



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAestrÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**FUSIÓN DE LA PROTEÍNA VP7 CON UNA OLIGOHISTIDINA,
SU EXPRESIÓN EN EL SISTEMA DE CÉLULAS DE INSECTO
BACULOVIRUS Y SU PURIFICACIÓN MEDIANTE
CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR METAL INMOVILIZADO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO

P R E S E N T A

ESTEBAN PEGUERO SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. OCTAVIO TONATIUH RAMÍREZ REIVICH IBT, UNAM

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL:

DR. GERARDO CORZO IBT, UNAM

DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA IBT, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice general

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE ECUACIONES	9
AGRADECIMIENTOS.....	11
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	14
ANTECEDENTES	15
PARTÍCULAS PSEUDO-VIRALES.....	15
ENSAMBLAJE DE LAS PPV	17
EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE PROTEÍNAS VIRALES.....	19
ROTAVIRUS	20
LA PROTEÍNA VP7	21
INTERACCIONES ENTRE TRÍMEROS DE VP7	24
SISTEMA DE EXPRESIÓN CÉLULAS DE INSECTO-BACULOVIRUS (CI/BV).....	25
PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	26
PURIFICACIÓN DE VP7.....	28
DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ.....	29

HIPÓTESIS.....	32
OBJETIVOS GENERALES.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
CONSTRUCCIÓN DE UN BACULOVIRUS RECOMBINANTE	33
Obtención del gen de VP7	33
Producción del plásmido pGEM conteniendo VP7	33
Verificación de la secuencia y la direccionalidad del gen de VP7 en el vector pGEM mediante el uso de enzimas de restricción.....	33
Generación de un producto de PCR de VP7.....	35
Clonación del gen de interés	36
Ligación del fragmento de DNA amplificado con el vector pFastBac™ TOPO® C-His.	37
Transformación de las células competentes One Shot® Mach1-T1®.....	38
Análisis de las clonas positivas y purificación del plásmido	38
Corroboración de la orientación del gen	39
Clonación del gen de VP7 en el genoma del baculovirus (Construcción del baculovirus recombinante).....	39
Transformación de células competentes de E. coli DH10Bac®.....	40
Verificación del fenotipo.....	41
Transfección de células de insecto.....	41
Expresión de proteínas recombinantes	42
LÍNEAS CELULARES Y TÉCNICAS DE CULTIVO	42
PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE	42
ENSAYO EN PLACA PARA EL AISLAMIENTO DE PLACAS VIRALES	43

PURIFICACIÓN DE VP7.....	44
Protocolo de optimización del paso de intercambio iónico.....	44
Concanavalina.....	45
Cromatografía de exclusión de tamaño.....	46
Intercambio aniónico fuerte.....	46
Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado.....	46
Precipitación ácida.....	46
Precipitación básica.....	47
Reporte de los resultados mediante tablas de resumen de la purificación.....	47
ESTRATEGIA DE PURIFICACIÓN.....	48
MÉTODOS ANALÍTICOS	49
Concentración y viabilidad celular.....	49
Determinación del perfil de glicosilación mediante PNG-asa F, marcaje con 2AB y HPLC* ...	49
Determinación del perfil de glicosilación utilizando PNGasa-A.....	51
Determinación del título viral.....	52
Monitoreo cualitativo de los pasos de purificación.....	52
Purificación de plásmido.....	54
Cuantificación y pureza del DNA.....	54
Dispersión dinámica de luz.....	55
Microscopia electrónica (Tinción negativa).....	55
Inmuno nano-oro para microscopía electrónica.....	55
Geles de poliacrilamida para electroforesis con dodecil sulfato de sodio.....	56

Tinción con plata de geles de poliacrilamida.	56
RESULTADOS	57
Generación de abastos virales.....	57
Producción de la proteína recombinante sin cola de histidinas.....	58
Purificación de VP7 (Estrategia inicial).....	59
DISEÑO EXPERIMENTAL PARA MEJORAR LA PUREZA DE VP7	69
Precipitación ácida y básica.....	71
Precipitación ácida seguida de Concanavalina A, medio de cultivo Sf900 II.	73
Precipitación ácida seguida de Concanavalina A, medio de cultivo ExCell 405.....	73
Etapa de cromatografía de exclusión por tamaño comparando ambos medios de cultivo....	74
Intercambio iónico.....	75
PRODUCCIÓN DE VP7 CON COLA DE HISTIDINAS.	79
Análisis de restricción del plásmido pGEM 3Z.....	79
Transfección de las células de insecto.....	85
Pruebas preliminares de purificación por IMAC.	86
Optimización de la Cromatografía de Afinidad por metal inmovilizado (CAMI)	90
Verificación de la glicosilación de VP7	92
Determinación del perfil de glicosilación de VP7	93
Pruebas de dispersión dinámica de luz de VP7	98
MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	105
CONCLUSIONES	109

PERSPECTIVAS	114
---------------------------	------------

REFERENCIAS	115
--------------------------	------------

Índice de figuras

Figura 1. Modificaciones químicas y biológicas a las cápsides virales.	17
Figura 2. Diagrama de fases de la proteína viral VP6.	19
Figura 3. Estructura del rotavirus. Adaptado de Patton y Spencer, 2000.	20
Figura 4. Organización de los trímeros de VP7 como serían vistos sobre la cápside del rotavirus.	22
Figura 5. Posición de la glicosilación en VP7.	23
Figura 6. Estructura del gen de VP7 y de la proteína VP7.	23
Figura 7. Interacciones entre trímeros de VP7.	24
Figura 8. Plásmido pGEM 3Z.	34
Figura 9. Mecanismo de acción de la Topoisomerasa I.	36
Figura 10. Construcción del vector pFastBac TOPO C-His.	37
Figura 11. Sistema Bac-to-Bac.	40
Figura 12. Diseño experimental para mejorar la pureza de VP7.	49
Figura 13. Western-blot de placas virales.	58
Figura 14. Sobrenadante del cultivo.	59
Figura 15. Cromatograma de afinidad (Concanavalina A, sefarosa B).	60
Figura 16. Gel de poliacrilamida y Western-blot de las fracciones eluidas de la columna empacada con ConA Sepharose.	61
Figura 17. Cromatograma de exclusión por tamaño.	62
Figura 18. Análisis de la etapa de exclusión por tamaño.	63
Figura 19. Western-blot de las pruebas de optimización del pH para el paso de intercambio iónico.	64
Figura 20. Efecto del pH en la retención utilizando la resina Eshmun Q para VP7.	64
Figura 21. Recuperación de VP7 para dos pH's distintos.	65
Figura 22. Cromatograma de intercambio iónico.	66
Figura 23. SDS-PAGE y su correspondiente Western-blot, para las fracciones obtenidas del paso de intercambio iónico.	67
Figura 24. Comparación de la producción Sf900II vs ExCell 405.	70
Figura 25. Comparación de la producción Sf900 II vs Medio de Protein Sciences.	70
Figura 26. Western-blot del proceso de precipitación ácida.	72
Figura 27. Western-blot del proceso de precipitación básica.	72

Figura 28. Precipitación ácida seguida de Concanavalina A, medio de cultivo Sf900 II.....	73
Figura 29. Precipitación ácida seguida de Concanavalina A, medio de cultivo ExCell 405.....	74
Figura 30. Etapa de cromatografía de exclusión por tamaño comparando ambos medios de cultivo	75
Figura 31. Intercambio iónico resina Eshmuno.	76
Figura 32. Purificación para intercambio aniónico con la resina Fractogel	77
Figura 33 Intercambio aniónico fuerte con la resina fractogel, para el medio ExCell 405 previa precipitación básica	78
Figura 34. Resumen de purezas obtenidas en los pasos de la purificación utilizados.	79
Figura 35. Análisis de restricción de pGEM 3Z	80
Figura 36. Obtención del producto de PCR de VP7.....	81
Figura 37. Confirmación de clonas positivas en el vector TOPO.....	82
Figura 38. Gel de agarosa de la purificación del vector TOPO conteniendo el gen de VP7.	83
Figura 39. Identificación de colonias positivas para la clonación del gen de VP7 en <i>E. coli</i> DH10 Bac.....	84
Figura 40. Resultado de la producción y purificación del Bámido conteniendo VP7.....	84
Figura 41. Análisis de la transfección de células Sf9 mediante western-blot.....	85
Figura 42. Western blot anti-His tag. Para detectar la presencia de la cola de histidina.	86
Figura 43. Pruebas preliminares de purificación con CAMI.....	87
Figura 44. Purificación de VP7 mediante CAMI. Se llevó a cabo la confirmación mediante Western- blot utilizando un anticuerpo anti cola de histidinas.	88
Figura 45. Ejemplo de gel de poliacrilamida utilizado para calcular la pureza de la proteína.	89
Figura 46. Gel de poliacrilamida y Western blots del proceso de purificación de VP7.	91
Figura 47. Western-blot para determinar la presencia de residuos glicosilados en VP7.....	92
Figura 48. Escalera de glicanos.....	93
Figura 49. Ajuste de la curva para correlacionar el tiempo de retención con las unidades de glucosa.	94
Figura 50. Cromatograma para la determinación del perfil de glicosilación en una muestra de VP7 purificada.	95
Figura 51. Estructuras probables para los glicanos de VP7.....	95
Figura 52. Dispersión dinámica de luz.VP7 14 µg/mL Tris buffer salino (TBS) y 4 mM de CaCl ₂ (Condición estándar)	99
Figura 53. VP7 60 µg/mL TBS y 4 mM de CaCl ₂ (Incremento de concentración de VP7 de 14 µg/mL a 60 µg/mL).	100
Figura 54. Tamaño promedio z en función de la temperatura para VP7 14 mM en TBS y 4 mM de CaCl ₂	101
Figura 55. VP7 14 mM en TBS y 4 mM CaCl ₂ Temperatura = 60 °C. (Aumento de temperatura). 102	

Figura 56. VP7 14 mM en TBS, 4 mM de CaCl ₂ y 40 mM de NiSO ₄ . (Adición de NiSO ₄).	103
Figura 57. VP7 14 mM en TBS, 4 mM de CaCl ₂ y 40 mM de CuSO ₄ . (Adición de CuSO ₄).	104
Figura 58. Microscopía electrónica de transmisión de una muestra de VP7 en TBS conteniendo CuSO ₄	106
Figura 59. Control negativo sin VP7.	107
Figura 60. Inmuno-tinción con oro de una muestra que contiene VP7 y CuSO ₄	107
Figura 61. Control negativo de la inmunotinción correspondiente a la muestra con cobre.	108

Índice de tablas

Tabla 1. Análisis de restricción de pGEM 3Z.	35
Tabla 2. Concentraciones de reactivos usados en el PCR	35
Tabla 3. Parámetro usados en el PCR.	35
Tabla 4. Cantidades de reactivos utilizadas para la reacción de ligación.	38
Tabla 5. Resumen de la purificación utilizando afinidad por concanavalina, filtración en gel e intercambio iónico. Fracción de VP7 se refiere a la fracción de VP7 con respecto al total de proteína en la muestra.	68
Tabla 6. Análisis de restricción de pGEM 3Z.	81
Tabla 7. Resumen de la purificación utilizando CAMI.	90
Tabla 8. Resumen de la purificación utilizando CAMI, después de la optimización del protocolo. ...	92
Tabla 9. Resultados del análisis de dispersión dinámica de luz para VP7 en condición estándar. .	99
Tabla 10. Resultados de la dispersión dinámica de luz para VP7 al incrementar la concentración de proteína.	100
Tabla 11. Resultados de la dispersión dinámica de luz para VP7 después de calentar a 60 °C. ...	102
Tabla 12. Resultados de la dispersión dinámica de luz para VP7 al agregar NiSO ₄	103
Tabla 13. Resultados de la dispersión dinámica de luz para VP7 al agregar CuSO ₄	104
Tabla 14. Resumen de las condiciones utilizadas en los experimentos de dispersión dinámica de luz.	105

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1.....	30
Ecuación 2.....	30
Ecuación 3.....	30
Ecuación 4.....	31
Ecuación 5.....	31
Ecuación 6.....	47
Ecuación 7.....	47
Ecuación 8.....	48
Ecuación 9.....	48
Ecuación 10.....	48

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la duración del presente proyecto se contó con el apoyo económico del CONACyT y de la UNAM. Beca para maestría CONACyT 47258, proyecto CONACYT CB-101847 y proyecto DGAPA IT-200113.

AGRADECIMIENTOS

A **mis padres**, por todo.

Al **Dr. Carlos Camacho**, por su guía a lo largo del camino.

Al **Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich**, por su tutoría en la realización del presente proyecto y por su continuo ejemplo en la práctica de la actividad científica realizada con excelencia y dedicación.

A los miembros del **comité tutorial**: Dr. Enrique Rudiño Piñera y Dr. Gerardo Corzo.

A los miembros del **jurado**: Dr. Baltazar Becerril Luján, Dr. Norberto Cruz García, Dra. Georgina Gurrola Briones, Dr. Jaime Ortega López y Dra. Gloria Saab Rincón.

Por el **apoyo técnico**: MC Vanessa Hernández, Dra. Alba Neri Lecona, Dra. Laura Alicia Palomares, MC Ana Ruth Pastor, Dra. Guadalupe Zavala.

A **todos los integrantes de nuestro grupo de investigación (OTR)**.

Resumen

El desarrollo de materiales basados en complejos multiproteicos está teniendo un rápido desarrollo debido a sus aplicaciones como vehículos para el envío de medicamentos, el desarrollo de nuevas vacunas, la creación de catalizadores y en la industria electrónica, entre otros. De manera natural los virus se autoensamblan en estructuras de simetría y composición definidas, por lo que ofrecen muchas herramientas para la creación de este tipo de materiales. VP7 es una glicoproteína estructural viral de rotavirus. El contar con la proteína VP7 purificada a una alta pureza y en cantidades suficientes, abre la posibilidad de llevar a cabo estudios de su ensamblaje. Estos estudios podrían contemplar la formación de estructuras con otras proteínas como VP6, con la cual VP7 normalmente interactúa en el rotavirus, o estudios de formación de estructuras complejas de VP7, e incluso funcionalizarla de manera química. Además al ser VP7 una glicoproteína, sería posible combinar el mundo nanométrico con el mundo de la glicobiología como una forma de funcionalización, que ha sido poco explorada hasta el momento.

