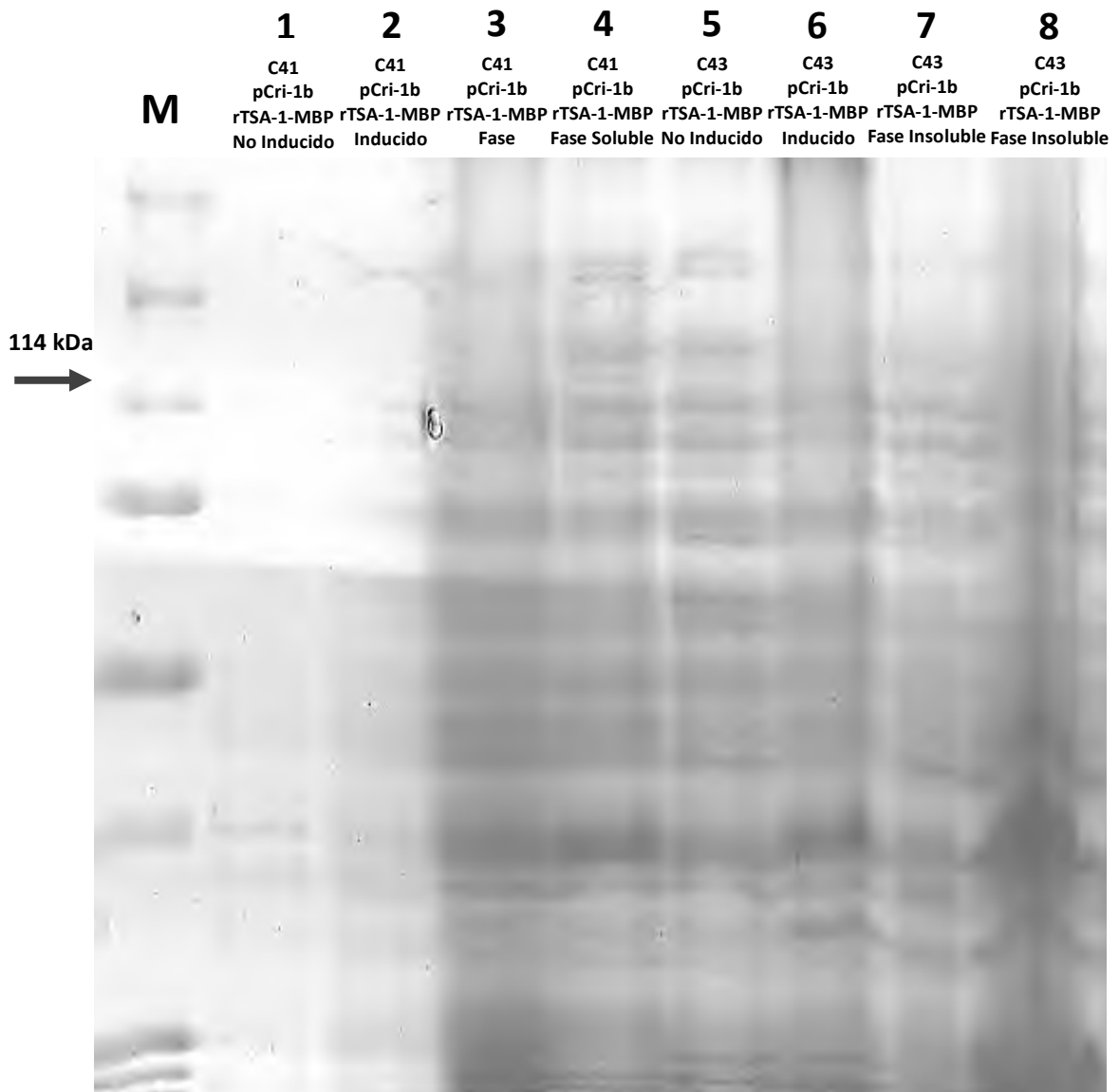


Figura 13: Patrón de corrimiento de proteínas de células *E. coli* C41 y C43. Extracto 1-4 Proteínas de las células *E. coli* C41 (DE3) con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP, cultivo inducido y no inducido, fase soluble e insoluble. Extracto 5-8 Proteínas de las células *E. coli* C43 (DE3) con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP, cultivo inducido y no inducido, fase soluble e insoluble. Electroforesis SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomasie. La flecha de 114 kDa indica donde debería visualizarse la proteína rTSA-1-MBP.

7.5. ENSAYOS DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO A DIFERENTES TEMPERATURAS.

La primera aproximación fue una modificación de temperatura de 37° C a 25° C en el periodo de incubación para el crecimiento de las células *E. coli*. BL21 (DE3), para ayudar a generar cambios en el metabolismo del sistema de expresión, permitiendo menor inversión energética en las fases de crecimiento y duplicación celular, redirigiéndola en la síntesis proteica (Gadgil *et al.*, 2008).

Se cultivaron células BL21 (DE3) transformadas con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP en medio de cultivo con temperaturas de incubación a 25° C. Simultáneamente como control se incubaron células BL21 (DE3) transformadas con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP a 37° C. Los resultados en el patrón de bandas no mostraron la presencia de la proteína rTSA-1-MBP (Figura 14), lo que indicó que el cambio de temperatura de crecimiento no favoreció su producción y que ralentizar el metabolismo celular para redirigirla a la síntesis de proteínas o metabolitos no deseados, no es una solución para su producción. Posiblemente, la complejidad de la proteína por su peso molecular arriba de los 100 kDa en un sistema de expresión como *E. coli* BL21 (DE3), basado en un sistema polimerasa T7, genere errores durante la síntesis de RNA por la rapidez del proceso, hasta ocho veces más rápido que en un sistema eucariota (Iost *et al.*, 1992) lo que podría provocar la inhibición o parcial síntesis de la proteína rTSA-1-MBP.

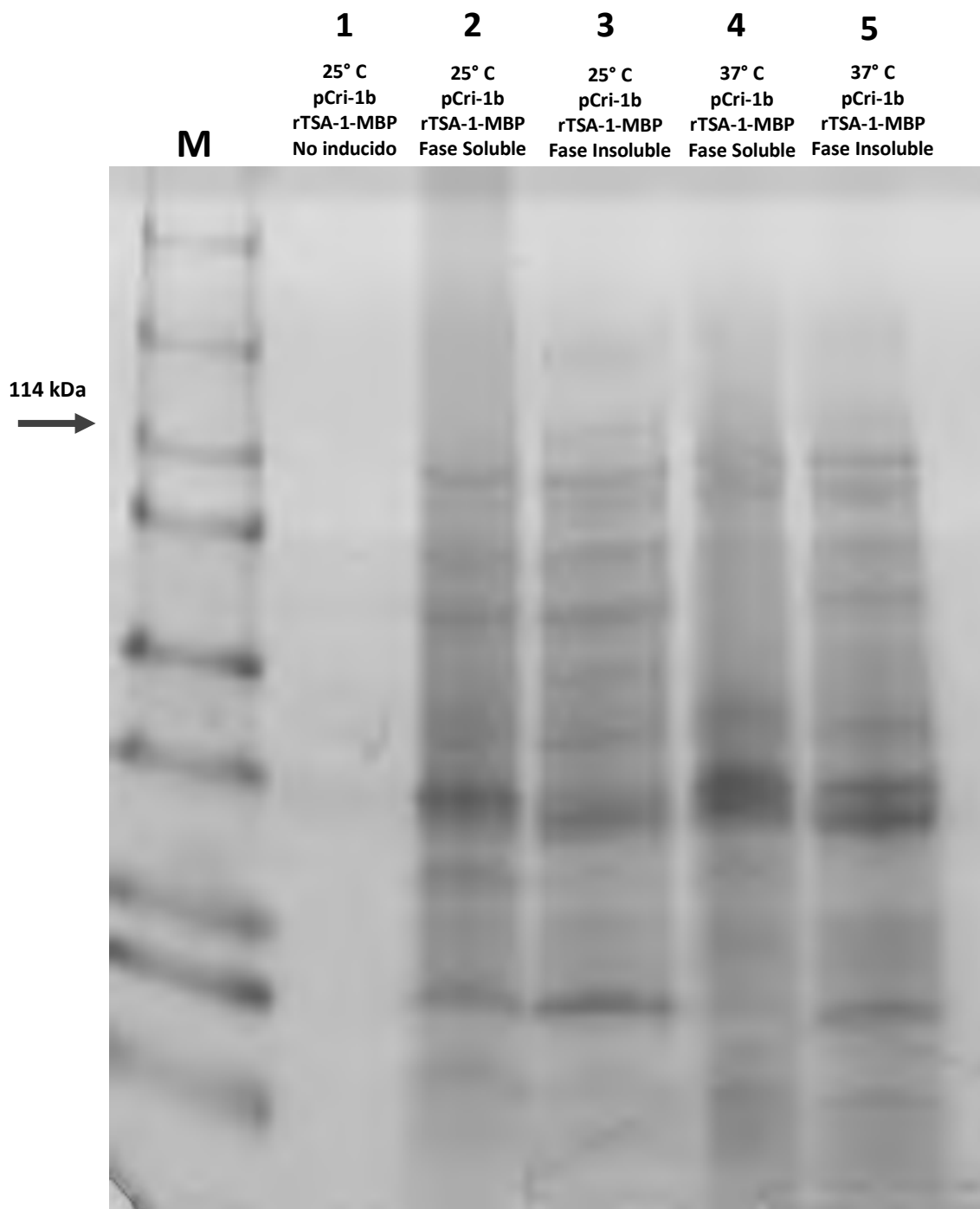


Figura 14: Patrón de corrimiento de proteínas de células con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP de la clona A incubadas a 25° y 37° C. Extracto 1 proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3) no inducidas a 25° C. Extracto 2, 3 proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3), fase soluble y no soluble a una temperatura de crecimiento de 25° C. Extracto 4, 5 proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3), fase soluble y no soluble a una temperatura de crecimiento de 37° C. Electroforesis SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie. La flecha de 114 kDa indica donde debería visualizarse la proteína rTSA-1-MBP expresada con la etiqueta MBP.

