

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



**“EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y PURIFICACIÓN DE LA
FRACCIÓN ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA LKTA DE
Mannheimia haemolytica”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**


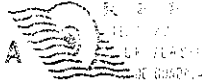
PRESENTA

MARÍA SARAY QUINTERO FABIÁN

Las Agujas, Zapopan, Jalisco a 12 de enero de 2009.

TESIS/CUCBA

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 Domínguez. Es parte de los productos de un proyecto apoyado por el CONACYT (Registro: ECO-2007-C01-71496).

 **BIBLIOTECA** 
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
Número de adquisición: 055322
Fecha: 30 - Jun - 09
Procedencia: Tesis / Donación
Número de código de barras: BAC-055322

B1065

81

N. S 329 103



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
Coordinación de Titulación y Carrera de Licenciatura en Biología

1388/ C. C. BIOLOGÍA

C. MARIA SARAY QUINTERO FABIAN

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 heteróloga y purificación de la fracción antigénica de la proteína LKTA de *Manhemia haemolytica*" para obtener la Licenciatura en Biología.

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

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

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Las Agujas, Zapopan., 13 de noviembre del 2008.

DR. FRANCISCO MARTÍN HUERTA MARTÍNEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN



COORDINACIÓN DE LA CARRERA Y
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

P.A.

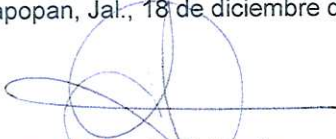
M en C. GLORIA PARADA BARRERA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dr. Fco. Martín Huerta Martínez.
 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 FRACCIÓN ANTIGÉNICA DE LA PROTEÍNA LKTA DE *Mannheimia haemolytica*"** que realizó la pasante **C. María Saray Quintero Fabián** con número de código **398673474** 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.

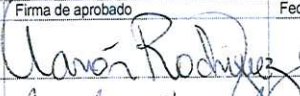



Atentamente
 Las Agujas, Zapopan, Jal., 18 de diciembre del 2008


 Dr. Daniel Ortuño Sahagún
 Director del trabajo


 Dra. Beatriz Flores Samaniego
 Asesora


 Biol. José Pedro Castruita Domínguez
 Asesor



Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dr. Aarón Rodríguez Contreras		07/01/09
Dra. Josefina Casas Solís		07/01/09
M en C. Verónica Palomera Ávalos		7° Enero 09
Supl. Dra. Mónica Ayub Ayala		07/Enero/09

3.	Amplificación de una región interna del gen de <i>lktA</i>	35
4.	Clonación del producto amplificado	35
5.	Transformación bacteriana con el vector recombinante pCR 2.1-TOPO	36
6.	Extracción del DNA plasmídico de la construcción pCR 2.1-TOPO- <i>lktA</i>	37
7.	Digestión del inserto pCR 2.1-TOPO- <i>lktA</i>	38
8.	Análisis de la secuencia del inserto <i>lktA</i>	39
9.	Transformación de bacterias químicamente competentes JM109	41
10.	Preparación del vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa.	42
11.	Clonación de <i>lktA</i> en el vector de expresión pQE-30 Xa	43
12.	Extracción del DNA plasmídico del clon pQE-30 Xa- <i>lktA</i>	44
13.	Digestión del fragmento <i>lktA</i> clonado en el vector de expresión pQE-30 Xa	45
14.	Inducción de la proteína recombinante iLKTA-pQE-30 Xa con IPTG	46
15.	Cuantificación de la proteína recombinante iLKTA-pQE-30 Xa	47
16.	Análisis de la expresión de la proteína recombinante iLKTA-pQE-30 Xa.....	48
	Discusión.....	49
	Conclusiones.....	53
	Referencias	55
	Índice de tablas y figuras.....	61

Contenido

Agradecimientos	vii
Dedicatoria	ix
Resumen	xi
Abreviaturas	1
Introducción	3
Complejo respiratorio bovino o “Fiebre del embarque”	3
Antecedentes	5
Epidemiología y etiología	5
Leucotoxina	7
Planteamiento del problema	9
Justificación	11
Hipótesis	13
Objetivos	15
Objetivo General	15
Objetivos Particulares	15
Diseño experimental	17

Material y métodos.....	19
1. Diseño de oligonucleótidos	19
2. Extracción de DNA genómico	19
3. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	20
4. Clonación del producto amplificado en el vector pCR 2.1-TOPO	21
5. Extracción de DNA plasmídico (pCR 2.1-TOPO- <i>lktA</i>)	23
6. Secuenciación del inserto <i>lktA</i>	23
7. Preparación del inserto para subclonación en el vector de expresión pQE-30 Xa.....	24
8. Bacterias competentes (JM109)	25
9. Transformación de bacterias químicamente competentes JM109	25
10. Extracción de DNA plasmídico: miniprep y maxiprep	26
11. Preparación del vector pQE-30 Xa para clonación. .	26
12. Clonación de <i>lktA</i> en el vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa.	27
13. Transformación de la cepa M15 con la construcción pQE-30 Xa- <i>lktA</i>	28
14. Digestión del fragmento <i>lktA</i> clonado en el vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa.....	29
15. Inducción de la expresión de un fragmento de la proteína iLKTA recombinante con IPTG	29
16. Cuantificación de la proteína recombinante iLKTA-pQE-30 Xa.....	30
17. Análisis en PAGE de la inducción de la expresión de la iLKTA recombinante	30
Resultados	33
1. Diseño de oligonucleótidos	33
2. Extracción de DNA genómico	33

Agradecimientos

Agradezco la vida y la oportunidad que me ha brindado para desarrollarme como profesional.

A la Universidad de Guadalajara por haberme acogido y formado en sus aulas desde hace ya varios años.

Al Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Tecnología Biológica de México S.A. de C.V. por el apoyo y confianza durante el desarrollo de este trabajo.

A mis profesores que en su medida contribuyeron a mi formación. De forma muy particular debo agradecer las intervenciones adecuadas y precisas de mi director el Dr. Daniel Ortuño Sahagún y sobre todo por su confianza.

A mis amigos Paty, Gris, Gaby, Veros Castro y Kuki, Josémovil (Omar), Sergio, Juve y Leono (Jorge), por sus buenos deseos, ánimo, cariño y confianza brindada. A los que no fueron tan amigos, ya que todos formaron un pilar para mi desenvolvimiento académico.

A la base medular que fueron y siguen siendo mi familia, por ser la fuerza que me hace seguir adelante; mi papá Jesús, mi mamá Eugenia y a mis hermanos David, Hugo y Juan Pablo. A Carlos, Félix y Carmen que me acogieron en momento difíciles y siempre han estado de manera incondicional.

A mi amorcito govico Rodrigo por sus consejos, ayuda y amor.

Muchas gracias a todos ellos.

Dedicatoria

A toda mi familia, para ellos con cariño y mucho esfuerzo el producto de este trabajo.

Resumen

El complejo respiratorio bovino (CRB), es causado por infecciones virales y bacterianas que, en combinación con otros factores, desencadenan un conjunto de síntomas característicos de esta enfermedad, la cual provoca grandes pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas. Entre los agentes etiológicos relacionados al CRB destaca la bacteria *Mannheimia haemolytica*.

El CRB es la causa principal de morbilidad y mortalidad en los establos, por lo que su prevención y control mediante inmunización resulta importante. Actualmente se utilizan vacunas polivalentes para prevenir el CRB, sin embargo, existen reacciones sistémicas adversas al aplicar bacterinas formuladas con combinaciones de bacterias gram-negativas. Debido a lo anterior, nos hemos planteado el objetivo de formular una vacuna polivalente que incluya protección contra *M. haemolytica*, en la que se hayan eliminado los factores determinantes de reacciones adversas. Para ello, en el presente trabajo desarrollamos una cepa M15 recombinante de *Escherichia coli* que expresa un fragmento de la proteína antigénica leucotoxina (LKTA) de *M. haemolytica*, en el vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa. Luego de un análisis de la secuencia de la proteína, se seleccionó un fragmento y se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes para amplificarlo a partir de DNA de la bacteria. Una vez amplificado, el inserto se clonó en el vector pCR 2.1-TOPO. Se verificó su identidad por secuenciación y posteriormente se subclonó en el vector de expresión pQE-30 Xa, el cual permite la sobreexpresión y la purificación de la proteína correspondiente para su utilización.

Como resultado de este trabajo se logrará la obtención de grandes cantidades de un fragmento antigénico de la proteína LKTA purificada, la cual posteriormente será utilizada en la formulación de una vacuna polivalente contra CRB.

