

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS



“Coexpresión de los antígenos GP5 y M del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino en plantas transgénicas de tabaco”

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA
PRESENTA

ANA LILIA ROSALES CAMPOS

DIRECTOR DE TESIS
DR. ABEL GUTIÉRREZ ORTEGA

ASESORA
DRA. CARLA VANESSA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

Las Agujas, Zapopan, Jalisco. Septiembre 2014



Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología

COORD. BIOL. 207/2012

**C. ANA LILIA ROSALES CAMPOS
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 "**Coexpresión de los antígenos GP5 y M del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino en plantas transgénicas de tabaco**", para obtener la Licenciatura en Biología.

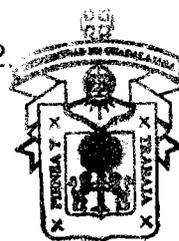
Al mismo tiempo le informamos, que ha sido aceptado como director(a) de dicho trabajo a **Dr Abel Gutiérrez Ortega**, y como asesor a: **Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández**.

Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"**

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., 11 de octubre, del 2012.

**DRA. TERESA DE JESÚS ACEVES ESQUIVIAS
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



**COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

Verónica Palomera Gto.

**M.C. VERÓNICA PALOMERA AVALOS
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

Dra. Georgina Adriana 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: **“Coexpresión de los antígenos GP5 y M del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino en plantas transgénicas de tabaco”** que realizó la pasante Ana Lilia Rosales Campos con número de código 206413854, 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

“PIENSA Y TRABAJA”
 Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. 8 de julio del 2014


 Dr. Abel Gutiérrez Ortega
 Director del Trabajo


 Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández
 Asesor

COMITE
 TITULACION





Nombre completo de los Sinodales asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobado	Fecha de aprobación
Dra. Anne Marguerite Helene Santerre		15 /07 /2014
Dr. Liberato Portillo Martínez		15 julio 2014
Dra. Lucila Méndez Morán		15 Julio 2014
Supl. Dra. Carla Vanessa Sánchez Hernández		23-Junio-2014

En memoria de mi Padre y mi Tita.

**A mi madre,
por ser mi pilar y un gran ejemplo de fortaleza.
Te quiero "maaaami"**

Agradecimientos:

A la Universidad de Guadalajara, por ser mi *alma mater*, por brindarme la oportunidad de superarme y de estudiar la carrera de Biología que es mi pasión

Al CIATEJ, por abrirme las puertas para realizar mi trabajo de investigación en el área de Biotecnología Médica y Farmacéutica.

A mis papás, por estar en todo mi camino de vida y porque gracias a ustedes, soy la persona que soy.

A Carla y Abel, por ser mis padres académicos; gracias a ustedes conocí el mundo de la Investigación y la Biotecnología. Además, gracias por ser mi ejemplo profesional a seguir y por todos esos momentos compartidos fuera del laboratorio, por los consejos y por todo el apoyo que me han brindado en estos años de conocernos.

A todo el PTV'S team: Mi Siame (Olga), Aurora, mi Bro (Carlos), Paola, Apatzingan, Marcela y Jesús Fernando por toda su ayuda en el laboratorio, por su valiosa amistad, y por transmitirme sus conocimientos.

A mis compañeros de Biotecnología Médica y Farmacéutica y Biotecnología Industrial: Mimito (Guillermo), Michel, Ñoñita (Adriana), Gisela, Felipe, Marco, César y Yessica por todos los momentos que vivimos juntos en el laboratorio.

A mi primera familia de laboratorio: Isa, Paulina, Martha, Alejandro, Fernanda, Martín y Guilli, gracias por todas las enseñanzas, el cariño y todo su tiempo en el laboratorio de marcadores moleculares.

De forma especial a mis amigos: Lety Ontiveros, Mayra Alcalá, Tito Mora y Miguel Vázquez por estar en los buenos momentos y en los malos también, gracias porque cuento con ustedes y porque diario se aprende algo nuevo con ustedes.

A mi Tito, Madrina y Abui por todo su cariño y comprensión.

A mis sinodales, por su paciencia, por todas las correcciones y observaciones hechas a mi tesis.

A los Doctores Jorge Bravo y Mario Flores por sus consejos y su apoyo durante mi estancia en CIATEJ.

Y a todos los que han andado en mi camino, por los que estuvieron y están porque gracias a todos se saborea más la vida, compartiendo y aprendiendo.

Esta tesis fue realizada gracias al financiamiento otorgado por el fondo de Investigación Científica Básica SEP-CONACYT al proyecto “Presentación de antígenos en partículas tipo virus obtenidas de células en suspensión de tabaco para el desarrollo de vacunas” con clave 83863.

De igual manera agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que recibí para la realización de esta tesis a través del mismo proyecto

ÍNDICE

Página

Índice de figuras	6
Índice de cuadros	7
Abreviaturas	8
Resumen	9
Antecedentes	10
El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV).....	10
Las plantas como biorreactores para la producción de antígenos	12
Desarrollo de vectores vacunales contra PRRSV	14
Planteamiento del problema	15
Justificación	15
Objetivos	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
Hipótesis	16
Metodología	16
Diseño de oligonucleótidos y amplificación de <i>GP5</i> y <i>M</i>	16
Construcción de vectores	18
Transformación de <i>Nicotiana tabacum</i> vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	22
Análisis de expresión genética de <i>GP5</i> y <i>M</i> en <i>Nicotiana tabacum</i>	23
Resultados	23
PCR para la amplificación del ORF5 y ORF6	23
Clonación dentro de los vectores de transferencia	24
Identificación de los genes <i>GP5</i> y <i>M</i> en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
Generación y análisis de las proteínas GP5 y M en plantas de tabaco transformadas	29
Discusión	33
Conclusiones	36
Perspectivas	36
Literatura citada	37
Anexos	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Topología de las proteínas GP5 y M en el PRRSV

Fig 2. Diseño *in silico* de las construcciones para los vectores de Transformación

Fig 3. Amplificación de los genes *GP5* y *M*

Fig 4. Digestión de las construcciones pCAS35s2XGP5 y pCAS35s2XM con las enzimas *XhoI* y *SstI*.

Fig 5. PCR para amplificar los genes *GP5* y *M* dentro de los vectores pCAS35s2XGP5 y pCAS35s2XM

Fig 6. Vector pCAS35s2XGP5 y pCAMBIA2300 digeridos con la enzima *EcoRI*

Fig 7. Comprobación por digestión de la construcción pCAMBIA2300M con las enzimas *HindIII* y *EcoRI*

Fig 8. Comprobación por digestión de la construcción pCAMBIA2300GP5-M con la enzima *EcoRI*

Fig 9. Corrimiento electroforético de los productos de PCR de dos colonias de *Agrobacterium tumefaciens* para verificar la presencia de los genes *GP5* y *M*

Fig 10. Comparación del crecimiento en medio de selección de los explantes transformados de *N. tabacum*.

Fig 11. Plantas transformadas, con el vector pCAMBIA2300 y transformante con el vector pCAMBIA2300GP5-M

Fig 12. Placa de ELISA para la identificación de NPT II

Fig 13. Integridad de ARN extraído de las plantas transformantes

Fig 14. RT-PCR de las plantas de tabaco.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes *GP5* y *M* y su subclonación.

Cuadro 2: Condiciones para la amplificación de los genes *GP5* y *M* por PCR

ABREVIATURAS

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido Ribonucleico.

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

MPM: Marcador de peso molecular

ng/μl: Nanogramos por microlitro

ORF: Por sus siglas en inglés Open Reading Frame. Marco de Lectura Abierto

Pb: Pares de bases.

PCR: Por sus siglas en inglés Polymerase Chain Reaction.
Reacción en cadena de la polimerasa.

PRRSV: Por sus siglas en inglés Porcine Respiratory and Reproductive
Síndrome Virus. Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

RPM: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Transcriptasa reversa, reacción en cadena de la polimerasa.

S.O.C: Del inglés Super Optimal Broth with Catabolic Repressor.
Caldo super óptimo con represor catabólico.

U/μl: Unidades por microlitro

μl: Microlitro.

UTR: Por sus siglas en inglés Untranslated Region. Región no traducible.

RESUMEN

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es una enfermedad causada por el virus del mismo nombre (PRRSV) y en la actualidad se encuentra distribuida en la mayoría de las regiones porcícolas a nivel mundial, generando fuertes pérdidas económicas. Diversos grupos de investigación trabajan para encontrar alternativas profilácticas contra este agente infeccioso. Los estudios actuales se enfocan en las proteínas más importantes e inmunogénicas de este virus, GP5 y M, observando que ambas son buenas candidatas para el desarrollo de vacunas de nueva generación. Sin embargo, a la fecha no se han coexpresado dichas proteínas en un sistema vegetal. El objetivo de este trabajo de investigación fue coexpresar los antígenos GP5 y M del PRRSV en tabaco, mediante ingeniería genética, generando diversas construcciones que permitieran su uso para transformar una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* y por esta vía transformar explantes de tabaco. Los resultados fueron favorables a nivel de expresión del transcrito, sin embargo, este proyecto aun tiene como perspectivas un análisis a nivel de proteína para corroborar la coexpresión de dichos antígenos en el sistema vegetal y posteriormente comprobar la eficacia inmunogénica de los extractos expresantes de GP5 y M en un modelo murino.

ANTECEDENTES

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV)

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino es una enfermedad causada por el virus del mismo nombre (PRRSV) que fue detectada por primera vez en Estados Unidos de América en 1987 (Arias *et al.*, 2002). En la actualidad se encuentra distribuida en la mayoría de las regiones productoras de carne de cerdo representa un problema que genera pérdidas económicas millonarias (Flores–Mendoza y Hernandez y Hernández., 2010) sobre todo en las granjas porcícolas de Asia, Europa y Norteamérica (Dietze *et al.*, 2011).

El agente causal de esta enfermedad es un virus de ARN que mide de 50 a 72 nm de diámetro y pertenece a la familia *Arteriviridae* del orden Nidovirales; dada la diversidad existente entre los aislados de PRRSV, éstos se clasifican en dos grandes tipos antigénicos: europeo, representado por la cepa Lelystad, y americano, representado por la cepa ATCC VR-2332; ambos subtipos tienen en la actualidad una distribución mundial. No se conoce con exactitud el mecanismo de patogénesis de la enfermedad ya que el periodo de incubación es muy variable, desde tres días hasta varias semanas. El cuadro de síntomas que pueden presentar los animales infectados son: inapetencia, fiebre, tos y úlceras gástricas. La vía de infección es oronasal-vaginal, así, el virus principalmente se replica en macrófagos pulmonares y en nódulos linfáticos. El genoma de este virus es, como ya se había mencionado antes, de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, con un tamaño de aproximadamente 15 Kb, compuesto de una región no traducible en el extremo 5' (UTR, por sus siglas en inglés: untranslated region) seguida de 9 marcos de lectura abierta (ORF's) llamados ORF1a, ORF1b, ORF2a, ORF2b, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 y ORF7. Los ORF 1a y 1b constituyen el 75% del genoma y codifican para una poliproteína con actividad de ARN polimerasa. Por su parte, los ORF's 2a y del 3 al 5 codifican para las glicoproteínas estructurales GP2a, GP3, GP4, GP5, mientras que el ORF 2b codifica para una proteína no glicosilada, y los ORF6 y 7 codifican para la proteína de matriz (M) y de nucleocápside (N), respectivamente.