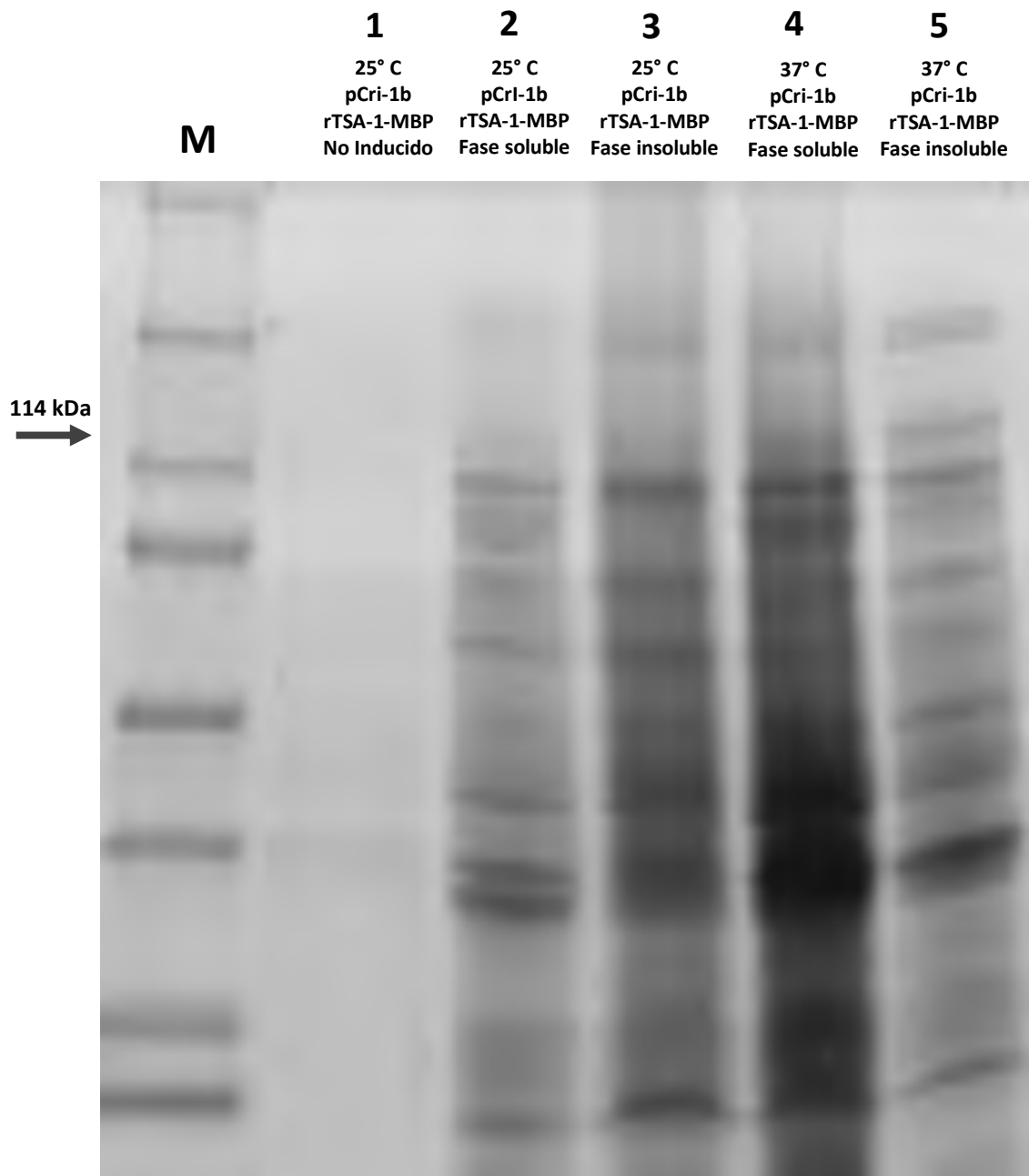


Figura 15: Patrón de corrimiento de proteínas de células con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP de la clona B incubadas a 25° y 37° C. Extracto 1 proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3), no inducidas a 25° C. Extracto 2, 3 proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3), fase soluble y no soluble a una temperatura de crecimiento de 25° C. Extracto 4, 5 proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3), fase soluble y no soluble a una temperatura de crecimiento de 37° C. Electroforesis SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomasie.

7.6. ENSAYOS DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN CON CÉLULAS CULTIVADAS EN MEDIO DE CULTIVO ENRIQUECIDO CON GLUCOSA.

En referencia a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, donde se observó la expresión de la proteína control GFP-MBP del vector pCri-1b antes de la inducción con IPTG y baja expresión posterior a la inducción con IPTG, se hipotetizó que la proteína rTSA-1-MBP con el vector pCri-1b posiblemente se expresó en ausencia de IPTG y se degradó en el medio, dando como resultado su ausencia en las bandas esperadas a través de la electroforesis de proteínas. Por lo tanto, se implementó una estrategia con adición de glucosa al medio de crecimiento.

La glucosa se utiliza cuando requiere evitar la expresión proteica antes de agregar IPTG, fenómeno ocasionado por la presencia de lactosa en los medios de cultivo de crecimiento (Bäcklund *et al.*, 2011), además el crecimiento celular y la producción de vector tienden a competir por el abanico limitado de fuentes de energía dentro de una célula, por lo que al proporcionarles a las células una mayor fuente de energía a través de fuentes de carbono como la glucosa, ayuda a la respuesta adaptativa del sistema de expresión para elevar la tasa de concentración de RNA celular para la síntesis proteica (Shiloach *et al.*, 2009).

Las células con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP se inocularon en un medio enriquecido con glucosa y se indujeron con IPTG. Se cosecharon las células y lisaron para la obtención de las proteínas intracelulares. Las muestras se corrieron en un gel de electroforesis. No se visualizó en el patrón de bandas la proteína rTSA-1-MBP de 114 kDa (Figura 16). Nuevamente, las bandas cercanas al peso en baja concentración se muestran en el control y se descartan como proteínas intracelulares de la cepa *E. coli* BL21 (DE3). Se concluye con base en la serie de experimentos realizados anteriormente que la falta de síntesis de la proteína rTSA-1-MBP puede que no esté relacionada con problemas de inducción temprana en ausencia de IPTG o del metabolismo de la célula por demanda energética para realizar el proceso de síntesis de la proteico.

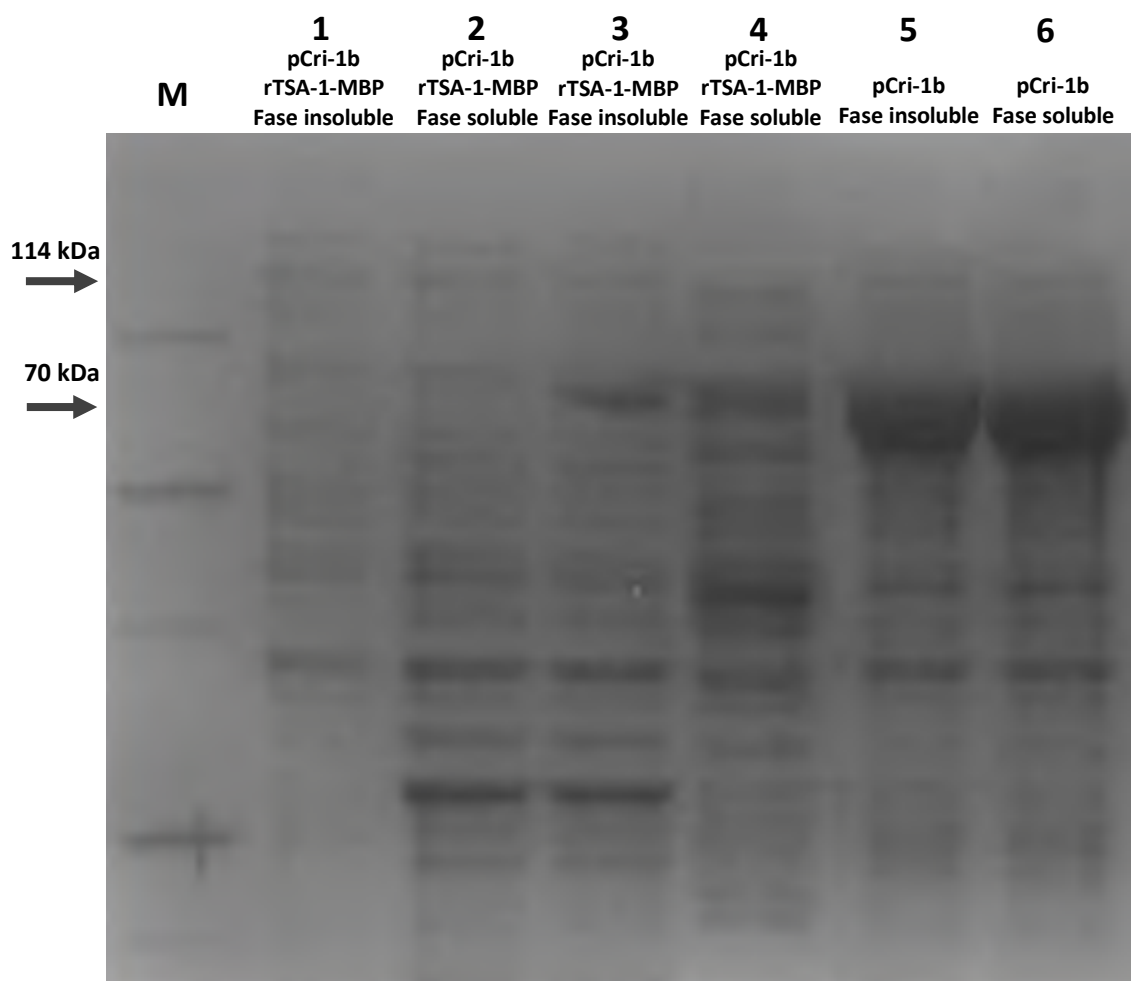


Figura 16: Patrón de corrimiento de células crecidas en medio de cultivo enriquecido con glucosa al 0.5%. Extracto 1, 2 Proteínas de las células *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP de la clona A fase insoluble y soluble. Extracto 3, 4 Proteínas de las células *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP de la clona B, fase insoluble y soluble. Extracto 5, 6 Proteínas de las células *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pCri-1b, fase insoluble y soluble. Electroforesis SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie.