Abreviaturas

A	absorbancia
°C	grados centígrados
CRB	complejo respiratorio bovino
D.O.	densidad óptica
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	di-desoxinucleótidos fosforilados
h	hora
iLKTA	inserto de la proteína LKTA
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactósido
kD	kilodaltons
λ	longitud de onda
LB	medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani
<i>lclA</i>	leucotoxina (gen)
LKTA	leucotoxina (proteína)
M	molar
min	minutos
ml	mililitro
mM	milimolar
μg	microgramo
μM	micromolar
μl	microlitro
ng	nanogramo
nm	nanómetros
OH ⁻	radicales oxidrilo
pb	pares de bases

PBS	<i>(phosphate buffered saline solution)</i> solución amortiguadora de fosfatos
PCR	<i>(polymerase chain reaction)</i> reacción en cadena de la polimerasa
PM	peso molecular
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
RTX	<i>(repeats in toxin)</i>
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis de proteínas en geles desnaturalizantes
SOC	medio de cultivo bacteriano con triptona y extracto de levadura
TA	temperatura ambiente
TAE	solución amortiguadora de tris-acetato-EDTA pH. 8.0
U	unidades
V	volts
V:V	volumen – volumen

Introducción

Complejo respiratorio bovino o “Fiebre del embarque”

Es una enfermedad multifactorial y común en el ganado lechero. Se manifiesta dependiendo de una serie de complejas interacciones entre agentes infecciosos, como virus y bacterias, con el sistema inmunológico de los organismos, así como con los factores ambientales a los cuales se encuentran expuestos. La fiebre del embarque consiste en un proceso neumónico agudo de los bovinos, ocurre cuando los animales son sometidos a situaciones de estrés, como son el traslado de éstos de los sitios de producción a las zonas de consumo humano, hacinamiento de animales de edades y niveles inmunológicos diferentes, temperaturas extremas y deficiente ventilación en los sitios donde se encuentran, así como el destete y descorne de terneros. Esta enfermedad también es conocida con el nombre de pasteurelosis pulmonar, pasteurelosis neumónica o complejo respiratorio bovino (CRB). Las principales infecciones constituyentes del complejo de enfermedades de la fiebre del embarque, son la rinotraqueitis bovina y la pasteurelosis neumónica (Trigo, 1987; Lee y cols. 2001).

Entre los virus que juegan un papel importante en el desarrollo del CRB, se encuentran incluidos el herpesvirus-1 bovino, virus sincitial bovino, virus de la diarrea bovina y el virus parainfluenza-3, algunos otros virus como rinovirus, enterovirus y reovirus pueden jugar un papel secundario en la etiología del CRB. Las bacterias directamente involucradas son *Mycoplasma bo-*

vis y *Mannheimia haemolytica* serotipo A1. Otros agentes implicados son *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus* y *Salmonella dubli* (Trigo, 1987; Yeşilbağ y Güngör, 2008).

Antecedentes

Mannheimia haemolytica serotipo A1 es la principal bacteria responsable del CRB, causando abortos, neumonía, mastitis y septicemia en el ganado, por lo que es considerada una de las principales causas de enfermedad, muerte y pérdidas económicas en la industria ganadera. Con métodos tradicionales de vacunación se ha venido proporcionando cierto grado de protección contra el CRB, sin embargo tanto los virus como las bacterias han coevolucionado con sus hospederos y estos patógenos han desarrollado sofisticadas estrategias para evadir o truncar, tanto la respuesta innata como la adaptativa del sistema inmune del hospedero (Trigo, 1987; Srikumara y cols. 2007; Yeşilbağ y Güngör, 2008; Adamu, 2007; Lee y cols. 2001; Hodgson y cols. 2005; Ayalew y cols. 2004).

Epidemiología y etiología

La familia *Pasteurellaceae*, comprende tres géneros: *Pasteurella*, *Atinobacillus* y *Haemophilus*. Son bacilos gram negativos, sin movimiento, anaerobios, típicamente oxidasa positivos, que reducen nitratos y fermentan carbohidratos. La mayoría son parásitos comensales de animales (Hirsh y Chung, 1999). En 1959 y 1961, fueron descritas dos variedades diferentes de lo que en ese momento se conocía con el nombre de *Pasteurella haemolytica*. Con base en las diferentes características de sus cultivos, así como en

la diversidad de aspectos bioquímicos y patológicos, se les designó como tipos A (fermenta arabinosa) y T (fermenta trehalosa; Hirsh y Chung, 1999; Merchant, 1980). Estos tipos, A y T, difieren en cuanto a la patogenicidad y susceptibilidad antimicrobial de sus cultivos, los rasgos serológicos y sus relaciones genéticas (Hirsh y Chung, 1999). En el tipo A se clasificaron 13 subtipos y 4 en el tipo T (3, 4, 10 y 15), el cual más tarde fue denominado *Pasteurella trehalosi*.

Posteriormente, en 1999, estudios basados en hibridaciones DNA-DNA y secuencias del 16S RNA, permitieron renombrar a los serotipos existentes hasta entonces (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) como *Mannheimia haemolytica*, mientras que el serotipo A11 se definió como *Mannheimia glucosida*. Los serotipos A1 y A2 presentan una distribución mundial. A1 es el principal agente causante del CRB, aun cuando otros serotipos como A6, A7, A9, A11 y A12 hayan sido también reportados. Tanto A1 como A2 son especie-específicos y son capaces de colonizar el tracto respiratorio superior del ganado vacuno y de borregos (Hirsh y Chung, 1999; Zecchinon y cols. 2005; Lillie, 1974; Adamu, 2007).

Mannheimia haemolytica es un habitante normal de las vías respiratorias superiores del ganado. Posee la capacidad para vivir como serotipo A2 apatógeno en las vías respiratorias superiores, sin embargo, bajo situaciones de estrés, puede convertirse en el serotipo A1 patógeno. Así, *M. haemolytica* es la principal causa de muerte en vacas y terneros. En México, estudios realizados en pulmones neumónicos del ganado enfermo, demuestran que *M. haemolytica* está involucrada en neumonías de becerros, vacas adultas y corderos (Trigo, 1987; Rebhun y cols. 1995).

Mannheimia haemolytica presenta una cápsula que le proporciona protección frente a la fagocitosis. Entre los agentes potenciales de virulencia de *M. haemolytica* se encuentran proteínas de membrana exterior, fimbrias, glicoproteasas y neuraminidasas,

además de producir y secretar una toxina denominada leucotoxina (LKTA), que es considerada el factor principal de virulencia en la patogénesis del CRB. La LKTA deriva de los lipopolisacáridos de la pared celular y resulta letal para los macrófagos alveolares, monocitos y neutrófilos. Es clave en la inducción de la neumonía, ya que media la infiltración y la destrucción de neutrófilos y otros leucocitos. Los lipopolisacáridos pueden actuar sinérgicamente con la LKTA, lo que contribuye a incrementar la actividad de esta endotoxina (Trigo, 1987; Hirsh y Chung, 1999; Merchant, 1980; Adamu, 2007; Rebhun y cols. 1995).

Leucotoxina

Todas las cepas de *Mannheimia haemolytica* secretan LKTA, citotoxina dependiente de calcio, compuesta de 953 aminoácidos y cuyo peso es de 102 kD (Genbank M20730; figura 1). Proteína que pertenece a una familia de exotoxinas, del grupo de las RTX (*repeats in toxin*). Son llamadas así porque cerca del extremo carboxilo terminal existen regiones altamente conservadas ricas en glicina, las cuales se repiten dentro de la secuencia.

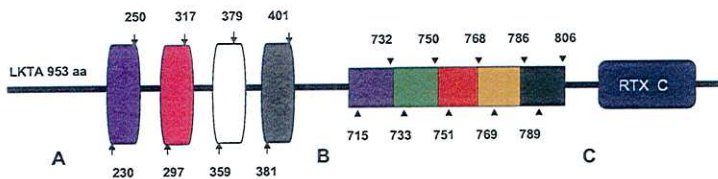


Figura 1. Esquema de la proteína LKTA (953 a.a.). Los números representan la posición de los aminoácidos. A) posibles dominios transmembranales, B) regiones del tipo "Hemolysin-type calcium-binding" que se repiten dentro de la secuencia de la proteína LKTA. C) extremo carboxilo terminal. Esquema basado en las bases de datos UniProt (número de acceso Q9EV32) e InterPro y en el análisis de la proteína mediante el software desarrollado por Hau y cols. (2007).

En altas concentraciones, la toxina crea poros en la membrana que conducen a la lisis celular. En concentraciones subletales, activa a los neutrófilos e induce la producción de citocinas inflamatorias, además promueve cambios en el citoesqueleto y causa apoptosis. La LKTA, es codificada por un operón policistrónico de cuatro genes (figura 2). Para la síntesis, activación y secreción de la proteína, en orden de su organización genética, el gen *lktC* se necesita para la acilación de LKTA y lograr su activación, *lktA* codifica para LKTA en sí misma, mientras que *lktB* y *lktD* codifican para proteínas involucradas en la secreción (Srikumara y cols. 2007; Zecchinon y cols. 2005; Adamu, 2007; Hirsh y Chung, 1999; Roberts y Baillie, 2003; Gioia y cols. 2006; Highlander y Hang, 1997).

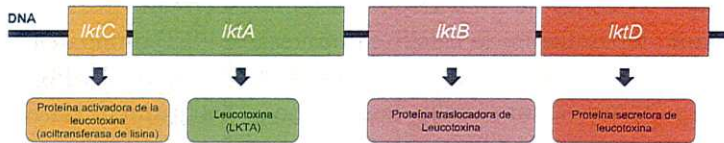


Figura 2. Operón *lktCABD* para la síntesis, activación y secreción de la proteína LKTA de *Mannheimia haemolytica*.

Planteamiento del problema

Si bien el manejo de los animales se facilita con la aplicación de vacunas polivalentes, se ha documentado que existen reacciones sistémicas adversas al aplicar bacterinas formuladas con combinaciones de bacterias gram-negativas. Dado que la gran mayoría de las vacunas que existen en el mercado están diseñadas bajo este esquema, en este trabajo proponemos construir cepas recombinantes de *Escherichia coli* que expresen un fragmento antigénico de la leucotoxina (LKTA), proteína de *Mannheimia haemolytica*, en el vector de expresión pQE-30 Xa, para después utilizarla en la formulación de una vacuna polivalente contra CRB. Mediante la construcción de este recombinante esperamos llegar, posteriormente, a la formulación de una vacuna que no produzca los efectos adversos que presentan las vacunas que actualmente existen en el mercado.

