

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**“EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y PURIFICACIÓN
DE LA LIPOPROTEÍNA PipE DE
Mannheimia haemolytica”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA



PRESENTA

ALVARO DE OBESO FERNÁNDEZ DEL VALLE

Las Agujas, Zapopan, Jalisco a 23 de julio de 2009

UNIVERSIDAD

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Tecnología Biológica de México S.A. de C.V. y en el Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural del Instituto de Neurobiología, del Departamento de Biología Celular y Molecular del CUCBA, bajo la dirección del Dr. Daniel Ortuño Sahagún y con la asesoría de la Dra. Beatriz Flores Samaniego y del Biólogo José Pedro Castruita Dominguez. Es parte de los productos de un proyecto apoyado por el CONACYT (Registro: ECO-2007-C01-71496)

 **BIBLIOTECA**  **REBI**
RED DE BIBLIOTECAS
UNIVERSIDAD
DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
No. de adquisición: 061658
Fecha: 25/ Mayo/ 2011
Precedencia: donación
No. de código de barras Buc- 061658

N.S 357895

N.O 146597

TESIS CUORA

11/11/11



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1479/ C. C. BIOLOGÍA

C. ALVARO DE OBESO FERNANDEZ DEL VALLE

PRESENTE

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **Tesis e Informes** opción Tesis con el título: **“Expresión heterológica y purificación de la lipoproteína PlpE de *Mannheimia haemolytica*”** para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicho trabajo al: **Dr. Daniel Ortuño Sahagún** y como asesores a la **Dra. Beatriz Flores Samaniego** y al **Biol. José Pedro Castruita Domínguez**.

Sin más por el momento, le envío un afectuoso saludo.

ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
“2009, AÑO DEL BICENTENARIO DE CHARLES DARWIN”
Las Agujas, Zapopan., 02 de abril del 2009.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

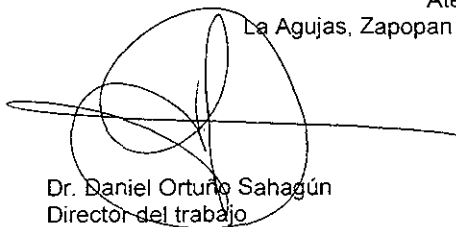
Dra. Georgina A. Quiroz Rocha.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Licenciatura en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad Tesis e informes, opción tesis con el título: **"Expresión heteróloga y purificación de la lipoproteína PlpE de Mannheimia haemolytica"** que realizó el pasante Álvaro de Obeso Fernández del Valle con número de código B04008863 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.

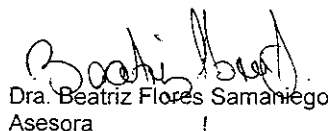
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente

La Agujas, Zapopan Jalisco a 6 de julio de 2009



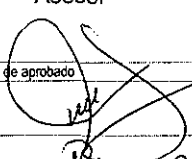
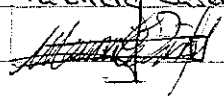
Dr. Daniel Ortúño Sahagún
 Director del trabajo



Dra. Beatriz Flores Samaniego
 Asesora



Biól. Pedro Castruita Domínguez
 Asesor

Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
ROSA MARIA DOMINGUEZ ARIAS		13 Julio/2009
Veronica Palomera Avalos	Veronica Palomera G	13 Julio 2009
Dra Patricia Castro Felix	Patricia Castro	13 Julio 2009
Supl. Mónica Ortega		15/Jul/09

70.80
 161

Contenido

Agradecimientos.....	v
Resumen	vii
Abreviaturas	ix
Introducción	1
Complejo respiratorio bovino	1
Antecedentes.....	3
<i>Mannheimia haemolytica</i>	3
La lipoproteína PlpE.....	4
Planteamiento del problema.....	7
Justificación.....	9
Hipótesis.....	11
Objetivos	13
Objetivo General.....	13
Objetivos particulares.....	13
Diagrama experimental	15
Material y métodos.....	17
Cepas bacterianas	17
Vectores	17
Medios de cultivo	19

Diseño de oligonucleótidos	20
Electroforesis de ácidos nucleicos.....	21
Extracción de DNA genómico	21
Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	21
Preparación de bacterias competentes.....	22
Clonaje en vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen).....	23
Transformación de bacterias competentes.....	23
Extracción del DNA plasmídico	24
Secuenciación del DNA plasmídico	25
Obtención de productos de PCR clonados en pCR 2.1 TOPO	26
Clonaje en vector de expresión pQE30-Xa	26
Inducción de la expresión de la proteína recombinante ..	26
Cuantificación de proteínas	27
Análisis por electroforesis (SDS-PAGE) de la proteína recombinante	27
Purificación de la proteína	28
 Resultados	 29
Diseño de oligonucleótidos.....	29
Extracción de DNA genómico	29
Amplificación de <i>p/pE</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
Transformación de bacterias competentes.....	31
Secuenciación de DNA plasmídico	33
Inducción de la expresión de la proteína PlpE recombinante y análisis por electroforesis (SDS-PAGE) de la proteína de fusión	35
Purificación de la proteína de fusión PlpE.....	36
 Discusión.....	 39
 Conclusiones.....	 43
 Referencias	 45

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a la Dra. Beatriz Flores Samaniego y al Dr. Daniel Ortuño, por darme la oportunidad y la confianza para realizar este trabajo, así como ser guías en su realización junto con el Biol. Pedro Castruita. Agradezco también a todos aquellos que me auxiliaron con su tiempo, trabajo y conocimiento: Carolina Guzmán, Saray Quintero, Aida Silva, Ana Laura Rodríguez y Ángel González. Agradezco en general a laboratorios BIO-ZOO por el apoyo para desarrollar la investigación. Agradezco a todas las personas del CUCBA, principalmente profesores, que me ayudaron durante estos más de 4 años de estudios. Agradezco a mi familia.

Resumen

El complejo respiratorio bovino (CRB) es el término general empleado para denominar a la neumonía que se presenta durante el transporte del ganado o cuando se encuentran bajo condiciones de estrés. Existen diversos factores involucrados en la etiología de la enfermedad, sin embargo el principal agente patógeno involucrado en los casos agudos es la bacteria Gram negativa *Mannheimia haemolytica*. Este patógeno posee diversos factores de virulencia capaces de activar el sistema inmune, de los cuales destaca una lipoproteína de la membrana externa denominada PlpE. Debido a las desventajas que implica utilizar bacterias Gram negativas completas para el desarrollo de vacunas, en el presente trabajo se buscó obtener una proteína PlpE recombinante capaz de estimular al sistema inmune contra *M. haemolytica*. El gen *plpE* se amplificó por medio de PCR y se clonó en el vector pCR 2.1 TOPO. Una vez verificada su secuencia, el amplicón fue subclonado en el vector de expresión pQE30-Xa. Los clones con la construcción se cultivaron en medio con IPTG para su inducción. Una vez comprobada la sobre expresión de la proteína PlpE recombinante, se purificó el homogenado bacteriano para separar la proteína recombinante del resto de las proteínas. Con la proteína recombinante purificada se realizarán posteriormente pruebas de inmunogenicidad lo cual servirá para la elaboración de una vacuna polivalente.

Abreviaturas

6xHis-Tag	Etiqueta de 6 histidinas
°C	Grados centígrados
CRB	Complejo respiratorio bovino
g	Gramo
h	Hora
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido
kb	Kilobases
kDa	Kilodaltons
Medio LB	Medio Luria Bertani
Medio SOC	Medio enriquecido “ <i>Super optimal broth with catabolite repression</i> ”.
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitro
Ni-NTA	Níquel-Nitrilotriacético
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
PBS	“ <i>Phosphate-buffered saline</i> ”, solución salina amortiguada por <i>fosfatos</i>
PCR	“ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”, Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular

rpm	Revoluciones por minuto
SDS	“ <i>Sodium dodecyl sulfate</i> ”, dodecilsulfato de sodio
s	Segundos
T.A.	Temperatura ambiente
TAE	Amortiguador con tris, ácido acético y EDTA
TE	Amortiguador con tris y EDTA
Tm	“ <i>Melting temperature</i> ”, temperatura de hibridación

Introducción

Complejo respiratorio bovino

El complejo respiratorio bovino (CRB) o fiebre de embarque es el término general empleado para denominar a la neumonía que se presenta durante el transporte del ganado o cuando se encuentran bajo condiciones de estrés. El CRB es la enfermedad más común durante las dos semanas posteriores al destete, tiempo durante el cual los terneros enfrentan una etapa de elevado estrés. Lo anterior debido a que durante este período los terneros serán castrados, manejados extensivamente y embarcados a diversos lugares. Adicionalmente, estarán expuestos a los diversos agentes infecciosos que provocan el CRB. El estrés tiene un efecto negativo en el sistema inmune, lo que provoca que los terneros sean más susceptibles a infecciones por varios agentes (McClanahan, 2007).