En el presente trabajo se llevó a cabo la producción recombinante de VP7 de rotavirus en el sistema células de insecto/baculovirus. Este sistema permite la expresión de proteínas heterólogas que requieren de un procesamiento post-traducciona l como la glicosilación. Adicionalmente, este sistema permite la construcción rápida de vectores para la producción de proteína heteróloga. Posteriormente se procedió a purificar VP7. Dentro del proceso de purificación se utilizaron y contrastaron dos estrategias principales. La primera de las estrategias consistió en un tren de purificación utilizando como primer paso la cromatografía de afinidad por Concanavalina A. La Concanavalina A permite la separación de proteínas glicosiladas, donde se une a α -manopiranosidos o α -glucopiranosidos de otras que no presentan esta modificación. El segundo paso utilizado fue la cromatografía de exclusión por tamaño y finalmente la cromatografía de intercambio aniónico. En la segunda estrategia de purificación se utilizó la cromatografía de afinidad por metal inmovilizado. Para llevar a cabo esta técnica, se construyó un baculovirus recombinante conteniendo el gen de VP7, fusionado con una cola de histidinas en el C-terminal. Para su correcta expresión en el

sistema de células de insecto/baculovirus se utilizó el promotor de la poliedrina. Este baculovirus permitió llevar a cabo la producción de VP7, para después purificarla. A continuación se compararon las purezas obtenidas con las metodologías utilizadas. Con la primera estrategia de purificación se alcanzó una pureza máxima del 24 % para VP7, sin embargo con la segunda estrategia se logró una pureza superior al 95 %, con un solo paso de purificación. Posteriormente se llevaron a cabo pruebas preliminares de caracterización con VP7. Para estas pruebas preliminares se utilizaron la dispersión dinámica de luz y la microscopía electrónica de transmisión. La primera de estas técnicas permite determinar el tamaño de las especies en solución con base en el movimiento browniano que presentan y es muy útil para detectar formación de complejos o agregados siempre y cuando estos sigan siendo solubles. La microscopía electrónica se utilizó para observar los agregados de VP7 formados.

Introducción

Las partículas pseudovirales (PPV) son estructuras ordenadas que resultan del autoensamblaje de proteínas virales pero a diferencia de los virus, no contienen material genético. En la actualidad se están llevando a cabo muchos avances en el estudio de las PPV, principalmente en la ingeniería de nuevas partículas, ya sea mediante modificaciones químicas en su estructura o utilizando biología molecular para llevar a cabo mutaciones y de esta manera modificar sus propiedades fisicoquímicas o biológicas (Mateu 2010). Algunas de las aplicaciones de las PPV comprenden el envío específico de medicamentos, la terapia génica, el desarrollo de nuevas vacunas y la creación de materiales novedosos (Boisgérault et al 2002). Las investigaciones que implican el uso de las PPV se encuentran muy relacionadas con el campo de la nanotecnología ya que los virus son nanomateriales naturales, capaces de adoptar estructuras ordenadas, simétricas y homogéneas que se autoensamblan (Douglas 2006). Sin lugar a dudas una de las etapas críticas en el estudio de las PPV es su purificación. Esta etapa permite obtener el material de trabajo con un nivel de impurezas suficientemente bajo para que los fenómenos observados en los experimentos puedan ser atribuidos a la proteína de interés y no a sus contaminantes o a la interacción de la proteína de interés con otros componentes (Gaussier 2006). Se busca que los métodos de purificación sean rápidos y que permitan tener una alta recuperación del material, al mismo tiempo entregando una proteína con una pureza suficiente para la aplicación deseada y en cantidades adecuadas.

Los rotavirus son agentes patógenos que afectan a mamíferos, incluidos los humanos. Son los principales causantes de diarrea en niños. El virión se encuentra formado por una partícula de triple capa formada por las proteínas VP2, VP6 y VP7, siendo VP7 la que constituye la capa exterior (Aoki 2009). Actualmente se busca mejorar las vacunas existentes contra rotavirus mediante el uso de PPV. De la misma manera, la proteína VP6 de rotavirus está siendo utilizada para la creación de nuevos materiales nanoestructurados (Plascencia-Villa 2009).

Antecedentes

Partículas pseudo-virales

Este tipo de estructuras forman arreglos ordenados y simétricos que se asemejan estructuralmente a las partículas virales y pueden estar formadas por una o más proteínas. Desde hace algunos años se ha logrado producir proteínas virales de manera recombinante y lograr ensamblarlas en PPV. Dicho ensamblaje puede ser llevado a cabo tanto *in vivo* como *in vitro* (Goldman *et al.*, 1999; Fromantin *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 1998). El estudio extensivo de los virus como patógenos ha producido un conocimiento detallado de sus propiedades a nivel biológico, genético y estructural. El entendimiento de las características biológicas y fisicoquímicas de los virus y sus proteínas estructurales permite manipular y ensamblar diferentes tipos de PPV. Algunas de sus aplicaciones son como vacunas, aprovechando el hecho ya mencionado de su carencia de material genético y que sin embargo muchas de ellas presentan una inmunogenicidad alta ya que asemejan las estructuras de los virus de las que se originan. Ejemplos de la utilización de PPV como vacunas son el caso de la vacuna para Hepatitis B, o también, la vacuna para el virus del papiloma humano GARDASIL™ (Thomas y Carman, 2000; Siddiqui y Perry, 2006) y la vacuna CERVARIX™, también contra este último virus (Monie, 2008)^{oo}. Actualmente se estudia la posibilidad de emplear PPV de virus adeno-asociado producidas en células de insecto como vectores para terapia génica, debido a la capacidad de empaquetar material genético foráneo (Urabe *et al.*, 2002).

Las PPV tienen otras aplicaciones, por ejemplo en nanotecnología, donde se han usado como base para formar diversas estructuras de escala nanométrica (Fischlechner y Donath, 2007). Algunos de los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, se basan en la funcionalización con metales de estructuras tubulares formadas con la proteína VP6 de rotavirus. Estos metales incluyen al oro, paladio y platino, por lo que podrían encontrar aplicación en la industria electrónica o como catalizadores (Plascencia-Villa *et al.*, 2009). Las proteínas virales forman ensamblajes supramoleculares o macromoléculas con estructura tridimensional

bien definida, por lo que pueden ser consideradas como nanomateriales biológicos naturales con topología, simetría y morfología precisas. Debido a esto, las proteínas virales han recibido gran atención por su gran potencial en aplicaciones nanotecnológicas (Fischlechner y Donath, 2007, Plascencia-Villa et al., 2009).

La gran diversidad de virus y su uso en ciencias de materiales abre innumerables oportunidades para generar nuevas estructuras complejas sintéticas, por ejemplo PPV con múltiples ligandos unidos ya sea en su superficie, en su interior o en las interfases de las subunidades. Estos ligandos unidos al virus pueden servir como señales de reconocimiento específico para el envío de medicamentos o para conferir propiedades mecánicas, eléctricas o químicas específicas. (Douglas et al., 2006) (

Figura 1).

Otra de las aplicaciones de las PPV se da en el campo de la terapia génica y envío de medicamentos, debido a su capacidad de encapsular ya sea material genético foráneo o fármacos. Dichas aplicaciones también se trabajan actualmente en nuestro laboratorio. La terapia génica se está empleando para combatir una gran variedad de padecimientos, sean de origen genético o no. Se ha utilizado contra la distrofia muscular, la fibrosis quística, hemofilia B, cáncer, mal de Parkinson y regeneración de la retina (Lai et al., 2002; Gonçalves, 2005). Este tipo de terapia involucra la introducción de material genético a células de tejidos específicos, por lo que es necesario algún tipo de vector. En terapia humana, por ejemplo, los vectores de virus adeno-asociado se han convertido en vehículos muy prometedores (Kay, 2011).

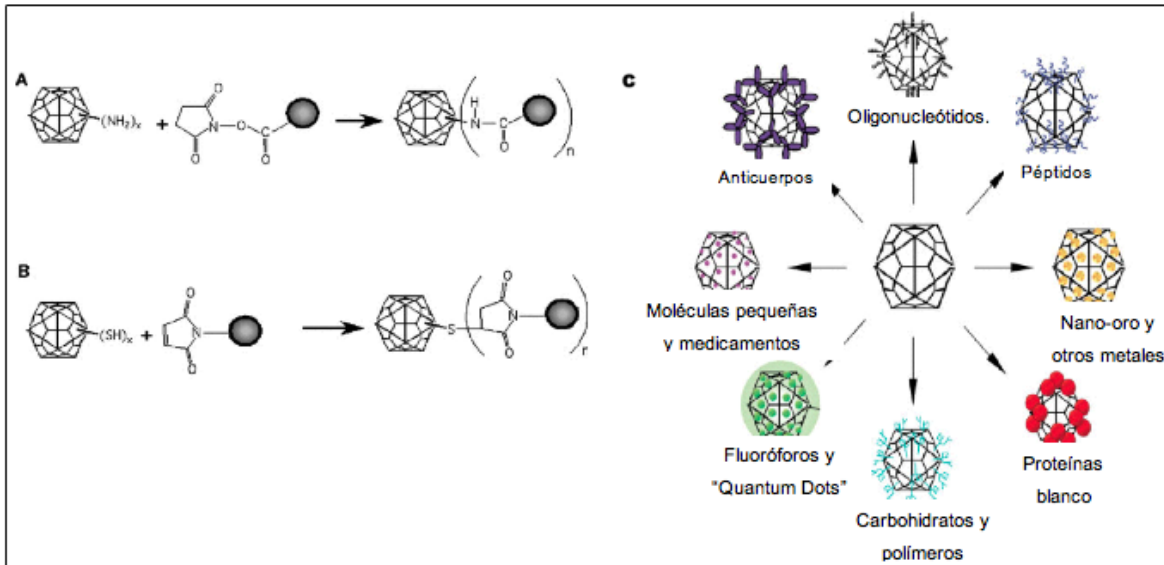


Figura 1. Modificaciones químicas y biológicas a las cápsides virales.

A) Lisinas en una cápside viral reaccionando con moléculas derivatizadas con NHS-éster. B) Tioles de cisteínas de una cápside viral reaccionando con moléculas derivatizadas con maleamida. C) Utilizando como base un virus es posible unir una gran variedad de ligandos ya sea mediante el uso de ingeniería genética o modificación química. Singh et al., 2006.

Ensamblaje de las PPV

Para muchos virus esféricos el proceso de ensamblaje y desensamblaje es de vital importancia para su ciclo de vida. La cápside tiene que ser suficientemente resistente y mantener tanto su integridad, como la del material genético que protege durante su paso entre distintos huéspedes. Sin embargo, en el caso de muchos virus la cápside debe desensamblarse para permitir la salida del material genético. Esto nos habla de que existe un control fino del proceso de ensamblaje y desensamblaje de las cápsides virales, que depende en muchos casos de las condiciones fisicoquímicas del medio en el que se encuentre el virus (Ceres y Zlotnick, 2002). En algunos estudios se ha demostrado que las interacciones de tipo débil son las que tienen mayor importancia para el ensamblaje de las cápsides virales y de las PPV. Ello es debido a que permiten lograr un mejor control del proceso de ensamblaje/desensamblaje. Si la energía de interacción es muy alta, el ensamblaje de las cápsides puede caer en estados pseudo-estables, en los cuales no se han terminado de ensamblar la cápsides. El fenómeno de formación de estados inestables que no culmina con el ensamblaje de una cápside o PPV completa, se conoce como trampa cinética y se caracteriza por un rápido

agotamiento de las subunidades, y la presencia de estructuras que no se encuentran bien ensambladas (intermediarios incompletos) (Zlotnick *et al.*, 1999; Hagan *et al.*, 2011; Zlotnick y Mukhopadhyay, 2011).

Así mismo, las PPV no solo forman estructuras morfológicamente semejantes a las de los virus nativos. Las PPV pueden formar distintos tipos de estructuras, dependiendo de las condiciones fisicoquímicas a las que se encuentren sujetas. En la **Figura 2** se muestra a manera de ejemplo un diagrama de fases de la proteína VP6 de rotavirus. Se observa que dicha proteína presenta polimorfismo estructural a distintas condiciones de pH y fuerza iónica. En las proteínas virales existen otros ejemplos de polimorfismo, provocado ya sea por cambios en las condiciones fisicoquímicas del medio o causado por interacciones con proteínas que funcionan como templados para el ensamblaje (Butler *et al.* 1972, Johnson y Speir 1997, Kanesashi 2003, Trus *et al.* 2004, Saugar *et al.* 2010). También se ha logrado inducir el polimorfismo estructural mediante mutaciones en las secuencias de las proteínas virales, en particular provocadas debido a la delección del amino terminal (Calhoun 2007, Kakani *et al.* 2008).

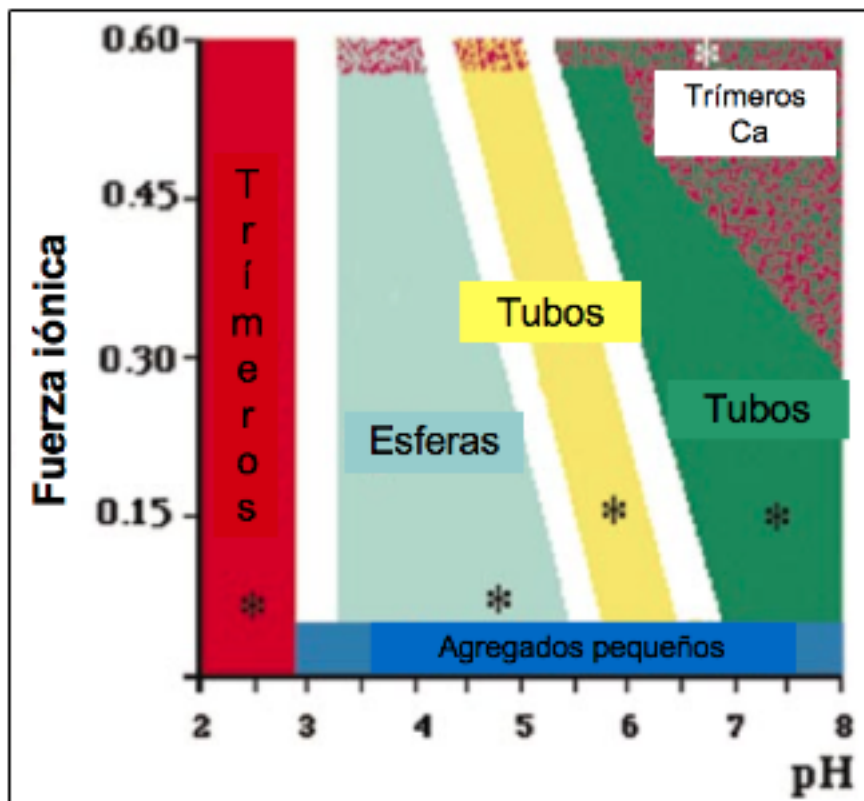


Figura 2. Diagrama de fases de la proteína viral VP6. (Adaptado de Lepault et al., 2001)

Expresión recombinante de proteínas virales

Es posible producir las PPV en diferentes sistemas recombinantes como bacterias, levaduras, células de mamífero, células de insecto, plantas y larvas de insecto. Cada uno de los sistemas presenta ventajas y desventajas. Por ejemplo, si lo que se busca es producir grandes cantidades de proteína, y dicha proteína es fácil de plegar y su procesamiento post-traduccional es bajo, entonces un buen sistema de producción es el de *E. coli* (Zhang et al 1998). Cuando el procesamiento post-traduccional se vuelve de mayor importancia, entonces la producción en levaduras es más apropiada (Tsai et al., 2011). También se ha explorado la producción de proteínas virales en plantas (Warzecha et al., 2003; Saldaña et al., 2006). Sin embargo, el sistema que ha sido mas utilizado y que provee el mayor número de ventajas para la producción tanto de PPV ya ensambladas como de proteínas virales es el sistema células de insecto/baculovirus (CI/BV). Este sistema permite llevar a cabo modificaciones a las proteínas recombinantes por ejemplo,

glicosilación. Además posibilita la construcción rápida de baculovirus para llevar a cabo la infección de las células y es un sistema seguro ya que los promotores utilizados en este sistema no permiten la expresión de proteínas recombinantes en mamíferos (Palomares et al, 2006).