Justificación

La fiebre del embarque o CRB, constituye un problema importante en la industria ganadera a nivel mundial, debido a los altos costos del tratamiento, la pérdida de peso y las pérdidas por muerte, lo cual provoca graves daños a las explotaciones ganaderas. El CRB se observa cuando los animales son sometidos a procesos de estrés como son: el transporte, la comercialización, el destete, descorne y condiciones climáticas extremas. Además de ser la causa principal de morbilidad y mortalidad en los establos, por lo que su prevención y control mediante una inmunización eficaz resulta importante.

Hipótesis

Es factible la construcción de una proteína recombinante que contenga la fracción antigénica de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*.

Objetivos

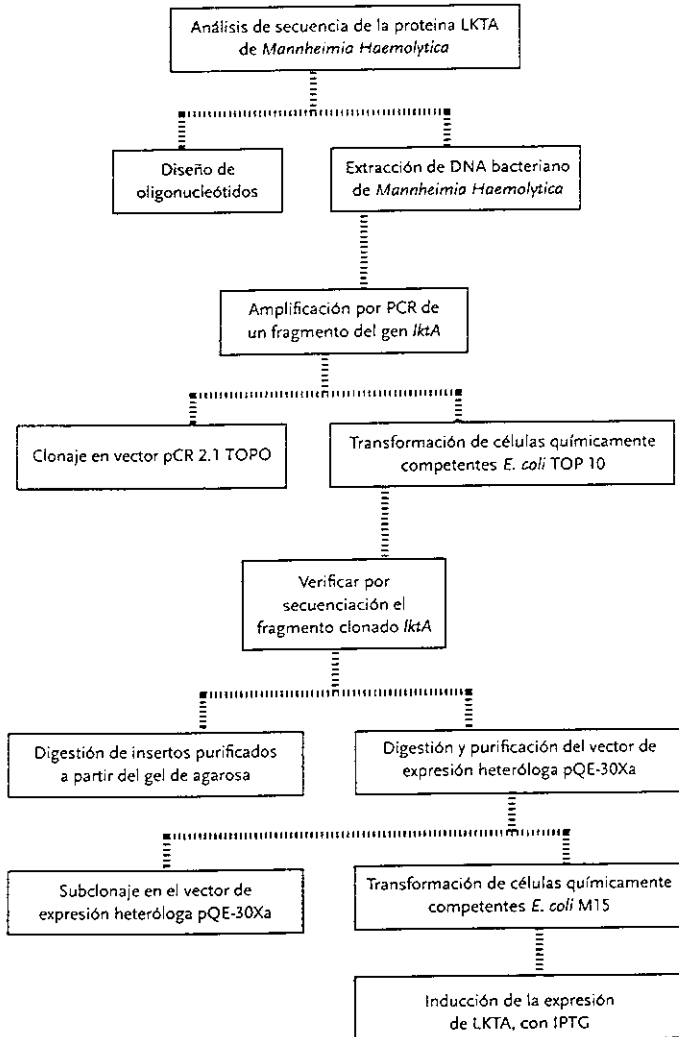
Objetivo General

Generar una proteína recombinante de la fracción antigénica de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*.

Objetivos Particulares

1. Diseñar los oligonucleótidos necesarios para amplificar la fracción antigénica de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*.
2. Clonar el amplicón de *ilktA* y verificar por secuenciación la construcción.
3. Subclonar el *ilktA* y generar una proteína de fusión en el vector de expresión pQE-30 Xa.
4. Verificar la expresión de la proteína de fusión que lleve la fracción antigénica de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*.

Diseño experimental



Material y métodos

1. Diseño de oligonucleótidos

En el diseño de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de un fragmento del gen *lktA* de la LKTA de *Mannheimia haemolytica*, se consideraron las siguientes reglas (Oriola, 1991):

- a) 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%.
- b) 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.
- c) 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.
- d) Comprobar que los oligonucleótidos, sean complementarios al DNA molde al menos en el extremo 3', por ser este el lugar de unión de la *Taq* polimerasa.

2. Extracción de DNA genómico

Para la extracción del DNA bacteriano se utilizó el kit de extracción *Illustra bacteria genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). El

cual emplea una solución de lisis y proteínasa K para romper las paredes celulares bacterianas, una vez que el DNA ha quedado libre de proteínas es pasado a través de una columna de sílica, donde son removidos los restos celulares mediante una serie de lavados. Finalmente, el DNA es eluído con una solución amortiguadora.

3. Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron mediante una mezcla en un volumen final de 25 μl , adicionando 22 μl de *Platinum PCR Super-Mix High Fidelity* (Invitrogen), el cual contiene un anticuerpo llamado anti-*Taq* DNA polimerasa, magnesio, desoxirribonucleótidos trifosfato, DNA *Taq* polimerasa y una polimerasa termolábil *GB-D* de *Pyrococcus* spp. Se agregó 1 μl del oligonucleótido directo [10 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$], 1 μl del oligonucleótido reverso [10 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$] y 1 μl del DNA genómico [80 ng/ μl]. La reacción de amplificación se realizó de acuerdo a la tabla 1.

Tabla 1
Condiciones de amplificación del fragmento del gen *lktA*

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	3 min	1
Desnaturalización	94°C	30 seg	30
Hibridación	60°C	1 min	30
Extensión	72°C	1 min	30
Extensión final	72°C	5 min	1

El fragmento amplificado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con 2 μl de colorante *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen). La electroforesis se realizó en una solución amortiguadora TAE 1X.

4. Clonación del producto amplificado en el vector pCR 2.1-TOPO

La clonación de los productos amplificados por PCR se llevó a cabo en el vector pCR 2.1 TOPO (figura 3; Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez completada la reacción de PCR, el producto *kkl1* de 846 pb se clonó en el vector pCR 2.1-TOPO de la siguiente manera: a la mezcla de reacción se le añadió 1 μ l (100 ng) del vector pCR 2.1-TOPO, 1 μ l de solución salina, 1 μ l de agua y 3 μ l del producto de PCR. La mezcla de transformación se incubó por 30 min a 23°C y posteriormente se mantuvo en hielo hasta la transformación de las células químicamente competentes.

Todo el proceso de transformación se realizó en condiciones de esterilidad. Células químicamente competentes de *E. coli* TOP 10 fueron transformadas con el producto de la reacción de ligación.

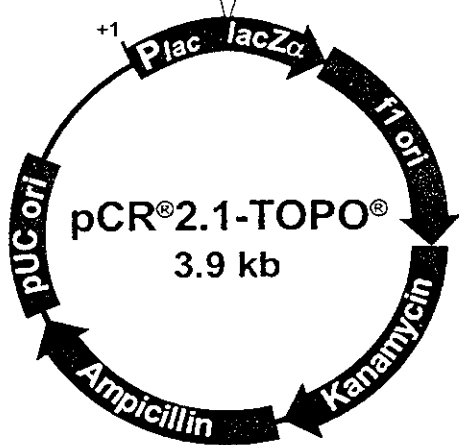
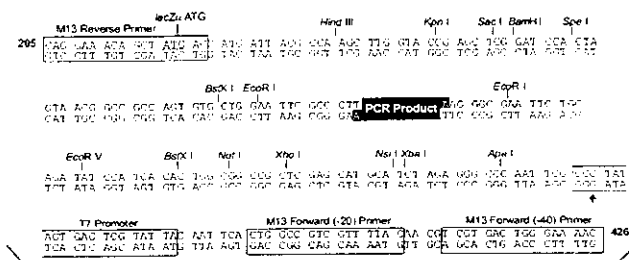


Figura 3. Vector pCR 2.1-TOPO, empleado para la clonación del amplicón del gen *lktA* generado por PCR.

El procedimiento de transformación se realizó de acuerdo al protocolo *Transforming One Shot DH5α-T1R, TOP10, and TOP10F' competent cells*, con las siguientes modificaciones. Se añadieron 3 µl de la reacción de clonación pCR 2.1-TOPO-*lktA* a un vial de células químicamente competentes de *E. coli* TOP10, la mezcla fue incubada en hielo durante 5 min. Posteriormente, se incubó a 42°C por 30 segundos (choque térmico), inmediatamente después se transfirió el vial a hielo por 3 min. Seguido a esto, se añadió al vial 200 µl de medio SOC (que contiene glucosa)

y se incubó a 37°C y en agitación constante a 200 rpm durante 1 hora. Las bacterias fueron sembradas en medio sólido LB-amp [100 µg/ml] con 50 µl y 100 µl e incubadas a 37°C durante aproximadamente 16 horas.

5. Extracción de DNA plasmídico (pCR 2.1-TOPO-*lktA*)

Con el objetivo de obtener plásmido para su secuenciación, fue utilizado el kit *Illustra plasmid Prep Mini Spin kit* (GE Healthcare) el cual consiste en desnaturalizar las proteína con sales que promueven la unión selectiva del DNA plasmídico a una membrana de sílica. Una vez que se eliminaron los restos celulares, la membrana fue lavada y el DNA del vector purificado se eluyó en 70 µl de solución amortiguadora. El vector pCR 2.1-TOPO-*lktA* se almacenó a -20°C.

6. Secuenciación del inserto *lktA*

La secuenciación consiste en determinar el orden de las bases nitrogenadas del DNA. Para ello el DNA plasmídico de la construcción pCR 2.1-TOPO-*lktA*, fue extraído y purificado con el kit *Illustra plasmid Prep Mini Spin kit* (GE Healthcare), su concentración fue de 100 ng/µl, concentración requerida para la reacción de secuenciación. El análisis de la secuencia de insertos obtenidos por PCR se realizó por el método automático de Sanger, aplicado por *Applied Biosystems* (1986). Para la lectura de las secuencias se utilizó el secuenciador de tecnología capilar ABI Prism 310.