El antígeno más inmunodominante y antigénico es GP5, el cual es una proteína transmembranal glicosilada de aproximadamente 25 kDa que puede dividirse en varios dominios que son: un péptido señal en la región N-terminal de 30 aminoácidos, una región transmembranal y un endodominio. Dentro del ectodominio se han encontrado dos epítopes (A y B) separados por siete aminoácidos. Se ha demostrado que el epítotope A, situado entre los aminoácidos 27 al 30, es el más inmunodominante, sin embargo, no está asociado a la neutralización viral, induciendo anticuerpos que distraen de manera momentánea la respuesta neutralizante, ya que se puede reconocer la presencia de este epítotope al inicio de la infección. El epítotope B comprende la región de los aminoácidos 37 al 45; esta región es conservada y altamente glicosilada, este epítotope es el encargado de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes ya que la unión antígeno-anticuerpo está dentro de los residuos 39 al 41 (Ostrowski *et al.*, 2002). Se ha sugerido que esta región tiene un papel funcional-estructural importante para el virus.

La proteína M es la más conservada dentro de la familia *Arteriviridae*, es una proteína de matriz que presenta un tamaño aproximado de 19 kDa, posee un ectodominio corto de 10 a 18 aminoácidos y el dominio amino terminal se extiende tres veces a través de la membrana; esta proteína está involucrada en el ensamblaje y gemación del virus. Además, se ha demostrado que es un potente inductor de células T (Kimman *et al.*, 2009).

Los antígenos GP5 y M son las proteínas de envoltura más grandes en el virus, formando heterodímeros dentro del virión determinadas por uniones de puentes disulfuro (Figura 1) que se forman en el retículo endoplasmático. Se conoce que estos heterodímeros interactúan con moléculas de heparan sulfato como primer sitio de unión en macrófagos alveolares a principios de la infección por PRRSV (Kimman *et al.*, 2009). Estas proteínas son blanco para la producción de vacunas subunitarias.

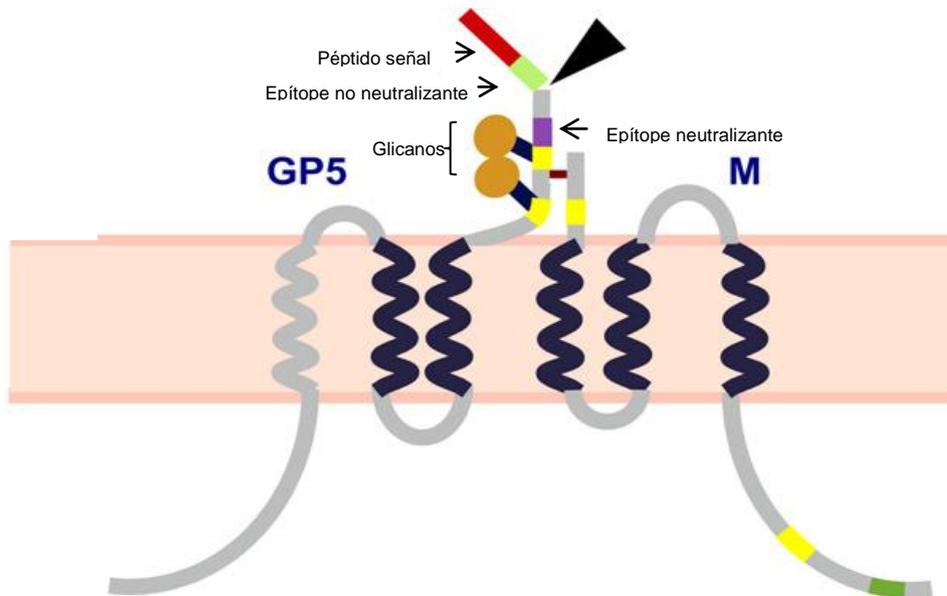


Fig 1. Topología de las proteínas GP5 y M en el PRRSV (Cruz *et al.*, 2010)

Las plantas como biorreactores para la producción de antígenos.

Los avances en la biotecnología y el estudio de moléculas que inducen los componentes de la respuesta inmune han ampliado el panorama para el desarrollo de vacunas y las formas de implementación de éstas. Las vacunas de nueva generación utilizan principalmente complejos de estructuras antigénicas (como lo son las partículas tipo virus) donde los antígenos o el epítipo antigénico son presentados en superficies o usados en conjunto con complejos estructurales como adyuvantes (Buonaguro y Butler-Ransohoff., 2010).

Actualmente, la producción de biofármacos se realiza utilizando básicamente microorganismos como las levaduras y las bacterias, sin embargo, estas no son capaces de producir modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, que en la mayoría de los casos es indispensable para la funcionalidad de los biofármacos; además, el plegamiento incorrecto de la proteína y la formación de agregados insolubles limitan la obtención de productos biológicamente activos o cuyo costo de purificación es alto.

La principal ventaja de las plantas como sistemas de producción de proteínas recombinantes es la disponibilidad prácticamente ilimitada de biomasa que puede obtenerse utilizando la infraestructura ya existente para la siembra, cosecha, almacenamiento y procesamiento de los cultivos (Shih y Doran.,

2009). La optimización de los niveles de producción puede lograrse por diversas estrategias. La elección de la estrategia más adecuada o combinación de ellas dependerá de las características de la proteína a sintetizar, de la especie vegetal utilizada, así como de las necesidades de producción. En cuanto a la elección del sistema de expresión, las opciones comprenden dos grandes grupos: integrativos y no integrativos; el primer grupo se refiere a aquellos sistemas que permiten la integración estable de la construcción genética en el genoma vegetal, tanto en el núcleo como en los organelos. Los sistemas no integrativos, en cambio, no requieren la integración del transgén, son más rápidos, pero no heredables a la progenie; en este último grupo se encuentran la transformación transitoria con vectores virales y la agroinfiltración (Bravo *et al.*, 2005).

Los tipos de plantas y tejido usados para la producción de proteínas y otros antígenos vacunales incluyen:

- Tejidos de hoja y tallo de tabaco y sus diferentes variedades
- Hierbas acuáticas
- Semillas de arroz, frijol, maíz y tabaco
- Frutas como los jitomates y las fresas
- Raíces vegetales como las zanahorias
- Cultivos unicelulares de algas
- Células en suspensión de tabaco y otras plantas
- Raíces peludas (*hairy roots*) derivadas de varias plantas transformadas vía *Agrobacterium rhizogenes*
- Transformación de cloroplastos de diferentes especies de plantas.

Las plantas transgénicas representan una fuente de propagación estable y de bajo costo, sin embargo el desarrollo y selección de la línea transgénica adecuada puede tomar varios meses (Rybicki, 2009).

Nicotiana tabacum, ha sido ampliamente usada para la producción de antígenos, anticuerpos y proteínas de interés farmacéutico, ya que ofrece una ventaja experimental en cuanto a la extracción del antígeno y transformación, además de la facilidad en su manipulación.

A la fecha, se han expresado algunos antígenos del virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino en sistemas vegetales. Chen y Liu (2011) obtuvieron plantas de papa transformadas con la glicoproteína GP5 e inmunizaron ratones vía oral con extractos de tubérculos transformados; los resultados demuestran respuesta inmunológica a través de la producción de IgG e IgA. Resultados similares fueron obtenidos por Chia *et al.* (2011) con tabaco transformado con GP5 y la subunidad B de la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*.

Desarrollo de vectores vacunales contra PRRSV

En la actualidad, GP5 y otras proteínas del PRRSV existen ya como proteínas recombinantes: Pirzadeh y Dea (1998) expresaron una proteína codificada por el ORF5 fusionada con la proteína Glutathion S- transferasa (GST) en *E. coli*, y observaron que la glicosilación no está asociada con la neutralización de los epítopes reconocida por los anticuerpos monoclonales. También se ha trabajado con algunos fragmentos de esta misma proteína: Zhou *et al.* (2009) expresaron distintas fracciones fusionadas a GST para poder determinar los epítopes neutralizantes de la proteína GP5.

En cuanto a la coexpresión de los antígenos GP5 y M se han utilizado algunos modelos, como el virus de Ankara, en el que se observó que la expresión de dichos antígenos es más eficiente si se utilizan dos promotores diferentes (Zheng *et al.*, 2007), al igual que en el trabajo de Wang *et al.* (2007), la coexpresión de estos antígenos induce tanto respuesta inmune celular como humoral. Por otra parte, Jiang *et al.*, (2006), lograron coexpresar a estos antígenos en un adenovirus y concluyeron que la coexpresión de dichas proteínas aumentaba significativamente la producción de anticuerpos así como la respuesta humoral y celular en ratones, en comparación con el antígeno GP5 o M por separado; estos anticuerpos se presentaron a los 14 días después de la inoculación y se mantuvieron a lo largo de todo el experimento.

Hasta la fecha, no se ha demostrado la coexpresión de los antígenos GP5 y M del PRRSV dentro de un sistema vegetal de forma estable o transitoria, ya sea a partir de la introducción de una unidad bicistrónica controlada por un solo promotor o mediante la introducción de dos unidades de transcripción

monocistrónicas, lo anterior representa un reto metodológico interesante y sienta las bases para el desarrollo de una vacuna subunitaria vegetal contra el PRRSV.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El virus del síndrome respiratorio reproductivo y porcino representa uno de los problemas más importantes que afectan la producción porcícola a nivel mundial. Existen trabajos de investigación donde se busca expresar una o varias proteínas inmunogénicas de este virus para implementar vacunas; sin embargo, no se han realizado investigaciones sobre la coexpresión de las dos proteínas más importantes del virus (GP5 y M) en plantas. La producción de ambas proteínas en un modelo vegetal representa una alternativa factible para el desarrollo de una nueva vacuna. Su obtención representa una medida profiláctica contra este virus.

JUSTIFICACIÓN

Los trabajos donde se han expresado antígenos del virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino engloban algunos sistemas vegetales, virus o la utilización de vectores vacunales; pero a la fecha, no se han coexpresado los antígenos más inmunogénicos de este virus (GP5 y M) en plantas; por lo anterior, en el presente trabajo se pretende transformar explantes de tabaco con un plásmido binario que contiene dos unidades de transcripción para la expresión de los genes que codifican para las proteínas GP5 y M del PRRSV, así como analizar su expresión a nivel de RNA mensajero.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la coexpresión de los antígenos GP5 y M del virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino (PRRSV) en plantas transgénicas de tabaco.

Objetivos específicos

1. Obtener los genes que codifican para los antígenos GP5 y M de una cepa vacunal de PRRSV
2. Generar la construcción del vector de transformación que contenga los genes GP5 y M del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
3. Transformar explantes de tabaco con el vector de expresión vía *Agrobacterium tumefaciens*
4. Determinar la expresión de los antígenos GP5 y M en líneas de tabaco transformadas con el plásmido de expresión

HIPÓTESIS

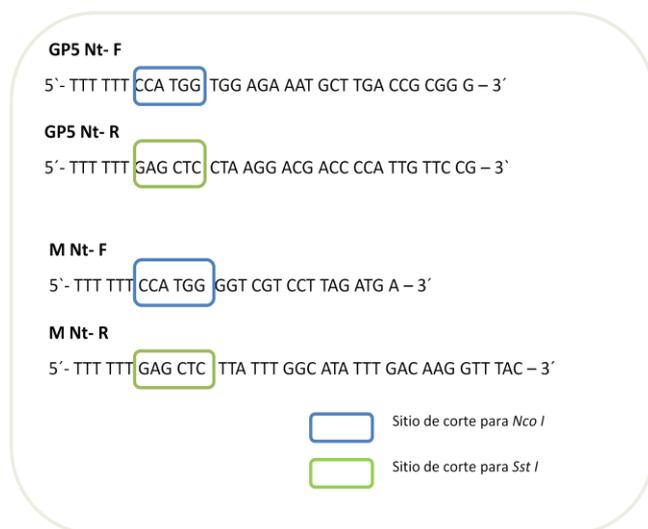
Los antígenos GP5 y M pueden coexpresarse de manera estable en plantas de tabaco bajo unidades transcripcionales independientes.