Rotavirus

Los rotavirus son virus no envueltos pertenecientes a la familia *Reoviridae* que infectan a animales y humanos. Son virus de ARN de doble cadena (11 segmentos, para un total de 18.5 kpb), cuya cápside se encuentra formada por tres capas de proteínas. La capa mas interna del rotavirus se encuentra formada por VP2, VP6 forma la capa intermedia, mientras que VP7 y VP4 forman la capa exterior. La proteína VP4 forma 60 espículas en la superficie del virus. VP1 y VP3 son proteínas que se encuentran en el núcleo del virión (Estes y Cohen, 1989; Kipikian y Chanock, 1996; Mathieu *et al.*, 2001). En total el virus codifica 12 proteínas de las cuales 6 son estructurales (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 y VP7) y 6 no son estructurales (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 y NSP6). El diámetro del rotavirus es de 75 nm aproximadamente, dicho tamaño se encuentra en el intervalo normalmente utilizado en nanotecnología (Aoki et al., 2009; Mirazimi y Svensson, 1998). En la **Figura 3** se muestra un diagrama de la estructura del rotavirus.

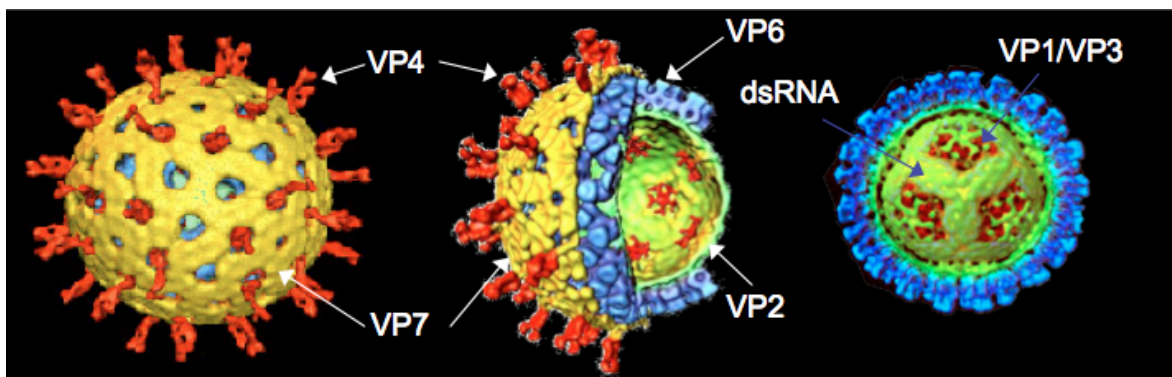


Figura 3. Estructura del rotavirus. Adaptado de Patton y Spencer, 2000.

La proteína VP7

VP7 es una proteína estructural del rotavirus que, como ya se mencionó, forma la capa más externa de la cápside y es la segunda de mayor abundancia, solo después de VP6. VP7 tiene un péptido señal que la dirige hacia el retículo endoplásmico para su procesamiento. Algunas características de VP7 son: (i) Es una proteína que presenta N-glicosilaciones donde el número presente de glicosilaciones depende del serotipo de VP7 (Dyall-Smith et al. 1984). Estos sacáridos son agregados de manera cotraduccional al tiempo que la proteína es insertada en la membrana del retículo endoplásmico. (ii) Antes del ensamblaje de la partícula viral VP7 es una proteína integral de membrana con una orientación luminal en el retículo endoplásmico de la célula huésped.

El gen que codifica para VP7 tiene un marco abierto de lectura de 326 aminoácidos. El péptido señal en VP7 comprende desde el aminoácido 1 hasta el 50. En VP7 madura, la región N-terminal se encuentra modificada como ácido piroglutámico. La maduración de VP7 implica el corte del péptido señal y su glicosilación; el peso molecular de la proteína madura es de alrededor de 34 kDa.

La glicosilación en los serotipos SA11 y RRV, que son los utilizados en el presente trabajo, se presenta en Asn-69, que corresponde a la porción del N-terminal (Aminoácidos 51-78), (Aoki et al., 2009; Estes y Cohen, 1989; Kastan y Atkinson, 1985; Stirzaker et al., 1987).

VP7 se ensambla sobre VP6 en el virión. Cada virión se encuentra formado por 780 subunidades de VP7. Mediante criomicroscopía electrónica se ha logrado visualizar que en dicho ensamblaje, los monómeros de VP7 interactúan entre sí, formando dímeros y trímeros. Cuando VP7 se encuentra ensamblada en el virión del rotavirus cada uno de estos trímeros a su vez presenta interacciones con tres trímeros vecinos en la capa externa. También se ha comprobado que VP7 tiene cuatro sitios de unión a calcio. El calcio juega un papel preponderante en la formación de los trímeros debido a que permite interacciones de tipo electrostático entre los distintos monómeros. Las zonas de unión de la proteína a iones calcio presentan una carga negativa por la presencia de Glu y Asp (Aoki et al., 2009; Zongli et al., 2009). De la misma manera, los trímeros de VP7 presentan una gran

afinidad por VP6. El ensamblaje/desensamblaje de VP7 está mediado por su unión a calcio, de igual forma el calcio es necesario para la estabilidad de las cápsides (Ruiz et al., 1996). En la **Figura 4** se observa un arreglo de 4 trímeros como se presentan en el virión del rotavirus. La proteína VP7 presenta 4 enlaces del tipo disulfuro en su estructura. Aparentemente, la glicosilación de VP7 (**Figura 5**) es necesaria para que la enzima disulfuro isomerasa la reconozca y facilite la formación de los puentes disulfuro (Mirazimi y Svensson 1998; Mirazimi y Svensson 2000). En las **Figuras 4 y 5** se muestra la estructura general de VP7 así como la formación de trímeros y los sitios de unión a calcio (Aoki et al., 2009; Carter y Saunders, 2007). En la estructura terciaria de VP7 se encuentra un dominio con un plegamiento de tipo “Rossman” con extensiones C-terminal y N-terminal (brazos) y otro dominio que presenta un plegamiento del tipo “Jelly roll” que se encuentra insertado en uno de los lazos del plegamiento tipo “Rossman”. En la **Figura 6** se muestra la estructura de VP7 (Chen et al., 2009).

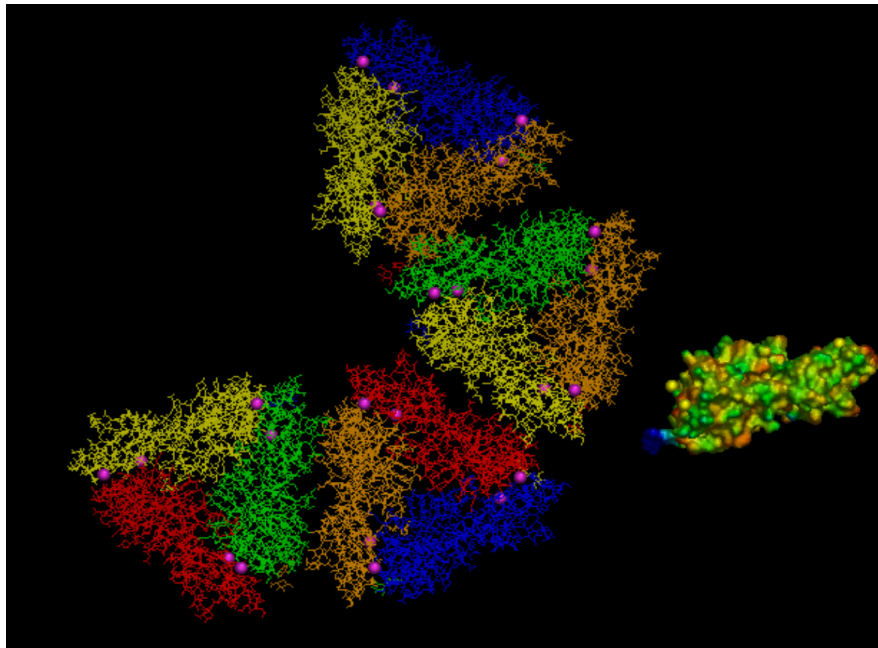


Figura 4. Organización de los trímeros de VP7 como serían vistos sobre la cápside del rotavirus. Los monómeros se muestran por color. En rosa se observan los iones Ca^{2+} en los sitios de unión a VP7, que se localizan en las interfases entre las subunidades. Para crear la imagen se utilizó el programa ASTEX Viewer. En la parte derecha de la figura se muestra la superficie de un monómero de VP7 coloreado en base a su hidrofobicidad. El azul representa las zonas menos hidrofóbicas y el rojo las más hidrofóbicas.

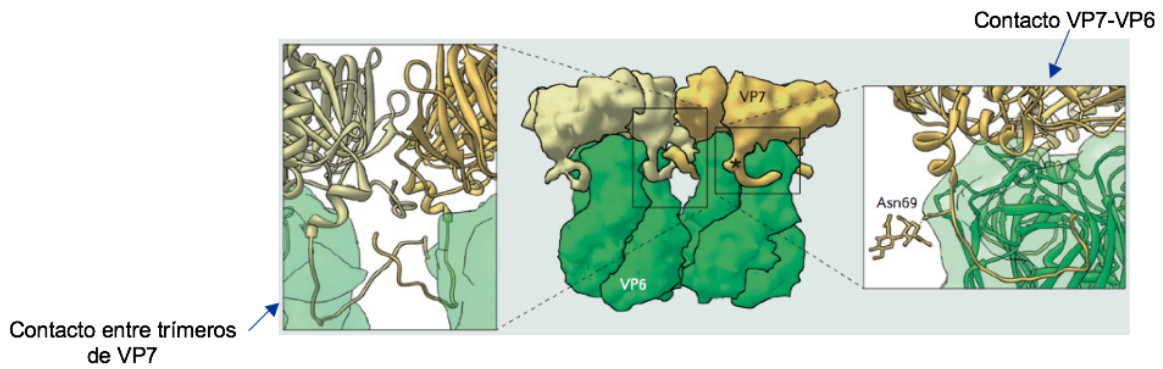


Figura 5. Detalles de las interacciones entre VP6 y VP7 y posición de la glicosilación en VP7.

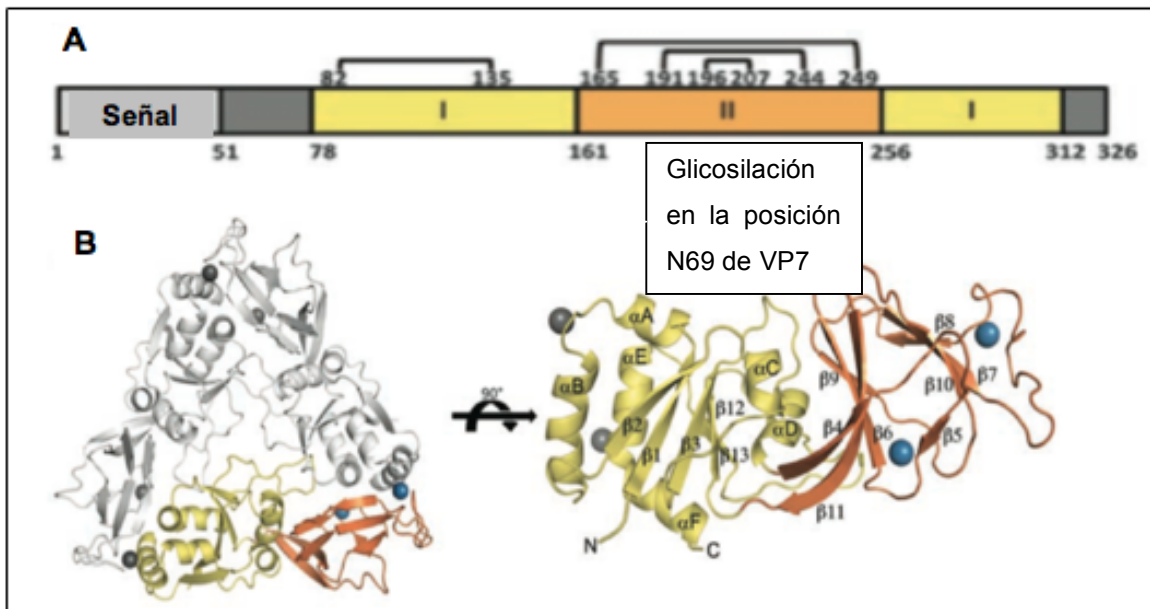


Figura 6. Estructura del gen de VP7 y de la proteína VP7.

En la imagen se observan: A) Diagrama esquemático del gen VP7. Se incluye la secuencia señal (residuos 1-50) Los dominios se muestran en el mismo color que en B. De la misma manera se ilustra la posición de los puentes disulfuro. En B) se muestra la estructura del trímero de VP7. El dominio que presenta el plegamiento tipo "Rossman" se presenta en amarillo (Dominio I) y el que presenta el plegamiento tipo "Jelly Roll" se muestra en anaranjado. Los iones calcio se presentan en azul (Adaptado de Aoki et al., 2009). Se ilumina solo uno de los monómeros.

Interacciones entre trímeros de VP7

En la **Figura 7** se muestra la interfase formada por dos trímeros de VP7, en ella se observa que el extremo N terminal posiblemente se encuentra implicado en las interacciones entre trímeros (Aoki et al., 2009). Es de notar también que dicho lazo se encuentra glicosilado en la posición N69. Esta glicosilación posiblemente se encuentra relacionada con que el extremo N-terminal tome la orientación necesaria para que las interacciones sean favorables. En posteriores trabajos también sería interesante determinar la influencia de la glicosilación con respecto a la interacción entre VP6 y VP7, ya que al parecer el extremo N-terminal también se encuentra involucrado con dichas interacciones (Bosques et al., 2004; Imperiali et al., 1999). En la **Figura 7** se muestran las posibles interacciones entre las regiones N-terminales de VP7.