7.7. CINÉTICA DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN.

El experimento anterior se probó la glucosa como represor de expresión antes de la inducción con IPTG, sin embargo, la proteína rTSA-1-MBP aún pudo expresarse dentro de lapso de periodo inicial posterior a la inducción. Por ello, se implementó la cosecha de muestras de los cultivos a las 2, 4 y 6 horas posterior a la inducción con IPTG. Las muestras cosechadas en una cinética, se resuspendieron y se lisaron. Se utilizó como control el vector destino pCri-1b con la proteína GFP-MBP. El patrón de bandas no mostró la presencia de rTSA-1-MBP con el peso molecular de 114 kDa (Figura 16). Las bandas cercanas a este peso molecular en baja concentración, también se descartan debido a que se muestran en el patrón de bandas del control con el vector pCri-1b, lo que nos permite deducir que son proteínas intracelulares comunes de la cepa *E. coli* BL21 (DE3). La proteína control GFP-MBP de 70 kDa se expresa desde las primeras 2 horas posterior a la inducción con IPTG. De esta manera, se puede concluir que, aunque el vector y sistema de expresión funciona con GFP-MBP, por alguna razón no puede expresar a rTSA-1-MBP.

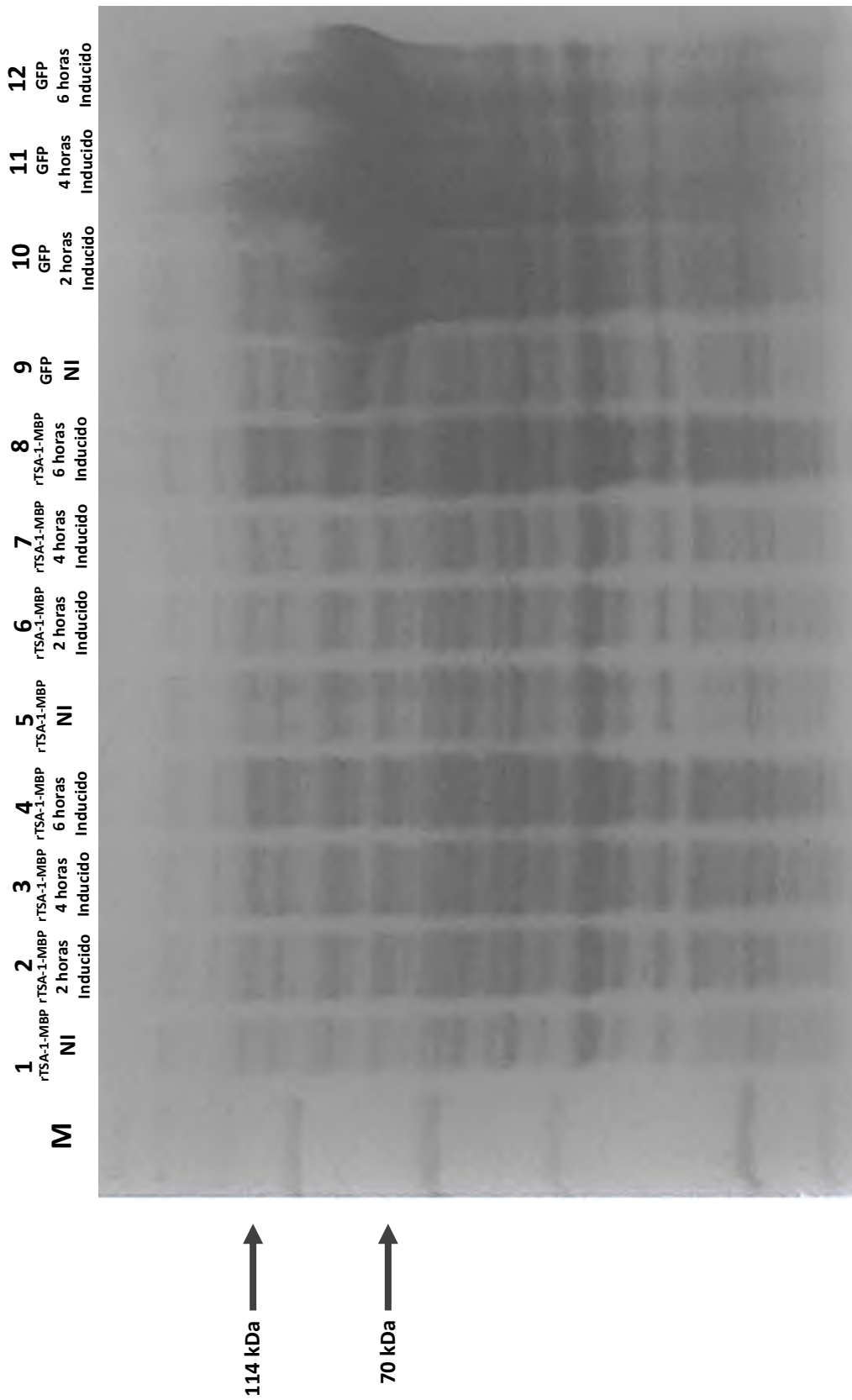


Figura 17: Patrón de corrimiento de proteínas de células inducidas con IPTG. Extracto 1-4 Proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP de la clona A sin inducir e inducida a las 2, 4 y 6 horas. Extracto 5-8 Proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP de la clona B sin inducir e inducida a las 2, 4 y 6 horas. Extracto 9-12 Proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3) con el vector destino pCri-1b con GFP-MBP sin inducir e inducida a las 2, 4 y 6 horas. Electroforesis SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie.

7.8. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR COLUMNA DE AFINIDAD NI-SEFAROSA.

Con la finalidad de detectar la posible expresión de la proteína rTSA-1-MBP del vector pCri-1b rTSA-MBP en la cepa BL21 (DE3), se implementó una técnica de purificación de proteínas específica por afinidad, permitiendo así capturarla si está sintetizándose en los sistemas de expresión, pero no puede ser visualizada en geles de electroforesis. Para esto se indujo la expresión de células BL21 (DE3) con IPTG e incubaron a 25° C y 37° C. Se realizó el proceso de purificación con columnas empacadas con Ni-Sefarosa con lavados con agua estéril, lavados con imidazol y elución con imidazol. Las eluciones se corrieron en un gel de electroforesis (Figura 18).

Como control se utilizó el vector destino pCri-1b con la proteína GFP-MBP. Analizando el patrón de bandas, no hay presencia de ninguna proteína a nivel de 114 kDa (Figura 18), la proteína rTSA-1-MBP no se expresó y no se ancló con la técnica específica de purificación en columna de Ni-Sefarosa. Sin embargo, los resultados mostrados, confirmaron que la técnica de purificación funciona, ya que fue posible visualizar una banda al nivel de 70 kDa de la proteína control GFP con la etiqueta de dominio de unión a maltosa.