Diversos estudios han mostrado que alrededor de una cuarta parte del ganado presenta algún tipo de enfermedad respiratoria durante el primer año de vida (Muggli-Cockett *et al.*, 1992). Además, se ha establecido que cerca del 70% del ganado que es removido del sistema de producción de carne o de engorda intensivo por enfermedad se debe al CRB (Nyamusika *et al.*, 1994). En 1988, se encontró en el ganado de carne bovino que el 64% de los animales mostraron evidencias de neumonía. De estos casos, el 75% correspondieron a la fiebre de embarque (Trigo, 1987). Las causas del CRB son múltiples y complejas, pero los

factores de estrés, infecciones virales e infecciones bacterianas, se encuentran casi siempre presentes en los casos severos (tabla 1).

Las enfermedades por infecciones en el tracto respiratorio incrementan las pérdidas por muerte, además de generar elevados costos por la medicación, labor y baja en la producción (Bagley, 1997). La prevención del CRB, más que su tratamiento, es el objetivo primordial en el manejo de la salud del ganado bovino (McClanahan, 2007).

Tabla 1

Factores desencadenantes del complejo respiratorio bovino (CRB)

Factores de estrés	Agentes virales	Bacterias
Calor	PI3	<i>Pasteurella multocida</i>
Frío	IBR	<i>Mannheimia haemolytica</i>
Polvo	BVD	<i>Histophilus somni</i>
Lesiones	BRSV	otros
Fatiga	Adenovirus	
Deshidratación	Rhinovirus	
Hambre	Herpesvirus IV	
Ansiedad	Enterovirus	
Gases irritantes	MCF	
Nutrición deficiente	Reovirus	
Cirugía		

Modificado de Bagley (1997)

Antecedentes

Mannheimia haemolytica

El principal agente patógeno involucrado en los casos agudos de CRB es *Mannheimia haemolytica*, la cual suele presentarse como una infección secundaria (Hodgson *et al.*, 2005). *M. haemolytica* suele ser un habitante común de la microbiota del ganado y se le puede encontrar en la parte superior del tracto respiratorio. Ante situaciones de estrés, como las ya mencionadas, puede viajar hasta los pulmones y provocar neumonía. Su diseminación se puede dar por contacto directo o por la ingestión de comida o agua contaminada por descargas nasales u orales del ganado infectado. Es por eso que las bacterias pueden diseminarse fácilmente entre el ganado, especialmente cuando existe una gran cantidad de terneros en un solo lugar (Irsik, 2007).

Mannheimia haemolytica es un cocobacilo Gram-negativo cuya clasificación taxonómica es: **Dominio**-Eubacteria; **Phylum**-Proteobacteria; **Clase**-Gammaproteo-bacteria; **Orden**-Pasteurellales; **Familia**-Pasteurellaceae; **Género**-*Mannheimia* (NCBI, Taxonomy Browser, 2009)

La bacteria ha sido sujeta a extensa reclasificación en el pasado debido a su heterogeneidad. Primero nombrada *Bacterium bipolare multocidum* en 1885, y posteriormente *Pasteurella haemolytica* en 1932. Esta se dividía en 2 biotipos. El biotipo A, capaz de

fermentar la L-arabinosa y el biotipo T, que fermenta trehalosa; juntos incluían 17 serovariedades (Zecchinon *et al.*, 2005). En 1990 se reclasificó el biotipo T (que incluía 4 serovariedades) en *Pasteurella trehalosi* (Bingham *et al.*, 1990). De los 13 serotipos del biotipo A, en 1997 se descubrió que el serotipo 11 representaba una especie diferente (Davies *et al.*, 1997). Finalmente en 1999, se reclasificó la especie siendo colocada en el género *Mannheimia*, y nombrada *M. haemolytica*, mientras *M. multocida* fue el nombre para el que anteriormente era el serotipo 11 (Angen *et al.*, 1999).

Mannheimia haemolytica posee diversos factores de virulencia, entre los que se incluyen la cápsula, proteínas de membrana externa, neuroaminidasas, adhesinas y leucotoxinas (Gioia *et al.*, 2006). Diversos estudios han demostrado que el principal factor de virulencia es la leucotoxina (Zecchinon *et al.*, 2005), la cual provoca una respuesta inflamatoria que puede causar un edema intenso y necrosis en el ganado infectado (Jeyaseelan *et al.*, 2002). Una vez establecida la infección, los animales generan anticuerpos específicos contra algunas de las proteínas, de las cuales la leucotoxina y diversas proteínas de membrana externa han demostrado ser capaces de inducir inmunidad (Mosier *et al.*, 1989; Pandher *et al.*, 1998). Los mecanismos utilizados en la generación de anticuerpos relacionados con la superficie de *M. haemolytica* no se han identificado aún.

La lipoproteína PlpE

El ganado que ha desarrollado inmunidad contra *Mannheimia haemolytica* presenta anticuerpos contra una lipoproteína de membrana externa de 45 kDa de peso molecular (PM) aparente, que ha sido designada como PlpE, dichos anticuerpos contribuyen a la identificación y eliminación, mediada por el complemento, de la bacteria *M. haemolytica*. Con base en su secuencia, esta proteína presenta un peso molecular teórico de 39.1 kDa (Pandher *et al.*

1998). La diferencia entre los dos datos anteriores puede ser causada por la gran cantidad de prolina que posee la PlpE, ya que se ha observado que este aminoácido suele provocar una migración un poco más lenta cuando las proteínas se resuelven en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE; Postle, 1990). El gen *plpE* presenta un marco de lectura abierto de 1,068 nucleótidos, equivalente a 356 aminoácidos, el cual inicia con el codón GTG, siendo el único gen de la especie *haemolytica* con estas características (Pandher *et al.*, 1998).

La PlpE es una lipoproteína inmunogénica que se encuentra expuesta en la superficie de la bacteria. Presenta básicamente tres regiones que incluyen un péptido señal, una región de repeticiones de hexapéptidos ricos en glutamina y el dominio característico de las lipoproteínas bacterianas de membrana (figura 1). La parte expuesta corresponde a un epítipo inmunodominante que se encuentra en la región denominada R2, la cual corresponde a los aminoácidos 37 al 79 y que ha demostrado ser de gran importancia para la estimulación de anticuerpos capaces de inmunizar contra *Mannheimia haemolytica* (Ayalew *et al.*, 2004), inclusive en serotipos distintos (Confer *et al.*, 2005). La utilización de una proteína PlpE recombinante para la producción de vacunas posiblemente pueda eliminar los efectos secundarios de las vacunas polivalentes que utilizan bacterias Gram negativas completas (Ellis y Yong, 1997).

PlpE 356 aa

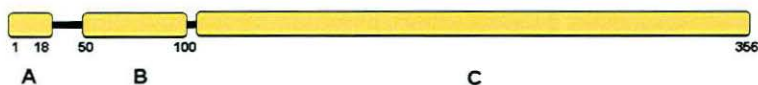


Figura 1. Estructura de dominios de la PlpE correspondiente a 356 aa. **A)** péptido señal, **B)** repeticiones de hexapéptidos ricos en glutamina, **C)** dominio de lipoproteína bacteriana.