METODOLOGÍA

Diseño de oligonucleótidos y aislamiento de los genes *GP5* y *M*

A partir de la secuencia obtenida en GenBank número V87392.3, se diseñaron los oligonucleótidos con ayuda del programa CLC Sequence para la amplificación de los genes *GP5* y *M* de la cepa vacunal VR-2332 proporcionada por Boehringer® y su posterior clonación. Se añadieron los sitios de restricción *NcoI* y *SstI* en los oligonucleótidos sentido y antisentido, respectivamente y en

todos los casos se añadió una secuencia de seis timinas que aumenta la eficacia de unión y corte en el sitio de reconocimiento para estas enzimas (Cuadro 1).



Cuadro 1. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los genes *GP5* y *M* y su subclonación. Se señalan los sitios de corte para las enzimas *Nco*I y *Sst*I.

El gen *GP5* se obtuvo de una construcción hecha anteriormente en laboratorio como parte de un proyecto global, por lo que sólo se clonó a partir del vector pET101 TOPO. Por otro lado, el gen *M* se aisló a partir de ARN proporcionado por Boehringer® de la cepa vacunal VR-2332. A partir de este ARN se realizó una RT-PCR con la enzima SuperScript® III de Invitrogen™, la reacción se realizó con: 5 µl de RNA, 1 µl del primer Reverse (10 µM) 1 µl de dNTP's (10 µM) y 6 µl de agua Milli- Q® esterilizada, la reacción se incubó a 65 °C por 5 min y en hielo por 5 min; transcurrido el tiempo se añadió 4 µl del buffer 5X First strand, 1 µl de DTT al 0.1 M, 1 µl de la enzima RNaseOUT y 1 µl de la enzima SuperScript III®, se mezcló por pipeteo, se incubó a 50 °C por una hora y posteriormente se dejó a 70 °C por 15 min para detener la reacción, y así obtener el ADN complementario para amplificar dicho gen. Para la PCR se usó la enzima *Taq* polimerasa de Invitrogen™, usando 5 µl del buffer PCR 10X, 1.5 µl de MgCl₂ 50 mM, 1 µl de dNTP's, 1 µl de cada oligonucleótido (forward y

reverse) a 10 μ M, 4 μ l de cADN de la reacción de transcripción anterior para *M* y 1 μ l de ADN plasmídico para *GP5*, 0.4 μ l de la *Taq* polimerasa y se llevó a un volumen final de 50 μ l, bajo las condiciones que se muestran en el cuadro 2 en el termociclador Veriti de Applied Biosystems®; los fragmentos de *GP5* y *M* (500 y 600pb, respectivamente), se purificaron con el kit QIAquick Spin de Qiagen® siguiendo las instrucciones de la casa comercial (Anexo 1), para eliminar contaminantes.

1.	95°C	5m	
2.	95°C	30s	} 40 ciclos
3.	54°C M /60°C Gp5	30s	
4.	72°C	40s	
5.	72°C	7m	
6.	4°C	∞	

Cuadro 2: Condiciones para la realización de PCR

Una vez purificados los fragmentos se realizó nuevamente una PCR con la enzima PFUltra de Invitrogen™ que brinda una menor tasa de errores que una *Taq* polimerasa común, y se añadieron los sitios de restricción a los fragmentos previamente amplificados para posteriores clonaciones. La PCR se corrió con: 5 μ l del buffer PFUltra, 1 μ l de dNTP's, 1 μ l de cada oligonucleótido (forward y reverse) a 10 μ M, 1 μ l de la enzima PFUltra, 1 μ l de ADN plasmídico para *GP5* y 4 μ l de cADN para *M* en 50 μ l de volumen final y con el mismo programa para el termociclador.

Construcción de vectores

Inicialmente, se clonaron ambos genes por separado dentro del vector para expresión de genes en plantas pCAS35s2X, que contiene un casete con el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor por duplicado (35SCaMV), la región no traducible 5' del virus del jaspeado del tabaco (TEV 5'), la región no traducible 3' de la proteína de almacenamiento vegetativo de soya (VSP3') como terminador, además de poseer un gen que confiere resistencia a ampicilina. Para realizar la clonación se digirieron el vector y los productos de PCR con las enzimas de restricción* (Anexo 1) *Nco*I y *Sst*I. Para digerir *GP5* y

*Todas las enzimas de restricción usadas en este trabajo son de Invitrogen™ y se siguieron las instrucciones de la casa comercial para las digestiones

M se utilizaron 25 μ l de ADN (de cada gen) con 1 μ l de la enzima *Nco*I, 1 μ l de la enzima *Sst*I y 3 μ l del buffer 2 de Invitrogen™, en un volumen de 30 μ l. Para digerir el vector pCAS35s2X se utilizaron 5 μ l del ADN plasmídico con las mismas cantidades de buffer y enzimas. Una vez digerido este vector se corrió el producto en gel de agarosa, se cortó la banda de aproximadamente 4500 pb y se purificó con el kit Q1 gel extraction kit (50) de Qiagen® (Anexo 3). Posteriormente, se hizo una ligación de los fragmentos de restricción con el vector con a una relación de 4:1 (fragmentos:plásmido) es decir , 2 μ l del plásmido pCAS35s2X con 8 μ l de cada fragmento, 1 μ l de la enzima Ligasa T4 de Invitrogen™ y 3 μ l del buffer de la ligasa 5 X; la reacción se dejó toda la noche en baño recirculador a 16 °C para después transformar células de *E. coli* de la cepa Top10 de Invitrogen™ mediante electroporación: añadiendo 3 μ l del producto de ligación en 50 μ l de células electrocompetentes (Anexo 4) en cubetas de electroporación con receptáculo de 0.1 cm (Sigma®) con un pulso de 200 Ω de resistencia, 25 μ faradios y 1.5 KV en el Gene Pulser II de Bio Rad®. Se resuspendieron las células en la cubeta de electroporación con 500 μ l de medio SOC y posteriormente se plaquearon en cajas Petri con medio LB con ampicilina a una concentración de 100 mg/L y X-GAL de Fermentas® a una concentración de 20 mg/mL.

La incubación se realizó a 37 °C por 16h. Posteriormente, se picaron y sembraron 8 colonias en medio LB con ampicilina 100 mg/L y en 3 mL de medio LB líquido, de igual manera se dejaron en incubación por 16 h a 37 °C (el medio líquido se dejó en agitación constante de 250 rpm); para el análisis, se extrajo ADN plasmídico por medio del Kit GeneJet Mini Prep de Fermentas® (Anexo 5) analizando el ADN de 16 colonias por medio de digestión con las enzimas *Xho*I y *Sst*I y se corrieron los productos en gel de agarosa al 1% en TAE 1 X teñido con SYBR-Safe de Invitrogen™

Cuatro de las construcciones obtenidas pCAS35s2XGP5 y pCAS35s2XM se analizaron por PCR (dos por cada gen), para asegurar que las cepas estuvieran transformadas con vectores recombinantes, utilizando los oligonucleótidos ya diseñados y siguiendo el protocolo para *Taq* Polimerasa de Invitrogen™.

Posteriormente, se hicieron dos nuevas construcciones dentro del vector binario pCAMBIA2300 (funcional para *E. coli* como para *Agrobacterium tumefaciens*); este vector tiene un gen de resistencia a Kanamicina por lo que en el medio de selección se utilizó LB con una concentración de 50 mg/L de este antibiótico. Las condiciones fueron las mismas que la transformación antes descrita en el documento: extracción de ADN plasmídico, digestión, ligación y transformación por electroporación (cambiando las enzimas de restricción), el vector pCAS35s2XM se digirió con *HindIII* y *EcoRI* para obtener el casete de expresión completo de *M* y se clonó dentro del vector pCAMBIA2300; por otra parte, pCAS35s2XGP5 se digirió con *PstI* para obtener el casete de expresión *GP5* y clonarlo en el vector pCAMBIA2300. Para clonar los dos genes dentro del mismo vector, se utilizó la construcción pCAMBIA2300M, digiriendo el plásmido con la enzima *EcoRI* para poder linealizarlo y en esta ocasión se desfosforiló con la enzima rAPid alkaline Phosphatase de Roche® para evitar autoligaciones la reacción se realizó con: 10 µl del vector pCAMBIA2300 digerido, 2 µl del buffer rAPID Alkaline Phosphatase, 1 µl de la enzima Phosphatase y 7 µl de agua Milli-Q® esterilizada, se dejó incubar a 37 °C por una hora y se detuvo la reacción a 75 °C por 2 min. Después se clonó el casete de expresión de *GP5* en este vector linealizado, con la endonucleasa *EcoRI* (Figura 2).