El análisis y comparación para la verificación de las secuencias, se realizó con el programa PSI-BLAST y consultas al GenBank del *National Center for Biotechnology Information*. El alineamiento de secuencias y su análisis se realizó mediante el *software* DNASTar.

El análisis inicial de la proteína en estudio se realizó con información de las siguientes bases de datos: NCBI-BLAST (*National Center for Biotechnology Information*), UniProtKB/Swiss-Prot, UniProtKB/TrEMBL y PROSITE del *Swiss Institute of Bioinformatics*, el Motif Scan y el Pfam en el Sanger Institute.

7. Preparación del inserto para subclonación en el vector de expresión pQE-30 Xa

Para liberar el inserto *lktA* de la construcción realizada, se preparó una mezcla de reacción con 5 μ l de la construcción del pCR 2.1-TOPO-*lktA* [3 μ g/ μ l], 10% (1.5 μ l) de solución amortiguadora 10X (Invitrogen), 2 μ l de enzima *Sma* I [10 U/ μ l] (Invitrogen), 2 μ l de enzima *Hind* III [10 U/ μ l] (Invitrogen) y 4.5 μ l de agua desionizada, para tener un volumen final de 15 μ l. La reacción se incubó durante 16 h a 37°C.

Una vez verificado por secuenciación el fragmento clonado en el vector pCR 2.1-TOPO, se purificó el inserto correspondiente a la *lktA*. Para lo cual se siguió el protocolo del kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare), el cual utiliza diversos agentes para disolver la agarosa y desnaturar las proteínas. La unión es selectiva y el DNA se une a una membrana de sílice contenida en una columna. La membrana es lavada con una solución amortiguadora de etanol para remover sales y otros agentes contaminantes. De esta manera, el DNA purificado es diluido en 20 μ l de la solución amortiguadora de elución. Para la cuantificación del DNA, se realizó una electroforesis en una solución amortiguadora TAE 1X, el gel de agarosa al 1% se tiñó con 2 μ l de colorante *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen).

8. Bacterias competentes (JM109)

A partir de un precultivo de la cepa JM109 de *E. coli* (Quiagen), crecida durante 16 h en medio LB en agitación constante (250 rpm) y a 37°C, se tomaron 80 µl para inocular 80 ml de medio LB. Este nuevo cultivo se incubó en las mismas condiciones y se monitoreó su crecimiento hasta obtener una densidad óptica entre 0.5-0.7 registrada en un espectrofotómetro (D.O._{600nm}). Posteriormente, el cultivo se transfirió a una botella Nalgen de 80 ml y fue centrifugado a 4°C durante 10 min a 3000 rpm.

El sobrenadante se eliminó para resuspender la pastilla celular en 10 ml de una solución de cloruro de calcio (CaCl₂) 0.1 M. y se incubó por 10 min a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm, durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido cuidadosamente en 4 ml de CaCl₂ 0.1 M, adicionando glicerol estéril frío al 15 % V:V. Se almacenaron alícuotas de 100 µl a -70°C.

9. Transformación de bacterias químicamente competentes JM109

Las células competentes JM109, fueron transformadas con 250 ng de vector pQE-30 Xa, para lo cual fueron utilizados 100 µl de la cepa bacteriana químicamente competente (descongeladas previamente sobre hielo). Esta mezcla se transfirió inmediatamente a 42°C, durante 40 segundos y posteriormente se colocó en hielo por 3 min. Se agregó 300 µl de medio SOC (Invitrogen) y se incubó durante 1 h en agitación constante a 250 rpm y a 37°C. Finalmente, se sembró con 10 y 90 µl en placas Petri de medio sólido LB-amp [100 µg/ml]. Las bacterias transformadas con el plásmido crecieron durante aproximadamente 16 h a 37°C. El vector de expresión pQE-30 Xa, no permite la selección de clones positivos por reacción colorimétrica.

10. Extracción de DNA plasmídico: miniprep y maxiprep

A fin de obtener DNA plasmídico tanto del vector de expresión pQE-30 Xa como de la construcción pQE-30 Xa-*lktA*, se siguió el protocolo conforme al kit *Illustra plasmid Prep Mini Spin kit* (GE Healthcare). Para comprobar la calidad y la cantidad de plásmido extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Otra técnica también utilizada en la extracción de plásmido fue la de lisis alcalina, en la que una alta concentración de OH⁻ rompe la membrana celular y en combinación con SDS (detergente altamente aniónico) se desnaturalizan las proteínas del DNA. La reacción es neutralizada con acetato de potasio y tratada con RNAsa, a fin de eliminar el RNA. Finalmente, el DNA plasmídico es precipitado con etanol (Sambrook y Russell 2001).

El protocolo de lisis alcalina permitió obtener mayor cantidad de vector de expresión pQE-30 Xa ya que se llevó a cabo en un volumen de 50 ml (maxiprep). Es importante purificar el vector pQE-30 Xa antes de ser ligado al fragmento de interés *lktA*, así como para su secuenciación.

11. Preparación del vector pQE-30 Xa para clonación

Para la inducción de la expresión de la proteína LKTA, fue necesario subclonar el inserto de *lktA* una vez analizada su secuencia en el vector pQE-30 Xa (figura 4). Para esto el vector fue digerido con 0.5 µl de las enzimas de restricción *Stu* I y *Hind* III (10 U/µl), se añadió 2.5 µg/µl de vector pQE-30 Xa (6 µl), 2 µl de la solución amortiguadora 10X (Invitrogen) y 6 µl de agua. Esta reacción fue incubada durante 6 h a 37°C.

La mezcla total de reacción (20 µl), fue cargada en un gel de agarosa al 1%, en una solución amortiguadora al 1X de TAE. Una vez que se comprobó que el vector estuviera linearizado, se

cortó la banda correspondiente para su purificación. Se utilizó el kit *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare). El plásmido fue eluído en 20 μ l de la solución amortiguadora de elución.

12. Clonación de *lktA* en el vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa

Se llevó a cabo la reacción de ligación direccional del inserto *lktA* liberado y purificado. La reacción de clonación se realizó en una proporción 3:1 y de 6:1, añadiendo 3 o 6 μ l de inserto *lktA* [300 ng/ μ l] y 1 μ l [300 ng] del vector de expresión pQE-30 Xa, con 2 μ l de ligasa T4 (1U/ μ l ; Invitrogen), 2 μ l de solución amortiguadora 5X (Invitrogen) y 2 μ l de agua desionizada. La DNA ligasa tiene la propiedad de ligar tanto extremos romos como cohesivos, además de reparar pequeñas rupturas en la cadena de DNA. La reacción de clonación se incubó a 16°C durante 16 horas.

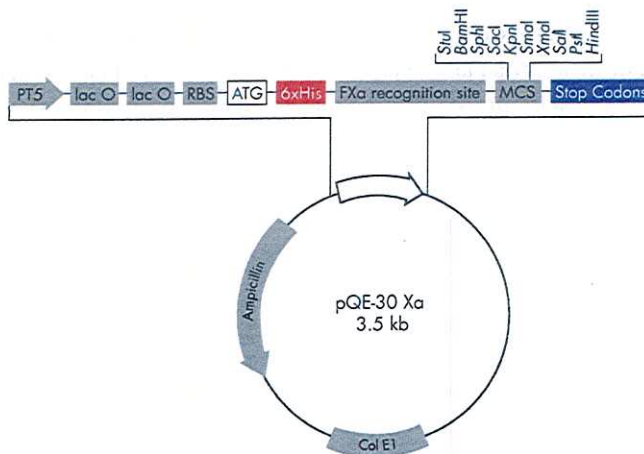


Figura 4. Vector de expresión pQE-30 Xa, en el cual se subclona el producto previamente amplificado por PCR del gen *lktA*.

13. Transformación de la cepa M15 con la construcción pQE-30 Xa-*lktA*

La cepa M15 de *E. coli* (Quiagen), es utilizada para la expresión de proteínas, además de ser útil en la propagación de construcciones. Debido a estas características, fueron obtenidas células M15 *E. coli*, químicamente competentes con la metodología de cloruro de calcio descrita anteriormente para la cepa JM109.

Las células químicamente competentes M15 de *E. coli*, fueron transformadas con la construcción pQE-30 Xa-*lktA*. El protocolo ya fue descrito en la transformación de pCR 2.1-TOPO-*lktA*. Las células transformantes fueron seleccionadas en medio sólido LB-amp [100 µg/ml], a partir de las cuales se preparó una reacción de PCR en colonia para verificar que el fragmento *lktA*, estuviera ligado al vector. En este caso se utilizó *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) 2.1 µl, 0.7 µl de MgCl₂ 50 mM (Invitrogen), dNTPs 10 mM (Invitrogen) 0.4 µl, oligonucleótido directo 1 µl, oligonucleótido reverso 1 µl, 0.3 µl de solución amortiguadora 10X (Invitrogen) y 12.5 µl de agua desionizada. Se realizó el inóculo del clon transformante en el volumen de la reacción de PCR. En un gel de agarosa al 1% se corroboró la presencia del inserto *lktA*. Las condiciones de amplificación se indican en la tabla 2.

Tabla 2
Condiciones de amplificación por PCR en colonia

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	5 min.	1
Desnaturalización	94°C	30 seg.	35
Hibridación	60°C	1 min.	35
Extensión	72°C	1 min.	35
Extensión final	72°C	5 min.	1

14. Digestión del fragmento *lktA* clonado en el vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa

Con el propósito de comprobar la identidad del fragmento clonado, se liberó el inserto mediante digestión con las enzimas de restricción *Stu* I y *Hind* III a partir de los clones identificados como positivos por la amplificación por PCR en colonia, así como a partir de minipreparaciones obtenidas por lisis alcalina. Para lo cual, se agregó a la reacción de digestión 1 μ l del plásmido conteniendo la construcción pQE-30 Xa-*lktA* [aproximadamente 700 ng/ μ l], 1 μ l de agua desionizada, 0.7 μ l de enzima de restricción *Stu* I [10 U/ μ l] (Invitrogen) y 0.7 μ l de *Hind* III [10 U/ μ l] (Invitrogen), 2 μ l de solución amortiguadora 10X (Invitrogen).