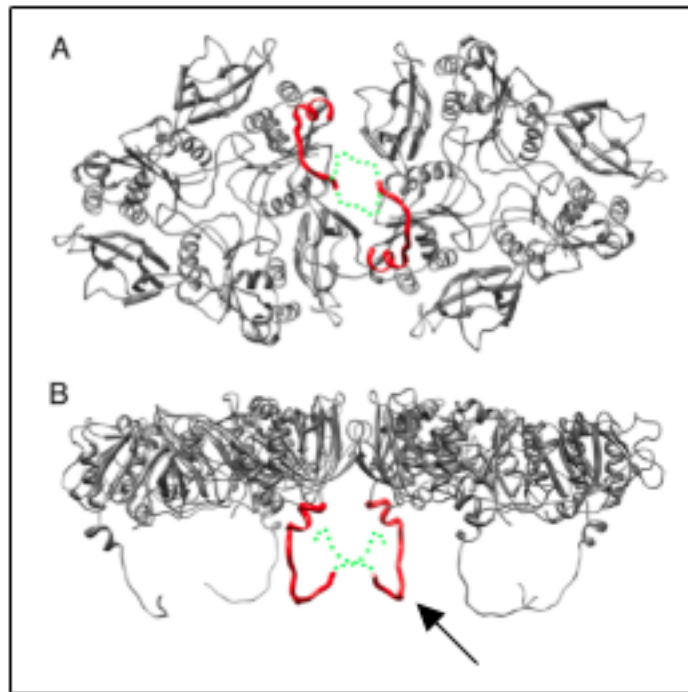


Figura 7. Interacciones entre trímeros de VP7.

Esta figura fue generada mediante datos de cristalografía de rayos X, los cuales fueron sobrepuestos en datos de crioelectromicroscopía. En rojo se muestran los residuos 58-78 del N terminal. En verde se muestran los residuos 51-57. A) Interfase de los trímeros de VP7 vista desde la parte exterior del virus. B) Imagen vista desde el lado perpendicular al eje de simetría³. La flecha muestra la ubicación de una de las glicosilaciones de VP7, la cual se propone está relacionada con las interacciones entre trímeros (Tomado de Chen et al., 1999).

Sistema de expresión células de insecto-baculovirus (CI/BV)

Algunas de las características de este sistema son las siguientes:

Seguridad

Los baculovirus, exhiben un rango de infectividad generalmente restringido a los artrópodos. Las líneas celulares de insecto, no son consideradas como transformadas, por lo que el riesgo de transmitir compuestos que promuevan el cáncer es reducido.

Velocidad, simplicidad y confiabilidad

La construcción de baculovirus recombinantes es simple y rápida con relación a otros sistemas.

Como se trata de un sistema de expresión transitorio, se requieren periodos de tiempo cortos para producir una cantidad apreciable de proteínas recombinantes.

Versatilidad

Más de 500 distintas proteínas recombinantes funcionales han sido producidas en este sistema.

Genes múltiples pueden ser clonados en un mismo baculovirus y expresarlas al mismo tiempo para producir proteínas multiméricas adecuadamente ensambladas.

Es posible llevar a cabo coinfección con varios baculovirus para producir proteínas multiméricas adecuadamente ensambladas.

Los baculovirus pueden llevar a cabo “splicing” de intrones/exones.

Las proteínas heterólogas pueden ser transportadas a los lugares naturales de localización celular.

Altos niveles de expresión.

La proteína heteróloga puede llegar a ser tal alta como el 50% de la proteína total celular, lo que corresponde a aproximadamente 1 ng de proteína recombinante por célula.

Modificaciones post-traduccionales

Las proteínas heterólogas pueden ser modificadas mediante glicosilación (N y O), fosforilación, acilación con ácidos grasos, α -amidación, amidación N-terminal, carboximetilación, isoprenilación, corte del péptido señal, y cortes proteolíticos. Aunque pueden existir diferencias, con respecto a las proteínas auténticas.

Características convenientes para el bioprocesamiento

Las líneas celulares de insecto pueden ser cultivadas de manera indefinida.

Las líneas celulares de insecto pueden ser adaptadas fácilmente a crecer en suspensión.

Pueden obtenerse altas concentraciones celulares en cultivo en lote, perfusión, o lote-alimentado.

El escalamiento es directo.

La expresión de la proteína heteróloga puede ser controlada mediante la manipulación del tiempo y la multiplicidad de infección.

Las proteínas de fusión pueden ser fácilmente construidas para facilitar la purificación.

Pueden ser utilizados promotores muy tardíos para permitir la producción de compuestos citotóxicos.

(Adaptado de Palomares et al., 2006)

Purificación de proteínas

Muchas de las investigaciones en el área de la bioquímica implican la purificación de los materiales de estudio para llevar a cabo una caracterización adecuada ya sea a nivel estructural o de actividad biológica. El proceso de purificación, por lo tanto es de una gran importancia. Sin embargo con frecuencia representa una tarea formidable debido a que normalmente existen miles de componentes que se consideran contaminantes de la proteína. Estos componentes son principalmente ácidos nucleicos, lípidos y otras proteínas (Berg 2002, Rosenberg 2005). Además el componente de interés en muchas ocasiones se encuentra en cantidades muy pequeñas, incrementando con ello el grado de dificultad de la purificación. Los métodos de purificación se basan en la discriminación de las propiedades fisicoquímicas o biológicas de los componentes. Por ejemplo, la cromatografía de exclusión por tamaño, nos permite llevar a cabo una separación con base en el radio hidrodinámico de los componentes, la cromatografía de intercambio iónico posibilita la separación en base a la diferencia en la carga de los componentes y la cromatografía de afinidad habilita que la separación pueda ser llevada a cabo a partir de la afinidad de una proteína por un ligando en particular (Whitford 2005).

Sin embargo, típicamente muchas de las proteínas que coexisten ya sea dentro de una célula o que son excretadas a un medio de cultivo, comparten muchas características. Ello hace necesario en muchas ocasiones utilizar varias etapas de purificación que contrasten el principio de separación. Por ejemplo, es útil combinar un proceso de separación en base a la carga de la molécula como lo es la cromatografía de intercambio iónico con una etapa de purificación de exclusión por tamaño. Cotidianamente se combinan tres o cuatro diferentes procesos en un mismo tren de purificación. Adicionalmente es requerido considerar la estabilidad de la proteína de interés ya que esta puede ser blanco de proteasas, microorganismos o ser susceptible a desnaturalización debido a las condiciones ya sean térmicas o fisicoquímicas del solvente en el que se encuentre disuelta.

Otro aspecto muy importante a considerar es que en casi todos los trenes de purificación es necesario llevar a cabo un proceso de cambio de disolvente, normalmente por una solución amortiguadora (buffer). Este proceso es necesario por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la proteína y por lo tanto mantener su integridad estructural y/o biológica (Linn 2009). El cambio de buffer también es muy importante para asegurar la compatibilidad con los procesos de purificación a ser utilizados y mantener condiciones fisicoquímicas estables que permitan tener operaciones reproducibles. Por ejemplo, para utilizar la cromatografía de intercambio iónico es necesario que la muestra se encuentre disuelta en una solución amortiguadora con una fuerza iónica baja ya que las sales, al estar cargadas compiten con los componentes que deseamos adsorber en la fase estacionaria.

Las técnicas de biología molecular han revolucionado la expresión y la purificación de proteínas. En un principio la purificación de una proteína implicaba obtenerla a partir del tejido original en el que era producida, donde normalmente se presentaba en cantidades muy pequeñas, además el control de la producción era difícil y estaba sujeto a una gran variabilidad. La capacidad de producir proteínas de manera recombinante ha permitido utilizar sistemas en donde la proteína de interés se sobre-expresa gracias al diseño de los vectores utilizados, las técnicas de transducción/transfección y al adecuado control de las variables de operación

(Palomares et al. 2004). Esto ha facilitado la purificación de proteínas ya que es más fácil purificar una proteína cuando esta se encuentra en una alta concentración.

Otra de las aportaciones se refiere a la fusión de la proteínas de interés con los llamados “tags” o etiquetas de reconocimiento. Existen varios tags que ofrecen una alta afinidad por ligandos específicos (Gräslund 2008).

Generalmente se prefiere que el tren de purificación tenga el mínimo número de pasos para evitar mermas en el rendimiento, pero que sean suficientes para lograr una pureza adecuada de la proteína de interés. A mayor número de pasos, menor es la cantidad de proteína que se recupera, debido a que en cada etapa se pierde algo de material, aumentan los costos y el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso. Sin embargo, con cada paso de purificación adicional normalmente aumenta la pureza del producto buscado (Rosenberg 2005).

Purificación de VP7

En trabajos anteriores se ha reportado la purificación de VP7 utilizando diferentes técnicas. Por ejemplo en uno de los enfoques el tren de purificación se diseñó utilizando como primer paso la cromatografía de afinidad por Concanavalina A. La Concanavalina A es una lectina que se une a glicanos que contienen manosas. En este caso sirve para purificar VP7 ya que esta proteína se encuentra glicosilada. Después se utilizó un paso de exclusión en gel y finalmente un paso de cromatografía de afinidad por anticuerpos inmovilizados (Dormitzer et al. 2000). Esta estrategia, según es reportada, arroja una pureza de VP7 alrededor del 98 %. Sin embargo, la dificultad para implementarla radica en la necesidad de utilizar una gran cantidad de anticuerpos para la etapa final, requiriendo la disponibilidad del hibridomas específicos para su producción. El otro método reportado es una modificación del anterior, la diferencia principal radica en que la etapa final de cromatografía de afinidad por anticuerpo inmovilizado se sustituye por una de cromatografía de intercambio aniónico (Mellado et al. 2008). Si bien esto simplifica el proceso de purificación, la pureza reportada es de alrededor del 90 %. Adicionalmente la aplicación exitosa de este último protocolo de purificación depende de la utilización de columnas de alta resolución que resultan costosas. La

purificación mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado representa una técnica muy poderosa y ampliamente utilizada para purificar proteínas. Si bien implica el uso de técnicas de biología molecular para fusionar una cola de histidinas a la proteína de interés. El proceso en sí mismo se simplifica de manera bastante importante. En muchos casos un solo paso de purificación es suficiente para obtener purezas superiores al 95 %. Ello implica una reducción muy importante en el uso de los recursos. El obtener este grado de pureza depende del organismo utilizado para producir la proteína recombinante, del tipo de resina utilizado y de la naturaleza de la proteína a purificar (Arnau et al., 2006; Block et al., 2011; Gaberc-Porekar et al., 2001; Charlton et al., 2009; Hu et al., 1999; Kuusinen et al., 1995; Kühn et al., 1995; Lichty et al., 2011; Schmidt et al., 1998; Waugh 2005; Zhou et al., 2010).

Dispersión dinámica de luz

Cuando un haz de luz atraviesa una solución que contiene partículas, parte de la luz incidente es dispersada. Este fenómeno de dispersión puede ser analizado ya sea en términos de su intensidad promedio o en términos de las fluctuaciones de la luz dispersada con respecto al tiempo. En la dispersión dinámica de luz se analiza el segundo caso. Estas fluctuaciones en la intensidad de la luz son provocadas por el movimiento Browniano de las partículas. Si se miden dichas fluctuaciones es posible determinar el coeficiente de difusión traslacional y subsecuentemente el radio hidrodinámico de las moléculas o partículas, debido a que la velocidad a la que la intensidad de la señal fluctúa depende del tamaño de las partículas o moléculas. Las moléculas más grandes se mueven a velocidades menores con respecto a las moléculas más pequeñas, por lo tanto mientras más grande sea la molécula las fluctuaciones causadas por el movimiento Browniano serán menores. La señal de la luz dispersada es analizada utilizando un correlacionador. Un correlacionador es básicamente un comparador de señal y está diseñado para medir el grado de similitud de una señal en diferentes intervalos de tiempo. En tiempos suficientemente cortos, la señal resulta muy similar con respecto a sí misma en el estado inicial, debido a que las moléculas en solución no se han desplazado de manera importante, sin embargo en tiempos

mayores la traslación de las moléculas cambia de manera importante la intensidad de la luz medida y por lo tanto disminuye la correlación. Con estos datos se obtiene una función de correlación. Esta función de correlación contiene información valiosa sobre las partículas presentes en la solución (Friskén 2001, Koppel 1972). La **Ecuación 1** muestra la función de correlación, donde I es la intensidad de la luz dispersada, t es el tiempo inicial de la medición y τ es la diferencia de tiempo del correlador.

$$G(\tau) = \frac{I(t)I(t+\tau)}{I(t)^2} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Para una sola población de partículas, la función de correlación sigue un decaimiento exponencial **Ecuación 2**:

$$G(\tau) = 1 + \beta e^{-Dq^2\tau} \quad \text{Ecuación 2.}$$

En este caso, la rapidez del decaimiento está dada por Dq^2 , que incluye el coeficiente de difusión traslacional de las moléculas D y un parámetro de ajuste β . La relación de Stokes-Einstein (**Ecuación 3**), puede ser utilizada para entonces obtener el radio hidrodinámico.

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d_H} \quad \text{Ecuación 3.}$$

En donde k_B es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta y η es la viscosidad del líquido. Esta técnica ha sido utilizada de manera exitosa para medir la agregación de proteínas y otros polímeros (Gräslund 2008 et al. 2008, Nobbmann et al. 2007). Para el caso de muestras polidispersas es necesario considerar al decaimiento de la función de correlación como una sumatoria de funciones exponenciales (**Ecuación 4**).

$$G(\tau) = 1 + \beta \sum_{i=1}^n c_i e^{(-Dq^2\tau)}$$

Ecuación 4.

Para el análisis de datos en este caso, la **Ecuación 4** se aproxima como un polinomio utilizando una serie de Taylor resultando la **Ecuación 5**. La estrategia utilizada es llamada el “método de los acumulados”. En este caso el primer momento de la distribución exponencial está dado por el primer término de la expansión en la serie de Taylor, el segundo momento se obtiene del segundo término y así sucesivamente.

$$\ln[G(\tau) - 1] = \ln \beta - Dq^2(\tau) + \frac{\mu_2}{2!}(\tau^2) - \frac{\mu_3}{3!}(\tau^3)$$

Ecuación 5.

Al primer momento de la distribución (la media del radio hidrodinámico) obtenido de esta manera es llamado el promedio z o el “diámetro armónico promediado de la partícula” de acuerdo al ISO 22412. En resumen, el promedio z proporciona una medida de tendencia central basada en el ajuste de los datos suponiendo que la función de correlación puede ser modelada mediante una sumatoria de funciones exponenciales, donde cada una de estas funciones representa a una población de partículas.

Hipótesis

La purificación de VP7 fusionada con una cola de histidinas permitirá su eficiente purificación y el estudio del ensamblaje consigo misma y con otras moléculas.

Objetivos generales

- Diseñar una estrategia de purificación que permita obtener a la proteína VP7 de rotavirus en cantidad y pureza suficientes para caracterizar sus propiedades de ensamblaje.
- Estudiar la agregación y/o ensamblaje de VP7 en diferentes condiciones fisicoquímicas.

Objetivos específicos

1. Producir VP7 utilizando el sistema células de insecto/baculovirus.
2. Implementar una estrategia de purificación para VP7 (VP7 de secuencia nativa).
3. Construir un baculovirus recombinante para expresar VP7 fusionada con una cola de histidinas.
4. Desarrollar una estrategia para la purificación de VP7 con cola de histidinas.
5. Comparar las estrategias de purificación desarrolladas.
6. Comprobar la glicosilación de VP7 y determinar su perfil.
7. Caracterizar las estructuras de VP7 con cola de histidinas formadas en presencia de iones Ni(II) y Cu(II).