Planteamiento del problema

El complejo respiratorio bovino (CRB) es una enfermedad con grandes repercusiones económicas a nivel mundial (Trigo, 1987; Muggli-Cockett *et al.*, 1992; Nyamusika *et al.*, 1994). En el mercado, la gran mayoría de las vacunas que buscan su prevención son polivalentes. Sin embargo, se ha observado que existen reacciones adversas al aplicar bacterinas formuladas con combinaciones de bacterias Gram negativas (Ellis y Yong, 1997), debido principalmente a la presencia de endotoxinas (Henderson y Wilson, 1995) las cuales pueden producir reacciones fisiológicas adversas cuando son administradas al ganado, tales como edemas, choque sistémico y abortos; por lo que es de gran importancia el desarrollo de formulaciones de vacunas que eviten dichos efectos adversos (Cullor, 1992).

Justificación

Dado que las bacterinas actuales producen efectos adversos en el ganado bovino, es necesario mejorar dicha vacuna con la finalidad de obtener un producto de mejor calidad que genere una protección inmune eficaz y que no produzca los efectos colaterales de las vacunas actualmente disponibles. Se ha demostrado que la lipoproteína PlpE es capaz de desarrollar inmunidad contra *Mannheimia haemolytica*, proporcionando una opción para el desarrollo de una vacuna recombinante contra el complejo respiratorio bovino.

Hipótesis

Es posible obtener y purificar la proteína recombinante PlpE de *Mannheimia haemolytica* mediante la expresión heteróloga en *E. coli*.

Objetivos

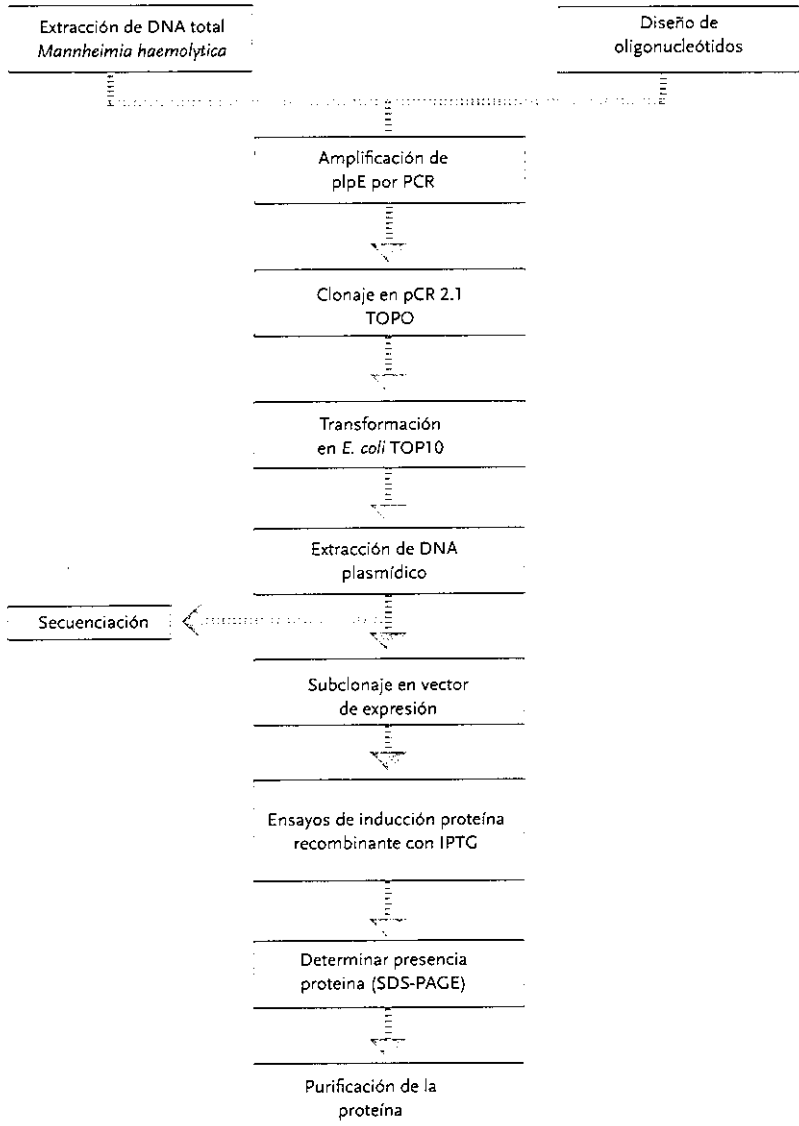
Objetivo General

Obtener la proteína recombinante PlpE de *Mannheimia haemolytica*.

Objetivos Particulares

1. Diseñar los oligonucleótidos para lograr amplificar la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína PlpE a partir del genoma de *M. haemolytica*.
2. Clonar el amplicón de la PlpE, verificado por secuenciación, en el vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa.
3. Demostrar la sobre expresión y purificación de la proteína recombinante PlpE.

Diagrama experimental



Material y métodos

Cepas bacterianas

1. *Mannheimia haemolytica*, serotipo 1 (ATCC).
2. *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Se empleó para la transformación con el vector pCR 2.1 TOPO
Genotipo: F-*mcrA* *.(mrr-bsdRMS-mcrBC)* *ö80lacZ.M15* *.lacX74 recA1 araD139 .(aralen)* 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*
3. *E. coli* JM109 (Stratagene). Se empleó para la replicación del vector de expresión pQE-30Xa.
Genotipo: *e14- (McrA-)* *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17* *(rK- mK+)* *supE44 relA1 .(lac-proAB)* [F' *traD36 proAB lacI-qZ.M15*].
4. *E. coli* M15 (QIAGEN). Se empleó para los ensayos de inducción de la proteína recombinante con el vector de expresión pQE-30Xa.
Fenotipo: NaIS, StrS, RifS, Thi-, Lac-, Ara+, Gal+, Mtl-, F-, RecA+, Uvr+, Lon+.

Vectores

1. pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) Se utilizó para clonar los productos de la PCR. El vector está linealizado con una timina libre en cada extremo 3' para permitir la clonación T-A.

Además, cuenta con una Topoisomerasa I, unida covalentemente al vector, que ligará el fragmento de PCR al vector (figura 2).

2. pQE30-Xa (QIAGEN) Se utilizó para la expresión intracelular y purificación posterior de la proteína recombinante. La principal característica de este vector consiste en añadir una secuencia de 6 histidinas acompañada por una secuencia de corte identificada por el factor Xa. Además, el vector posee el promotor T5 de fago y 2 operones lac para asegurar la represión de dicho promotor. Adicionalmente, presenta un sitio de clonación múltiple, codones de paro de la transcripción y el gen β -lactamasa, que provee resistencia a la ampicilina (figura 3).

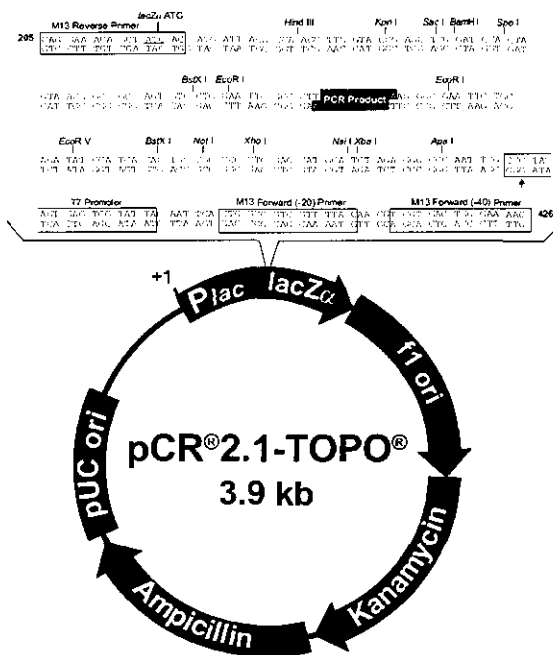


Figura 2. Vector pCR 2.1-TOPO, empleado para la clonación del amplicón del gen *pIpE* generado por PCR.