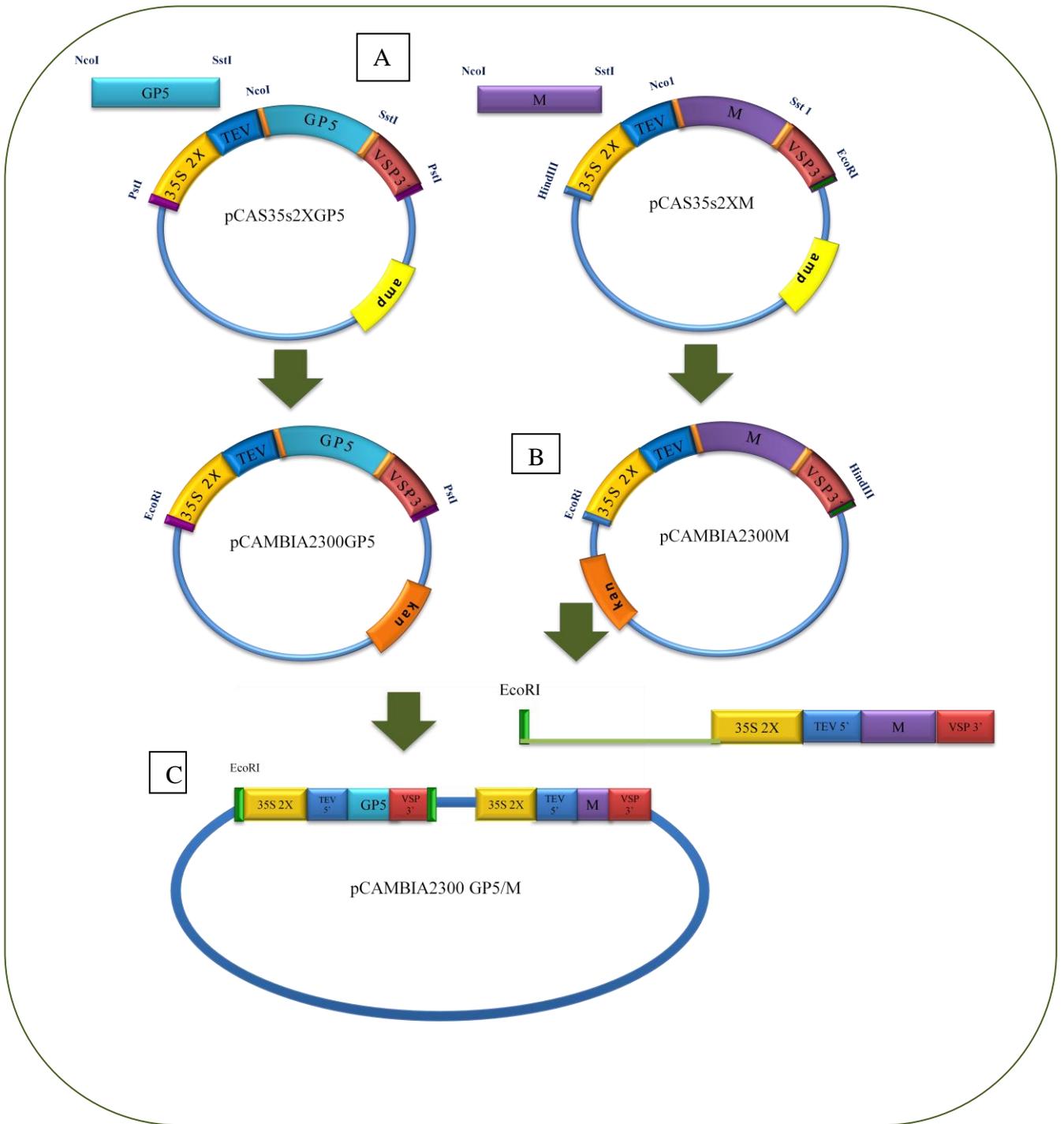


Fig 2. Diseño *in silico* de las construcciones para los vectores de Transformación: A) Clonación de los genes GP5 y M en el vector pCAS35s2X; B) Obtención de los casetes de expresión para los genes GP5 y M en el vector binario pCambia2300; C) Construcción pCambia2300GP5-M para transformación de *Nicotiana tabacum*

Transformación de *Nicotiana tabacum* vía *Agrobacterium tumefaciens*

Obtenida la construcción pCAMBIA2300GP5-M en *E. coli* se extrajo el plásmido con el kit GeneJet Mini Prep de Fermentas® y se transformó la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Las células electrocompetentes de *A. tumefaciens* se obtuvieron en el laboratorio siguiendo el protocolo de Sharma y Schimke (1996); estas células se transformaron utilizando el plásmido antes mencionado con las mismas condiciones para la transformación de *E. coli*, excepto que las células se dejaron en recuperación de 3 a 4 h a 30 °C y utilizando medio YM de Amresco® (11.2 g/L)

Para el análisis de transformación de la cepa LBA4404, se realizó una PCR directamente de la colonia con el mismo juego de oligonucleótidos para amplificar los genes *GP5* y *M* ya utilizados anteriormente y bajo las mismas condiciones para la reacción y para el termociclador.

La presencia de los amplicones se utilizó para confirmar que la cepa de *A. tumefaciens* contiene los genes de interés. En este caso la transformación de *Nicotiana tabacum* se realizó de la siguiente manera: se picó una colonia de la cepa de *A. tumefaciens* transformada y se dejó crecer en 3 mL de medio SOC para realizar el preinóculo; transcurridas 24 h de crecimiento se inocularon 50 mL de medio YM líquido para formar el inóculo. Por separado, se cortaron explantes de hoja de *N. tabacum* de un centímetro cuadrado de diámetro aproximadamente y se dejaron en co-cultivo con el medio que contenía *A. tumefaciens* durante 5 min en agitación constante, se sembraron los explantes con el envés hacia arriba en cajas Petri con medio de recuperación MS semisólido adicionado con bencil amino purina, BAP (1 mg/mL) para inducir la diferenciación celular y se incubaron en obscuridad; a las 48 h posteriores se cambiaron los explantes a medio de selección MS con Kanamicina (100 mg/L) y Cefotaxima (500 mg/L) con el envés hacia abajo y se dejaron en cuarto de crecimiento a 21 °C con fotoperiodo de 16 h luz / 8 h obscuridad hasta que se generaran nuevas plántulas.

Los explantes se monitorearon constantemente para evitar cualquier contaminación y se cambiaron de frasco cada dos semanas hasta obtener plántulas de aproximadamente 5 cm de altura con raíz, entonces se cambiaron a macetas y se dejaron crecer en condiciones de invernadero.

Análisis de expresión genética de GP5 y M en *Nicotiana tabacum*.

Después de seis semanas posteriores a la transformación, se extrajo proteína moliendo el tejido vegetal de hoja con nitrógeno líquido y se hizo un escrutinio para seleccionar líneas transformadas mediante una prueba de ELISA que identificaba la presencia del gen NPTII, que le confiere a las plantas resistencia a kanamicina utilizando el Kit neomycin phosphotransferase II, enzyme conjugate de Agdia® (Anexo 6).

Una vez seleccionadas las plantas, se analizó la expresión realizando una RT-PCR. En principio, se extrajo ARN utilizando el reactivo Plant RNA purification reagent de Invitrogen™ (Anexo 7), se hizo un tratamiento con ADNasa de Invitrogen™ utilizando 8 µl de ARN, 1 µl del buffer RQ1 RNase-Free DNase 10X reaction y 1 µl de RQ1 RNasa; se dejó incubar a 37°C en termoblock Eppendorf® y se detuvo la reacción con 1 µl de RQ1 DNase stop solution, incubando a 65 °C durante 15 min. para inactivar la enzima.

La RT se realizó siguiendo las instrucciones de la enzima de Promega® ImProm-II Reverse Transcriptase con el ARN previamente obtenido y finalmente se realizó una PCR utilizando los mismos oligonucleótidos diseñados anteriormente y las mismas condiciones de amplificación.

RESULTADOS

PCR para la amplificación del ORF5 y ORF6

El corrimiento electroforético mostró la amplificación de los fragmentos de 600 pb para el ORF5, y de 500pb para el ORF6. La amplificación se muestra en la figura 3.

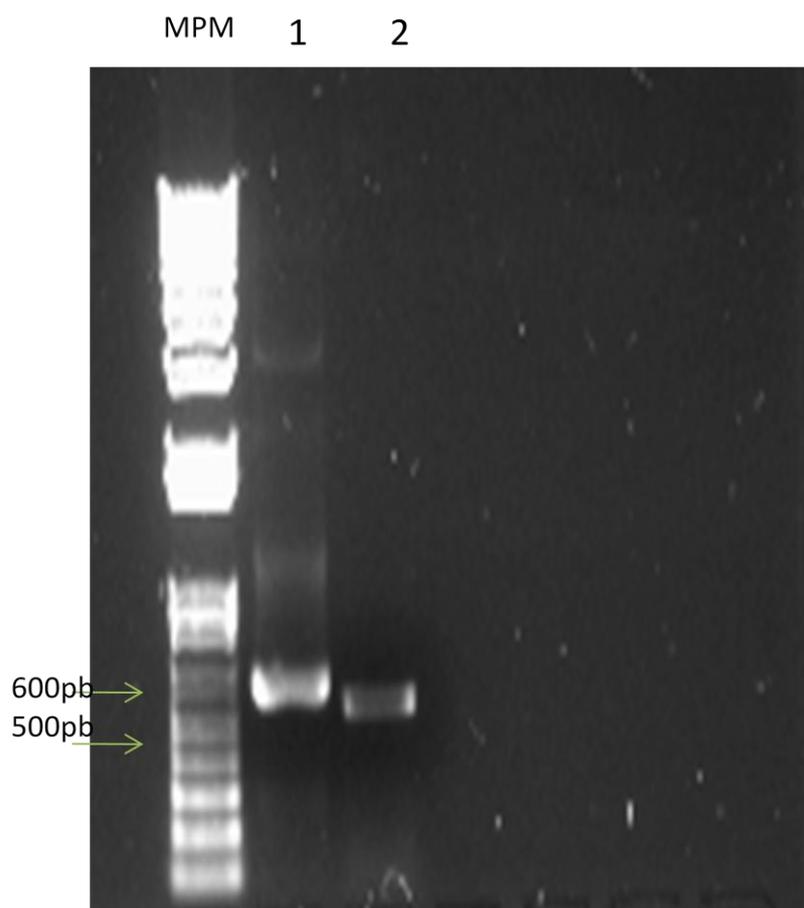


Fig 3. Amplificación de los genes *GP5* (carril 1) y *M* (carril 2). Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR-Safe (Invitrogen™). MPM 1Kb Plus (Invitrogen™).

Clonación dentro de los vectores de transferencia.

Con los amplicones *GP5* y *M* ya purificados se realizó la clonación molecular dentro del vector pCAS35s2X y se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* cepa TOP10, con cada vector y se analizaron ocho colonias por medio de digestión con las enzimas *XhoI* y *SstI*, a cuatro de estas colonias que resultaron positivas por patrón de restricción se les realizó PCR para una segunda confirmación; ambos experimentos mostraron la clonación de los genes *GP5* y *M* dentro de los vectores pCAS35s2X (fig. 4 y 5) En la figura 3, se muestra el patrón esperado con un recuadro, señalando las construcciones positivas.

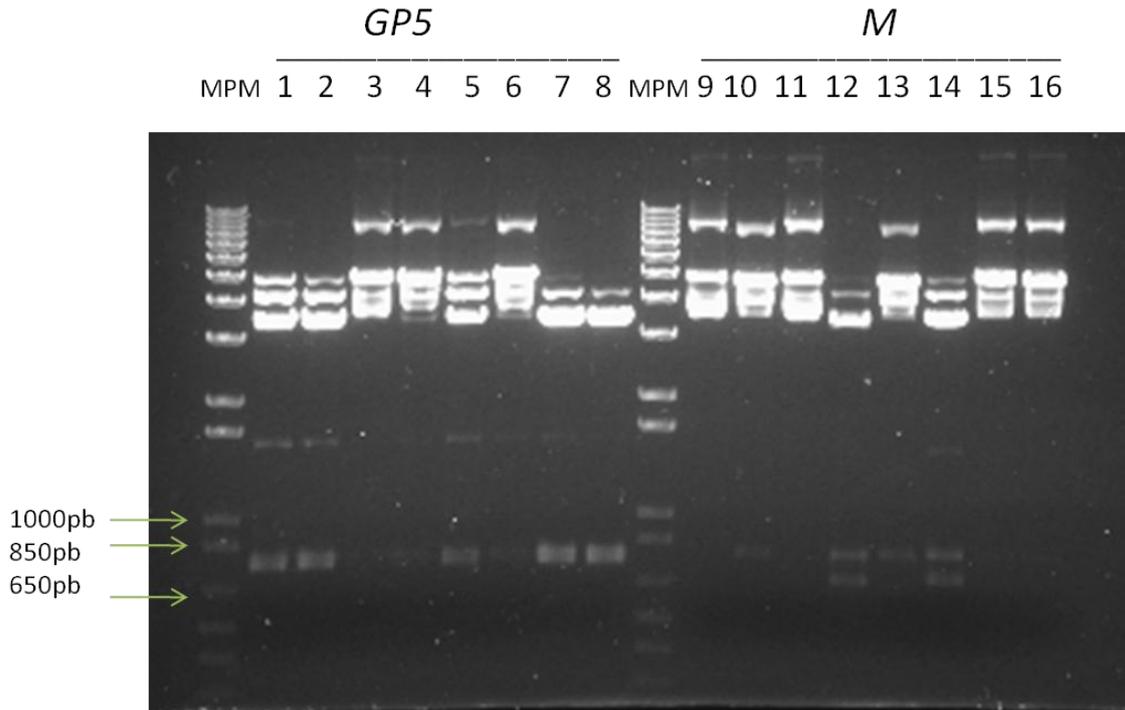


Fig 4. Digestión de las construcciones pCAS35s2XGP5 (carriles del 1 al 8) y pCAS35s2XM (carriles de la A a la H) con las enzimas *XhoI* y *SstI*. Fragmentos esperados de 713 y 108 pb. Las transformantes se muestran con un cuadrado. Gel de agarosa al 0.8% teñido con SYBR-Safe. MPM: 1Kb Plus.