Materiales y métodos

Construcción de un baculovirus recombinante

Para construir el baculovirus recombinante conteniendo una cola de histidinas en el C-terminal de la proteína VP7, se utilizó el sistema completo Bac-to-Bac® TOPO® C-His. Este sistema incluye todos los elementos necesarios para generar baculovirus recombinantes. Adicionalmente permite la fusión con una cola de 6 histidinas en el carboxilo terminal de la proteína de interés. El procedimiento consta de dos procesos: a) Clonación del gen de interés en el plásmido pFastBac® TOPO®. b) Expresión del gen en el baculovirus. Para la etapa de clonación se requiere que el gen sea amplificado mediante PCR y es necesario remover el codón de paro si es que se quiere fusionar el gen de interés con la cola de histidinas.

Obtención del gen de VP7

El plásmido conteniendo el gen de VP7 fue donado por el laboratorio de la Dra. Susana López (IBT-UNAM). La construcción de dicho plásmido se encuentra en el vector pGEM 3Z, el sitio de clonación, en el contexto del vector se muestra a continuación en la **Figura 8**.

Producción del plásmido pGEM conteniendo VP7

Para obtener una cantidad suficiente del vector pGEM conteniendo VP7, se llevó a cabo su producción en una cepa de *E. coli* DH5 α . Para la electroporación de la cepa se utilizó un equipo Gene Pulser® II (Bio-Rad. USA). Se siguió el protocolo descrito en (Smith et al, 1990). Se purificó el plásmido con un kit para miniprep (Qiagen).

Verificación de la secuencia y la direccionalidad del gen de VP7 en el vector pGEM 3Z mediante el uso de enzimas de restricción

Para el análisis de restricción se seleccionaron tres enzimas distintas: Eco RV, Pst I y Bam HI. Este análisis se diseñó de tal manera que dos de las enzimas cortaran un solo sitio de la secuencia, pero fuera del gen de VP7 (BamHI y

PstI) y una enzima efectuara un solo corte y dentro de la secuencia de VP7 (EcoRV) (**Tabla 1**). Posteriormente se llevó a cabo la secuenciación del gen de VP7 mediante el uso de los primers pUC/M13 FWD y pUC/M13 REV. A la secuencia obtenida se le llevó cabo un BLAST contra la entrada EU636932.1 correspondiente a la proteína VP7 de la cepa RRV de rotavirus, depositada en el GeneBank.

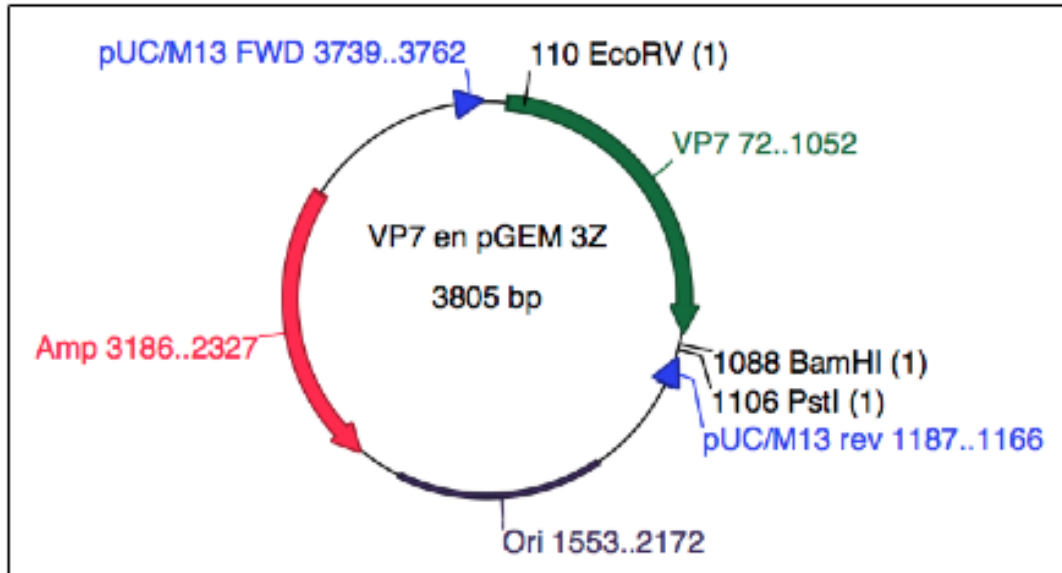


Figura 8. Plásmido pGEM 3Z. Se muestran los sitios de corte de las enzimas utilizadas en el análisis de restricción y los sitios de hibridación de los primers utilizados para la secuenciación.

Para la selección de las enzimas y la predicción de los sitios de corte así como de los tamaños esperados de los fragmentos se utilizó la aplicación NEBcutter V2.0 de New England Biolabs (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). El dibujo de los plásmidos se llevó a cabo utilizando la aplicación ApE (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>).

Enzimas	Sitios de corte	Tamaño esperado de los fragmentos (pb)
Eco RV	112	3,805
Pst I	1110	3,805
Bam HI	1088	3,805
Eco RV + Pst I	112 + 1110	2,695 + 998 + 112
Eco RV + Bam HI	111 + 1088	2,717 + 976 + 112

Tabla 1. Análisis de restricción de pGEM 3Z

Generación de un producto de PCR de VP7.

Para la generación de un producto de PCR se utilizaron los primers FWD: CGG TTA GCT CCT TTT AAT GTA TGG T y REV: TCT ATA GAA TGG AGG AGA GTT AAG T. La polimerasa utilizada fue la Phusion High-fidelity DNA polymerase (Finnzymes. Espoo, Finland) en la **Tabla 2** se muestran las concentraciones de reactivos usadas para el PCR y en la **Tabla 3** las condiciones del PCR.

Componente	Concentración
Buffer Phusion 5X	1X
dNTPs	Cada uno 200 μ M
Primers	Cada uno 0.5 μ M
Templado de DNA	20 pg/ μ L
Polimerasa Phusion	0.02 U/ μ L

Tabla 2. Concentraciones de reactivos usados en el PCR

Etapa	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (s)	No. De ciclos
Desnaturalización inicial	98	30	1
Desnaturalización	98	10	30
Hibridación	55	30	
Extensión	72	60	
Extensión final	72	600	1

Tabla 3. Parámetro usados en el PCR

Clonación del gen de interés

El vector pFastBacTM TOPO C-His está diseñado para la inserción de un producto de PCR con extremos romos de una manera altamente eficiente. No es necesario el uso de ligasas. Los únicos procesos que se recomiendan llevar a cabo después del PCR son el utilizar un gel de agarosa para cortar la banda de interés y posteriormente utilizar un kit para purificación de ADN. El vector TOPO linealizado se encuentra enlazado de forma covalente por cada extremo a la topoisomerasa I del virus *Vaccinia*. Dicha topoisomerasa se une al DNA de doble cadena en sitios específicos y rompe la cadena fosfodiéster después de 5'-CCCTT en una cadena. La energía del enlace roto se conserva mediante la formación de un enlace covalente entre el 3' fosfato de la cadena rota y un residuo tirosilo (Tyr-274) de la topoisomerasa I. El enlace fosfotirosilo (Enlace TOPO activado) entre el DNA y la enzima puede ser atacado posteriormente por el hidroxilo del producto de PCR. En la **Figura 9** se muestra la reacción entre el plásmido activado y el producto de PCR con el gen de interés. En la **Figura 10** se presenta la estructura de la construcción en el vector pFastBac.

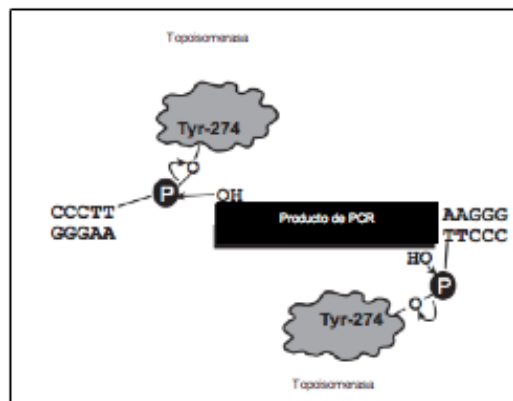


Figura 9. Mecanismo de acción de la Topoisomerasa I .

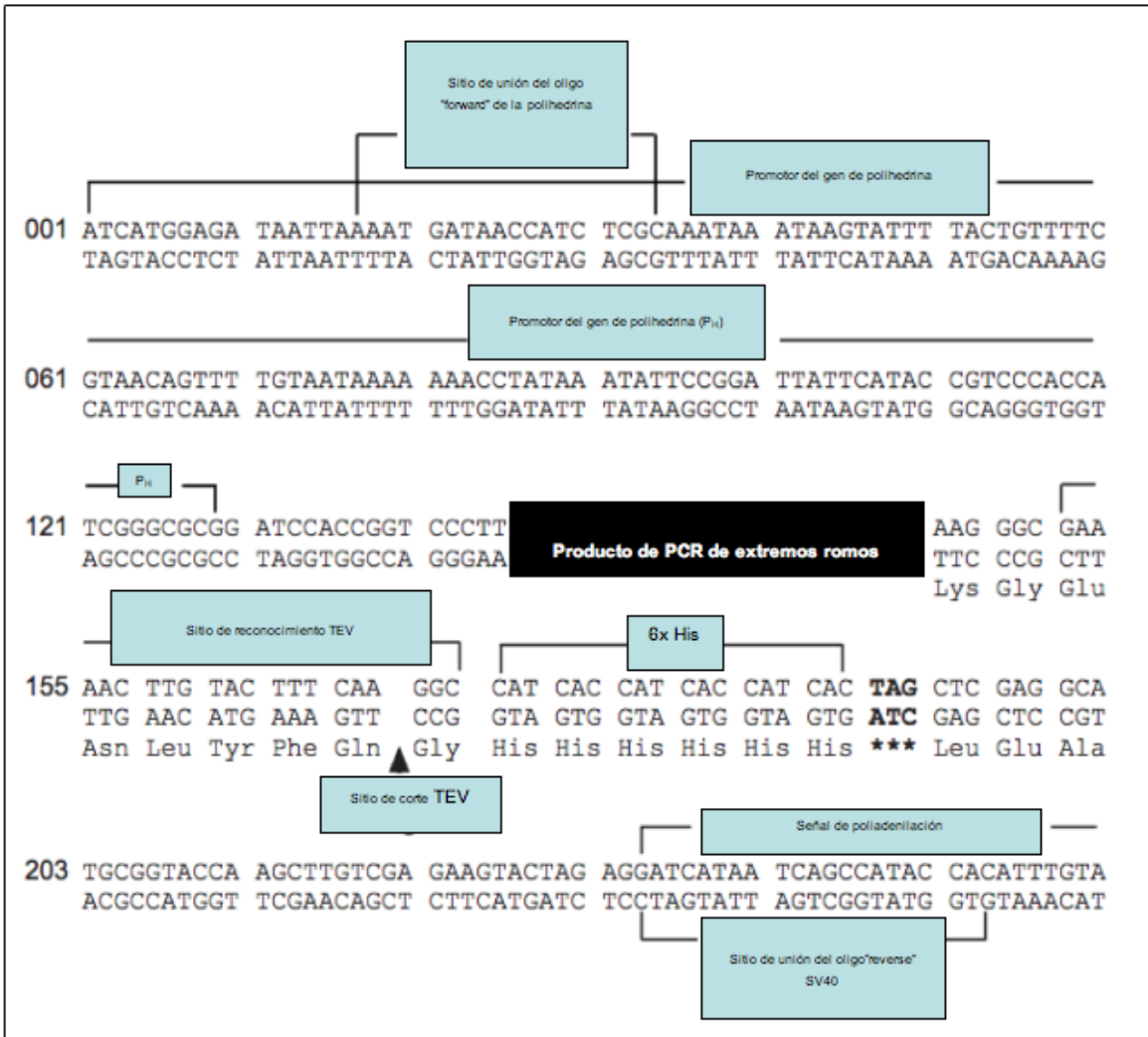


Figura 10. Construcción del vector pFastBac TOPO C-His

Ligación del fragmento de DNA amplificado con el vector pFastBac™ TOPO® C-His.

El producto de PCR obtenido en la etapa anterior se utilizó para llevar a cabo la reacción TOPO. Los reactivos y sus cantidades se muestran en la **Tabla 4**:

Reactivo	Volumen (μL)
Producto de PCR	4
Solución de Salina*	1
Vector pFastBac TM TOPO [®]	1
Volumen total	6

*1.2 M de NaCl, 0.06 M de MgCl₂

Tabla 4. Cantidades de reactivos utilizadas para la reacción de ligación.

La mezcla de estos reactivos se incubó por 30 minutos a 23°C, luego se enfrió a 0°C para detener la reacción.

Transformación de las células competentes One Shot[®] Mach1-T1[®]

El plásmido resultante del paso anterior se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*. Se agregaron 2 μL de la reacción de clonación TOPO[®] en un vial de células químico competentes de *E. coli*, se incubó por 30 minutos en hielo y luego se sometieron a choque térmico a 42°C, para después regresarlas al hielo. Posteriormente se agregaron 250 μL de medio SOC a temperatura ambiente. El vial se cerró y se colocó horizontalmente en una incubadora a 37 °C por una hora a 225 rpm.

Posteriormente se tomaron 25 y 100 μL de la transformación anterior y se sembraron en un plato de selección previamente calentado a 37 °C. El plato se invirtió y se incubó a 37 °C. Con la selección de ampicilina, las colonias fueron de visibles dentro de las siguientes 8 h. Se eligieron diez colonias para su análisis.

Análisis de las clonas positivas y purificación del plásmido

Se tomaron 10 colonias del plato de selección. Se cultivaron toda la noche en medio LB conteniendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina. Se aisló el plásmido utilizando el kit PureLinkTM (Roche). Después se analizó el plásmido por secuenciación.

Corroboración de la orientación del gen

La orientación del plásmido se corroboró mediante PCR utilizando un primer interno a la secuencia de VP7 y otro externo a VP7, presente en el vector. En este caso se utilizó el FWD VP7 CGG TTA GCT CCT TTT AAT GTA T y el REV SV40 polyA GGT ATG GCT TGA TTA TGA TC.

Clonación del gen de VP7 en el genoma del baculovirus (Construcción del baculovirus recombinante)

El sistema de expresión Bac-to-Bac® TOPO® provee un sistema rápido y efectivo para construir baculovirus recombinantes, ya que combina la tecnología TOPO de extremos romos con la eficiencia de la transposición sitio específica del sistema Bac-to-Bac. A continuación se muestra el diagrama general del sistema, **Figura 11**. Una de las ventajas principales de este sistema es que no requiere el uso de enzimas de restricción debido a que se procede a partir de un producto de PCR el cual es ligado utilizando una reacción química realizada al desplazar a la Topoisomerasa unida de manera covalente al vector. La reacción resulta bastante eficiente y fácil de realizar.