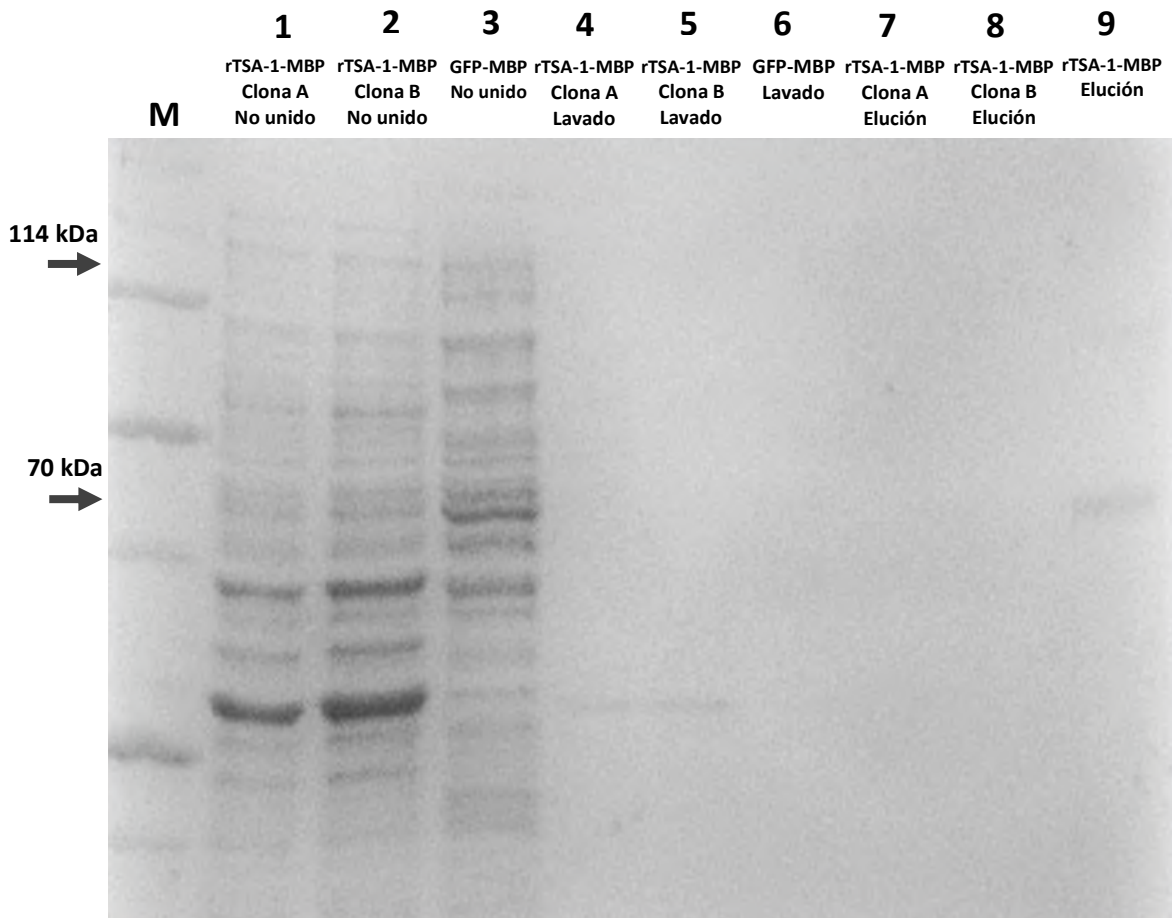


Figura 18: Patrón de corrimiento de proteínas purificadas mediante columna de resina de Ni-Sefarosa. Extracto 1, 4 y 7 de proteínas rTSA-1-MBP de células *E. coli* BL21 (DE3) de la clona A con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP no unidas a la resina, lavado con agua estéril y elución con 500 mM Imidazol. Extracto 2, 5 y 8 de proteínas rTSA-1-MBP de células *E. coli* BL21 (DE3) de la clona B con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP no unidas a la resina, lavado con agua estéril y elución con 500 mM Imidazol. Extracto 3, 6 y 9 proteínas GFP de células *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pCri-1b no unidas a la resina, lavado con agua estéril y elución con 500 mM Imidazol. SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie. Crecimiento celular a 37° C en medio de cultivo LB con kanamicina. Inducción con IPTG.

7.9. WESTERN BLOT.

Con base a la serie de resultados encontrados durante el proceso de implementación de todas las técnicas de inducción, expresión y purificación. Se realizaron dos pruebas de Western blot con anticuerpos específicos anti-tsa y anti-histidinas, para verificar si existía la presencia la proteína rTSA-1-MBP en bajas concentraciones indetectable para otras técnicas de elucidación de proteínas tras la inducción con IPTG.

Se realizó la transferencia de proteínas de los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa, se añadió el anticuerpo primario y secundario, para posteriormente realizar el revelado de la membrana mediante una técnica de colorimetría por HRP con un rango de detección de concentraciones de ng hasta 5-500 pg (Figura 19 y 20). Como control se utilizó la proteína rTSA-1 purificada de 70 kDa del vector pET-41a rTSA-1. No se visualizaron las bandas en el nivel esperado de 114 kDa en la membrana de nitrocelulosa revelada (Figura 12). Tampoco se visualizó el control debido a que el control rTSA-1 utilizado solo poseía las etiquetas de histidinas del -N terminal y el anticuerpo solo reconocía las etiquetas del -C terminal de una proteína.

De tal manera, se optó para utilizar un método de detección para proteínas en concentraciones debajo de los femto gramos, SuperSignal West (Bio-Rad, 34580). para el revelado de la membrana incubada con anticuerpos anti-tsa. Este experimento permitió observar bandas en de 114 kDa (Figura 19 y 20), lo anterior permite confirmar que la proteína rTSA-1-MBP sí se pudo expresar en *E. coli* BL21 (DE3). De esta forma, se concluye que la baja abundancia de la proteína fue la razón por la que en los anteriores experimentos no se pudiera observar la proteína rTSA-1-MBP en los geles de electroforesis de proteínas convencionales. Antecedentes de los experimentos anteriores, nos dicen que el vector pCri-1b ha es capaz de expresar la proteína fluorescente GFP-MBP con y sin inducción de IPTG (Figura 11). Por lo tanto, la proteína rTSA-1-MBP del vector pCri-1b rTSA-1-MBP también puede estar siendo sintetizada antes de realizar la inducción para la expresión, degradándose en el medio intracelular del sistema en sus de por si bajas concentraciones.

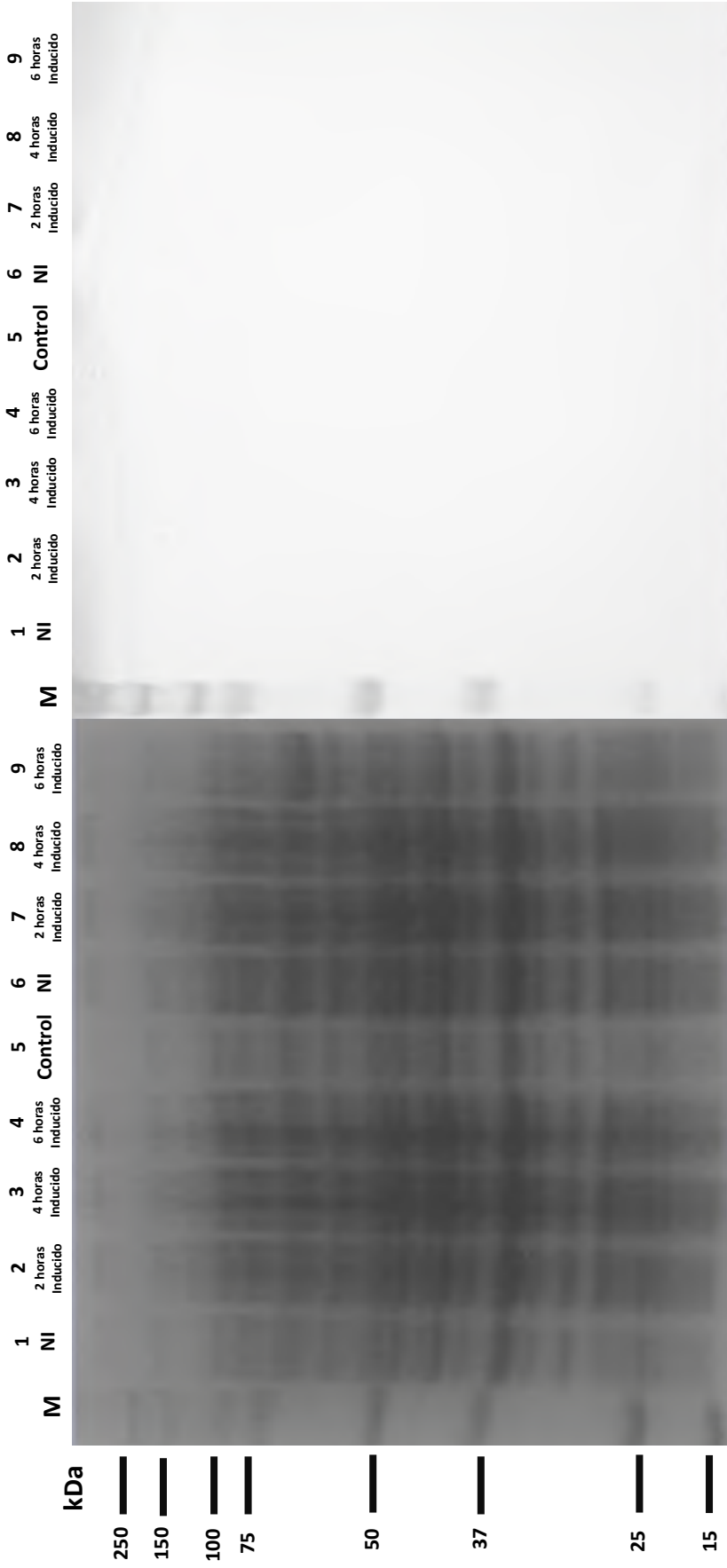


Figura 19: Patrón de corrimiento de proteínas para Western Blot. Extracto 1 a 4 proteínas de las células *E. coli* BL21 (DE3) clona A con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP sin inducir e inducido con IPTG 2, 4 y 6 horas. Extracto 6 proteína rTSA-1 control. Extracto 7 a 9 proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3) clona B con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP sin inducir e inducido con IPTG 2, 4 y 6 horas. Electroforesis SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie. Crecimiento celular a 37° C en medio de cultivo LB con kanamicina. NI= No inducido.

Figura 20: Western Blot con anticuerpos anti-his: Carril 1-9 negativos. Membrana de nitrocelulosa con PBS-T al 10%, revelada mediante HRP. NI= No inducido.