15. Inducción de la expresión de un fragmento de la proteína iLKTA recombinante con IPTG

El vector pQE-30 Xa permite la expresión de proteínas recombinantes al ser inducido por IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido), el cual se une a la proteína represora del gen *lac* inactivándola. Una vez que el represor ha sido inactivado, la RNA polimerasa de la célula puede transcribir la secuencia posterior al promotor y por lo tanto la secuencia del clon pQE 30 Xa-*lktA* se traduce como una proteína recombinante.

Para la inducción de la expresión de la proteína, se preparó un precultivo de medio líquido LB-amp inoculado con una colonia de la cepa M15 (Quiagen), previamente transformada con el vector pQE-30 Xa-*lktA* y se incubó a 37°C durante 16 h en agitación constante a 250 rpm.

Tomando una alícuota de 400 μ l del precultivo, se inocularon 30 ml de medio líquido LB-amp [100 μ g/ml] para el control positivo y una más para el control negativo (no será inducida su expresión). Se incubó a 37°C durante 1 h, después de este tiem-

po, se monitoreó el cultivo hasta alcanzar una D.O. entre 0.5 y 0.7 A_{600} .

16. Cuantificación de la proteína recombinante iLKTA-pQE-30 Xa

Previo al análisis de la proteína iLKTA en un gel de acrilamida, se determinó la cantidad de proteína de los extractos crudos de los cultivos mediante el método de Lowry (1951). Para lo cual, se tomaron 1.5 ml de la muestra inducida con IPTG (T_2) y 1.5 ml de la muestra control T_2 (no inducida), se centrifugaron ambas muestras a 14,800 rpm durante 10 min. Las células M15 se resuspendieron en 120 μ l de PBS con SDS al 4% para lisarlas. Se calentaron en agua en ebullición durante 5 min. Posteriormente, se centrifugó durante 10 min a 14,800 rpm y el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, del cual se toman 10 y 20 μ l para un volumen final de 1 ml de cada una de la muestras (inducidas y control, T_2). Se realizó una curva estándar de albúmina [100 μ g/ml]. Se toman las lecturas a 625 nm y se cuantifica la cantidad de proteína con el propósito de cargar la misma cantidad de proteína total en cada carril en un gel de poliacrilamida.

17. Análisis en PAGE de la inducción de la expresión de la iLKTA recombinante

Una vez establecida la concentración de proteínas totales de los extractos, se cargaron 30 μ g de proteína por carril de los diferentes extractos. La inducción de la expresión de la proteína recombinante LKTA se analizó en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 12%. Para el corrimiento electroforético se colocaron los geles de SDS-PAGE en la cámara de electroforesis con sistema vertical (Hoefer miniVE), se adicionó la solución amortiguadora

y se cargaron las muestras, tanto del control positivo (inducido con IPTG) como del control negativo (sin inducir). Se inició la electroforesis a 100 V (30 mA por gel) y cuando el frente rebasó la interfase se aumentó a 150 V. Posteriormente, el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 16 h en agitación constante. Finalmente, se destiñó en agitación con una solución decolorante (10% ácido acético y 10% etanol). El patrón de bandas se analizó con ayuda de un sistema de análisis de imagen.

Resultados

1. Diseño de oligonucleótidos

Con base en las reglas para el diseño de oligonucleótidos, se diseñaron los oligonucleótidos directo

5'-GAAA**AGGCCT**GATGGTGCAGCAAGTTCTAC-3'

y reverso

5'-GGCACAA**AGCTT**AGCAAAATCAGCCTCTCGG-3',

introduciendo los sitios de restricción *Stu* I y *Hind* III respectivamente (señalados en negritas), para la amplificación por PCR de un fragmento del gen *lktA* que codifica para la leucotoxina (LKTA) de *Mannheimia haemolytica*.

2. Extracción de DNA genómico

Se realizó un cultivo bacteriano en 200 ml de medio líquido de soya tripticaseína (Casoy) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml, el cual fue inoculado con 2 ml de *Mannheimia haemolytica* A1 (ATTC BAA-410). La inoculación se realizó en un área estéril. El medio de cultivo inoculado con la bacteria se dejó crecer 16 h en agitación constante a 250 rpm. Al concluir este tiempo, fue mo-

nitoreada la densidad óptica (D.O) del cultivo a 600 nm hasta alcanzar una absorbancia por arriba de 0.4 unidades de absorbancia. La extracción del DNA se realizó acorde a lo indicado en la metodología. La electroforesis se realizó en una solución amortiguadora TAE 1X (figura 5).

Posteriormente, se realizó la cuantificación del DNA genómico a 260 nm (tabla 3) con base en el coeficiente de extinción molar (50/Mcm) y a través de un estándar (marcador de peso molecular 1 kb), en un gel de agarosa al 1% teñido con 2 μ l de colorante SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). Para la amplificación del gen *lktA*, se utilizó una concentración del 80 ng/ μ l de DNA genómico.

Tabla 3

Determinación de la pureza de la extracción de DNA genómico por espectrofotometría

	Absorbancia		Pureza	Concentración
	λ 260nm	λ 280nm	A260/A280	ng/ μ l
DNA <i>M. haemolytica</i>	0.116	0.070	1.652	580

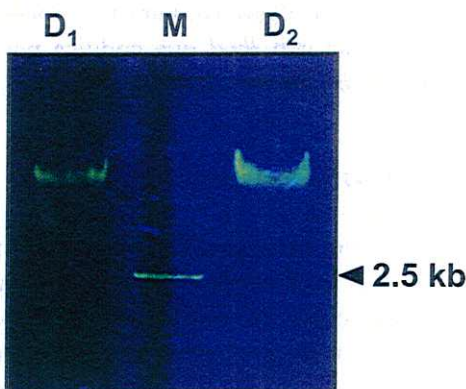


Figura 5. Extracción de DNA genómico de *Mannheimia haemolytica*. D₁) 1 μ l dilución 1:100, M) marcador de tamaño molecular D₂), 2 μ l dilución 1:100.

3. Amplificación de una región interna del gen de *lktA*

Una vez obtenido, el DNA genómico de *Mannheimia haemolytica* se amplificó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un fragmento de 846pb que corresponde al marco de lectura abierto del gen *lktA* de *M. haemolytica* y que generará un polipéptido de 29.6 kD de PM teórico, con 4.71 de punto isoelectrico.

La reacción de PCR se realizó inicialmente en un gradiente de temperatura de 54 a 64°C, en intervalos de 2 grados, con el propósito de establecer la temperatura óptima de amplificación, esto debido a que los oligonucleótidos no correspondían exactamente con la secuencia genómica al tener insertados los sitios de restricción. Se obtuvo como producto de amplificación a 60 y 63°C el fragmento *lktA* de 856 pb (figura 6).

4. Clonación del producto amplificado

Previo a la clonación del amplicón *lktA* producto de la PCR en el vector pCR 2.1-TOPO, se agregó a este producto una unidad de enzima *Taq* polimerasa (0.2 µl), la cual añadirá preferentemente una adenina (A), en el extremo 3' del producto amplificado. Esto permitirá que se lleve a cabo con mayor eficacia la reacción de clonación en el vector pCR 2.1-TOPO, el cual se encuentra linealizado y sobresalen de sus extremos residuos de timina. De esta manera se favorece el proceso de ligación. La reacción de adición de adenina por parte de la enzima *Taq* polimerasa al amplicón *lktA* fue incubada a 72°C durante 20 minutos.

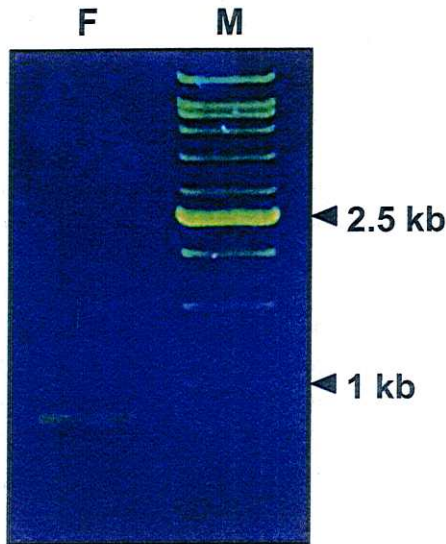


Figura 6. F) Amplificación de un fragmento del gen *lktA* de 846 pb. M) Marcador de tamaño molecular.

5. Transformación bacteriana con el vector recombinante pCR 2.1-TOPO

Con la construcción anterior fueron transformadas bacterias TOP 10 químicamente competentes y seleccionadas por medio de ampicilina [100 µg/ml]. Se consideraron clones positivos a la transformación aquellas colonias que lograron crecer en el medio con restricción de antibiótico. Se seleccionaron algunas colonias al azar para verificar a continuación que portaran el inserto correspondiente.

6. Extracción del DNA plasmídico de la construcción pCR 2.1-TOPO-*lktA*

Este procedimiento se realizó con la finalidad de analizar, a través de su secuenciación, el fragmento amplificado de *lktA*. Se seleccionaron al azar 10 clones positivos y se inocularon en un volumen de 6 ml de medio líquido LB-amp en tubos Corning de 15 ml. Fueron mantenidos en agitación constante a 250 rpm durante 16 h a 37°C.