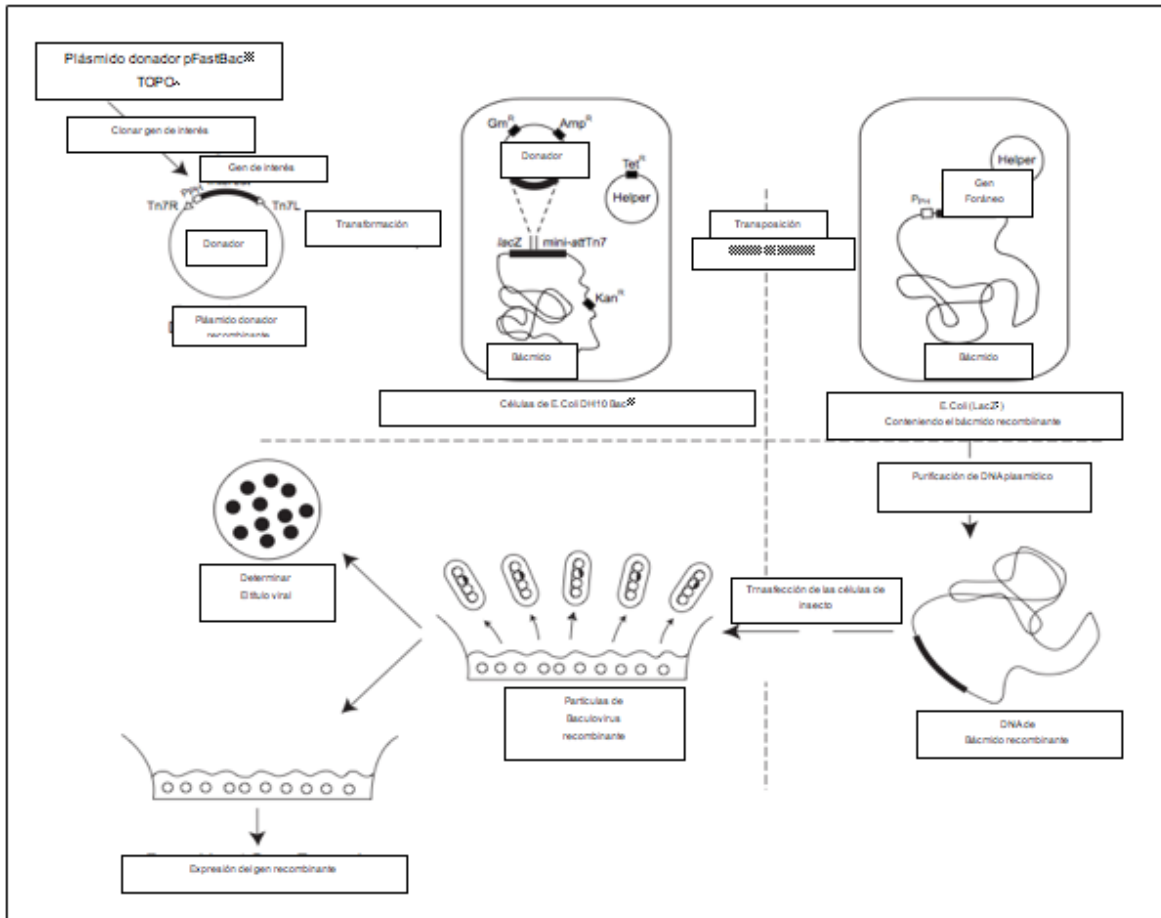


Figura 11. Sistema Bac-to-Bac.

Transformación de células competentes de E. coli DH10Bac®

Un vial de células de *E. coli* competentes DH10Bac™ se descongeló para cada transformación. Se transfirieron 100 μ L de las células competentes en un tubo de polipropileno de fondo redondo de 15 mL. Se agregaron 5 μ L de la construcción en el plásmido pFastBac™, 1 ng del plásmido control Gus y 50 pg del control pUC19. Las células se incubaron por 30 min en hielo, después se les llevó a 42 °C durante 45 s y se regresaron al hielo. Se agregaron 900 μ L de medio SOC. Se incubaron los tubos a 37 °C a agitando a 225 rpm por 4 h.

Posteriormente se prepararon diluciones seriales de un orden de magnitud con el medio SOC. Se colocaron 100 μ L de cada una de las diluciones en un plato de agar LB conteniendo 50 μ g/mL de kanamicina,

7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Bluo-gal y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IPTG. Se incubaron los paltos por 48 h a 37 °C. Se seleccionaron las colonias para análisis.

Verificación del fenotipo

Se eligieron diez colonias blancas y se colocaron en medio LB fresco conteniendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Bluo-gal y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IPTG. Se incubaron a 37 °C toda la noche. De una sola colonia confirmada de tener el fenotipo blanco se inoculó medio de cultivo líquido conteniendo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina. Se utilizó el kit PureLink™ para purificar el plásmido. Se analizó el bécrido recombinante para verificar que la transposición fue exitosa por medio de PCR.

Transfección de células de insecto

En una placa de seis pozos se sembraron células Sf9 en crecimiento exponencial con una viabilidad mayor al 95 %. Estas células se crecieron previamente en medio TnM-FH con suero fetal bovino al 10 %. Se incubaron 1 h para permitir la adhesión de las células a la superficie del fondo del pozo.

Aparte, en un tubo de 1.5 mL se mezclaron 100 μL de bécrido recombinante con 1 mL de medio Grace para células de insecto (Gibco) sin suero y 20 μL de Cellfectina® (Invitrogen, USA). Esta mezcla se dejó incubando 45 min a temperatura ambiente.

Se removió el medio de las células Sf9 sin alterar la monocapa y se lavaron con 2 mL de medio Graces sin suero. Nuevamente se removió el medio agregado y se añadió la mezcla de transfección antes preparada distribuyendo uniformemente por toda la monocapa sin levantarla. Las placas se incubaron a 27 °C por 4 horas. Luego se añadió 1 mL de medio TnM-FH con 10 % de suero y se incubaron a 27

°C por 4 días. Posteriormente se cosechó el sobrenadante de las transfecciones, este se designó como el abasto viral pase 0.

Expresión de proteínas recombinantes

Para verificar la expresión VP7 se llevó a cabo un western-blot con anticuerpo policlonal anti TLP's y otro western blot con un anticuerpo monoclonal anti GP64

Líneas celulares y técnicas de cultivo

Se trabajó con la línea celular High Five™ (BTI-TN-5B1-4) de Invitrogen que es una mutante de las células de ovario del lepidóptero *Trichoplusia ni* y con la línea Sf9 de ovario de pupa de *Spodoptera Frugiperda*. El cultivo se llevó a cabo en un régimen de lote en matraces de 500 mL o 1L, agitados a 110 RPM y con control de temperatura a 27 °C. Células con viabilidad superior a 95 % y en fase exponencial de crecimiento, se sembraron a una concentración celular de 1×10^6 cel/mL y fueron infectadas en ese mismo instante. Se trabajó con células con un pase menor a 60 para evitar efectos de mutación entre los pases (O'Reilly et al., 1994). Para la producción y título del abasto viral se utilizó la línea celular Sf9.

Producción de la proteína recombinante

La proteína se produjo mediante el sistema células de insecto-baculovirus. Las células utilizadas fueron las BTI-Tn-5B1-4 (H5) (Rhiel 1999) y las Sf9. Se cultivaron las células en medios SF-900 II o ExCell 405 a una densidad celular inicial de 1×10^6 cel/mL y un volumen de medio de cultivo de 200 mL. La infección se efectuó a una multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 ufp/mL o de 0.2 ufp/mL (Wong et al., 2000). Se utilizó una MOI de 0.2 para la producción de VP7 fusionada con cola de histidinas ya que se probó que esta condición favorece una concentración mayor de VP7 (datos no mostrados). Posteriormente se incubó el cultivo en un matraz previamente esterilizado de 1L, se cosechó a una viabilidad celular del 10%, 50% u 80%. Al momento de cosechar, el cultivo se centrifugó a 3000 g por 10 min. Posteriormente se separó el pellet del sobrenadante. Al sobrenadante se le agregó azida de sodio para limitar el crecimiento bacteriano.

Ensayo en placa para el aislamiento de placas virales

Se sembraron células Sf9 con viabilidad mayor al 95 % en cajas de 6 pozos a una densidad de 1.5×10^6 células/pozo en un volumen de 3 mL de medio Grace sin suero fetal bovino (SFB). Las cajas se incubaron 1 h en reposo para que las células se adhirieran. Se prepararon diluciones seriales (10^{-1} - 10^{-6}) de los abastos virales en medio Graces con 10 % de SFB. Posteriormente se retiró el medio y se agregaron 0.75 mL de las diluciones virales. Las cajas infectadas se incubaron a temperatura ambiente por un tiempo de 3-4 h. Al final del periodo de incubación se removió el inóculo de cada pozo utilizando una pipeta (sobrenadante), cuidando no remover las células adheridas a la superficie de la caja y se añadió una capa de 3 mL de agarosa de bajo punto de fusión (1 vol de agarosa de bajo punto de fusión al 3% + 0.8 mL de medio Grace 2X + 0.2 vol de SFB) a una temperatura de 37 °C. Las cajas se incubaron a 27 °C en ambiente húmedo por 4 días. Al concluir el periodo de incubación se añadieron 2 mL por pozo de una segunda capa de agarosa (1 vol de agarosa al 1.2% + 0.8 vol de medio Grace 2X + 0.2 vol de SFB + 0.02 vol de rojo neutro al 1%). Se incubó durante 4 h a 27 °C en ambiente húmedo para posteriormente identificar las placas virales por la formación de halos líticos incoloros en la capa de agarosa. La formación de dichos halos está relacionada con la presencia de células muertas (por el efecto de la infección con baculovirus) que no retienen el colorante rojo neutro. Las placas se colectaron picando el agar con una pipeta, y se resuspendieron en 1 mL de medio Grace 1X con 0.5% de SFB.

Se incubaron cajas de 6 pozos con células Sf9 en medio SF-900 II (1×10^6 células/mL) a 27 °C por 1 h. Se eliminó el medio de cultivo, los pozos se infectaron con 0.5 mL de las placas seleccionadas y se incubó 1 h en agitación. Se añadieron 1.5 mL de medio SF-900 II por pozo y se dejaron incubando a 27 °C. A las 96 horas posteriores a la infección (hpi) se centrifugaron las cajas a 2000 g por 10 min. El sobrenadante se almacenó a 4 °C para posteriormente generar nuevos abastos virales.

Para evaluar la expresión de VP7 las células se lavaron con PBS, posteriormente se resuspendieron en 20 μ L de agua, se tomó una alícuota de 5 μ L que se

añadieron a 10 μL de agua y 5 μL de solución amortiguadora de lisis. Las muestras se hirvieron, y se cargó el mismo volumen de muestra en geles desnaturalizantes de poliacrilamida que se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar ensayos de western-blot.

Para producir abastos virales a partir de las placas aisladas, se infectaron 30 mL de células Sf9 en medio SF-900 II a una concentración de 0.75×10^6 células/mL con 100 μL del sobrenadante recuperado de la infección de células Sf9 con la placa viral identificada como la mejor productora de proteína recombinante. El sobrenadante se colectó por centrifugación a las 96 hpi y se almacenó a 4 °C con 0.5% de SFB (suero fetal bovino). Este nuevo abasto viral se denominó abasto pase 1.

Purificación de VP7

Protocolo de optimización del paso de intercambio iónico.

Se probaron 5 pH distintos (4.3, 4.8, 5.2, 5.5 y 6) y dos resinas diferentes para seleccionar la resina que lograra la mayor pureza y el pH mínimo que asegurara la retención de VP7. A cada una de las 4 muestras se les intercambió una solución amortiguadora por medio de diálisis. Para las pruebas de adsorción se utilizaron tubos de 2 mL. Se prepararon 4 tubos con 200 μL de la resina Eshmuno Q (Merck, Alemania) y con la resina Fractogel EMD TMAE (Merck, Alemania). Las resinas se equilibraron con las distintas soluciones amortiguadoras. Se colocaron 200 μL de cada solución amortiguadora en su respectivo par de tubos, se agitó por espacio de 5 min, se centrifugó 1 min a 5,000 g, posteriormente se retiró el sobrenadante con una pipeta. Esta operación se repitió para cada tubo.

Posteriormente se tomaron dos alícuotas de 200 μL de cada una de las cuatro muestras. Se agitaron los tubos 10 minutos, se centrifugaron y se separó el sobrenadante. Posteriormente se colocó un volumen de 100 μL de NaCl 2 M a cada uno de los tubos, para eluir las proteínas. Al eluido de cada uno de los tubos se les llevó a cabo un Western-blot para determinar el pH al cuál se lleva a cabo una adecuada retención de VP7. Adicionalmente se comparó mediante Western-blot la recuperación del eluido, con respecto a la carga de muestra.

La purificación de VP7 se llevó a cabo por medio de combinaciones de técnicas cromatográficas. Las técnicas utilizadas en esta estrategia fueron: afinidad, intercambio iónico, exclusión por tamaño y fase reversa. El tren de purificación utilizado es el que se describe a continuación:

Concanavalina.

El primer paso en la purificación de VP7 fue el uso de la resina Concanavalina A (ConA). La concanavalina es una lectina que tiene afinidad por las glicoproteínas, en especial por las que son altas en manosa. Se empacaron aproximadamente 7 mL de la resina Concanavalina A-sepharose 4B (Sigma, USA) en una columna de vidrio de 1 cm (DI) x 10 cm (Largo) (Biorad, USA). Se probaron diferentes protocolos, en el que se obtuvieron los mejores resultados se describe a continuación:

- Regeneración de la columna. Se llevaron a cabo lavados alternados básico/ácido de la columna. Buffer de lavado básico 0.1 M de Tris pH 8.5 con 0.5 M de NaCl. Buffer de lavado ácido 0.1 M de acetato de sodio pH 4.5 con 1 M de NaCl. Se llevaron a cabo 7 ciclos de lavado cada uno de ellos de 7 volúmenes de columna de cada una de las soluciones.
- Prelavado de la columna. La solución de prelavado de la columna utilizada fue 1 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM MnCl₂, y 5 mM CaCl₂. Se lavó la columna con 5 volúmenes de columna.
- Equilibrado de la columna. Para este proceso se utilizaron 5 volúmenes de columna de un buffer 20 mM de Tris pH 7.4, con 5 mM de CaCl₂.
- Elución. Este paso se llevó a cabo con una solución de la misma composición que la solución de equilibrio de la columna, pero adicionalmente conteniendo 0.8 M de metil- α -D-manopiranosido (Sigma).
- Recolección de fracciones. Se recolectaron todas las fracciones de la purificación.
- Western-blot. Se llevó a cabo un western-blot de todas las fracciones recolectadas para determinar en qué punto se recuperó VP7.

Cromatografía de exclusión de tamaño.

Se utilizaron 200 mL de la resina Superdex 200 empacados en una columna de 1.5 cm de diámetro. El flujo utilizado fue de 2.5 mL/min. La fase móvil usada fue un buffer de histidina 20 mM pH 6.0 1mM de CaCl₂. El objetivo de este paso de purificación es doble, en primer lugar, intercambiar el buffer para acondicionar la muestra a una baja conductividad y un pH adecuado para el siguiente paso que es el de intercambio iónico, en segundo lugar es el de mejorar la pureza de la muestra.