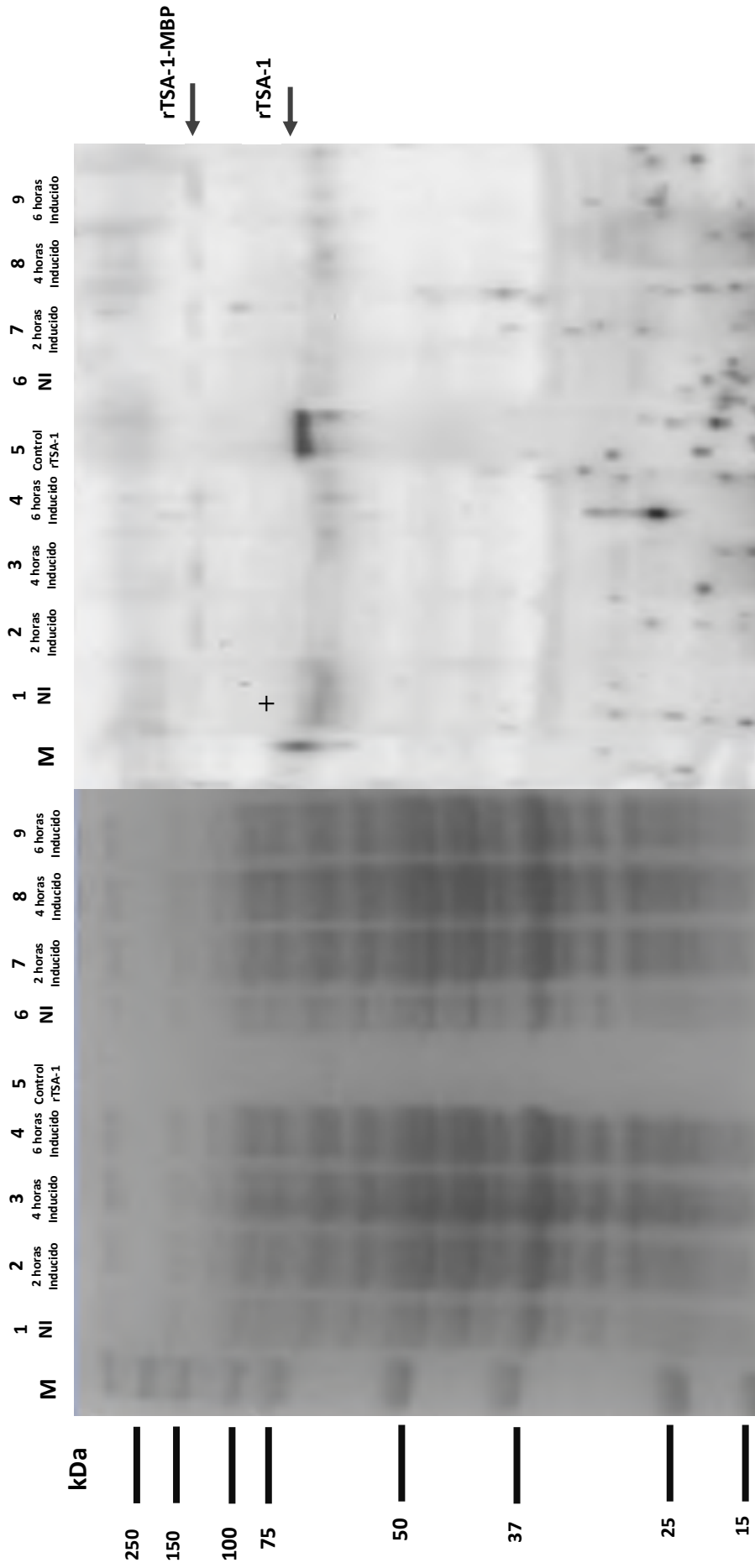


Figura 21: Patrón de corrimiento de proteínas para Western Blot. Extracto 1 a 4 proteínas de las células *E. coli* BL21 (DE3) clona A con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP sin inducir e inducido con IPTG 2, 4 y 6 horas. Extracto 6 proteína rTSA-1 control. Extracto 7 a 9 proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3) clona B con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP sin inducir e inducido con IPTG 2, 4 y 6 horas. Electroforesis SDS-PAGE 10% teñida con azul de Coomassie. Crecimiento celular a 37° C en medio de cultivo LB con kanamicina. NI= No inducido.

Figura 22: Western Blot con anticuerpos anti-tsa. Carril 2-4 y 7-9, Extracto de proteínas de células *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pCri-1b rTSA-1-MBP de la clona A, positivo al reconocimiento del anticuerpo anti-tsa. Carril 5, Control rTSA-1, positivo al reconocimiento del anticuerpo anti-tsa. Membrana de nitrocelulosa con PBS-T, revelada mediante HRP. NI= No inducido.

7.10. AMPLIFICACIÓN DEL GEN TSA-1.

Para verificar que el vector pCri-1b rTSA-1-MBP con el gen rTSA-1 estuviera correcta, se realizó una PCR con los oligos TSA-1 directo y TSA-1 reverso (Tabla 4) y usando como molde el vector extraído de *E. coli* DH5 α . Como control se utilizó el producto de una doble digestión del vector pCri-1b rTSA-1-MBP. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa (Figura 23). Usando como molde el vector pCri-1b rTSA-1-MBP y los oligos para amplificar el extremo terminal amino del gen que codifica rTSA-1. El patrón de mostró bandas con la presencia del gen amplificado con peso de 1000 pb del gen que codifica rTSA-1. El vector pCri-1b rTSA-1-MBP esta completo y contiene el inserto rTSA-1 que sintetiza la proteína rTSA-1-MBP.

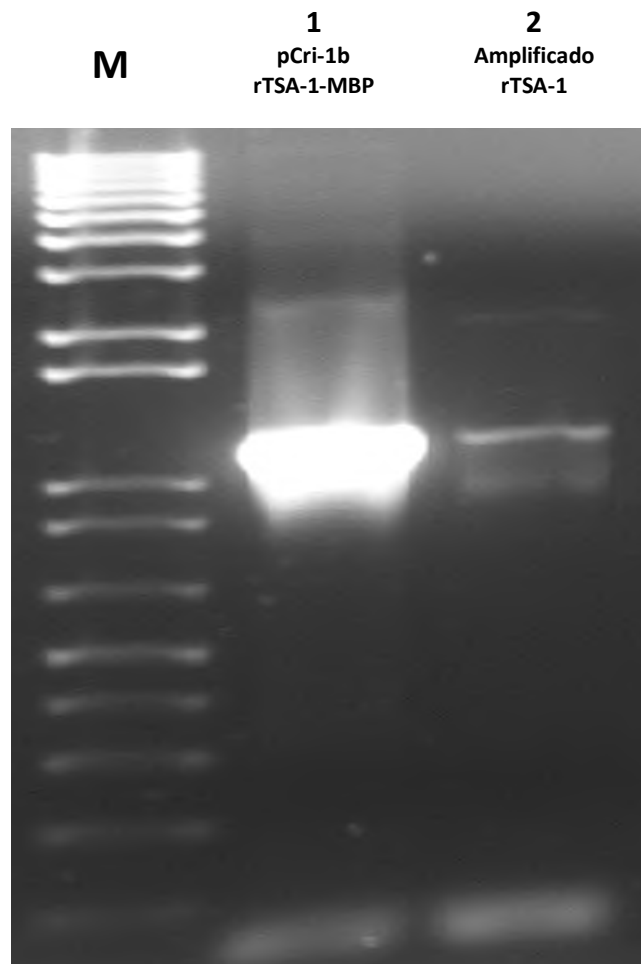


Figura 23: Patrón de corrimiento de amplificación: Carril 1. Doble digestión del vector pCri-1b rTSA-1-MBP con las enzimas *XhoI* y *NdeI*. Carril 2. Fragmento amplificado producto de PCR. Electroforesis de ADN en agarosa al 1.0% teñido con BrEt.

8. CONCLUSIONES

Se implementaron distintos métodos para obtener la expresión de la proteína rTSA-1-MBP con la etiqueta de dominio de unión a maltosa. Para descartar la vinculación de la posible muerte celular temprana por el sistema expresión debido a un reconocimiento de niveles de toxicidad por parte de la proteína rTSA-1-MBP con sus bajos niveles de expresión, se seleccionaron distintos genotipos celulares de *E. coli* para la expresión de las proteínas recombinantes en *E. coli*: BL21 (DE3), C41 (DE3) y C43 (DE3). También se probó la manipulación del metabolismo celular, a través de cambios de temperaturas de crecimiento de 37° C y 25° C para ralentizar el metabolismo y redirigir los niveles energéticos únicamente a la síntesis de proteínas heteróloga. Adicionalmente se probó el enriquecimiento del medio de crecimiento con glucosa para inhibir la expresión en ausencia de IPTG y elevar la cantidad de concentración de sustrato utilizable para reinvertir en la síntesis proteica, aparte la implementación de técnicas de purificación en columna de intercambio iónico Ni-Sefarosa para la captura de la proteína rTSA-1-MBP de forma específica, para descartar el extracto completo proteínas intracelulares que no fueran la proteína rTSA-1. No obstante, aún con estas modificaciones, la proteína rTSA-1-MBP no se logró detectar en extractos crudos. Finalmente, el uso de Western blot con detección de femtogramos permitió la detección de su expresión. De tal forma, la proteína rTSA-1-MBP fusionada a la etiqueta de unión a maltosa se pudo expresar en *E. coli* BL21.

Sin embargo, debido a que el peso molecular y complejidad de la proteína rTSA-1-MBP para proteínas expresadas en plataformas simples como *E. coli*, el sistema de expresión puede no ser capaz de sintetizar la proteína, por un conjunto de factores relacionados con los niveles demandas energéticas para la síntesis, modificaciones post-traduccionales complejas, errores en la síntesis de RNA por el promotor, los nutrientes necesarios para el crecimiento del sistema de expresión que inciden en el mecanismo de síntesis y errores en el vector de expresión pCri-1b mismo.

9. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos de este trabajo, y con la finalidad de incrementar la producción de la proteína rTSA-1-MBP en *E. coli*, se proponen las siguientes estrategias:

- **Cambio de la etiqueta de fusión.** El peso molecular elevado influye mucho en el proceso de sintetizar proteínas recombinantes en sistemas de expresión como *E. coli*, sobre todo en aquellos basados en el tipo de síntesis rápida en T7 polimerasa, como lo es BL21 (DE3). Se recomienda una estrategia para sustituir la etiqueta de MBP por otra de menor peso que ayude a la solubilizar la proteína. La etiqueta de fusión GST, es expresada en la plataforma *E. coli*, con un peso molecular de 26 kDa. Aunque como resultado la proteína se acumula en cuerpo de inclusión y es necesario la implementación de más pasos en las técnicas de purificación, como renaturalización por cromatografía, los cuerpos de inclusión ayudan a proteger a la proteína de degradación proteolítica (Kimple *et al.*, 2013).
- **Estrategia de inducción con niveles altos de densidad celular.** Esta una estrategia es implementada en *E. coli*, con cambios de medio de cultivo periódicos que permiten nutrir a las células de forma constante y ayudan a obtener mejores rendimientos de producción de proteínas recombinantes (Rosano *et al.*, 2014).
- **Fragmentación de la proteína a mínimo antigénico.** rTSA-1-MBP posee un elevado peso molecular y dificulta su expresión en plataformas simples como *E. coli*, por lo que fragmentar y seleccionar parte de la secuencia que es importante para el reconocimiento del sistema inmune del paciente puede ser una solución (Hoft *et al.*, 2007). Al cortar la secuencia de la proteína TSA-1 podría permitir una mejor expresión con un bajo peso molecular. Esto parte de la teoría de la función de las vacunas con subunidades, estas solo poseen pocas unidades antigénicas o epítopos que ayudan al cuerpo humano a generar inmunidad (de la Cruz *et al.*, 2019).

10. REFERENCIAS

1. Addgene.org (2014). *Addgene: pCri-1b*. [Página Web] Disponible en: <https://www.addgene.org/61327/>
2. Addgene.org. (2019). *Addgene: Vector Database - pET-41 a(+)*. [Página Web] Disponible en: <https://www.addgene.org/vector-database/2592/>
3. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *CDC - Chagas Disease - Biology*. [Página Web] Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
4. Autran, B. (2004). Therapeutic Vaccines for Chronic Infections. *Science*, 305(5681), pp.205–208.
5. Bäcklund, E., Ignatushchenko, M. and Larsson, G. (2011). Suppressing glucose uptake and acetic acid production increases membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 10(1), p.35.
6. Bern, C., Montgomery, S.P., Herwaldt, B.L., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., Dantas, R.O., Maguire, J.H., Acquatella, H., Morillo, C., Kirchhoff, L.V., Gilman, R.H., Reyes, P.A., Salvatella, R. and Moore, A.C. (2007). Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States. *JAMA*, 298(18), p.2171.
7. Buschiazzi, A., Amaya, M.F., Cremona, M.L., Frasch, A.C. and Alzari, P.M. (2002). The Crystal Structure and Mode of Action of Trans-Sialidase, a Key Enzyme in *Trypanosoma cruzi* Pathogenesis. *Molecular Cell*, 10(4), pp.757–768.
8. Carlos Beas Zárate, Daniel Ortuño Sahagún and Socorro, J. (2009). *Biología molecular : fundamentos y aplicaciones*. México: Mcgraw-Hill Interamericana.
9. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). *CDC - DPDx - American Trypanosomiasis*. [Página Web] Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/>
10. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2018. *World Health Organization*. [Página Web] Disponible en: <http://www.who.int/chagas/en/>
11. de la Cruz, J.J., Villanueva-Lizama, L., Dzul-Huchim, V., Ramírez-Sierra, M.-J., Martínez-Vega, P., Rosado-Vallado, M., Ortega-Lopez, J., Flores-Pucheta, C.I., Gillespie, P., Zhan, B., Bottazzi, M.E., Hotez, P.J. and Dumonteil, E. (2019). Production of recombinant TSA-1 and evaluation of its potential for the immuno-therapeutic control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 15(1), pp.210–219.

12. Daber, R., Stayrook, S., Rosenberg, A. and Lewis, M. (2007). Structural Analysis of Lac Repressor Bound to Allosteric Effectors. *Journal of Molecular Biology*, 370(4), pp.609–619.
13. Dawes, B. (1968). *Advances in parasitology. Volume 6*. London ; New York: Academic Press.
14. Dumon-Seignovert, L., Cariot, G. and Vuillard, L. (2004). The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). *Protein expression and purification*, 37(1), pp.203–6.
15. Dumonteil, E., Bottazzi, M.E., Zhan, B., Heffernan, M.J., Jones, K., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Ortega, J., Rosales, S.P. de L., Lee, B.Y., Bacon, K.M., Fleischer, B., Slingsby, B., Cravioto, M.B., Tapia-Conyer, R. and Hotez, P.J. (2012). Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Review of Vaccines*, 11(9), pp.1043–1055.
16. Dumonteil, E., Escobedo-Ortegon, J., Reyes-Rodriguez, N., Arjona-Torres, A. and Ramirez-Sierra, M.J. (2003). Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* Infection with DNA Vaccines in Mice. *Infection and Immunity*, 72(1), pp.46–53.
17. Expasy.org. (2019). *ExpASy: SIB Bioinformatics Resource Portal - Home*. [Página Web] Disponible en: <https://www.expasy.org>
18. Fundación Carlos Slim. (2016). *Inicio - Fundación Carlos Slim*. [Página Web] Disponible en: <https://fundacioncarlosslim.org/inicio/>
19. Gadgil, M., Kapur, V. and Hu, W.-S. (2008). Transcriptional Response of Escherichia coli to Temperature Shift. *Biotechnology Progress*, 21(3), pp.689–699.
20. Genscript.com. (2014). *MBP tag*. [Página Web] Disponible en: <http://www.genscript.com/bacterial-soluble-protein-expression-MBP-tag.html>
21. Goulas, T., Cuppari, A., Garcia-Castellanos, R., Snipas, S., Glockshuber, R., Arolas, J.L. and Gomis-Rüth, F.X. (2014). The pCri System: A Vector Collection for Recombinant Protein Expression and Purification. *PLoS ONE*, 9(11), p.e112643.
22. di Guana, C., Lib, P., Riggsa, P.D. and Inouyeb, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein. *Gene*, 67(1), pp.21–30.
23. Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L. and Sotelo-Mundo, R. (2013). PERSPECTIVAS ACTUALES DEL USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y SU

IMPORTANCIA EN LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA E INDUSTRIAL. *BIOtecnia*, 15(3), p.8

24. Hoft, D.F., Eickhoff, C.S., Giddings, O.K., Vasconcelos, J.R.C. and Rodrigues, M.M. (2007). Trans-Sialidase Recombinant Protein Mixed with CpG Motif-Containing Oligodeoxynucleotide Induces Protective Mucosal and Systemic *Trypanosoma cruzi* Immunity Involving CD8+ CTL and B Cell-Mediated Cross-Priming. *The Journal of Immunology*, 179(10), pp.6889–6900.
25. Hotez, P.J., Dumonteil, E., Heffernan, M.J. and Bottazzi, M.E. (2013). Innovation for the “bottom 100 million”: eliminating neglected tropical diseases in the Americas. *Advances in experimental medicine and biology*, 764, pp.1–12.
26. Iost, I., Guillerez, J. and Dreyfus, M. (1992). Bacteriophage T7 RNA polymerase travels far ahead of ribosomes in vivo. *Journal of bacteriology*, 174(2), pp.619–22.
27. Jena Bioscience GmbH (2019). *Restriction Enzymes: “S” Enzymes - Jena Bioscience*. [Página Web] Jenabioscience.com.
Disponible en: <https://www.jenabioscience.com/molecular-biology/restriction-enzymes/s-enzymes>
28. Kimple, M.E., Brill, A.L. and Pasker, R.L. (2013). Overview of Affinity Tags for Protein Purification. *Current Protocols in Protein Science*, pp.9.9.1-9.9.23.
29. Köberle, F. (1968). Chagas’ Disease and Chagas’ Syndromes: The Pathology of American Trypanosomiasis. *Advances in Parasitology Volume 6*, pp.63–116.
30. Laidlaw, B.J., Craft, J.E. and Kaech, S.M. (2016). The multifaceted role of CD4+ T cells in CD8+ T cell memory. *Nature Reviews Immunology*, 16(2), pp.102–111.
31. Limon-Flores, A.Y., Cervera-Cetina, R., Tzec-Arjona, J.L., Ek-Macias, L., Sánchez-Burgos, G., Ramirez-Sierra, M.J., Cruz-Chan, J.V., VanWynsberghe, N.R. and Dumonteil, E. (2010). Effect of a combination DNA vaccine for the prevention and therapy of *Trypanosoma cruzi* infection in mice: Role of CD4+ and CD8+ T cells. *Vaccine*, 28(46), pp.7414–7419.
32. Lodish, H.F. (2016). *Molecular cell biology*. New York: W.H. Freeman-Macmillan Learning.
33. Miroux, B. and Walker, J.E. (1996). Over-production of Proteins in Escherichia coli: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), pp.289–298.