De los clones positivos se realizaron mini y maxipreps para extraer la construcción pCR 2.1-TOPO-*lktA*. La construcción fue analizada en geles de agarosa al 1% mediante comparación con el vector pCR 2.1-TOPO. Los clones sin inserto migraron una mayor distancia que los que contenían el inserto *lktA* (figura 7).

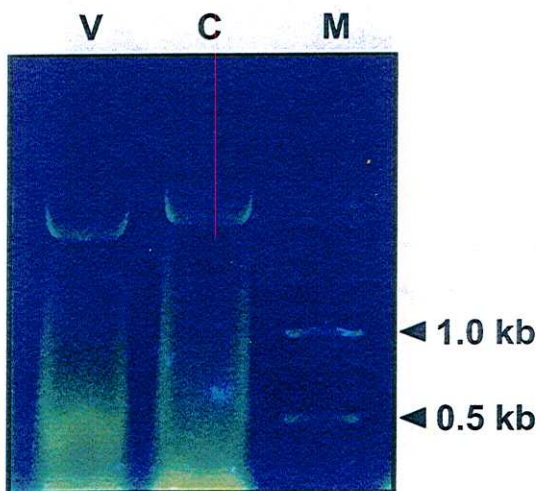


Figura 7. Maxi-preparaciones de DNA plasmídico. V) Vector pCR 2.1-TOPO, C) Vector pCR 2.1-TOPO clonado con el fragmento *lktA*, M) marcador de tamaño molecular.

7. Digestión del inserto pCR 2.1-TOPO-*lktA*

Los oligonucleótidos directo y reverso fueron diseñados con los sitios de restricción *Stu* I y *Hind* III respectivamente, los cuales se encuentran flanqueando al sitio múltiple de clonación (MCS) del vector de expresión pQE-30 Xa. Con estas enzimas se separó el fragmento del gen *lktA* del vector pCR 2.1-TOPO, para su posterior clonación en el vector de expresión pQE-30 Xa. La identidad del fragmento (*lktA* 846 pb) fue verificada en un gel de agarosa al 1% en el que fue cargada toda la reacción de digestión enzimática (15 μ l), al compararlo con un marcador de peso molecular de 100 pb (figura 8).

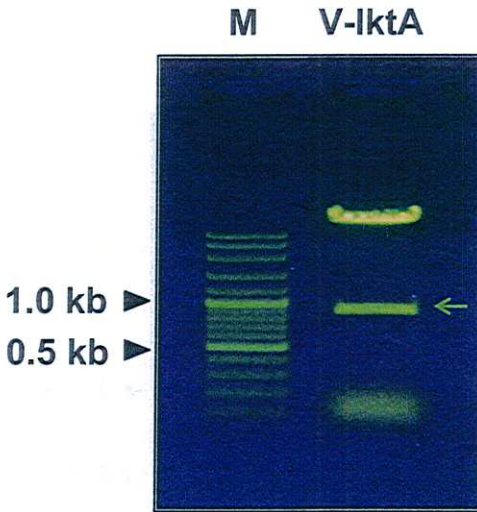


Figura 8. Digestión enzimática del vector pCR 2.1-TOPO. La flecha indica el inserto de *lktA* liberado mediante la digestión con *Stu* I y *Hind* III.

Una vez visualizado el fragmento en un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se cortó con un bisturí estéril y se almacenó a -20°C por 24 h en un tubo Eppendorf (envuelto en papel aluminio para evitar que el paso de la luz degradara la muestra de DNA) hasta su utilización para la purificación y clonación en el vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa (figura 9).

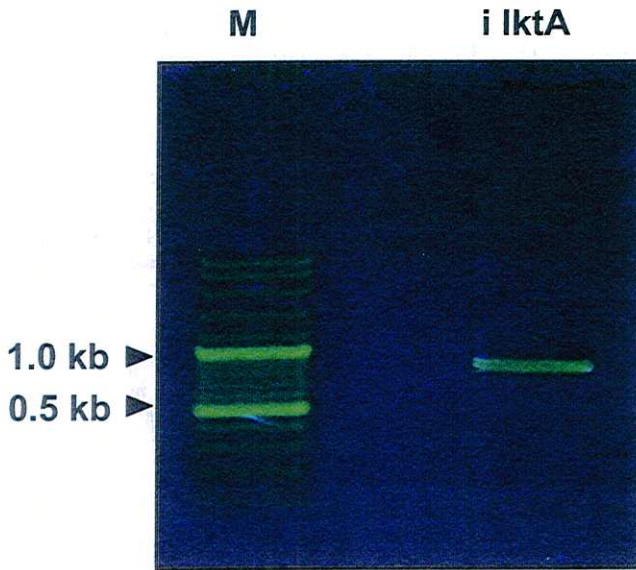


Figura 9. Fragmento purificado *IktA* (846 pb).

8. Análisis de la secuencia del inserto *IktA*

A partir de clones positivos pCR 2.1-TOPO-*IktA*, fueron seleccionados dos de ellos para su análisis y poder así realizar la comparación de secuencias con las bases de datos.

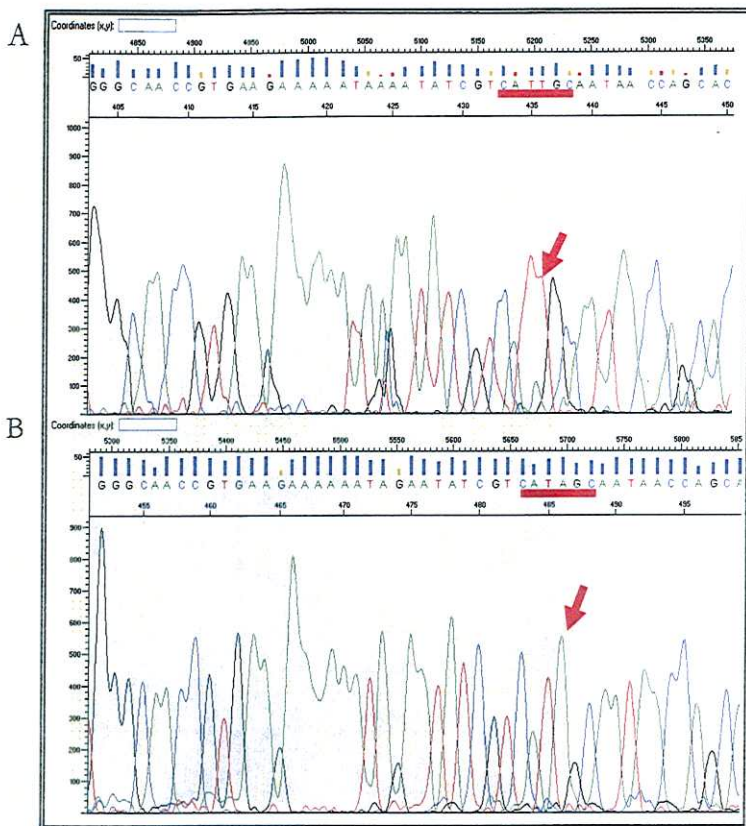


Figura 10. Electroferogramas de secuenciación. A) Secuencia obtenida del clon 1 de LKTA, B) Secuencia obtenida del clon 2 de LKTA, la flecha roja indica el nucleótido que cambia en el clon 2 con respecto al 1.

De los clones secuenciados, se eligieron aquellos que no tuvieran ningún cambio en su secuencia; así mismo, se comprobó que los fragmentos clonados entraran en la fase correcta de lectura en los vectores de expresión (figura 10). De esta forma se seleccio-

naron los clones que resultaron con la secuencia exacta al compararla con la reportada en las bases de datos, para garantizar que la proteína expresada corresponde con la descrita y se encuentra en fase para posibilitar su expresión.

9. Transformación de bacterias químicamente competentes JM109

A fin de contar con una cantidad suficiente de vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa, fue necesario transformar células *E. coli* JM109 con el vector de expresión. Las cuales se sembraron y seleccionaron en medio sólido LB-amp [100 µg/ml] resultando en un número significativo de transformantes.

La extracción del plásmido se realizó a partir de medio líquido LB-amp [100 µg/ml] inoculado con una colonia de JM109 transformada con el vector pQE-30 Xa y crecida a 37°C durante 16 h a 250 rpm. Concluido este tiempo, se midió la D.O. a 600 nm, que supera las 0,5 U. La calidad y cantidad del vector pQE-30 Xa extraído se analizó por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (figura 11).

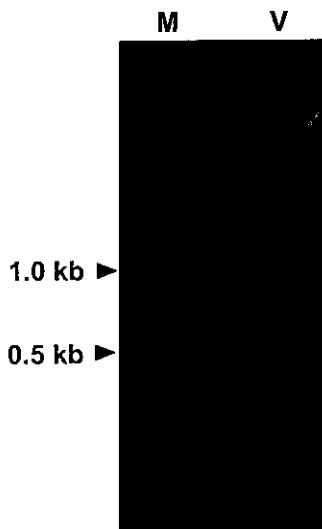


Figura 11. Extracción de DNA plasmídico. M) Marcador de tamaño molecular, V) Vector pQE-30 Xa.

10. Preparación del vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa

Una vez que se obtuvo el vector pQE-30 Xa a través de mini-preparaciones por lisis alcalina y las secuencias de los clones positivos pCR 2.1-TOPO-*lktA* fueron confirmadas, el vector pQE-30 Xa fue digerido con las enzimas de restricción *Stu* I y *Hind* III (figura 12), para luego llevarse a cabo la reacción de ligación con el fragmento *lktA* liberado y purificado y poder inducir posteriormente la expresión de la proteína heteróloga iLKTA.