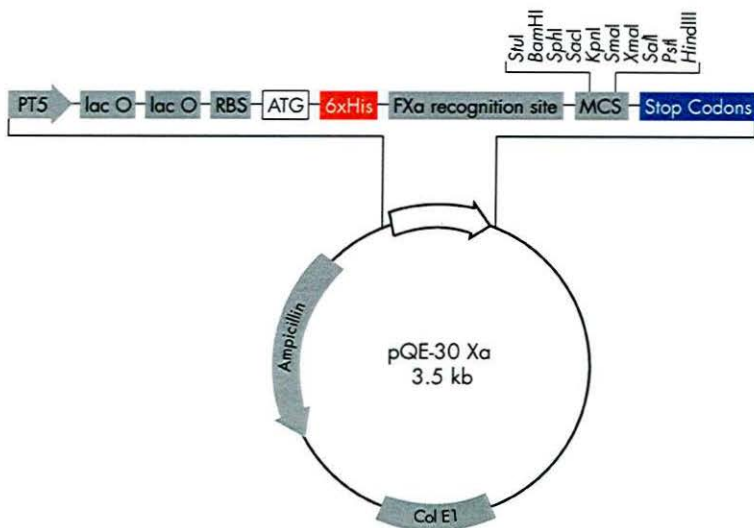


Figura 3. Vector de expresión pQE-30 X α , en el cual se subclona el producto previamente amplificado por PCR del gen *plpE*.

Medios de cultivo

- Medio LB para el crecimiento de células competentes. Contiene por cada litro: triptona de caseína (10 g), extracto de levadura (5 g) y NaCl (10g); pH=7.0. Se esteriliza a 121°C por 15 min. En el caso del medio sólido, se agregaron 15 gramos de agar bacteriológico (Sambroock y Russel, 2001).
- Medio LB con ampicilina. Se preparó medio LB, y se le añadieron 100 μ g/ml de ampicilina a T. A.
- Medio SOC. Contiene por cada litro: triptona de caseína (20 g), extracto de levadura (5 g), NaCl (0.5 g) y KCl 2.5 mM; pH=7.0. Se esterilizó a 121°C durante 15 min y cuando alcanzó una temperatura de aproximadamente 60°C, se le agregaron 20 ml de una solución de glucosa 1 M y antes de

ser utilizado se le agregaron 5 ml de una solución estéril de $MgCl_2$ 2 M (Sambroock y Russel, 2001).

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos se consideraron las siguientes reglas (Oriola, 1991):

1. Seleccionar secuencias en las que no abunden repeticiones de bases (poliuridinas o polipirimidinas), ya que contribuyen a la inespecificidad de la reacción. Procurar que el porcentaje de A-T y G-C sea aproximadamente del 50%.
2. Evitar secuencias que puedan formar estructuras secundarias por sí mismas, pues esto dificultaría la unión de los oligonucleótidos al DNA muestra y podría ocurrir una autoamplificación.
3. Comprobar en bancos de datos que las secuencias de oligonucleótidos elegidas no estén en otro lugar del genoma, lo que podría llevarnos a amplificar regiones no deseadas.
4. Comprobar que los oligonucleótidos, si no pueden ser 100% complementarios al DNA molde en toda su extensión, sí lo sean al extremo 3' por ser éste el lugar de unión de la *Taq* polimerasa.

El diseño de los oligonucleótidos para amplificar el gen *p/pE* se realizó tomando en consideración la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína. Además, se les insertaron los sitios de restricción *StuI* (para el oligonucleótido directo) y *HindIII* (para el oligonucleótido reverso) para facilitar su posterior clonaje.

Electroforesis de ácidos nucleicos

Para determinar la calidad y cantidad de los ácidos nucleicos se utilizaron geles de agarosa al 1% con amortiguador TAE 1X y teñidos con SYBR SAFE (Invitrogen). La electroforesis se realizó a 80 Volts.

Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico de *Manheimia haemolytica* se realizó utilizando el kit *Illustra bacteria genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del proveedor. El kit ha sido diseñado para obtener DNA genómico bacteriano con alto grado de calidad y pureza. Para liberar el DNA de las células bacterianas utiliza una solución de lisis en combinación con proteinasa K. El DNA es atrapado por una columna de sílica de la cual se libera con un amortiguador de elución precalentado, después de algunos lavados.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizaron amplificaciones por medio de una reacción de PCR en un gradiente de temperatura para establecer la T_m óptima. Las reacciones se prepararon de acuerdo a la tabla 2. Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 3.

Tabla 2
Mezcla de reacción para la amplificación del gen *p/pE*

Reactivo	Volumen	Concentración final
Tampón B	2.5 µl	1X
dNTPs	2.5 µl	0.25 mM
Oligonucleótido directo	2 µl	10 µM
Oligonucleótido reverso	2 µl	10 µM
TaqPol (Invitrogen)	0.4 µl	2 unidades
H ₂ O	13.6 µl	
DNA de <i>M. haemolytica</i>	2 µl	140 ng
Total	25 µl	

Tabla 3
Condiciones de amplificación de PCR

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Hibridación	50 a 66°C	1 min	30
Extensión	72°C	1 min	30
Extensión final	72°C	5 min	1

Se probó un gradiente de temperaturas de hibridación cada dos grados de 50 a 66°C para establecer la temperatura óptima de amplificación.

Preparación de bacterias competentes

Se prepararon bacterias competentes de las cepas M15 y JM109 de *E. coli* para transformación mediante el método de cloruro de calcio. El procedimiento se detalla a continuación (Sambroock y Russel, 2001).

1. Se tomaron 20 µl de un cultivo fresco y se transfirieron a un matraz de 250 ml con 50 ml de medio LB. Se incubó a 37°C

- durante 3h, hasta obtener una densidad óptica de entre 0.6 y 1.0 a 600 nm.
2. Se colectó el cultivo en tubos estériles de 50 ml enfriados previamente y se incubó el cultivo en hielo durante 10 min.
 3. Se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min, a 4°C.
 4. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 30 ml de una solución fría de MgCl₂- CaCl₂ (MgCl₂ 80 mM, CaCl₂ 20 mM)
 5. Se recuperaron las células por centrifugación a 4000 rpm por 10 min a 4°C, mediante la remoción del sobrenadante.
 6. Se resuspendió la pastilla en 2 ml de CaCl₂ 0.1 M.
 7. Se alicuotaron 100 µl de células competentes en tubos de 1.5 ml y se congelaron en hielo seco para ser almacenadas a -70°C.

Clonaje en vector pCR 2.1 TOPO (Invitrogen)

Se siguieron las instrucciones del proveedor, con las siguientes cantidades de reactivos: 3 µl de reacción de PCR, 1 µl de solución salina, 1 µl de vector pCR2.1 TOPO y 1 µl de agua. Se incubó durante 30 min a 23°C.

Transformación de bacterias competentes

Se transformaron las células competentes con el vector correspondiente mediante el siguiente protocolo (Sambroock y Russel, 2001):

1. A una alícuota de células competentes se le añadió la mezcla de ligación.
2. Se incubó 5 min en hielo. Posteriormente, se incubó a 42°C durante 40 seg.
3. Se incubó nuevamente en hielo durante 3 min.

4. Se agregaron 200 μl de medio SOC y se incubó durante 1 h a 37°C con agitación a 200 rpm.
5. Se sembraron 50 μl y 100 μl de las transformantes en placas de medio LB con ampicilina.
6. Se incubaron durante 16 h a 37°C.

Extracción del DNA plasmídico

Se realizaron extracciones plasmídicas de los diferentes vectores a partir de cultivos líquidos frescos, mediante el *kit Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), además de minipreparaciones por medio de lisis alcalina, para comparar el rendimiento en las extracciones. Dicho kit se utiliza para la extracción y purificación de plásmidos, mediante un método modificado de lisis alcalina y una membrana de sílica para atrapar el plásmido. Por medio de un amortiguador de elución se recupera el vector, en una cantidad adecuada para diferentes aplicaciones de biología molecular.

Las minipreparaciones de DNA se realizaron como se detalla a continuación (Birnboim y Doly, 1979).