Intercambio aniónico fuerte.

Este paso del tren de purificación se llevó a cabo en 10 mL de la resina Eshmuno Q (Merck, Alemania) o en la resina Fractogel (Merck, Alemania) a un flujo de 9 mL/min, con un buffer de equilibrio de histidina 20 mM pH 6.0, 1 mM de CaCl₂. El buffer de elución utilizado fue 2 M de NaCl.

Cromatografía de afinidad por metal inmovilizado.

Para este paso de purificación se utilizaron 5 mL de la resina Ni-NTA (Qiagen) empacada en una columna. Buffer de carga: 50 mM de Tris pH 8, 700 mM de NaCl y 5 mM de imidazol. Buffer de lavado: 50 mM de Tris p, 700 mM de NaCl y 50 mM de imidazol. Buffer de elución: 50 mM de Tris pH 8, 700 mM de NaCl y 500 mM de imidazol, pH 8.0. Se cargó la muestra disuelta en buffer de carga, se lleva a cabo un lavado con 5 volúmenes de columna con el buffer de lavado y finalmente se eluyó con el buffer de elución. Para la limpieza de la columna, su regeneración, y almacenamiento se siguió el manual del proveedor.

Precipitación ácida.

El cultivo se centrifugó durante 5 minutos a 5000 g para remover las células. Posteriormente se colocó el sobrenadante en un equipo de ultracentrifugación Amicon® (Millipore, USA) para intercambiar el buffer. El buffer de intercambio fue 50 mM de acetatos pH 4.5, 1 mM de CaCl₂. Se llevó a cabo el proceso de intercambio de buffer 2.5X en tres pasos. El pH final del sobrenadante fue alrededor de 5. Después se centrifugó la mezcla del proceso anterior 10 min a

10,000 g. Al término de la etapa de centrifugación se separó el sobrenadante de la pastilla sedimentada por decantación.

Precipitación básica.

Previa centrifugación del cultivo con las mismas condiciones del paso de precipitación ácida se procedió a agregar al sobrenadante una solución de CaCl₂ 1M, hasta llegar a una concentración de 10 mM. En seguida se le agregó una solución de tris 1M hasta llegar a una concentración de 20 mM. El pH final fue alrededor de 8. Se centrifugó la mezcla del paso anterior 10 min a 10, 000 g.

Reporte de los resultados mediante tablas de resumen de la purificación.

A continuación se definen los parámetros medidos y calculados en las tablas:

Proteína total (μg): Proteína cuantificada por el método de Bradford, referida a 1 L de sobrenadante inicial.

Fracción VP7: Cantidad de VP7 en la muestra en relación al total de las proteínas, determinada por densitometría en geles de poliacrilamida (**Ecuación 6**).

$$xVP7 = \frac{vVP7}{vTotal}$$

Ecuación 6.

En donde xVP7 es la fracción de VP7, vVP7 es la respuesta correspondiente a la banda de VP7 en el gel de poliacrilamida utilizando densitometría y vTotal es la respuesta correspondiente a todas las bandas.

VP7 (μg): Cantidad presente de VP7 **Ecuación 7.**

$$VP7 = xVP7(Ptot)$$

Ecuación 7

Recuperado (%): Porcentaje obtenido de VP7 en cada paso de recuperación en relación al paso anterior. Al inicio de la purificación la recuperación se considera del 100 % (En el sobrenadante sin tratar o en la carga aplicada a la columna según el caso) **Ecuación 8.**

$$R = 100 \frac{VP7_2 - VP7_1}{VP7_1}$$

Ecuación 8.

En donde R es el porcentaje recuperado de VP7.

Recuperación global (%): La recuperación global se refiere a la cantidad de VP7 presente en el paso “n” de purificación con respecto a la cantidad presente inicialmente **Ecuación 9.**

$$Rg = 100 \prod_{i=1}^n \frac{R_i}{100}$$

Ecuación 9.

Donde Rg es la recuperación global de VP7.

Factor de purificación: Es una medida relativa de la pureza en el paso “n” con respecto a la pureza al inicio del proceso, es decir ya sea en el sobrenadante sin tratar o en la carga de la columna cromatográfica.

$$Fp = \frac{xVP7_n}{xVP7_1}$$

Ecuación 10.

Donde Fp es el factor de purificación .

Estrategia de purificación

A continuación se muestra la estrategia experimental utilizada de manera inicial para purificar VP7, (**Figura 12**):

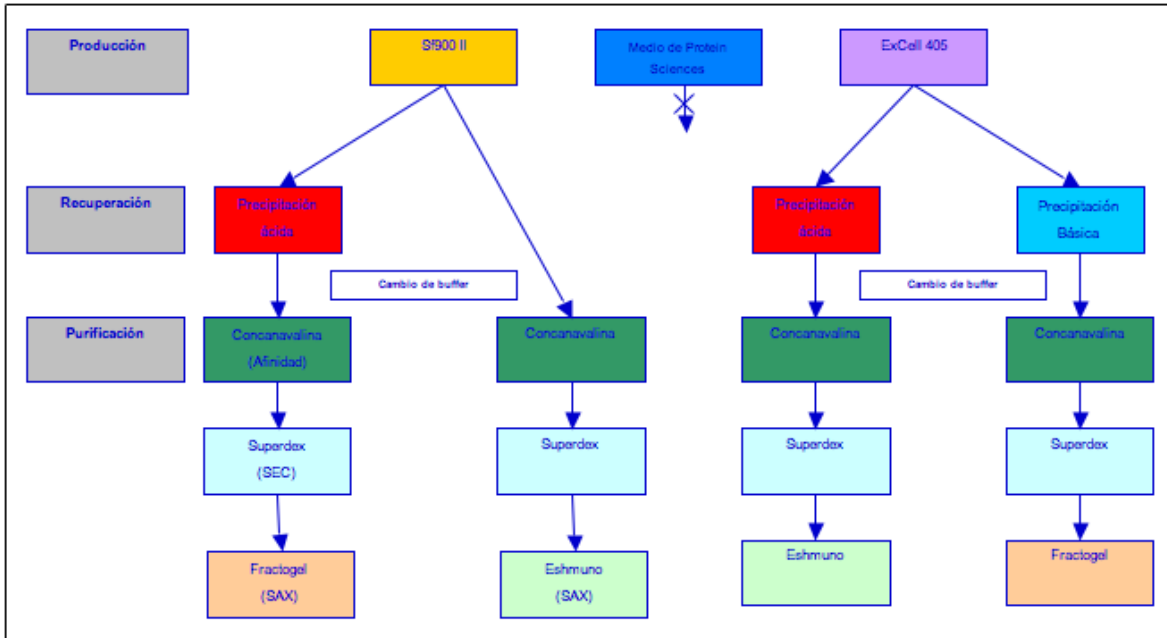


Figura 12. Diseño experimental para mejorar la pureza de VP7.

Posteriormente se utilizó la purificación mediante afinidad por metal inmovilizado.

Métodos analíticos

Concentración y viabilidad celular.

Se determinó mediante un hemacitómetro en un microscopio óptico. Se utilizó tinción con azul de tripano (Sigma T8154).

*Determinación del perfil de glicosilación mediante PNG-asa F, marcaje con 2AB y HPLC**

Los procedimientos se basan en las metodologías descritas por (Guile et al 1997, Palomares et al. 2003 y Serrato et al. 2004).

1. Se procesaron 100 μg de VP7. Se concentró la proteína a 32.5 μL en el evaporador SAVANT.
2. Para asegurar una completa desglicosilación de la proteína, se agregaron 2.5 μL de una solución de 2 % de SDS y 1M de β -mercaptoetanol y se hirvió a 99 $^{\circ}\text{C}$. Esto asegura la desnaturalización de la proteína.

3. Se llevó a cabo la desglicosilación enzimática de la proteína mediante digestión con PNGasa-F (N-Glicosidasa-F). La PNGasa-F libera todos los tipos de N-oligosacáridos, excepto los que contienen fucosa mediante un enlace $\alpha(1-3)$ con la primera N-acetilglucosamina (GlcNAc) del núcleo de la quitobiosa. Se agregaron 5 μL de IGEPAL 630 al 7 %. Se mezcló con pequeños golpes. Luego se agregó buffer 10X para PNGasa-F (250 mM de fosfato de sodio pH 7.5), 4 μL de agua y 1 μL de PNGasa-F (1 U/ μL , Calbiochem 362185). Se incubó por 16 horas a 37 °C.
4. Con la finalidad de tener un control interno de concentración conocida de glicanos en la muestra, se adicionaron 100 pmol de maltosa. Se agregaron 10 μL de una solución de maltosa 10 μM .
5. Se procedió a eliminar la proteína de los glicanos liberados mediante ultrafiltración utilizando cartuchos para centrífuga con una membrana de corte de 10 kDa Spin-X (Corning). En este caso la proteína VP7 no atraviesa la membrana y los glicanos si lo hacen.
6. Una vez que se tuvieron los glicanos libres de proteína, se llevaron a sequedad en un concentrados Savant.
7. Se procedió a derivatizar los glicanos mediante el compuesto fluorescente 2-aminobenzamida (2AB). Se agregaron 5 μL de 2AB. Se resuspendieron los glicanos con la punta de la pipeta y se centrifugó 1 minuto a 10,000 g. Posteriormente se incubó por dos horas a 65 °C. Se congeló a -20 °C por media hora.
8. Se lavó el exceso de colorante colocando los glicanos marcados en una membrana de papel filtro, lavando primero con acetonitrilo. Muchos contaminantes incluyendo el exceso de 2AB son disueltos por el acetonitrilo. Posteriormente se lava con agua para recuperar los glicanos a través del filtro.
9. Para analizar los glicanos marcados se utilizó la cromatografía líquida de alto rendimiento (CLAR) utilizando un detector de fluorescencia 2475 (Waters, Milford. MA. USA), una bomba 626 (Waters, Milford. MA. USA) y un inyector 717 (Waters, Milford. MA. USA). El modo de separación utilizado fue la cromatografía de interacción hidrofílica (CIH), con una columna Aminex. Como

fase móvil se utilizó formato de amonio 100 mM pH 4.4 (Fase A) y acetonitrilo (Fase B) en gradiente lineal desde unas condiciones iniciales de 25 % de A y 75 % de B hasta.

10. Para la caracterización estructural de los glicanos, cada uno de los picos obtenidos se identificaron de acuerdo su migración en unidades de glucosa (UG) de acuerdo a la comparación de sus tiempos de retención con los del homopolímero estándar de dextrana (escalera de glucosa-2AB).
11. Finalmente se propusieron estructuras para cada uno de los picos utilizando bases de datos de estructuras publicadas bajo las mismas condiciones cromatográficas (Glycibase, Guile et al. 1997, Palomares et al. 2003). Se debe de tener en cuenta que se trata de estructuras propuestas y además varias estructuras pueden co-migrar y estar presentes en el mismo pico. Para identificar plenamente cada estructura se puede coleccionar cada pico y tratarlo independientemente con una batería de exoglicosidasas en conjunto con un análisis de espectrometría de masas.

Determinación del perfil de glicosilación utilizando PNGasa-A.

1. Se procesaron 100 μ g de VP7. Se concentró la proteína a 32.5 μ L en el evaporador SAVANT.
2. Se agregaron 2.5 μ L de una solución de 2 % de SDS y 1M de β -mercaptoetanol y se hirvió a 99 °C. Posteriormente se agregaron 5 μ L de IGEPAL 630 al 7 % para neutralizar el efecto del SDS.
3. Se llevó a cabo el corte proteolítico de VP7 utilizando tripsina TPCK (Sigma, USA). Utilizando como buffer 50 mM Tris pH 8, 700 mM NaCl y 2 mM de CaCl_2 . Se utilizó una relación en peso 1:20 tripsina/VP7 y la reacción se llevó a cabo 24 hrs. a 37 °C.
4. Se llevó a cabo la desglicosilación enzimática de la proteína mediante digestión con PNGasa-A de almendra (N-Glicosidasa-A) (Millipore, USA). La PNGasa-A corta los enlaces de las cadenas de polipéptidos, incluyendo aquellos con un núcleo de α 1,3-fucosa. Esta enzima hidroliza el enlace entre la GlcNAc y la Asparagina.

5. El resto del procedimiento fue idéntico al utilizado para el tratamiento con PNGasa-F.

Digestión de glicanos con α -manosidasa.

Esta enzima posee una amplia especificidad, favoreciendo la hidrólisis de residuos de manosa unidos por enlaces α 1-2, 3 y 6 en oligosacáridos y proteínas. El producto final después de remover todas las manosas es el trisacárido Man β (1-4)-GlcNAc β (1-4)-GlcNAc.

1. Se procesaron 20 μ g de VP7 (equivalentes a 0.6 nmol).
2. Se completó al volumen con agua grado HPLC (tipo 1).
3. Se agregaron 4 μ L del buffer de reacción 5X pH 5.0.
4. Se agregó 1 μ L (0.015 U) de α (1-2,3,6) manosidasa (Prozyme, USA).
5. Se incubó durante media hora a 37 °C.
6. Se mezclaron 10 μ L de la mezcla de reacción con 40 μ L de acetonitrilo y se inyectó todo el volúmenes el cromatógrafo de líquidos para su análisis.

Determinación del título viral.

El título viral se evaluó mediante la técnica desarrollada por Mena y et al, 2007. Dicha técnica se basa en la ruptura del anillo tetrazolio del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio debido a una deshidrogenasa mitocondrial solo activa en células viables. El producto resultante es la sal insoluble de formasan. Este mecanismo permite la cuantificación de células viables mediante el uso de un espectrofotómetro. Se utiliza una calibración sigmoidea para la correlación entre células viables y absorbancia.

Monitoreo cualitativo de los pasos de purificación.

Se llevó a cabo mediante un gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y Western-blotting. La separación de las proteínas mediante geles desnaturizantes de poliacrilamida se realizó con un gel concentrador al 4 % y un

gel separador al 10 o 12 %. Las muestras se trataron como sigue: Se tomaron 15 μ L de muestra y se agregaron 5 μ L de solución amortiguadora de desnaturalización (200 mM tris-HCl pH 6.8, 8 % SDS, 0.4 % azul de bromofenol, 40 % glicerol y 1 % de β -mercaptoetanol). Las muestras fueron hervidas por 5 min y colocadas en el gel. Se corrieron a un voltaje constante de 120 V. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C Extra. Amersham) durante 1 h utilizando el sistema semi-húmedo. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon 1 h con una solución al 5 % de leche descremada (Carnation Nestle, USA) en una solución amortiguadora de tris con Tween (TBST). La proteína recombinante VP7 se identificó a partir de inmunodetección en membrana de nitrocelulosa (“Western blot”).

Detección de VP7:

La membrana se incubó 1 h con anticuerpos de conejo policlonales anti triple capa, a una dilución 1:1000 en TBST. Después de 3 lavados de 10 min con TBST, la membrana se incubó 1h con un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Jackson immunochemicals, USA).