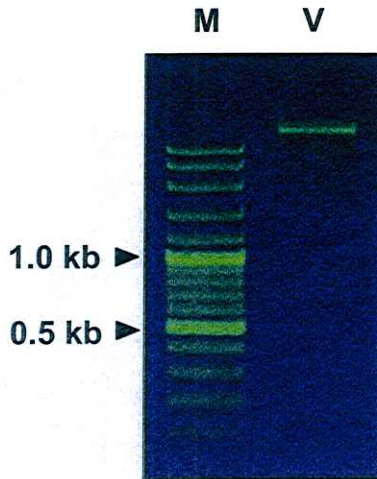


Figura 12. Digestión del vector pQE-30 Xa. M) Marcador de tamaño molecular, V) Vector linealizado por digestión con las enzimas *Stu* I / *Hind* III.

11. Clonación de *lktA* en el vector de expresión pQE-30 Xa

A partir de la clonación del fragmento del gen *lktA* en el vector de expresión heteróloga pQE-30 Xa, metodología descrita anteriormente, se transformaron células competentes M15. Los clones positivos fueron identificados mediante minipreparaciones por lisis alcalina y visualizados en un gel de agarosa al 1% (figura 13).

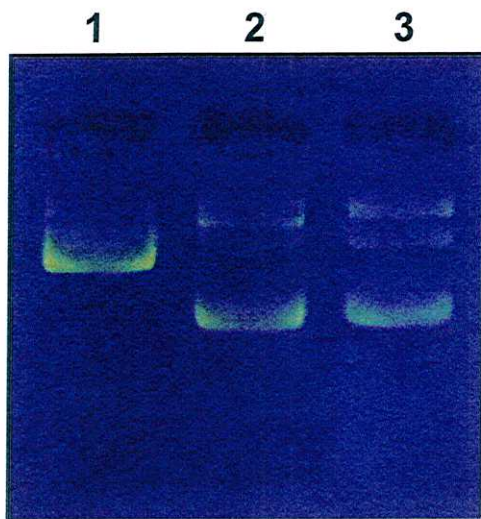


Figura 13. DNA plasmídico. 1) Clon positivo con inserto pQE-30 *Xa-lktA*. 2 y 3) Clones con el vector pQE-30 *Xa* sin inserto.

12. Extracción del DNA plasmídico del clon pQE-30 *Xa-lktA*

Una vez comprobada la presencia del fragmento clonado *lktA* (846 pb), se inoculó medio de cultivo líquido LB-amp [100 µg/ml] con una colonia positiva de la transformación pQE-30 *Xa-lktA* y se extrajo el DNA plasmídico pQE-30 *Xa-lktA* por medio de minipreparaciones por lisis alcalina. Para comprobar la calidad y la cantidad de vector extraído se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (figura 14).

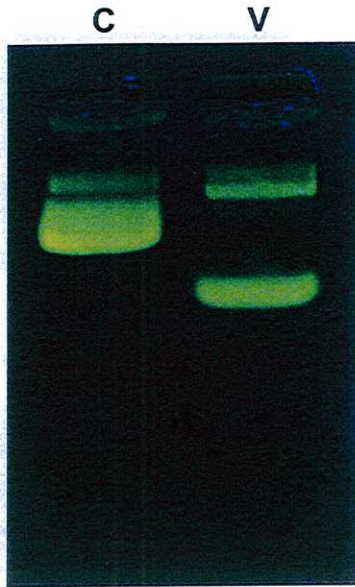


Figura 14. Extracción de DNA plasmídico. C) Construcción pQE-30 Xa-*lktA*, V) Plásmido pQE-30 Xa.

13. Digestión del fragmento *lktA* clonado en el vector de expresión pQE-30 Xa

Una vez realizada la extracción del plásmido pQE-30 Xa-*lktA*, el inserto *lktA* fue extraído del vector pQE-30 Xa mediante digestión con las enzimas de restricción *Stu* I y *Hind* III (figura 15) para comprobar la autenticidad del fragmento clonado y de esta forma realizar los ensayos de inducción correspondientes.

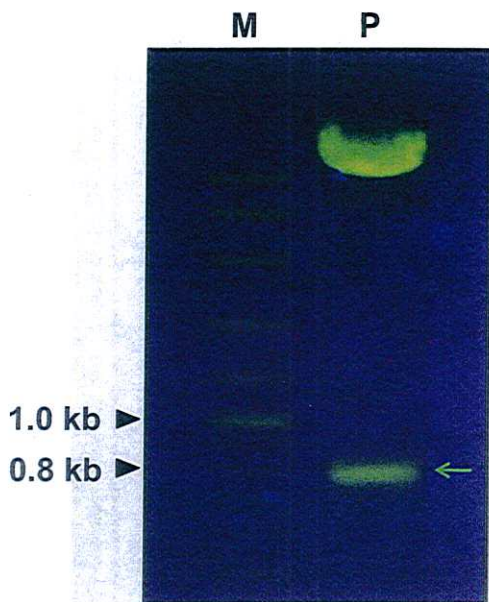


Figura 15. Digestión enzimática con *Stu* I y *Hind* III. M) Marcador de tamaño molecular, P) Plásmido y fragmento *lktA* de 846 pb (flecha).

14. Inducción de la proteína recombinante iLKTA-pQE-30 Xa con IPTG

El proceso de inducción se realizó una vez que el cultivo de células M15 transformadas con la construcción pQE-30 Xa-*lktA* alcanzó una D.O. a 600 nm de 0.588 (muestra a la que se indujo la expresión de la proteína iLKTA) y 0.548 (control negativo sin inducir). Una alícuota de 1.5 ml de cada uno se centrifugó durante 6 min a 12 000 rpm. El sobrenadante se almacenó a -20°C y el precipitado fue resuspendido en 10 µl de solución amortiguadora. A continuación, se adicionaron al cultivo original 65 µl de IPTG [400 mM] y se incubó durante 1 h en agitación a 250

rpm y a 37°C, (T_1). Se registró nuevamente la D.O. de los cultivos (T_1). Se tomó una muestra de 1.5 ml de cada uno, se centrifugó a 12,000 rpm durante 6 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a -20°C, la pastilla celular se resuspendió en 10 μ l de la solución amortiguadora. El cultivo original se incubó una vez más a 37°C durante 2 h en agitación constante a 250 rpm (T_2) y se determinó su D.O. Se centrifugaron 1.5 ml del cultivo, el precipitado se resuspendió en 10 μ l de solución amortiguadora del kit, y el sobrenadante se almacenó a -20°C hasta su procesamiento en un gel de poliacrilamida. Las mediciones de D.O. a los diferentes tiempos de inducción con IPTG [400 mM] se muestran en la tabla 4.

	T_0	T_2	T_3
M15+pQE-30 Xa-<i>lktA</i>, IPTG	0.588	1.231	1.538
M15+pQE-30 Xa-<i>lktA</i>, sin inducir	0.548	1.205	1.584

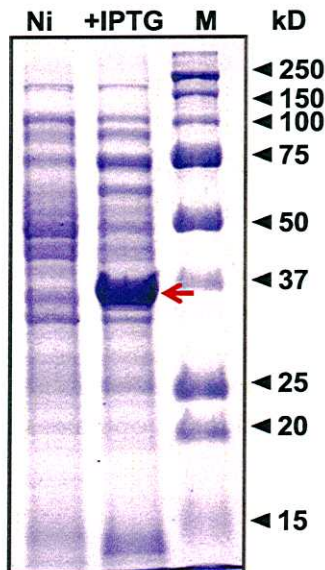
15. Cuantificación de la proteína recombinante iLKTA-pQE-30 Xa

Una vez realizada la inducción con IPTG, se determinó mediante el método de Lowry la cantidad de proteína en los extractos crudos de las células antes y después de la inducción, para posteriormente analizar las muestras en un gel de acrilamida. En la tabla 5 se muestran las cantidades obtenidas de proteína para cada muestra.

	10 I ₂	20 I ₂	D.O a 625 nm	g/ μ l de proteína	l a cargar en el gel [30 μ g]
M15+pQE-30 Xa- <i>lktA</i> , IPTG	0.293	0.277	0.285	13.728	2.2
M15+pQE-30 Xa- <i>lktA</i> , sin inducir	0.124	0.223	0.117	5.664	5.3

16. Análisis de la expresión de la proteína recombinante iLkTA-pQE-30 Xa

La inducción de la expresión de la proteína recombinante LKTA se analizó en un gel de poliacrilamida de acuerdo a lo descrito en material y métodos, cargando 30 μ g de proteína por carril (figura 16).



Discusión

Las bacterias Gram-negativas producen una serie de proteínas que son secretadas en el medio. Estas proteínas tienen diferentes funciones, sin embargo, parecen compartir dos propiedades: unen calcio y poseen repeticiones en tándem de un nonapéptido. El nonapéptido se encuentra en un grupo de proteínas secretadas al medio entre las que se encuentran las hemolisinas, ciclolisinas, metalopeptidasas y leukotoxinas (Economou y cols. 1990).

A partir del análisis de la leucotoxina de *Mannheimia haemolytica*, fue seleccionada una fracción de la proteína para ser amplificada. Dicho análisis consistió en identificar las regiones más posiblemente antigénicas. Se observó que la proteína LKTA contiene motivos de unión a calcio tipo hemolisina (*Hemolysin-type calcium-binding*) cerca del extremo carboxilo terminal que están altamente conservados entre diferentes leukotoxinas. Estos motivos se repiten 5 veces en la LKTA (figura 1). Los motivos tipo hemolisina de unión a calcio se han relacionado con los mecanismos de activación y secreción de la proteína LKTA, pues se ha demostrado que forman una estructura beta enrollada, involucrada en la unión de calcio (Baumann y cols. 1993).