1. Se centrifugaron (12,000 rpm / 1 min) 3 ml de cultivo crecido durante 16 horas del clon de interés y se eliminó el sobrenadante.
2. Se añadieron 200 μl de la solución I a 4°C. Se agitó en el vortex hasta homogenizar.
3. Se añadieron 400 μl de la solución II y se mezcló rápidamente por inversión (~10 veces). Se incubó en hielo durante 5 min.
4. Se añadieron 300 μl de la solución III a 4°C y se mezcló por inversión. Se incubó en hielo durante 5 min.
5. Se centrifugó a 12,000 rpm / 15min / 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

6. Se agregaron 50 μ l de RNasa (10 mg/ml) y se incubó durante 1 h a 37°C.
7. Se adicionó un volumen de fenol-cloroformo-álcool isoamílico (25:24:1) y se agitó en vortex durante 5 min.
8. Se centrifugó a 12,000 rpm / 15min / 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.
9. Se precipitó el plásmido con 1 volumen de isopropanol (agitando por inversión) y se mantuvo durante al menos 2 h a -20°C.
10. Se centrifugó a 12,000 rpm / 15min / 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 1 ml de Etanol al 70%.
11. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente durante 10 min.
12. Se resuspendió la pastilla en 10-50 μ l de amortiguador TE o agua desionizada.

Solución I: 50 mM glucosa, 25 mM TRIS-Cl (pH 8.0),
10 mM EDTA (pH 8.0)

Solución II: 0.2 N NaOH, 1% SDS

Solución III (para 100 ml): 5 M acetato de potasio, 11.5 ml
ácido acético glacial, 28.5 ml de H₂O.

Secuenciación del DNA plasmídico

Una vez extraídos los plásmidos con el fragmento de interés y almacenados en una concentración de 100 ng/ μ l, fue realizada su secuenciación por el método de Sanger, aplicado por Applied Biosystems (1986). Para la lectura de la secuencias se utilizó el secuenciador de tecnología capilar ABI Prism 310. El análisis y comparación de las secuencias, se realizó con el programa PSI-BLAST y consultas al GenBank del National Center for Biotech-

nology Information. El alineamiento de secuencias y su análisis se realizó mediante el software DNASTar.

Obtención de productos de PCR clonados en pCR 2.1 TOPO

Se digirió la construcción con las enzimas de restricción *StuI* y *HindIII*. El fragmento liberado fue purificado a partir del gel con el *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit permite purificar fragmentos de DNA de 50 pb hasta 10 kb a partir de geles de agarosa.

Clonaje en vector de expresión pQE30-Xa

Se llevó a cabo la ligación de los fragmentos purificados con el vector de expresión pQE30-Xa mediante el *Ligate-IT Rapid Ligation Kit* (USB). Este método permite reacciones de ligación que son incubadas por 10 min a T.A. con una proporción fragmento:vector (3:1).

Estas ligaciones se utilizaron para la transformación de células *E. coli* M15, como se detalla en el protocolo de transformación. Una vez obtenidas las transformantes, se eligieron 10 clones de los cuales se extrajo el plásmido por minipreparaciones para determinar cuales tenían el inserto.

Inducción de la expresión de la proteína recombinante

Se llevaron a cabo experimentos de expresión de la proteína recombinante de acuerdo a las indicaciones correspondientes al vector (QIAGEN, 2003):

1. Se inocularon 10 ml de medio LB con ampicilina y se incubaron a 37°C y 250 rpm durante toda la noche.
2. Se inocularon 50 ml de medio con 1 ml del precultivo y se incubó a 37°C y 250 rpm, hasta obtener una densidad óptica de 0.6 a 600 nm (entre 1 y 2 horas).
3. Se tomó una muestra de 1 ml antes de la inducción.
4. Se indujo la expresión de la proteína de fusión agregando IPTG a una concentración final de 1mM.
5. Se incubaron los cultivos durante 3 h. Se tomó una muestra de 1 ml cada hora, la cual se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 min. Se separó el medio de la pastilla.
6. Se centrifugó el resto del cultivo a 6,000 rpm durante 10 min y se separó la pastilla de células del medio.
7. Las muestras se congelaron a -20°C.

Todas las muestras obtenidas fueron tratadas posteriormente con una solución de PBS+SDS al 4%, y se incubaron en un baño maría durante 5 min. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 14,800 rpm durante 15 min, finalmente se rescató el sobrenadante con la proteína total.

Cuantificación de proteínas

Mediante el método de Lowry (1951) se cuantificó la cantidad de proteínas de las diversas alícuotas obtenidas de los ensayos de inducción, con un estándar de albúmina bovina.

Análisis por electroforesis (SDS-PAGE) de la proteína recombinante

La muestra (10 µg de proteína) se colocó en un tubo de 1.5 ml, junto con el amortiguador de carga 5X. Estas muestras se pu-

sieron en agua hirviendo durante 5 min, para desnaturalizar las proteínas. Posteriormente, fueron cargadas en el gel, la electroforesis se realizó a 120 Volts (a voltaje constante).

Posteriormente, el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 15 min. En seguida fue desteñido con solución I (metanol al 40%, ácido acético al 7% y agua) hasta que se resuelven las bandas. Finalmente, fue colocado en solución II (metanol al 4%, ácido acético al 7% y agua) para fotodocumentarlo y preservarlo.

Purificación de la proteína

La purificación de la proteína se llevó a cabo mediante una columna de ácido níquelnitrilotriacético (Ni-NTA) que es altamente afín a la secuencia de seis histidinas del extremo amino que el vector le agrega a la proteína de fusión (etiqueta 6xHis-tag).

Las bacterias fueron tratadas con un amortiguador de lisis (amortiguador B) para obtener y desnaturalizar la proteína. Posteriormente, la mezcla de lisado fue cargada en la columna de Ni-NTA, la cual fue lavada con 7.5 ml de amortiguador B (5 volúmenes con relación a la columna) y 7.5 ml de amortiguador C. Finalmente, la proteína se eluyó con dos diferentes amortiguadores. Se obtuvieron 9 fracciones con el amortiguador D (generalmente utilizado para monómeros) y 7 con el amortiguador E (utilizado para agregados o proteínas con más de una etiqueta 6xHis-tag).

Todos los amortiguadores están compuestos con los mismos reactivos: NaH_2PO_4 100 mM, Tris Cl 10 mM y urea 8 M. Sin embargo, el pH varía dependiendo del amortiguador, correspondiendo para el B un pH de 8.0, el C de 6.3, el D de 5.9 y el E de 4.5.

Resultados

Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron los siguientes oligonucleótidos a partir de la secuencia de *p/pE*:

Directo: 5'-AATAGGCCTTGCGGAGGAAGCGGTAGC-3'

Reverso: 5'-ATAAAGCTTATTTTCTTGCTAACCATTA-3'

Los oligonucleótidos de 27 y 29 nucleótidos (directo y reverso respectivamente), cuyo producto esperado es un fragmento de 1029 pb. Además los oligonucleótidos contienen los sitios de restricción *SmaI* y *HindIII*, para poder ser digeridos y clonados en fase en su respectivo vector.

Extracción de DNA genómico

Se obtuvo DNA genómico de *Mannheimia haemolytica* como se puede observar en la figura 4.

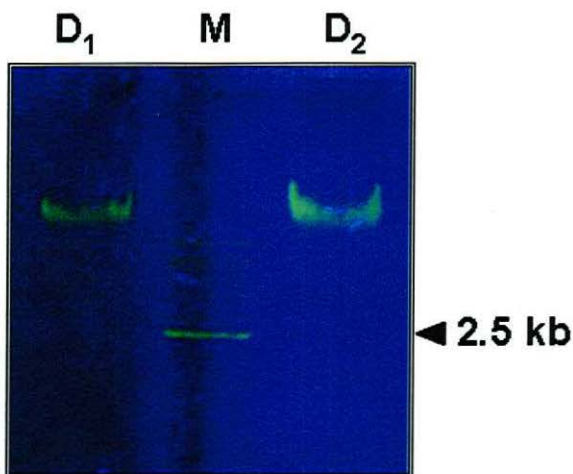


Figura 4. Extracción de DNA genómico de *Mannheimia haemolytica*. **D₁**) 1 µl dilución 1:100, **M**) marcador de tamaño molecular **D₂**) 2 µl dilución 1:100.