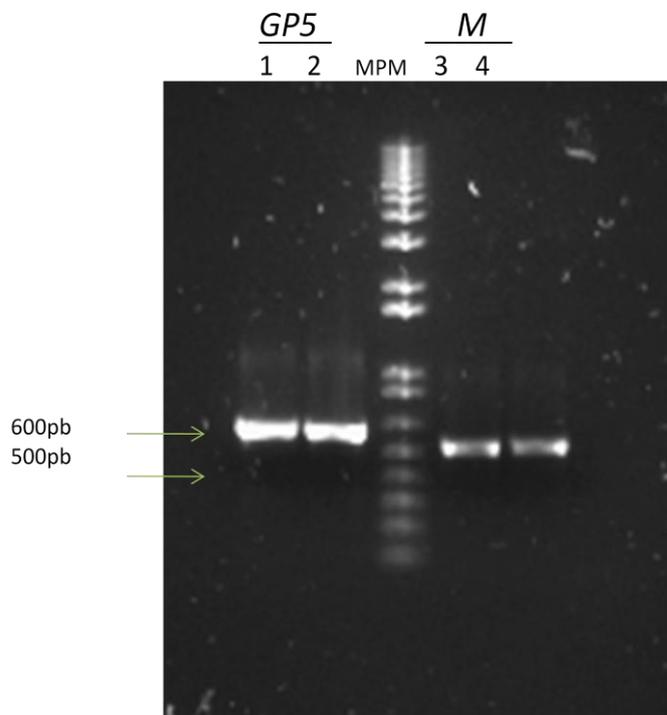


Fig 5. PCR para amplificar los genes *GP5* y *M* dentro de los vectores pCAS35s2XGP5 y pCAS35s2XM. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR-Safe. MPM 1Kb Plus.

Era necesario que el vector de transformación para tabaco contuviera en conjunto los casetes de expresión de los genes *GP5* y *M*, por lo que primero se movilizaron éstos por separado al vector pCAMBIA2300 para adicionar algunos sitios de restricción que permitieran la obtención del plásmido con dos unidades monocistrónicas. Se obtuvieron entonces los vectores pCAMBIA2300GP5 y pCAMBIA2300M, ambos analizados nuevamente por patrón de restricción.

Para verificar la inserción del casete de expresión de GP5 se analizó con la enzima *Pst*I dando como resultado una banda de 2000pb (figura 6) y al realizar la electroforesis con el ADN plasmídico de las ocho colonias transformadas con el vector pCAMBIAM, digerido con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI, la electroforesis mostró que éstas estaban transformadas ya que contenían el vector con el casete de expresión de 1900pb, el resultado se muestra en la figura 7 donde se observa para todas las construcciones, el fragmento de 1900pb que corresponde al casete de expresión del gen *M* y la banda de aproximadamente 8.7kb para el resto del vector pCAMBIA.

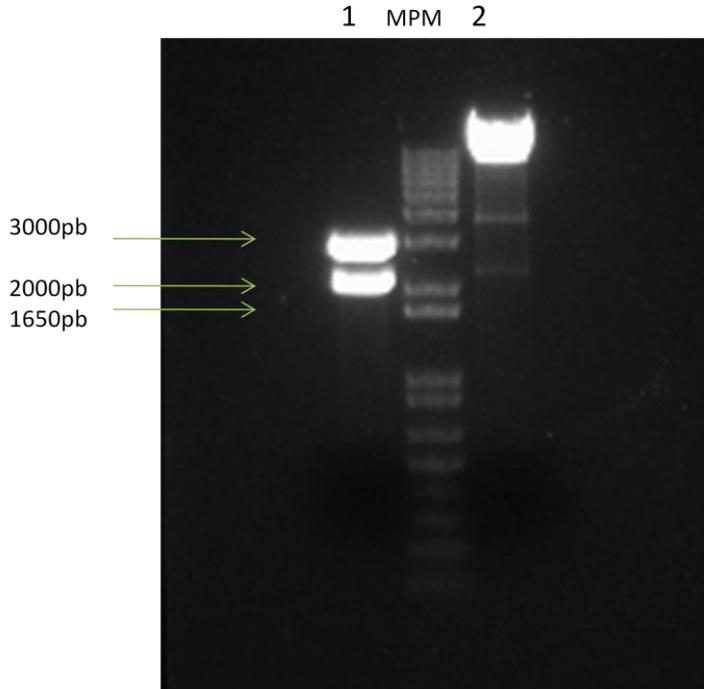


Fig 6. Carril 1 vector pCAS35s2XGP5 y carril 2 pCAMBIA2300 digeridos con la enzima *Eco*RI, fragmento esperado 1900pb. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR-Safe. MPM: 1Kb Plus

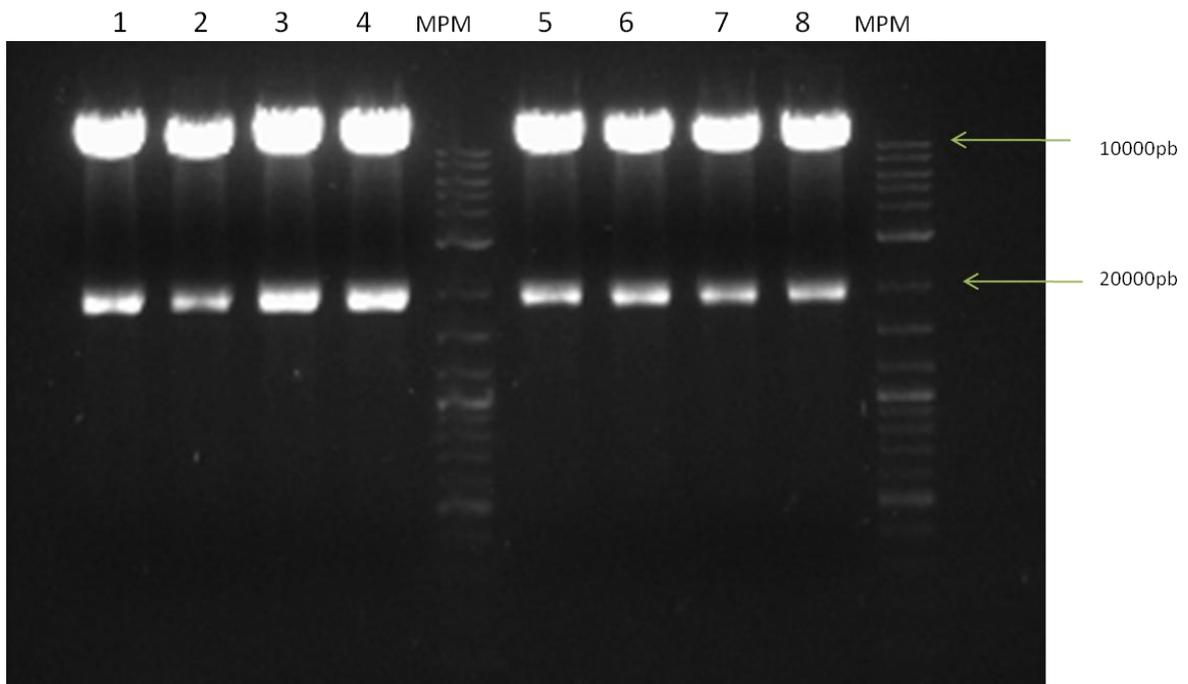


Fig 7. Comprobación por digestión de la construcción pCAMBIA2300M con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI, el fragmento esperado es de 1900pb, las 8 colonias seleccionadas muestran la correcta inserción del casete de expresión de M. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR-Safe. MPM: 2 Log (Biolabs®)

Posterior a la inserción de los casetes de expresión dentro del vector pCAMBIA2300 por separado, se utilizó la construcción pCAMBIA2300M, para clonar dentro de este vector el casete de expresión del gen *GP5* resultado de la linealización y desfosforilación de la construcción pCAMBIA2300M y la inserción del casete de expresión de *GP5* dentro del vector pCAMBIA2300M. El resultado de esto se muestra en la figura 8. La imagen muestra los productos de la digestión con la enzima *Eco*RI, para 7 colonias transformantes se observa una banda de 2000pb que corresponde al casete de *GP5* y una banda de aproximadamente de 10kb que corresponde al vector pCAMBIA2300 en conjunto con el casete de expresión de *M* para transformantes.

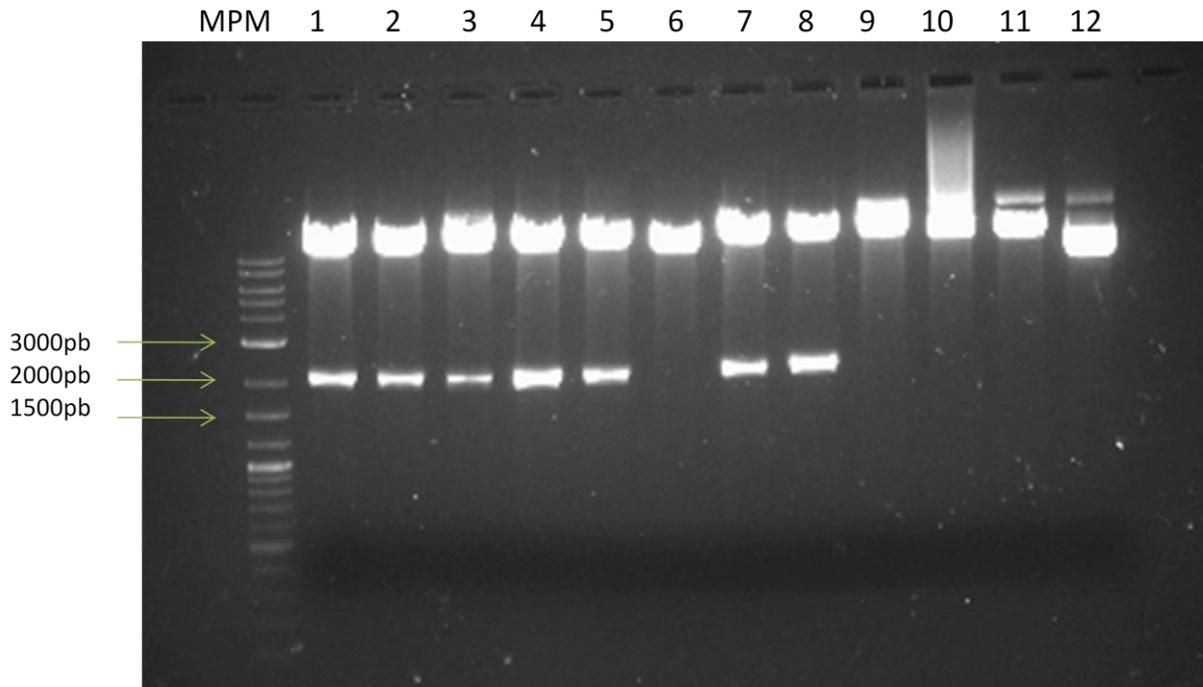


Fig 8. Comprobación por digestión de la construcción pCAMBIA2300GP5-M, la enzima utilizada para este experimento fue *EcoRI*, esperando visualizar el casete de expresión de GP5 con 2000pb. Los carriles 1,2,3,4,5,7 y 8 muestran la banda esperada de 2000pb, los carriles 11 y 12 son controles del vector pCAMBIA2300M sin digerir. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR-Safe. MPM: 2 Log.