El operón de la leucotoxina de *M. haemolytica* presenta una alta diversidad de aminoácidos y una estructura en mosaico (Larsen y cols. 2007), lo cual sugiere que deriva de transferencias de DNA horizontales intra e interespecie, dentro de los distintos linajes de *M. haemolytica*. Sin embargo, esta amplia recombinación del gen *lktA* ha tenido poco efecto sobre la función de la leukotoxina, ya que es altamente conservada (Robert y Baillie, 2003). Otro de los

dominios identificados en la LKTA está involucrado en la inserción de la toxina en las células blanco (Lee, 2001). Una vez ubicadas estas regiones, se diseñaron los oligonucleótidos correspondientes y se amplificó y clonó en el vector de expresión pQE-30 Xa el fragmento de 846 pb. El fragmento amplificado contiene las cinco regiones de tipo “Hemolysin-type calcium-binding” las cuales se repiten en tándem. Lo anterior, nos permite suponer que la formulación de una vacuna polivalente que incluya este fragmento hará posible la identificación de la LKTA bacteriana por el sistema inmunológico del huésped y activará la memoria inmunológica.

Vacunas polivalentes

Los antibióticos son empleados en la industria profiláctica y terapéuticamente; sin embargo, su eficacia varía ya que existen inconsistencias en el diagnóstico, tratamiento y desarrollo de resistencia a los antibióticos. Las vacunas modernas contienen el sobrenadante de un cultivo que contiene LKT y otros antígenos solubles o extractos de bacterias solos o combinados con bacterias. Estas vacunas tiene entre un 50-70% de eficacia en prevención de *M. haemolytica pneumonia*. Quizá el efectivo control de *M. haemolytica pneumonia* requiera una combinación de diagnósticos precisos, vacunas eficaces, intervención terapéutica y mejores prácticas de manejo (Yesilbag y Güngör, 2008).

Larson y Schell estudiaron la toxicidad y antigenicidad de las vacunas contra la fiebre del embarque o CRB y concluyeron que las bacterias pueden producir un shock endotóxico transitorio luego de las 4 a 6 primeras horas posteriores a su aplicación, especialmente bajo el estrés del transporte (Yates, 1982). Esto significa que las vacunas actuales pueden en efecto reducir la resistencia del sistema inmune del animal en lugar de mejorarla.

La mayoría de las vacunas para el CRB son bacterinas de *M. haemolytica* y *P. multocida*, combinadas con virus y otras bacte-

rias patógenas y los beneficios que otorgan son inconsistentes, pues con frecuencia aumenta la enfermedad en animales ya vacunados. Por otra parte, la LKT recombinante por sí misma no protege al ternero de la neumonía inducida por *M. haemolytica* (Srikumara y Ambagala, 2007; Hirsh y Chung Zee, 1999), por lo que la formulación de una vacuna que contenga varias proteínas recombinantes de *M. haemolytica*, resultará de gran importancia económica.

Conclusiones

A partir de los resultados del presente trabajo se derivan las siguientes conclusiones:

1. Se establecieron las condiciones de clonación y expresión del fragmento de 842 pb de la leucotoxina de *M. haemolytica* en el vector de expresión pQE-30 Xa.
2. El realizar PCR en colonia como método de selección de clones positivos con la construcción pQE-30 Xa-*lktA* no fue confiable, debido a que al secuenciar los clones que generaron un amplificado no contenían el inserto *lktA* y por lo tanto los resultados fueron falsos positivos. Debido a lo anterior, se utilizaron los métodos de extracción de DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción, para tener la certeza de que se realizó el clonaje del inserto.
3. Se indujo la expresión de un fragmento de la proteína LKTA en un sistema heterólogo. La fracción de LKTA expresada contiene cinco motivos de tipo *hemolysin-type calcium-binding*. Estas regiones, ricas en glicina, se han reconocido como determinantes en la unión de calcio, requerido para la unión de la bacteria a su célula blanco, así como para la actividad citolítica de la bacteria.

Con la amplificación, clonaje e inducción de la expresión de un fragmento de la proteína LKTA de *Mannheimia haemolytica*, será posible formular una vacuna polivalente que provea protección

al ganado vacuno contra la toxina de *M. haemolytica*, la cual afecta directamente a las células polimorfo-nucleares del hospedero.

Referencias

- Adamu, J.Y. (2007), “*Mannheimia Haemolytica*: phylogeny and genetic analysis of its mayor virulence factors”, *Veterinary medicine*, 62, 6-13.
- 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 PipE”, *Infection and Immunity*, 72, 7265-7274.
- Baumann, U., S. Wu, K.M. Flaherty y D.B. McKay (1993), “Three-dimensional structure of the alkaline protease of *Pseudomonas aeruginosa*: a two-domain protein with a calcium binding parallel beta roll motif,” *EMBO Journal*, 12, 3357-3364.
- Economou, A., W.D. Hamilton, A.W. Johnston y J.A. Downie (1990), “The Rhizobium nodulation gene nodO encodes a Ca²(+)-binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to haemolysin and related proteins” *EMBO Journal*, 9, 349-354
- Gioia, J., X. Qin, H. Jiang, 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.

- Hau, J., M. Muller y M. Pagni (2007), "HitKeeper, a generic software package for hit list management" *Source Code for Biology and Medicine* 2, 2.
- Highlander, S.K. y V.T. Hang (1997), "A putative leucine zipper activator of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin transcription and the potential for modulation of its synthesis by slipped-strand mispairing" *Infection and Immunity*, 65, 3970–3975.
- Hirsh, D.C. y Chung Z (1999), *Veterinary Microbiology*, USA, Blackwell Science.
- 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), "Effect of stress on viral–bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation", *Comparative and Functional Genomics*, 6, 244–250.
- Larsen, J., P. Kuhnert, J. Frey, H. Christensen, M. Bisgaard y J.E. Olsen (2007), "Analysis of gene order data supports vertical inheritance of the leukotoxin operon and genome rearrangements in the 5' flanking region in genus *Mannheimia*" *BioMed Central Evolutionary Biology*, 7, 1-11.
- Lee, R.W., J. Strommer, D. Hodgins, P.E. Shewen, Y. Niu, y R.Y. Lo (2001), "Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein", *Infection and Immunity*, 69, 5786-5793.
- Lillie, L.E. (1974), "The bovine respiratory disease complex", *Canadian Veterinary Journal*, 15, 233–242
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, y R. J. Randall (1951), "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Merchant, I.A. (1980), *Bacteriología y Virología Veterinarias*, España, Acribia.

- Oriola, J. (1991), "Metodología de la reacción en cadena de la polimerasa", *Revista de Diagnóstico Biológico*, 40, 31-34.
- Rebhun, W.C., C. Guard y C.M. Richards (1995), *Enfermedades del ganado vacuno lechero*, España, Acribia.
- Robert, D.L., S. Baillie (2003), "Citotoxic activity of *Mannheimia haemolytica* strains in relation to diversity of the leukotoxin structural gene lktA", *Veterinary Microbiology*, 92, 263-279
- Sambrook, J. y D.W. Russell (2001), *Molecular cloning. A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Srikumara, S., C.L. Kelling y A. Ambagala (2007), "Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex". *Animal Health Research Reviews*, 8 215-229.
- Trigo, F. J. (1987), "Complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos", *Ciencia Veterinaria*, 4, 1-37.
- Yates, W.D.G. (1982), "A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle", *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 46, 225-263
- Yesilbag, K. y B. Güngör (2008), "Seroprevalence of bovine respiratory viruses in north-western Turke", *Tropical Animal Health and Production*, 46, 225-263.
- Zecchinon, L., T. Fett y D. Desmecht (2005), "How *Mannheimia haemolytica* defeats host defense through a kiss of death mechanism". *Veterinary Research*, 36, 133-156.

Índice de tablas y figuras

Tablas

Tabla 1.	Condiciones de amplificación del fragmento del gen <i>lktA</i>	20
Tabla 2.	Condiciones de amplificación por PCR en colonia	28
Tabla 3.	Determinación de la pureza de la extracción de DNA genómico por espectrofotometría	34
Tabla 4.	D.O a 600 nm en diferentes tiempos de inducción con IPTG	47
Tabla 5.	Quantificación de proteínas totales por el método de Lowry	48

Figuras

Figura 1.	Esquema de la proteína LKTA (953 a.a.)	7
Figura 2.	Operón <i>lktCABD</i> para la síntesis, activación y secreción de la proteína LKTA de <i>Mannheimia haemolytica</i>	8
Figura 3.	Vector pCR 2.1-TOPO	22
Figura 4.	Vector de expresión pQE-30 Xa	27
Figura 5.	Extracción de DNA genómico de <i>Mannheimia haemolytica</i>	34
Figura 6.	Amplificación de un fragmento del gen <i>lktA</i> de 846 pb	36
Figura 7.	Maxi-preparaciones de DNA plasmídico	37
Figura 8.	Digestión enzimática del vector pCR 2.1-TOPO	38
Figura 9.	Fragmento purificado <i>lktA</i> (846 pb)	39
Figura 10.	Electroferogramas de secuenciación	40
Figura 11.	Extracción de DNA plasmídico	42
Figura 12.	Digestión del vector pQE-30 Xa	43

Figura 13. DNA plasmídico.....	44
Figura 14. Extracción de DNA plasmídico.....	45
Figura 15. Digestión enzimática con <i>Stu</i> I y <i>Hind</i> III.....	46
Figura 16. Gel de acrilamida con extractos de proteínas.....	48