Amplificación de *plpE* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Usando como referencia la temperatura de alineamiento sugerida por el proveedor de los oligonucleótidos (68°C promedio entre ambos oligonucleótidos) y las establecidas por el programa computacional OligoCalculator (57°C; <http://www.pitt.edu/~rsup/OligoCalc.html>), se estableció un gradiente de 3 temperaturas preliminares: 57° C, 60° C y 63°C. Dado que las temperaturas establecidas por el proveedor eran altas, se tomó como punto de partida las obtenidas del programa.

De las 3 temperaturas empleadas, se observó que la ideal para la amplificación de la *plpE* es de 60°C. Dado que la banda esperada corresponde a 1029 pb se asumió que era el amplicón deseado. Los resultados de la amplificación a 60 °C se muestran en la figura 5.

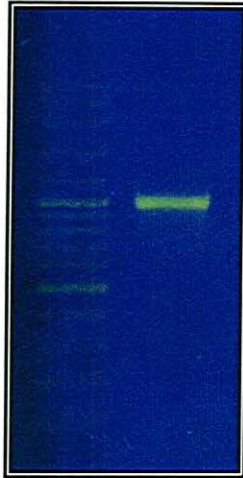


Figura 5. Amplificación de un fragmento del gen *p/pE* de 1029 pb

Transformación de bacterias competentes

Tanto las bacterias de la cepa *E. coli* TOP 10 como de la cepa M15 se lograron transformar eficazmente. Respecto a los clones en pCR 2.1 TOPO transformados en la cepa TOP10, se obtuvo un rendimiento muy alto, donde 9 de los 10 clones que se eligieron aleatoriamente aparentan tener el inserto (datos no mostrados). Por otro lado, las células de la cepa M15, a las cuales les fue introducida la construcción pQE30Xa con *p/pE*, tuvieron una eficiencia menor, ya que únicamente 4 de los 10 clones que fueron elegidos para verificación presentaron el inserto (figura 6).

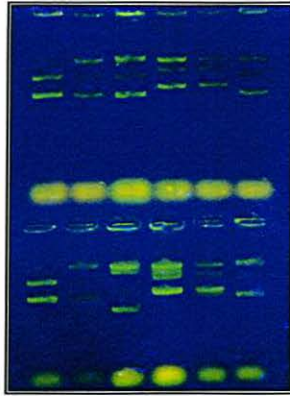


Figura 6. Minipreparaciones de las transformantes con pQE30-Xa con el fragmento *pIpE*. En la parte superior se observan 2 clones positivos y en la inferior otros 2 (carriles 4 y 5 de izquierda a derecha de ambos grupos).

Posteriormente los plásmidos de estos clones fueron digeridos con las enzimas de restricción *StuI* y *HindIII*, las cuales liberan el fragmento esperado de 1029 pb, para pCR 2.1 TOPO y pQE30Xa, figuras 7 y 8 respectivamente.

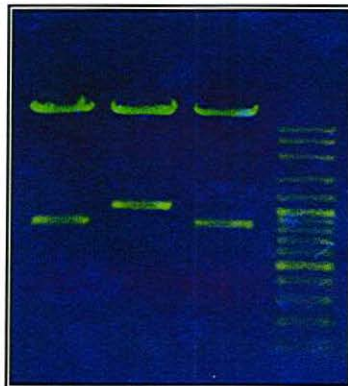


Figura 7. Minipreparaciones en TOPO, digeridas con *StuI* y *HindIII*. Liberan el fragmento de 1029 pb. Carriles 1 y 3 se observan fragmentos de referencia de 849 pb. En el carril 2 se observa el fragmento amplificado de 1029 pb correspondiente a *pIpE*. Carril 4 el marcador de tamaño molecular.

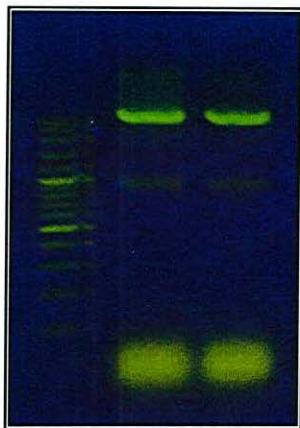


Figura 8. Digestiones con *StuI* y *HindIII* de las construcciones pQE30-Xa+*plpE*, se libera el fragmento de 1029 pb.

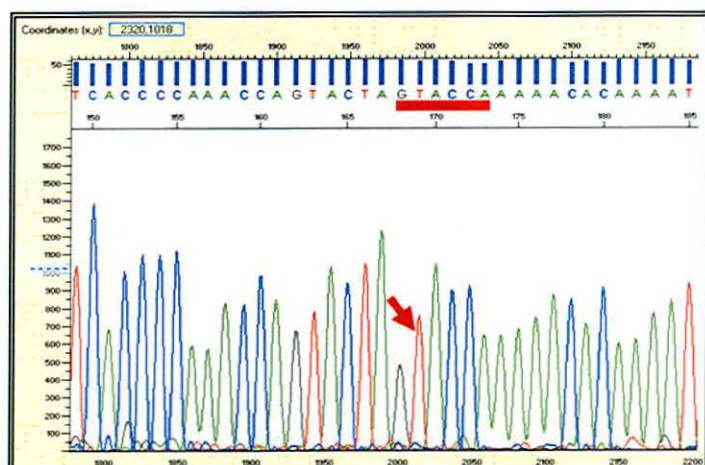
Secuenciación de DNA plasmídico

Se verificaron por secuenciación dos construcciones para pCR2.1 TOPO (clones positivos A y B), los resultados se muestran en los electroferogramas de la figura 9.

En el caso del clon A, se observaron varios errores en la secuencia, lo que la hacía inviable para la expresión. En el caso del clon B, la secuencia coincide exactamente con la reportada en el GenBank (Pandher *et al.*, 1998), por lo tanto este fue el clon que se utilizó para los experimentos de sobre expresión de la proteína PlpE.

Una vez que se corroboró la fidelidad de la secuencia, se prosiguió a subclonar la construcción en el vector de sobre expresión pQE30-Xa, con la confianza de obtener la secuencia aminoacídica deseada.A

A



B

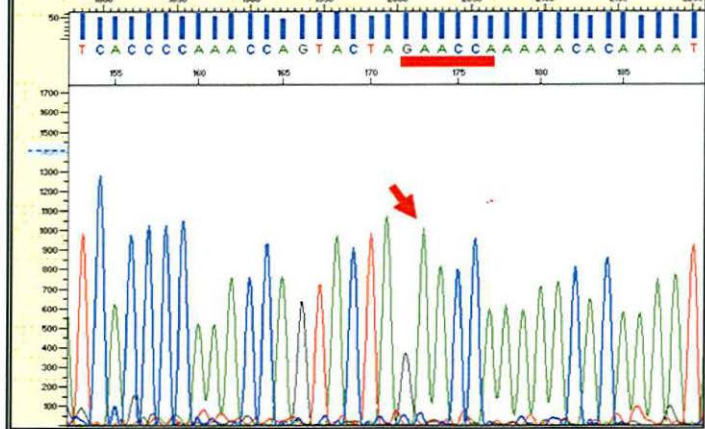


Figura 9. Electroferogramas de secuenciación. A) secuencia obtenida del clon 1 de PlpE, B) secuencia obtenida del clon 2 de PlpE. La flecha roja indica el nucleótido que cambia en el clon 2 con respecto al 1. Es un cambio de codón de gta/gaa, lo cual cambia el aminoácido de valina por glutámico.

Inducción de la expresión de la proteína PlpE recombinante y análisis por electroforesis (SDS-PAGE) de la proteína de fusión

Se trabajó con cuatro muestras durante la inducción: una con el vector de expresión sin inducir, otra con el vector de expresión inducido, una tercera con la construcción vector inserto sin inducir y finalmente, una con la construcción vector inserto inducido (figura 10).