34. Narayanan, A., Ridilla, M. and Yernool, D.A. (2010). Restrained expression, a method to overproduce toxic membrane proteins by exploiting operator-repressor interactions. *Protein Science*, 20(1), pp.51–61.
35. Neglected tropical diseases. (2019). *World Health Organization*. [Página Web] Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/en/
36. New England Biolabs (2019). *Maltose Binding Protein Expression | NEB*. [Página Web] Neb.com. Disponible en: <https://www.neb.com/applications/protein-expression-and-purification/coupled-protein-expression-and-purification/maltose-binding-protein-expression>.
37. Nih.gov. (2012). *Vaccine Types | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases*. [Página Web] Disponible en: <https://www.niaid.nih.gov/research/vaccine-types>
38. Novák, P. and Havlíček, V. (2016). Protein Extraction and Precipitation. *Proteomic Profiling and Analytical Chemistry*, pp.51–62. Disponible en:
39. Pech-Canul, Á. de la C., Monteón, V. and Solís-Oviedo, R.-L. (2017). A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology Research*, 2017, pp.1–13.
40. Promega.com. (2019). *Promega Corporation*. [Página Web] Disponible en: <https://www.promega.com>
41. Pryor, K.D. and Leiting, B. (1997). High-Level Expression of Soluble Protein in *Escherichia coli* Using a His6-Tag and Maltose-Binding-Protein Double-Affinity Fusion System. *Protein Expression and Purification*, 10(3), pp.309–319.
42. Quijano-Hernandez, I. and Dumonteil, E. (2011). Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines*, 7(11), pp.1184–1191.
43. Rassi, A., Rassi, A. and Marin-Neto, J.A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), pp.1388–1402.
44. Rosano, G.L. and Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5.
45. Sanchez-Burgos, G., Mezquita-Vega, R.G., Escobedo-Ortegon, J., Ramirez-Sierra, M.J., Arjona-Torres, A., Ouaissi, A., Rodrigues, M.M. and Dumonteil, E. (2007). Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. *FEMS immunology and medical microbiology*, 50(3), pp.333–41.

46. Shiloach, J. and Rinas, U. (2009). Glucose and Acetate Metabolism in E. coli – System Level Analysis and Biotechnological Applications in Protein Production Processes. *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*, pp.377–400.
47. Struhl, K. (1991). Subcloning of DNA Fragments. *Current Protocols in Molecular Biology*, 13(1), pp.3.16.1-3.16.2.
48. Therapeutic Vaccines: A New Revolution. (2015). *Journal of Pharmacovigilance*, 03(01).
49. Uniprot.org. (2019). *TSA-1 - Trypomastigote surface glycoprotein - Trypanosoma cruzi - TSA-1 gene & protein*. [Página Web] Disponible en: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q26971>
50. Vaccine-safety-training.org. (2019). *MODULE 1 – Types of vaccine - WHO Vaccine Safety Basics*. [Página Web] Disponible en: <https://vaccine-safety-training.org/types-of-vaccine-overview.html>
51. Vacunas. (2016). *Organización Mundial de la Salud*. [Página Web] Disponible en: <http://www.who.int/topics/vaccines/es/>

11. ANEXOS

11.1. ANEXO 1. GEL DE ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SDS-PAGE:

1. El gel de poliacrilamida se elabora añadiendo:

Gel separador	10%
Agua estéril	1.6 mL
Acrilamida	2 mL
Tris-HCl pH 8.0, 1M	1.3 mL
SDS 10%	50 µL
PSA 10%	50 µL
TEMED	10 µL
Gel concentrador	5%
Agua estéril	1.4 mL
Acrilamida	330 µL
Tris-HCl pH 8.0, 1M	250 µL
SDS 10%	20 µL
PSA 10%	20 µL
TEMED	5 µL

11.2. ANEXO 2. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES:

1. Descongelar el vial de células competentes (DH5α) crio preservadas en hielo frío.
2. Mezclar 50 µL de células competentes con 1 µL de ADN plásmidico.
3. Incubar en hielo por 30 minutos.
4. Dar un choque térmico con un baño de agua caliente a 42° C por 45 segundos seguido de 3 minutos en hielo frío.
5. Adicionar 450 µL de medio LB estéril (Anexo 17).
6. Incubar a 37° C a 200 RPM por 1 hora y 30 minutos.
7. Plaquear 50 µL de células transformadas en una caja Petri con medio LB con Kanamicina (100 mg/µL).
8. Incubar toda la noche a 37° C.

11.3. ANEXO 3. EXTRACCIÓN DE VECTOR:

El protocolo de extracción del kit con modificaciones: "ADN Fast-n-Easy Mini-Prep Kit" de Jena Bioscience.

1. Centrifugar el medio de cultivo a 13000 RPM a 4° C
2. Resuspender el pellet en 300 µL de Buffer de Lisis con pipeteo.
3. Añadir 300 µL de Buffer de Neutralización e invertir el tubo suavemente 6 veces. (El color de la mezcla debe tornarse amarillo brillante indicando un pH óptimo para la unión del ADN a la columna de unión).
4. Centrifugar a 13000 RMP a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Colocar una columna de unión en un tubo de 2 mL de recolección y añadir 100 µL de Buffer de Lisis.
6. Centrifugar la columna de unión con el tubo por 1 minuto y descartar el sobrenadante.
7. Pasar la columna de unión a un tubo de recolección nuevo de 2 mL.
8. Añadir 500 µL de Buffer de Lavado a la columna de unión.
9. Centrifugar por 1 minuto y descartar el sobrenadante.
10. Realizar un segundo lavado añadiendo 700 µL de Buffer de Lavado.
11. Centrifugar por 2 minutos y descartar el sobrenadante.
12. Centrifugar nuevamente por 1 minutos y descartar el sobrenadante restante.
13. Colocar la columna de unión en un tubo de 1.5 mL
14. Añadir 30 µL de agua estéril precalentada a 60° C.

11.4. ANEXO 4: ELECTROFORESIS DE ADN:

1. Limpiar la cámara de electroforesis adecuadamente, cubrir el molde en las secciones abiertas con cinta y colocar en la cámara.
2. Preparar el buffer de electroforesis (TBE al 0.5 X).

Buffer	Volumen (1 L)
TBE 5X	54 g Tris base
	27.5 g Ácido bórico
	20 mL de EDTA 0.5 M (pH 8.0)

- Preparar la solución de agarosa en buffer de electroforesis a una concentración apropiada de agarosa para separar los fragmentos de ADN muestra.

Concentración de Agarosa en Gel (% P/V)	Rango de separación de moléculas de ADN lineales (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

- Calentar la solución de agarosa en un baño de agua caliente o en un microondas hasta que la agarosa se halla disuelto totalmente.
- Una vez que la agarosa se halla enfriado lo suficiente para su manipulación, añadir el bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL (solo al volumen necesario para el molde de la cámara, este varía según el modelo de la cámara de electroforesis).
- Vaciar la solución de agarosa al molde y colocar el peine para la formación de pozos.
- Dejar enfriar y gelificar a temperatura ambiente por 30-45 minutos, remover el peine con mucho cuidado y añadir el buffer de electroforesis a la cámara hasta cubrir el gel en su totalidad.

8. Mezclar las muestras de ADN con 0.20 volúmenes de buffer de carga y mezclar pipeteando con una micro pipeta automática.
9. De forma lenta colocar con una micro pipeta automática las muestras mezcladas en los pocillos del gel de agarosa.
10. Correr el gel a un voltaje y tiempo determinado.

11.5. ANEXO 5. PURIFICACIÓN DE ADN:

El protocolo de extracción del kit con modificaciones: Agarose Gel Extraction Kit de Jena Bioscience.

1. Escisión del gel
 - a) Cortar el área que contiene el fragmento de ADN.
 - b) Transferir el fragmento a un tubo de 1.5 mL.
2. Preparación de la muestra
 - a) Añadir 300 µL de Buffer de Extracción por cada 100 mg de gel.
 - b) Incubar a 60° C por 10 minutos con una mezcla ocasional.
 - c) Para fragmentos de ADN mayores a 5000 pb añadir un volumen de isopropanol.
3. Activación de la columna
 - a) Colocar una columna de recolección en un tubo de 2 mL.
 - b) Añadir 100 µL de Buffer de Activación.
 - c) Centrifugar a temperatura ambiente por 30 segundos.
4. Cargar la columna
 - a) Agregar la solución tratada anteriormente.
 - b) Centrifugar a temperatura ambiente por 30 segundos.
5. Lavado de la columna
 - a) Colocar la columna de recolección con el ADN en un tubo nuevo de 2 mL.
 - b) Agregar 700 µL de Buffer de Lavado.
 - c) Centrifugar por 30 segundos y descartar el sobrenadante.
 - d) Centrifugar por 2 minutos y remover los residuos del buffer de lavado.
 - e) Esperar a que el etanol se evapore completamente.
6. Elución

- a) Colocar una columna en un tubo nuevo de 1.5 mL.
- b) Añadir 30 µL de agua estéril precalentada a 60° C.
- c) Incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
- d) Centrifugar 1 minutos para eluir el ADN.

11.6. ANEXO 6. DIGESTIÓN ENZIMÁTICA:

1. En reacciones de 50 µL se agregan los reactivos en las siguientes concentraciones:

Para obtención de inserto TSA-1:

Reactivo	Concentración final
CutSmart Buffer (10x)	1X
H ₂ O	Aforar a un volumen de 50 µL
Vector pET-41 a(+)	1 ug
Enzima <i>NdeI</i>	1 unidad de enzima por 1 µg ADN
Enzima <i>XhoI</i>	1 unidad de enzima por 1 µg ADN

Para obtención de vector pCri-1b:

Componente	Concentración final
CutSmart Buffer (10x)	1X
H ₂ O	Aforar a un volumen de 50 µL
Vector pCri-1b	1 ug
Enzima <i>NdeI</i>	1 unidad de enzima por 1 µg ADN
Enzima <i>XhoI</i>	1 unidad de enzima por 1 µg ADN

2. Incubar por 5 horas a una temperatura controlada de 37° C e inactivar la actividad enzimática a 65° C por 20 minutos.
3. Resguardar a 4° C para su posterior uso.