Identificación de los genes *GP5* y *M* en *Agrobacterium tumefaciens*.

Comprobada la última construcción, pCAMBIA2300GP5-M, se transformó con ésta la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 para su uso posterior en la transformación del tabaco.

Se realizó una PCR de colonia para identificar si se encontraban insertos en los plásmidos que contenían los ORF5 Y ORF6. Los fragmentos esperados de 500 y 600pb correspondientes a los genes *M* y *GP5*, respectivamente, fueron amplificados de las colonias transformadas y no se visualiza ninguna banda en la colonia que fue utilizada como control, como se muestra en la figura 9.

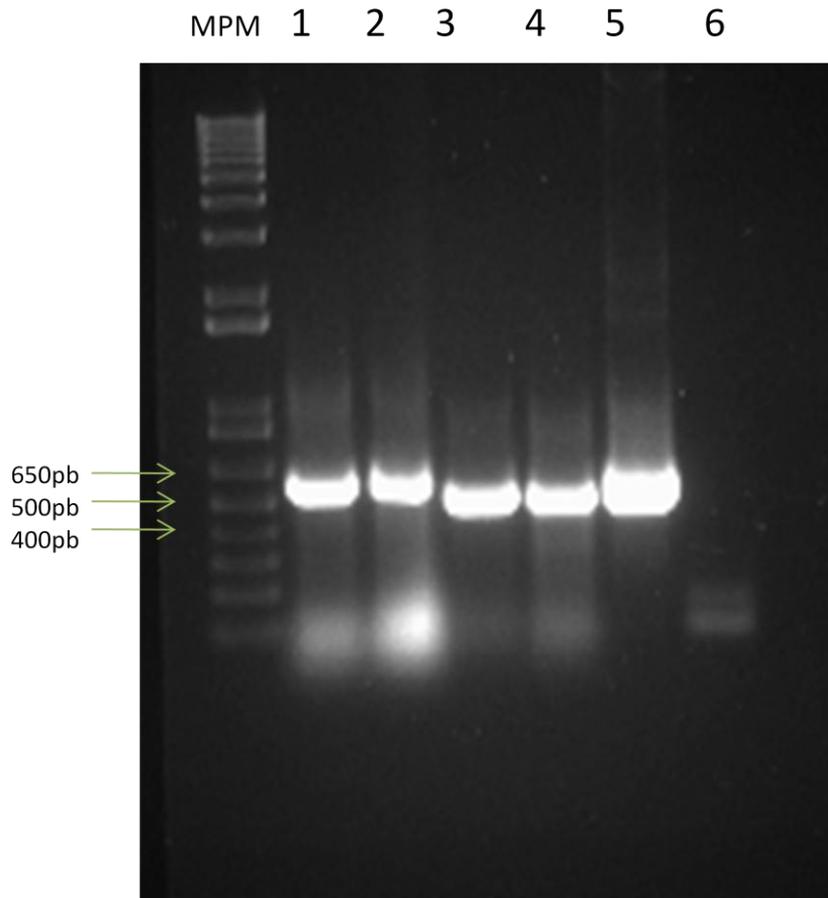


Fig 9. Corrimiento electroforético de los productos de PCR de dos colonias de *Agrobacterium tumefaciens*, para verificar la presencia de los genes GP5 y M dentro de su genoma. Carril 1 y 2 identificación de GP5, carril 3 y 4 identificación de M, carril 5 control positivo para ambos genes y carril 6 control negativo. Gel de agarosa al 1% teñido con SYBR-Safe. MPM: 1Kb Plus

Generación y Análisis de las proteínas GP5 y M en plantas de tabaco transformadas

Después de la clonación del vector binario que contenía los casetes de expresión GP5 Y M dentro de la cepa LBA4404, se realizó la transformación de tabaco mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. El crecimiento de las plantas en medio de cultivo de selección con kanamicina fue monitoreado durante 3 semanas aproximadamente, observando crecimiento nulo en los controles que correspondían a plantas de tabaco transformadas sólo con la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*; por el contrario, los explantes transformados con las cepas que contenían el vector pCAMBIA2300 y los explantes

transformados con el vector pCAMBIA2300GP5-M mostraron crecimiento en el medio de selección y posteriormente se cambiaron a medio de crecimiento donde se les siguió monitoreando durante 6 semanas más hasta su diferenciación a plántulas. La figura 10 muestra la comparación en el crecimiento de las plántulas en el medio de selección.

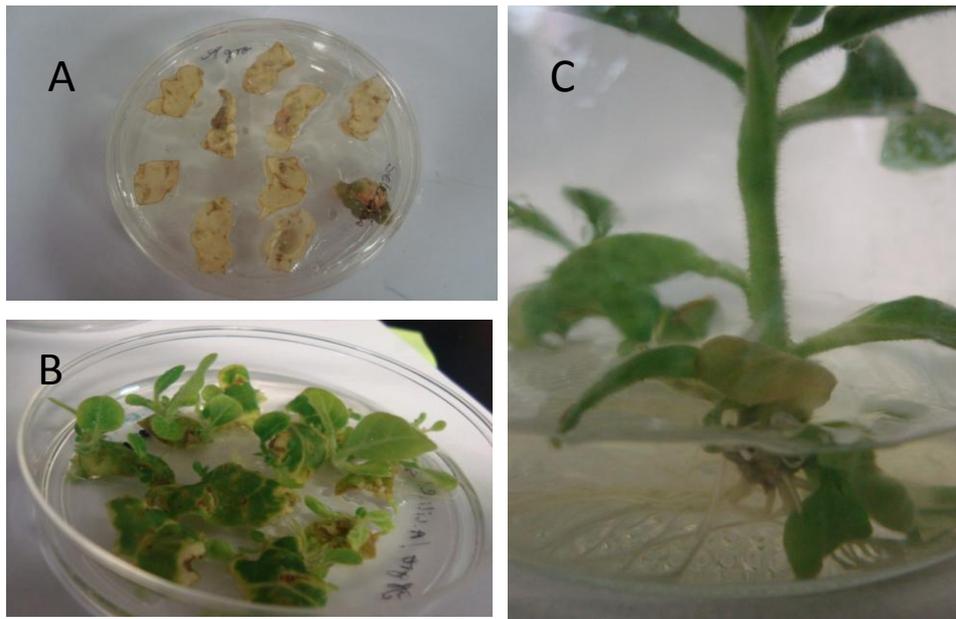


Fig 10. Comparación del crecimiento de los explantes de *N. tabacum*. Explantes transformados sólo con la cepa de *A. tumefaciens* en medio de cultivo de selección, control negativo (A). Explantes con 3 semanas de crecimiento en medio de cultivo de selección *N. tabacum* transformada con la cepa de *A. tumefaciens* con el vector pCAMBIA2300 (B). Plántula de tabaco con 5 semanas, en medio de cultivo de crecimiento, transformante con la cepa de *A. tumefaciens* que contenía el vector pCAMBIA2300GP5-M (C)



Fig 11. Plantas transformadas, sólo con el vector pCAMBIA2300 (izquierda) y transformante con el vector pCAMBIA2300GP5-M (derecha)

Los explantes transformados con el vector pCAMBIA2300 vacío y pCAMBIA2300GP5-M se dejaron crecer hasta su diferenciación a plántulas; una vez transcurridas ocho semanas aproximadamente (Figura 11), Obteniendo una planta transformante con el vector pCAMBIA2300GP5-M con pelos radiculantes y raíces laterales creciendo a partir de la raíz principal, y otra planta transformada con el mismo vector pero sin raíces laterales llamada pCAMBIA2300GP5-M2. A partir de estas plantas se extrajo proteína total para analizar la presencia del gen *NPTII* mediante un ELISA. La placa se muestra en la figura 12 donde se puede observar que la planta uno de las transformantes con la construcción pCAMBIA2300GP5-M muestra un valor de DO_{405} de 1.086, parecido al control positivo del kit (1.377), en comparación con la segunda planta transformada con la misma construcción que da un valor de 0.256 y la planta transformada sólo con el vector pCAMBIA2300 con un valor de 0.077 lo que puede indicar que estas plantas no eran transformantes.

Posterior al escrutinio se extrajo ARN total, la integridad del mismo se verificó por electroforesis (Figura 13). Al ARN se realizó un tratamiento con ADNasa para proceder a realizar RT-PCR para comprobar la transcripción de los genes *GP5* y *M* en las plantas transformadas; los productos se corrieron en gel de agarosa y se muestran en la figura 14, donde se observan las bandas de 500 y 600pb del peso molecular de los genes *GP5* y *M*.



Fig 12. Placa de ELISA para La identificación de NPTII.
A) Planta 1 pCAMBIA2300GP5-M
B) Planta 2 pCAMBIA2300GP5-M
C) Planta pCAMBIA2300
D) Control positivo
E) Control negativo
F) Buffer

Planta 1 Planta 2 Planta 3

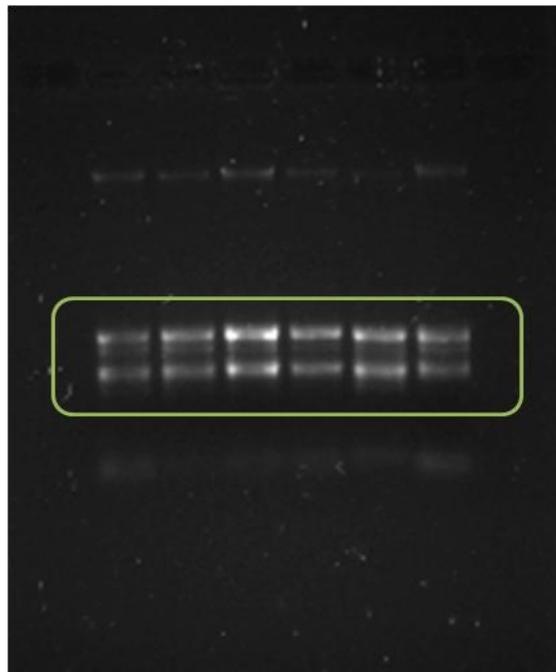


Fig 13. Integridad de ARN extraído de las plantas transformantes con los plásmidos siguientes. Planta 1: pCAMBIA2300GP5-M, planta 2: pCAMBIA2300GP5-M y planta 3: pCAMBIA2300. Gel de agarosa teñido con SYBR-Safe