Al realizar un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%), se observa claramente la expresión de la proteína esperada, únicamente en el clon con la construcción que ha sido inducida. Se observa una banda de la proteína sobre expresada entre los puntos del marcador correspondientes a los 37 y 50 kDa. La proteína esperada es de aproximadamente 42 kDa, por lo tanto la banda de la proteína sobre expresada corresponde con la esperada

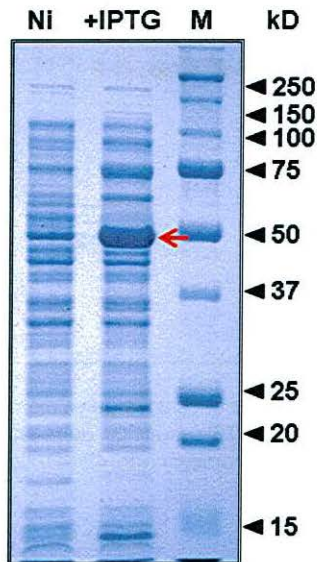


Figura 10. Gel de acrilamida de inducción de expresión. **Ni**) No inducido, **+IPTG**) inducción de la expresión de la construcción iPlpE-pQE-30 Xa (P.M. teórico aproximado 42 kD, flecha roja), **M**) marcador de peso molecular.

Purificación de la proteína de fusión PlpE

Una vez lisadas las bacterias, se cargó la columna. Posteriormente, se lavó y se eluyó la proteína. Se tomaron 9 fracciones con el amortiguador D y 7 con el amortiguador E. Las fracciones fueron tratadas para resolverse en SDS-PAGE. En la figura 11 se observa una fracción representativa del amortiguador D (F1) y las 7 correspondientes al amortiguador E (F2 a F8). La fracción 11 (F3), que fue la que mostró mejor rendimiento, posteriormente fue comparada con la proteína total de la misma clona inducida y sin inducir (figura 12).

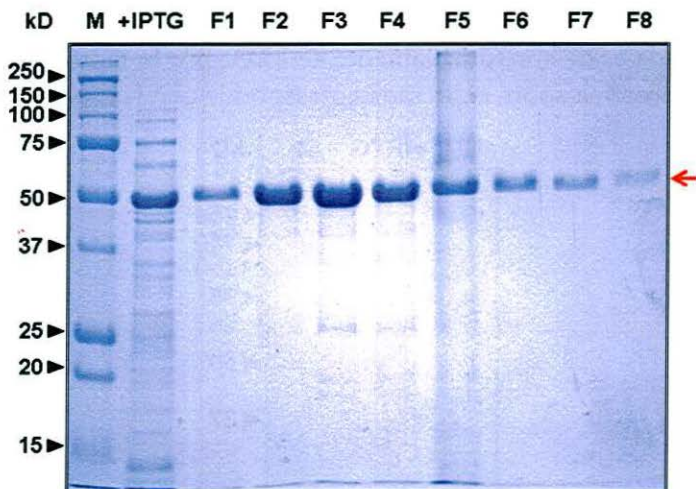


Figura 11. Gel de acrilamida con fracciones de elución. **Fx)** Fracciones purificadas de la fusión iPlpE-pQE-30, **+IPTG)** inducción de la expresión de la construcción iPlpE-pQE-30 Xa (P.M. teórico aproximado 42 kD, flecha roja), **M)** marcador de peso molecular.

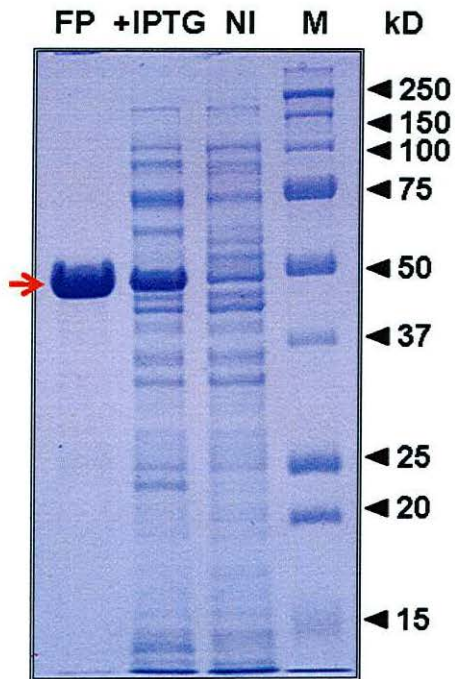


Figura 12. Gel de acrilamida de inducción de expresión y purificación. **FP)** Fracción purificada de la fusión iPlpE-pQE-30, **+IPTG)** inducción de la expresión de la construcción iPlpE-pQE-30 Xa), **NI** – no inducida, **M** - marcador de peso molecular. (P.M. teórico aproximado 42 kD, flecha roja).

Discusión

La obtención de la proteína PlpE recombinante abre la posibilidad del desarrollo de una vacuna sin la necesidad de utilizar bacterinas para *Mannheimia haemolytica*, disminuyendo la probabilidad de que los terneros enfermen por el CRB (Ayalew *et al.*, 2004). Se ha demostrado que la PlpE del serotipo 1 ayuda al desarrollo de inmunidad incluso en otros serotipos (Confer *et al.*, 2005). Ahora que se ha obtenido la proteína se podrá formular una vacuna que proteja al ganado y evite las reacciones secundarias que causan las bacterinas actuales que se utilizan en el mercado (Ellis y Yong, 1997). La obtención de la proteína y la posterior formulación de la vacuna, que además proveerá resistencia contra otros patógenos, permitirán realizar un medicamento más económico y seguro, que disminuya costos para el laboratorio y los ganaderos, cuyos terneros se pueden ver seriamente afectados por el CRB. De esta manera con el desarrollo de la vacuna recombinante se puede ayudar a prevenir el CRB y disminuir gastos por muerte y disminución de la producción (Bagley, 1997).

Inicialmente, se obtuvo un DNA genómico de alta calidad para la amplificación, con una concentración de 70 ng/ μ l, adecuada para poder realizar la reacción con una cantidad de DNA genómico entre los 100 y los 200 ng. A partir del DNA se obtuvo el amplicón deseado, lo que confirmó el adecuado diseño de los oligonucleótidos. El mayor defecto que se identificó en los oligonucleótidos de acuerdo a las reglas establecidas (Oriola, 1991), era el porcentaje de A-T y de G-C que idealmente debe acercarse

al 50%. Sin embargo en el oligonucleótido reverso el porcentaje de A-T supera el 80% de la secuencia sin provocar inespecificidades en el amplicón. Además los sitios de restricción, que evitaban que los oligonucleótidos fueran 100% complementarios, no impidieron la amplificación.

El fragmento clonado de 1029 pb corresponde a la mayor parte del gen *plpE* de *Mannheimia haemolytica*, eliminando únicamente el fragmento correspondiente al péptido señal, pero asegurándonos que se mantuviera intacta la región R2 correspondiente al epítoto inmunodominante que se encuentra cercano a esta parte de la proteína. El amplicón verificado por secuenciación se ajustó perfectamente a lo esperado por el diseño de los oligonucleótidos.

De los 2 clones secuenciados, solo uno presentó la misma secuencia que la original, ya que el otro sufrió un cambio de codón gta/gaa, lo cual en vez de codificar para valina codifica para un glutámico. Este cambio de aminoácidos provocó que el clon fuera inviable para la clonación ya que podría alterar la estructura de la proteína o su antigenicidad, por lo que se utilizó el clon con la secuencia exacta a la esperada.

La proteína recombinante PlpE se sobre expresó y se determinó su peso relativo en geles desnaturalizantes. El peso aparente observado en los geles fue algo superior a los 42 kDa esperados. Esto probablemente se deba a la gran cantidad de prolinas presentes en la proteína que modifican su patrón de migración electroforética (Postle, 1990). Además de verificarse la inducción con el IPTG de esta proteína, la purificación con la resina de níquel demostró que la proteína sobreexpresada correspondía precisamente a la proteína de fusión PlpE con la secuencia de 6 histidinas que permitió su unión a dicha resina.