11.7. ANEXO 7. DESFOSFORILACIÓN CON FOSFATASA ALCALINA:

Enzima fosfatasa alcalina el laboratorio New England BioLabs.

1. Para una reacción de 20 μ L añadir:

Componente	Cantidad
ADN	1 pmol de ADN terminal (1 pmol de fragmento ADN terminal equivale de 1 μ g de vector de 3 kb)
CutSmart Buffer (10X)	2 μ L
CIP	1 unidad
H ₂ O	Aforar a un volumen de 20 μ L

2. Incubar a 50° C por una hora e inactivar la actividad enzimática incubando a 65° C por 20 minutos.

11.8. ANEXO 8. REACCIÓN DE LIGACIÓN:

1. Calcular la cantidad de ADN necesario para mantener una relación molar 3:1 de inserto y vector en los extremos cohesivos.
2. Para una reacción de 20 μ L añadir:

Componente	Concentración	Control de Religación (pCri-1b)	Ligación (pCri-1b + TSA-1)
H ₂ O	-	Aforar a 20 μ L	Aforar a 20 μ L
Buffer Ligasa T4	10X	1X	1X
Vector	-	5 ng/ μ L (Total=100 ng)	5 ng/ μ L (Total=100 ng)
Inserto	-	-	5 ng/ μ L (Total=100 ng)

3. Incubar a 65° C las reacciones por 5 minutos.

4. Añadir 2 μL de la enzima ligasa T4 (400 U/ μL).
5. Incubar a 16° C por 16 horas e inactivar la actividad enzimática a 65° C por 20 minutos.
6. Transformar las células con la reacción de ligación inmediatamente o resguardar a -20° C.

11.9. ANEXO 9. PREPARACIÓN DE CRIO VIALES:

Las cepas bacterianas pueden ser almacenadas indefinidamente a bajas temperaturas (-20° C y -80° C) en solución de glicerol entre 15 y 40 %. Las cepas se deben almacenar tan pronto como se obtengan.

1. Añadir 650 μL de cultivo de células en tubo Eppendorf.
2. Añadir 350 μL de glicerol estéril a una concentración del 10%
3. Homogeneizar los tubos por inversión suave.
4. Congelar a -80° C para preservar.

11.10. ANEXO 10. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES:

1. Descongelar el vial de células competentes (DH5 α) crio preservadas en hielo frío.
2. Mezclar 50 μL de células competentes con 1 μL de ADN vector.
3. Incubar en hielo por 30 minutos.
4. Dar un choque térmico con un baño de agua caliente a 42° C por 45 segundos seguido de 3 minutos en hielo frío.
5. Adicionar 450 μL de medio LB estéril (Anexo 17).
6. Incubar a 37° C a 200 RPM por 1 hora y 30 minutos.
7. Plaquear 50 μL de células transformadas en una caja Petri con medio LB con Kanamicina (100 mg/ μL).
8. Incubar toda la noche a 37° C.

11.11. ANEXO 11. PROTOCOLO DE INDUCCIÓN Y EXPRESIÓN CON IPTG:

1. Inocular en matraces de 50 mL de medio de cultivo 2TY (Anexo 18), con 50 μ L de Kanamicina a una concentración de 50 mg/ μ L. Las cepas de células transformadas e incubar a 37° C.
2. Medir la densidad óptica en diluciones 1/10 de cultivo/agua estéril a una longitud de absorción de D600 nm en el espectrofotómetro.
3. Cuando la densidad del cultivo llegue a una lectura entre 0.600 y 0.700 inducir con 50 μ L de IPTG 1M.
4. Incubar a 20° C toda la noche (12-16 horas).

11.12. ANEXO 12. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNA CON BUGBUSTER:

1. Centrifugar el cultivo a 13,000 RPM a 4° C
2. Desechar el sobrenadante y Resuspender el pellet a temperatura ambiente en 5 mL de reactivo BugBuster por cada 1 gramo de biomasa colectada.
3. Incubar la suspensión en agitación a 25° C por 20 minutos.
4. Centrifugar a 13,000 RMP a 4° C
5. Separar la pastilla del sobrenadante.
6. Analizar el sobrenadante y la pastilla en una electroforesis SDS-PAGE al 10% de acrilamida.

11.13. ANEXO 13. WESTERN BLOT:

1. Preparar 4 geles de poliacrilamida al 10%, 2 controles para SDS-PAGE y 2 para Western blot.
2. Cargar las muestras y correr por 20 minutos a 85 V, 3 horas a 115 V.
3. Recortar las membranas de nitrocelulosa.
4. Colocar el gel en la siguiente disposición: Esponja → Papel Filtro → Gel de Poliacrilamida → Membrana Nitrocelulosa → Papel Filtro → Esponja
5. Sumergir el sándwich en una charola con Buffer de Transferencia:

Buffer	Volumen (1 L)
Buffer Transferencia	25 Mm Tris
	0.2 M Glicina
	20% Metanol

- Cerrar soporte, colocar en una cámara de electroforesis en hielo y adicionar Buffer de Transferencia dentro de la cámara como Buffer de corrimiento.
- Correr en frío por 30 minutos a 60 V y por 1 hora a 90 V.
- Extraer la membrana de nitrocelulosa con pinzas, marcar el peso molecular en la membrana con lápiz, colocarla en un recipiente limpio y teñirla con Ponceau por 5 minutos en agitación.
- Lavar 3 veces con PBS 1X + Tween20 0.1%

Buffer	Volumen (1 L)
PBS 10X	80 g NaCl
	2 g KCl
	14.4 g Na ₂ HPO ₄
	2.4 g KH ₂ PO ₄

- Dejar en agitación continua a 4° C toda la noche (<16 horas) con PBS 1X + Tween20 0.1% + 10% de leche en polvo deslactosada.
- Lavar la membrana con solución con PBS 1X + Tween20 0.1% + 10% de leche en polvo deslactosada y desechar la solución.
- Adicionar leche en polvo deslactosada al 5% con PBS 1X + Tween20 0.1% y añadir los anticuerpos en una relación 1:5000 para anti-tsa o 1:10000 para anti-his.
- Añadir cuidadosamente PBS 1X + Tween20 0.1% + 5% leche en polvo deslactosada.
- Incubar toda la noche (<16 horas) a 4° C en agitación.
- Añadir el anticuerpo secundario en una relación 1:3000 y revelar membrana.

11.14. ANEXO 14. REVELADO DE LA MEMBRANA DE WESTERN BLOT POR HRP:

1. Lavar la membrana con 10 mL de Buffer TBS 1X hasta que quede limpia.

Buffer	Volumen (1 L)
TBS 10X	20 Mm Tris
	50 Mm NaCl

2. Preparar por cada 10 mL de TBS - 2 mL de HRP.

Solución	Volumen (1 L)
TBS + HRP	10 mL TBS
	2 mL HRP
	2 mL Metanol
	6 mg 4CN
	60 uL H ₂ O ₂ al 3%

3. Añadir la preparación de TBS + HRP a la membrana. Dejar revelando un periodo no superior a 45 minutos (si la solución se precipita, cambiarla durante el proceso de revelado).
4. Detener la reacción del revelado con agua estéril agitando por 10 minutos.

11.15. ANEXO 15. REVELACIÓN MEMBRANA DE WESTERN BLOT POR SUPERSIGNAL DE BIORAD:

1. Colocar la membrana nitrocelulosa sobre papel acetato.
2. Añadir reactivo SuperSignal con una pipeta lo suficiente para recubrir la membrana.
3. Colocar inmediatamente papel acetato sobre la membrana de nitrocelulosa.
4. Leer en el fotodocumentador.

11.16. ANEXO 16. PCR PARA AMPLIFICACIÓN DE ADN:

1. Desnaturalización: Llevar la reacción a una temperatura de 90° C por 30 segundos. Ayuda a la muestra de ADN a romper los puentes de hidrogeno y a linealizar las moléculas de ADN.
2. Alineamiento: Llevar la reacción a 30 ciclos de 95° C por 1 minuto + 72° C por 2 minutos. Ayuda al alineamiento de los oligos al ADN.
3. Extensión: Llevar la reacción a 72° C por 7 minutos. Ayuda al ADN polimerasa para sintetizar las cadenas de ADN nuevo.

Para preparar una reacción de 50 uL:

Componentes	Cantidad/Concentración
pADN	50 ng
Buffer	1x
MgCl 2 mM	2 mM
dNTPs	1 mM
Oligo 1	10 pM
Oligo 2	10 pM
KappaTaq	1U

11.17. ANEXO 17. MEDIO DE CULTIVO LB (1L):

1. En agua destilada añadir:

Componente	Cantidad
Triptona o Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar (Medio de cultivo sólido)	15 g

2. Ajustar pH a 7.5 con una solución de NaOH 10 N.
3. Esterilizar a 121° C a 1 atm por 1 hora.

4. Añadir Kanamicina a una concentración final de 50 ng/ μ L.

11.18. ANEXO 18. MEDIO DE CULTIVO 2TY (1L):

1. En agua destilada añadir:

Componente	Cantidad
Tryptona	16 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g

2. Ajustar pH a 7.0 con una solución de NaOH 10 N
3. Esterilizar a 121° C a 1 atm por 1 hora.