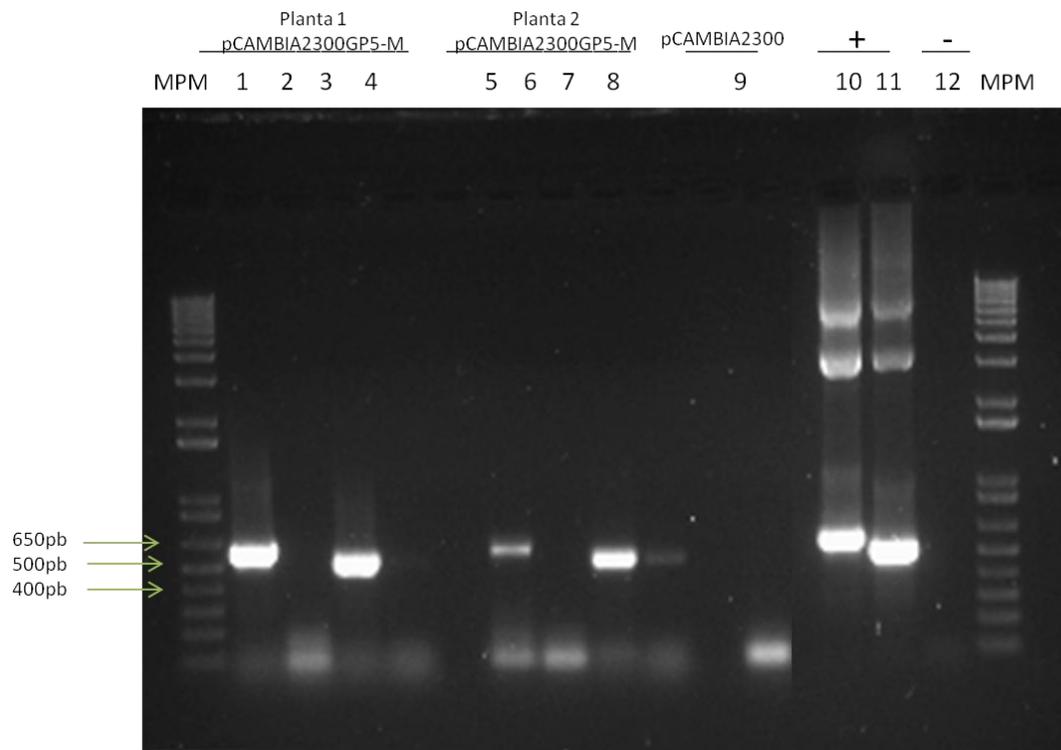


Fig 14. RT-PCR de las plantas de tabaco. Carril 1 y 5 RT-PCR para amplificar *GP5*, carril 2 y 6 PCR para amplificar *GP5* de la extracción de ARN tratado con ADNasa. Carril 3 y 7 RT-PCR para amplificar *M*, carril 4 y 8 PCR para amplificar *M* de la extracción de ARN tratado con ADNasa. Carril 9 RT-PCR control de la planta transformada con el vector pCAMBIA2300. Carril 10 y 11 controles positivos para *GP5* y *M*. Carril 12 control negativo de la RT-PCR.

DISCUSIÓN

El uso de sistemas vegetales para la producción de antígenos o vacunas recombinantes, representa una gran ventaja respecto a los métodos tradicionales por varias razones: primero, al transformar; sólo se utilizan los antígenos inmunogénicos, de esta manera se elimina la probabilidad de infección, la toxicidad y reacciones adversas para el organismo. Segundo, los cultivos vegetales representan una fuente estable de siembra, cosecha y transporte sin necesidad de red fría. Tercero, es posible administrar estas formulaciones por vía oral; lo que las hace particularmente eficiente estimulando la respuesta local de mucosas además de activar respuesta humoral (Streatfield *et al.*, 2001). Otra de las ventajas incluye los bajos costos en la producción de biomasa (Sharon *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta estas

consideraciones, se decidió utilizar a *Nicotiana tabacum* como modelo de expresión para los antígenos GP5 y M del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.

La biotecnología y la ingeniería genética generan perspectivas que permiten el diseño y modificación de organismos a nivel genotípica y fenotípicamente para obtener mejoras dentro de la medicina, la agricultura o la industria; Sin embargo, existe la limitante de aplicar métodos donde se ensamblen correctamente moléculas de ADN que codifiquen para varios genes. Weber *et al.* (2011) lograron realizar un vector que puede expresar hasta once unidades transcripcionales y 33kb de ADN, demostrando que es posible realizar una construcción eficiente con una metodología similar a la que utilizamos en nuestro proyecto: preparación de plásmido, digestiones por medio de enzimas de restricción, ligación, transformación de colonias y análisis de las mismas por enzimas de restricción nuevamente o por PCR.

Wang *et al.* (2011) transformaron *Atropa belladonna* con dos genes funcionales para la producción de escopolamina utilizando al mismo promotor del virus del mosaico de la coliflor por duplicado, concluyendo que es posible la inserción de un fragmento de ADN de 1177pb y que la coexpresión es un método ideal para aumentar significativamente la acumulación del metabolito. La cotransformación de cultivos vegetales es una opción prometedora para la obtención de proteínas recombinantes o una mayor síntesis de algún metabolito secundario con interés particular. En este trabajo logramos transformar tabaco con un T-ADN de aproximadamente 6000pb que contenía al promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor controlando la expresión de los genes *GP5*, *M* y *NPTII*. Chan *et al.* (2013) utilizan plantas de plátano para expresar el antígeno GP5 también con el promotor 35S por triplicado y obtienen una expresión favorable para posteriormente inmunizar por vía oral cerdos con extractos que contenían 12.9 µg de la proteína, concluyen que hay una fuerte respuesta inmune al analizar suero y saliva de estos animales retados. Nuestro trabajo tiene potencial en el sentido que obtuvimos buenos resultados a nivel de transcripción confirmando por RT-PCR la presencia de los mensajeros de *GP5* y *M* y se podrían seguir realizando experimentos inmunogénicos. Concluimos que la planta de tabaco que se utilizó como control positivo con el vector pCAMBIA2300, no estaba transformada, ya que los niveles de la

proteína NPTII (proteína que confiere resistencia a kanamicina) fueron similares al control negativo en el ensayo ELISA. El desarrollo de esta planta en medio selectivo se debió a cierta ineficacia de la kanamicina como agente de selección. La eficacia del agente selectivo puede aumentar mediante cambios semanales de los explantes de tabaco a medio nuevo

Los estudios de expresión de proteínas del virus del síndrome respiratorio reproductivo y porcino en diferentes sistemas se han realizado desde aproximadamente diez años, enfocándose principalmente en la expresión de GP5, ya que es el antígeno más inmunodominante e inmunogénico. Sin embargo, a la fecha no se han realizado estudios de coexpresión de las proteínas GP5 y M en un sistema vegetal por lo que este trabajo representa una línea de partida para posteriores análisis de coexpresión de antígenos en plantas.

CONCLUSIONES

El diseño de los oligonucleótidos para la amplificación de los ORF5 y ORF6 del virus del síndrome respiratorio reproductivo y porcino se realizó correctamente ya que se logró obtener los amplicones de dichos genes en la cepa vacunal de Boehringer VR-2332. Con este trabajo también se obtuvieron con éxito todas las clonaciones moleculares dentro de los vectores de expresión, y con ello, la transformación realizada en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* para su posterior uso en la transformación de *Nicotiana tabacum*.

También fue posible transformar tabaco con esta construcción, así se demostró la presencia del gen *NPTII* mediante prueba de ELISA y el crecimiento en medio de selección de los explantes transformados con la cepa que contenía el vector pCAMBIA2300 y pCAMBIA2300GP5-M, ya que el gen de resistencia a antibiótico se encuentra dentro del T-ADN de los vectores. Además, se comprobó la presencia del transcrito de los genes *GP5* y *M* en las plantas transgénicas de tabaco; sin embargo, no se pudo comprobar la hipótesis, ya que no contábamos con los anticuerpos adecuados para detectar la expresión de dichos antígenos en las plantas transformantes, por lo que se decidió analizar sólo a nivel de ARN mensajero donde sí se pudo comprobar la presencia de dichos transcritos.

PERSPECTIVAS AL ESTUDIO

Como perspectivas, se deben generar anticuerpos policlonales contra las proteínas GP5 y M, ya que el grupo de trabajo ha expresado con éxito estas proteínas en *E. coli*, las cuales se usarán como inmunógenos. Estos anticuerpos servirán para analizar la expresión de ambas proteínas en las plantas transgénicas generadas en este trabajo mediante una prueba tipo Western-blot, ya que los kits comerciales contienen el anticuerpo contra el antígeno de nucleocápside del virus, como el kit IDEXX PRRSV X3 Ab Test.

Finalmente, se podría evaluar la inmunogenicidad de estas plantas transgénicas en ratones y realizar comparaciones con otros trabajos basados en otros modelos de expresión de los antígenos.

LITERATURA CITADA

Arias M, Barceló J, Sánchez Vizcaíno J.M. 2002. Curso digital de enfermedades infecciosas porcinas. Sanidad animal.

Bravo F, Wirth S, Segretin M, Morgenfeld M. 2005. Las plantas como fábricas de proteínas terapéuticas. *Biotecnología*. 7 (2) 40-43

Buonaguro F, Butler-Ransohoff J. 2010. Pharmaplant: the new frontier in vaccines. *Expert Reviews*. 9 (8): 805-807.

Chan H.T, Chia M.Y, Pang V, Jeng C.R, Do Y.Y, Huang P.L. 2013. Oral immunogenicity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen expressed in transgenic banana. *Plant Biotechnology journal*. 11: 315-324.

Chen X, Liu J. 2011. Generation and immunogenicity of transgenic potato expressing the GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Virological Methods*. 173: 153-158.

Chia M.Y, Hsiao S, Chan H, Do Y, Huang P, Chang H, Tsai C, Lin C, Pang V, Jeng C. 2011. immunogenicity of recombinant GP5 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus expressed in tobacco plant. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 135: 234-242.

Cruz J, Zúñiga S, Bécares M, Sola I, Ceriani J, Juanola S. 2010. Vectored vaccines to protect against PRRSV. *Virus Research*. 154: 150-160.

Dietze K, Pinto J, Sherrilyn W, Hamilton C, Khomenko S. 2011. Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virulence jumps and persistent circulation. *Focus on*. 5: 1-8.

Flores-Mendoza L, Hernández J. 2010. Vacunas contra el virus del síndrome respiratorio reproductivo porcino: escribiendo una historia. *Veterinaria México*. 41 (2) 139-159.

Jiang W, Jiang P, Li Y, Tang J, Wang W, Ma S. 2006a. Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 113: 169-180

Jiang Y, Xiao S, Fang L, Yu X, Song Y, Niu Ch, Chen H. 2006b. DNA vaccines co-expressing GP5 and M proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) display enhanced immunogenicity. *Vaccine* 24: 2869–2879.

Kimman T, Cornelissen L, Moormann R, Rebel J. 2009. Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine*. 27: 3704-3718.

Ostrowski M, Galeota JA, Jar AM, Platt KB, Osorio FA, Lopez OJ. 2002. Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *Journal of Virology*. 76: 4241-4250.

Pirzadeh, B. and Dea, S. 1998. Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of general Virology*. 79: 989-999.

Rybicki E. 2009. Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug discovery today*. 14 (1-2) 16:24

Shih S, Doran P. 2009. Foreign protein production using plant cell and organ cultures: advantages and limitations. *Biotechnology advances*. 27: 1036-1042.