La purificación de la proteína mostró algunas características particulares ya que de acuerdo con los datos obtenidos, determinamos que el amortiguador E fue el más eficiente para eluir

la proteína. La fracción 11, obtenida con el amortiguador E, fue la que mostró mayor cantidad de proteína y prácticamente pura. Dado que se trata de un monómero, se esperaba mayor concentración proteínica en el amortiguador D, sin embargo hubo menos proteína en estas fracciones en comparación con las eluidas con el amortiguador E. Para lo cual, en subsecuentes ensayos de purificación, lo más recomendable será emplear dicho amortiguador.

Para obtener resultados contundentes del éxito de la investigación faltan por realizar pruebas posteriores para verificar la eficacia de la proteína PlpE recombinante para generar inmunidad. Primero, será necesario probar en animales de experimentación la producción de anticuerpos correspondientes a la PlpE y posteriormente, desafiar esta presunta inmunidad en pruebas de laboratorio y de campo. Una vez comprobada que la proteína es capaz de desarrollar la inmunidad en los animales, será necesario industrializar el proceso para la fabricación de la vacuna.

Conclusiones

- Se obtuvo la proteína recombinante PlpE.
- Mediante la amplificación de la secuencia nucleotídica de *p/pE* y su posterior clonación en un vector de expresión, se obtuvo un clon con la construcción adecuada, el cual se utilizó para la expresión de la proteína recombinante.
- Gracias a la etiqueta de histidinas que agrega el vector, se purificó la proteína PlpE por medio de la columna de Ni-NTA, como se esperaba.

Referencias

- Angen, O., R. Mutters, D. A. Caugant, J. E. Olsen, y M. Bisgaard (1999), "Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16s rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nova", *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 67-86.
- Ayalew, S., A.W. Confer, y E.R. Blackwood (2004), "Characterization of immuno-dominant and potentially protective epitopes of *Mannheimia haemolytica* Serotype 1 outer membrane lipoprotein PlpE", *Infection and Immunity*, 72: 7265-7274.
- Bagley, C. V. (1997), "Bovine Respiratory Disease", Utah State University Cooperative Extension, Estados Unidos.
- Bingham D. P., R. Moore, y A. B. Richards, (1990), "Comparisons of DNA: DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella haemolytica* and related species", *American Journal of Veterinary Research*, 51: 1161-1166.
- Birnboim, H.C. y J. Doly, (1979), "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", *Nucleic Acids Research*, 7(6): 1513-1523.
- Confer, A.W., S. Ayalew, R.J. Panciera, Montelongo, M.J.H. Wray (2005), "Recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein PlpE enhances commercial *M. haemolytica*

- vaccine-induced resistance against serotype 6 challenge” *Vaccine* 24: 2248-2255.
- Cullor, J. S. (1992), “Shock attributable to bacteremia and endotoxemia in cattle: Clinical and experimental findings”, *Journal of the American Veterinary Medical Association.*, 200: 1894-1902.
- Davies, R. L., S. Arkinsaw, R. K. Selander (1997), “Evolutionary genetics of *Pasteurella haemolytica* isolates recovered from cattle and sheep”, *Infection and Immunity*, 65 (9): 3585-3593.
- Ellis, J.A., y C. Yong (1997), “Systemic adverse reactions in young Simmental calves following administration of a combination vaccine.” *The Canadian Veterinary Journal*, 38: 45-47.
- Gioia, J., X. Qin, J. Huaiyang, K. Clinkenbeard, R. Lo, Y. Liu, G.E. Fox, S. Yerrapragada, M.P. McLeod, T.Z. McNeill, L. Hemphill, E. Sodergren, Q. Wang, D.M. Muzny, F.J. Homsí, G.M. Weinstock, y S.K. Highlander (2006), “The Genome Sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: Insights into Virulence, Natural Competence and Pasteurellaceae Phylogeny”, *Journal of Bacteriology*, 188: 7257-7266.
- Henderson, B., y N. Wilson (1995), “Modulins: a new class of cytokine-inducing, pro-inflammatory bacterial virulence factor”, *Inflammation Research*, 44: 187-197.
- Hodgson, P.D.P. Aich, A. Manuja, K. Hokamp, F.M. Roche, F.S.L. Brinkman, A. Potter, L.A. Babiuk, y P.J. Griebel (2005), “Effects of stress on viral-bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation”, *Comparative and Functional Genomics*, 6: 244-250.
- Irsik, M. (2007), “Bovine Respiratory Disease Associated with *Mannheimia haemolytica* or *Pasteurella multocida*”, University of Florida, Estados Unidos.
- Jeyaseelan, S.S. Sreevatsan y S.K. Maheswaran (2002), “Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bo-

- vine pneumonic pasteurellosis”, *Animal Health Research Reviews*, 3(2): 69-82.
- Lowry, O.H., N.J. Rosenbrough, A.L. Farr y R.J. Randall (1951), “Protein measurement with the folin phenol reagent”, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- McClanahan, S. L. (2007), “Health and National animal identification system”, University of Minnesota, Estados Unidos.
- Mosier, D.A., K.R. Simmons, A.W. Confer, R.J. Panciera y K.D. Clinkenbeard (1989), “*Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis”, *Infection and Immunity*, 57(3): 711-716.
- Muggli-Cockett, N.E., L.V. Cundiff y K.E. Gregory (1992), “Genetic analysis of bovine respiratory disease in beef calves during first year of life”, *Journal of Animal Science* 70: 2013-2019.
- Nyamusika, N., T.H. Spreen, O. Rae y C. Moss (1994), “A bioeconomic analysis of bovine respiratory disease complex”, *Reviews of Agricultural Economics*, 16: 39-53.
- Oriola, J. (1991), “Metodología de la reacción en cadena de la polimerasa”, *Revista de Diagnóstico Biológico*, 40: 31-34.
- Pandher, K., A.W. Confer, y G.L. Murphy (1998), “Genetic and Immunologic Analyses of PlpE, a Lipoprotein Important in Complement-Mediated Killing of *Pasteurella haemolytica* Serotype 1”, *Infection and Immunity*, 66: 5613-5619.
- Postle, K. (1990), “TonB and the Gram-negative dilemma”, *Molecular Microbiology*, 4(12): 2019-2025.
- Sambrook, J. y D.W. Russell (2001), “Molecular cloning. A laboratory manual.” New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Trigo, F. (1987), “El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos”, *Ciencia Veterinaria*, 4: 1-30.
- Zecchinon, L., T. Fett y D. Desmecht (2005), “How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism”, *Veterinary Research*, 36: 122-156.

índice de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1.	Factores desencadenantes del complejo respiratorio bovino (CRB)	2
Tabla 2.	Mezcla de reacción para la amplificación del gen <i>plpE</i>	22
Tabla 3.	Condiciones de amplificación de PCR	22

Figuras

Figura 1.	Estructura de dominios de la PlpE correspondiente a 356 aa.	5
Figura 2.	Vector pCR 2.1-TOPO, empleado para la clonación del amplicón del gen <i>plpE</i> generado por PCR.	18
Figura 3.	Vector de expresión pQE-30 Xa, en el cual se subclona el producto previamente amplificado por PCR del gen <i>plpE</i> .	19
Figura 4.	Extracción de DNA genómico de <i>Mannheimia haemolytica</i> .	30
Figura 5.	Amplificación de un fragmento del gen <i>plpE</i> de 1029 pb	31
Figura 6.	Minipreparaciones de las transformantes con pQE30-Xa con el fragmento <i>plpE</i> .	32
Figura 7.	Minipreparaciones en TOPO, digeridas con <i>StuI</i> y <i>HindIII</i> .	32
Figura 8.	Digestiones con <i>StuI</i> y <i>HindIII</i> de las construcciones pQE30-Xa+ <i>plpE</i> , se libera el fragmento de 1029 pb.	33
Figura 9.	Electroferogramas de secuenciación.	34
Figura 10.	Gel de acrilamida de inducción de expresión	35
Figura 11.	Gel de acrilamida con fracciones de elución.	36
Figura 12.	Gel de acrilamida de inducción de expresión y purificación.	37