Wang S, Fang L, Fan H, Jiang Y, Pan Y, Luo R, Zhao Q, Chen H, Xiao S. 2007. Construction and immunogenicity of pseudotype baculovirus expressing GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*. 25: 8220-8227.

Zheng Q, Chen D, Li P, Bi Z, Cao R. 2007. Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes*. 35: 585-595.

Zhou Y, Yu H, Tian Z, Liu J, An T, Peng J, Li G, Jiang Y, Cai X, Xue Q, Wang M, Tong G. 2009. Monoclonal antibodies and conserved antigenic epitopes in the C terminus or GP5 protein of the North American type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Microbiology*. 138: 1-10

ANEXO 1

Instrucciones kit QIAquick® PCR purification kit de Qiagen® (100 pb a 10 Kb)

- 1) Añadir 5 volúmenes del buffer PB por cada volumen de la muestra de PCR, relación 5:1 y verificar que el color sigue siendo amarillo (si no es el caso agregar 5 µl de acetato de sodio al 3 M p.H. 5. Y agitar por inversión.
- 2) Vaciar el contenido a la columna (sólo le caben 750 µl) y centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min
- 3) Descartar la parte eluida y agregar 750 µl del buffer P.E. Centrifugar por 1 min a 13,000 rpm
- 4) Retirar la parte eluida y volver a centrifugar por 1 min más a 13,000 rpm
- 5) Colocar la columna en un tubo para microcentrifuga de 1.5 mL nuevo y eluir con 35 µl del buffer EB previamente calentado a 50°C, incubar por 5 min y centrifugar por 2 min a 14,600 rpm.

Actividad de las enzimas de restricción de en los diferentes buffers REact® de Invitrogen™

Enzima	Sitio de corte	Condiciones de reacción	Condiciones de reacción	Inactivación por calor	Snsibilidad a metilaciones†
<i>EcoRI</i>	5'-G ↓ AATT C-3' 3'-C TTAA ↑ G-5'	REact® 3 Buffer at 37°C	REact® 3 Buffer at 37°C	10 min. @ 65°C	Y
<i>HindIII</i>	5'-A ↓ AGCT T-3' 3'-T TCGA ↑ A-5'	REact® 2 Buffer at 37°C	REact® 2 Buffer at 37°C	N	Y
<i>KpnI</i>	5'-G GTAC ↓ C-3' 3'-C ↑ CATG G-5'	REact® 4 Buffer at 37°C	REact® 4 Buffer at 37°C	10 min. @ 65°C	Y
<i>NcoI</i>	5'-C ↓ CATG G-3' 3'-G GTAC ↑ C-5'	REact® 3 Buffer at 37°C	REact® 3 Buffer at 37°C	10 min. @ 65°C	Y
<i>PstI</i>	5'-C TGCA ↓ G-3' 3'-G ↑ ACGT C-5'	REact® 2 Buffer at 37°C	REact® 2 Buffer at 37°C	10 min. @ 65°C	Y
<i>XhoI</i>	5'-C ↓ TCGA G-3' 3'-G AGCT ↑ C-5'	REact® 2 Buffer at 37°C	REact® 2 Buffer at 37°C	N	Y

ANEXO 2

REact® buffers.

Usar a concentración 1X

REact® 1: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM MgCl₂

REact® 2: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM MgCl₂
50 mM NaCl

REact® 3: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM MgCl₂
100 mM NaCl

REact® 4: 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
5 mM MgCl₂
50 mM KCl

REact® 5: 10 mM Tris-HCl (pH 8.2)
8 mM MgCl₂

REact® 6: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)
6 mM MgCl₂
50 mM NaCl, 50mM KCl

REact® 7: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
10 mM MgCl₂
50 mM NaCl
50 mM KCl

REact® 8: 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
10 mM MgCl₂

REact® 9: 20 mM TrisOAc (pH 7.9)
10 mM MgOAc
50 mM KOAc

REact® 10: 100 mM Tris-HCl (pH 7.6)
10 mM MgCl₂
150 mM NaCl

REact® 11: 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)
12 mM MgCl₂
100 mM KCl

ANEXO 3

Instrucciones QIAquick® Gel Extraction Kit(50) de Qiagen®

- 1) Cortar las bandas de ADN en el gel de agarosa con ayuda del transiluminador
- 2) Colocar cada una en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL y pesar (tarar con un tubo vacío)
- 3) Añadir 3 veces más el peso en volumen de buffer QG
- 4) Incubar a 50 °C por 10 min en termoblock y dar un vortex cada 3 min hasta que se disuelva completamente
- 5) Pasar la solución anterior a la columna y centrifugar 1 min a 14,600 rpm, descartar la parte eluida y realizar nuevamente el procedimiento si es necesario
- 6) Agregar 500 µl del buffer QG y centrifugar 1 min a 14,600 rpm y descartar parte eluida
- 7) Añadir 750 µl del buffer PE (chechar que esta solución ya contenga etanol como lo marca la casa comercial), centrifugar 1 min a 14,600 rpm, retirar la parte eluida y volver a centrifugar un minuto más a las mismas revoluciones
- 8) Pasar la columna a un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL nuevo y añadir 35 µl del buffer EB previamente calentado a 50 °C, y ponerlo justo al centro de la columna. Incubar 5 min a temperatura ambiente
- 9) Centrifugar 1m a 14,600 rpm, tirar la columna y almacenar a -20 °C

ANEXO 4

Realización de células electrocompetentes

Material para esterilizar:

500 mL de medio YENB 2X en matraz de 2 L

3 mL de medio SOC en tubo falcon de 15 mL

100 mL de H₂O Milli-Q®

50 mL de glicerol al 10%

Tubos para microcentrífuga de 1.5 mL

2 tubos para ultracentrífuga

1 probeta de 100 mL

Orbital a 37 °C/ 250 rpm

2 d antes:

Rayar un caja LB con la cepa de células quimiocompetentes de Invitrogen™ e incubar a 37 °C por 24 h

1 d antes:

Picar una colonia aislada e incubar en medio SOC e incubar con agitación de 250 rpm durante 12 h a 37 °C

1. Inocular 500 mL de YENB con 1 mL de cultivo SOC e incubar a 37 °C con agitación (250 rpm) de 3 a 6 h y esperar a que la DO₆₀₀ sea igual a 0.5 o 0.9
2. Poner a enfriar el glicerol, el agua, tubos y los rotores para la ultracentrífuga
3. Vaciar el medio con las células en los 2 tubos de ultracentrífuga y dejar enfriar 15 min
4. Centrifugar las células por 10 min a 5000 rpm, tirar sobrenadante con mucho cuidado, resuspender el pellet con 10 mL de agua, una vez disueltas añadir 190 mL más de agua. (Repetir este paso 3 veces)

ANEXO 5

5. Después del tercer lavado se tira el sobrenadante y se resuspende el pellet en 2 mL de glicerol, y se hacen alícuotas de 100 µl en tubos de 1.5 mL.
6. Congelar en baño de nitrógeno líquido y almacenar a -70 °C.

Extracción de ADN plasmídico GeneJET® Miniprep

1. Picar una colonia de *E. coli*, crecer en medio LB, dejar en agitación por 16 h a 37 °C y 250 rpm
2. Vaciar el cultivo a tubos para microcentrífuga de 1.5 mL, centrifugar a 13,000 rpm por 3 min y tirar el sobrenadante
3. Resuspender el pellet en 250 µl del buffer de resuspensión (4 °C), agitar por vortex cuidadosamente hasta eliminar la pastilla, agregar 250 µl de la solución de lisis, mezclar por inversión 6 veces cuidadosamente
4. Agregar 350 µl de la solución de neutralización y agitar nuevamente por inversión 6 veces
5. Centrifugar 8 min a 14,000 rpm
6. Vaciar el sobrenadante a la columna y centrifugar 1 min a 14,000 rpm, descartar la parte eluida
7. Añadir 500 µl de la solución de lavado, centrifugar 1 min a 14,000 rpm; retirar la parte centrifugada y centrifugar 1 min más (repetir 2 veces)
8. Cambiar a tubo de microcentrífuga de 1.5 mL nuevo y añadir 50 µl del buffer de elución previamente calentado a 50 °C, reposar durante 5 min a temperatura ambiente, centrifugar por 2.5 min a 14,000 rpm. Almacenar a -20°C

ANEXO 6

ELISA para identificación de NPTII, kit de Agdia®

Extracción en fresco de proteína, pesar 50 mg de tejido de hoja y moler en mortero con 200 µl de buffer PEB 1X (como en el kit viene al 10X se diluye en PBST) y se recupera con una micropipeta de 100 µl, vaciar a un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL nuevo y centrifugar con un pulso de 14,600 rpm

1. Poner 100 µl en cada pozo de la placa más el control positivo y negativo del kit
2. Incubar 2 h en cámara húmeda a 4 °C (se puede dejar toda la noche)
3. Preparar la solución diluyente de la enzima MRS-2 con el buffer PBST 1X relación 1:4 (solución: PBST)
4. Preparar el conjugado de la enzima usando la solución preparada en el punto anterior con las enzimas A y B con relación 1:100 (10 µl A + 10 µl B + 980 µl de la dilución del conjugado) agitar y dejar en hielo

Nota importante: prepararla dentro de los 10m de su uso

Se utiliza 1mL aproximadamente para 8 muestras

5. Lavar la placa con el buffer PBST 1X 6 veces, después del lavado tomar la placa y voltearla en papel secante, golpearla firmemente para remover gotas y burbujas
6. Agregar a cada pozo 100 µl del conjugado enzimático e incubar a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 2 h
7. Vaciar a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 mL la cantidad necesaria del sustrato TMB y temperar

Nota importante: no temperar todo el sustrato, sólo lo necesario

8. Lavar 6 veces la placa con PBST 1X, después del último lavado, tomar la placa, voltearla en papel secante y golpearla firmemente para eliminar burbujas y gotas
9. Agregar 100 µl del sustrato TMB a cada muestra en obscuridad
10. Incubar por 15 min a temperatura ambiente en cámara húmeda
11. Añadir 50 µl de ácido sulfúrico al 3 M para detener la reacción. El color debe virar de azul a amarillo y hacer una lectura a 450 nm

ANEXO 7

Extracción de RNA con RNA Reagent de Invitrogen™

1. Agregar 500 µl de RNA Reagent a 100 mg de tejido y mezclar por vortex
2. Incubar 5 min a temperatura ambiente en forma horizontal
3. Centrifugar 5 min a 12,000 g a temperatura ambiente y transferir sobrenadante a tubo para microcentrífuga de 1.5 mL nuevo
4. Agregar 100 µl de la solución NaCl al 5 M y mezclar
5. Añadir 300 µl de cloroformo y mezclar por inversión
6. Centrifugar por 12 min a 4 °C a 12,000 g y transferir fase acuosa a tubo nuevo
7. Agregar a la fase acuosa un volumen igual de isopropanol y dejar 10 min a temperatura ambiente
8. Centrifugar la muestra por 10 min a 4 °C y 12,000 g
9. Decantar el sobrenadante (evitando perder el pellet) y agregar 1 mL de etanol al 75%
10. Centrifugar 1 min a 12,000 g a temperatura ambiente y decantar
11. Disolver el pellet de 10 a 30 µl de agua Milli- Q® esterilizada