Detección de glicanos en VP7:

Se utilizó el kit para detección de glicanos mediante digoxigenina (Roche, USA). Se siguieron las instrucciones del proveedor (DIG Glycan Detection Kit).

Detección de GP64:

La membrana se incubó 1 h con anticuerpo monoclonal anti GP64, utilizando una dilución 1:10,000 en TBST. Después de 3 lavados de 10 min con TBST, la membrana se incubó 1h con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson immunochemicals, USA).

Detección de VP7 fusionada con cola de histidinas:

La membrana se incubó entre 10 y 12 h con un anticuerpo monoclonal anti

cola de histidinas, utilizando una dilución 1:2,000 en TBST. Después de 3 lavados de 10 min con TBST, la membrana se incubó 4 h con un anticuerpo anti IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Jackson immunochemicals, USA).

En todos los casos:

Después de lavar la membrana 3 veces por 10 min, se reveló ya sea con TMB (Invitrogen, USA), Luminol (Perkin-Elmer, USA) o mediante alcalino fosfatasa/4-Nitro azul cloruro de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato. Las imágenes se adquirieron en un fotodocumentador “Chemidoc” (Bio-rad, USA).

Purificación de plásmido.

La purificación de los plásmidos se llevó a cabo por medio del kit de purificación QIAprep® y siguiendo las instrucciones del proveedor (Qiagen). El procedimiento se basa en la extracción alcalina de DNA plasmídico. A un pH entre 12.0 y 12.5 el DNA lineal se desnaturaliza, sin embargo los plásmidos circulares permanecen en su estructura nativa. Este principio se utiliza para llevar a cabo la purificación de DNA plasmídico. Las células que contienen los plásmidos son tratadas con lisozima para debilitar la pared celular, posteriormente son lisadas completamente mediante el uso de dodecilsulfato de sodio (DSS) y NaOH. Cuando se lleva a cabo la neutralización, el DNA cromosomal precipita, permitiendo la separación del DNA plasmídico por centrifugación. Las proteínas y el RNA también precipitan debido a que fueron tratadas con DSS previamente (Birnboim and Doly 1979).

Cuantificación y pureza del DNA.

La cuantificación y la evaluación de la pureza del DNA se llevaron a cabo en un equipo Nanodrop (Termo corp.) La cuantificación se llevó a cabo a 260 nm. La pureza se evaluó mediante las relaciones entre las longitudes de onda 260/280 y 260/230. Para asegurar una pureza adecuada, la relación 260/280 se mantuvo en todos los casos entre 1.8 y 2.0 y la relación 260/230 entre 2.0 y 2.2. Cuando El DNA se encuentra entre estos valores se considera como “DNA puro”. Valores

menores en la relación 260/280 indicarían la presencia de contaminantes como proteínas o fenol. Si la relación 260/230 baja de estos valores ideales, los contaminantes podrían ser carbohidratos o isopropanol (Mathieson y Thomas, 2013).

Dispersión dinámica de luz.

Se llevó a cabo la caracterización de estructuras mediante esta técnica. (Erickson 2009). Se utilizó un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK). Como dispersante se utilizó una solución amortiguadora 30 mM Tris pH 8. 150 mM NaCl, y 2 mM de CaCl_2 . Se utilizó una celda de bajo volumen (50 μL). Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado. El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software DTS (Malvern, UK). Como medida de tendencia central para el análisis de datos se utilizó el promedio z. El promedio z es la media armónica de la distribución de intensidades.

Microscopía electrónica (Tinción negativa).

La proteína en solución fue transferida a rejillas de cobre de malla 200 (Electron Microscopy Sciences, USA) durante 3 min. Se llevó a cabo un lavado con TBS durante 5 segundos. La tinción negativa de VP7 se llevó a cabo utilizando uranilo al 5% durante 3 min y posteriormente se lavó con agua durante 5 s. Para la microscopía de transmisión se utilizó un microscopio Zeiss EM 900 (Zeiss, Alemania). Para la microscopía electrónica de transmisión de barrido se utilizó un equipo HITACHI S-5500 In-Lens FE-SEM (Hitachi, Singapur).

Inmuno nano-oro para microscopía electrónica

Para llevar a cabo la inmuno-tinción se utilizó un anticuerpo anti TLP's de rotavirus como primario y un anticuerpo secundario conjugado con oro. Ambos anticuerpos se utilizaron a una dilución 1:50. La proteína en solución fue transferida a rejillas de cobre de malla 200 durante 3 min. Se llevó a cabo un lavado con TBS durante 5 s. Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario durante una hora. Se llevaron a cabo 3 lavados con PBS por 5 s cada uno. Se incubó por una hora con el anticuerpo secundario. Se llevaron a cabo 3 lavados con PBS por 5 s cada uno.

A continuación se siguió el protocolo para la tinción negativa, exceptuando el paso de la fijación de la proteína.

Geles de poliacrilamida para electroforesis con dodecil sulfato de sodio.

Se utilizaron geles al 10 % y al 12 % de poliacrilamida. De acuerdo al protocolo descrito en (Rosenberg, 2005).

Tinción con plata de geles de poliacrilamida.

Materiales:

- Solución de fijación: Para un litro; 500 mL de metanol, 120 mL de ácido acético y 380 mL de agua.
- Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$): 0.2 g/L.
- Nitrato de plata (AgNO_3): 2 g/L, 0.75 mL/L de formaldehído al 37 %.
- Solución de revelado: Na_2CO_3 , 60 g/L, 0.5 mL/L de formaldehído al 37 %, 4 mg/L, 4 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
- Soluciones de etanol: 50 % y 30 %.

Procedimiento:

1. Cuando la electroforesis se completó, se removió el gel del molde.
2. Se sumergió el gel en 50 mL de la solución de fijación y se agregaron 100 μL de la solución al 37 % de formaldehído. Para mejorar el ruido de fondo en la parte baja del gel se puede dejar toda la noche en esta solución.
3. Se lavó el gel 2 veces con 25 mL de la solución de etanol al 50 % durante 20 min cada lavado y se llevó a cabo un lavado final de 20 min con la solución de etanol al 30 %.
4. Se sumergió el gel en la solución de tiosulfato de sodio por 1 min exacto.
5. Se lavó el gel 4 veces con agua por 20 s cada lavado. Para remover el exceso de tiosulfato.
6. Se sumergió el gel durante 30 min en la solución de nitrato de plata.
7. Se lavó el gel 4 veces con agua por 20 s cada lavado.
8. Se visualizaron las bandas sumergiendo el gel en la solución de revelado. El tiempo necesario para que las bandas sean visibles depende de la cantidad de proteína presente, así como de su naturaleza.

Protocolo modificado de (Rosenberg, 2005).

Resultados

Generación de abastos virales.

Se llevó cabo la producción de un abasto viral, para utilizarlo en la producción de nueva proteína recombinante. Se incluye el Western-blot que se realizó (**Figura 13**) para identificar la mejor placa viral para producción de proteína recombinante. La purificación por medio de la formación de placas virales permite obtener abastos virales puros, es decir que provienen de un solo virus. Adicionalmente, al evaluar la producción relativa de la proteína de interés por cada una de las clonas virales, es posible seleccionar el mejor fenotipo viral para sintetizar la proteína recombinante (Lee y Miller 1978). En este caso la placa 7 (Carril 10) en la **Figura 13** fue la mejor productora de VP7, ya que el Western-blot de esta muestra presenta la mayor intensidad de señal debida a VP7. Esto significa que la concentración de proteína en esta muestra es mayor con relación a las otras muestras producidas (carriles 4 al 9 **Figura 13**) Por lo tanto, esta placa fue utilizada para producir un abasto viral. Finalmente se llevó a cabo la titulación del abasto viral obteniendo un título de 3×10^7 ufp/mL (unidades formadoras de placa por mililitro). Esto asegura un abasto con un título suficientemente alto para llevar a cabo la producción de alrededor de 15 infecciones si se considera 1 L de medio de cultivo, una multiplicidad de infección de 0.1 y una concentración celular de 1×10^6 células/mL.

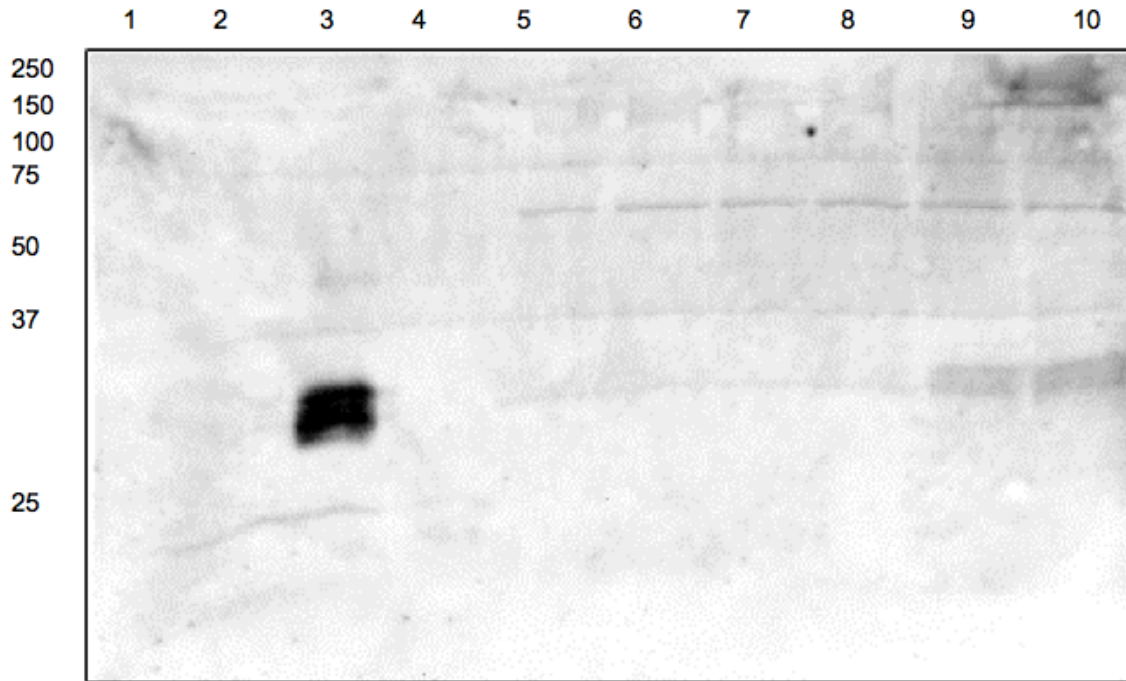


Figura 13. Western-blot de placas virales.

Carriles: 1.- Marcador de peso molecular 2.- Control negativo. 3.- Control positivo. 4.- Placa 1. 5.- Placa 2. 6.- Placa 3. 7.- Placa 4. 8.- Placa 5. 9.- Placa 6. 10.-Placa 7. Peso molecular en kDa. Como control negativo se utilizó el sobrenadante de cultivo de la proteína BacRep producido en células de insecto. Como control positivo se utilizó VP7 producida en un lote anterior y previamente caracterizada.

Producción de la proteína recombinante sin cola de histidinas.

Se llevó a cabo la producción de la proteína VP7 de rotavirus. La presencia de la proteína de interés se confirmó mediante la técnica de Western-blot, revelando con TMB (**Figura 14**). Para el Western-blot se utilizó un anticuerpo policlonal anti triple capa de rotavirus (anti-TLP). Este resultado permitió comenzar con las etapas de purificación de VP7 que se describen más adelante.

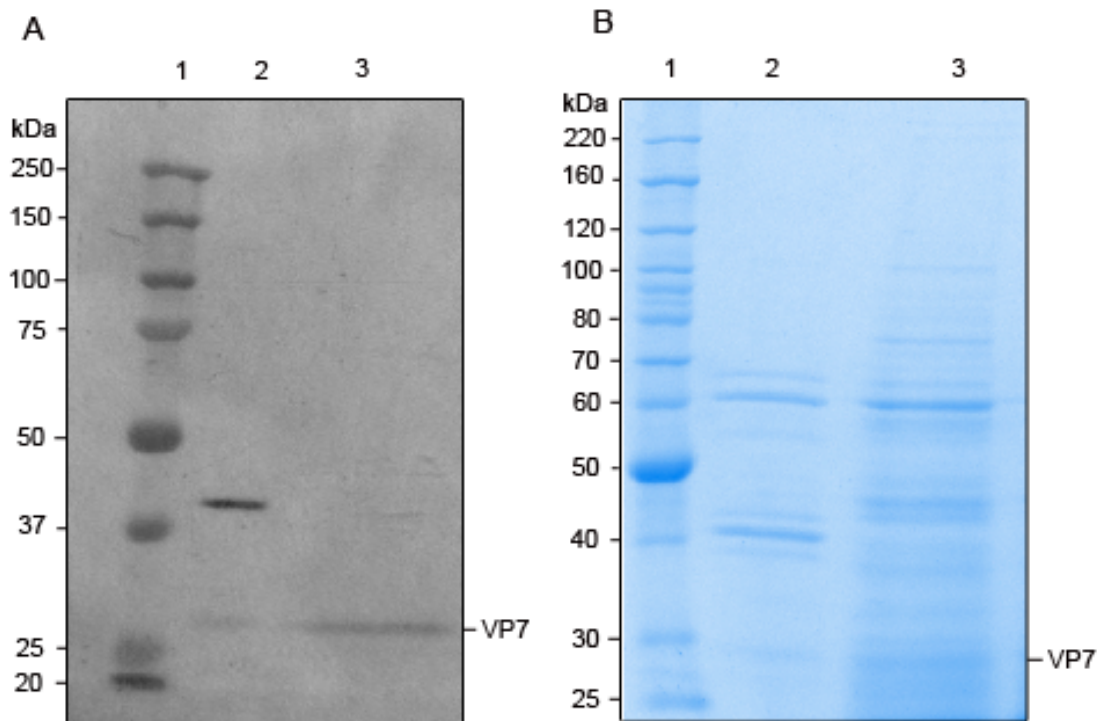


Figura 14. Sobrenadante del cultivo

En la figura se presenta el Western-blot del sobrenadante del cultivo de VP7, indicando la presencia de la misma. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2. Control positivo., 3. Sobrenadante. A) Western-blot, B) Gel de poliacrilamida teñido con azul de coomassie. Como control positivo se utilizó una muestra de triple capa producida con anterioridad en el laboratorio (VP2, VP6 y VP7).

Purificación de VP7 (Estrategia inicial).

El primer paso de la purificación fue mediante cromatografía de afinidad en concanavalina-A (ConA) **Figura 15**. En el cromatograma se aprecia de manera clara que una gran cantidad de proteínas no son retenidas con relación a la fracción eluida. Esto representa un indicio de que este paso resulta exitoso para incrementar la pureza de VP7 ya que se está llevando a cabo la separación entre la fracción de proteínas que no se encuentran glicosiladas (no retenido) y la fracción que sí lo está (en la fracción retenida), entre estas proteínas glicosiladas se encuentra VP7. En la **Figura 16** se muestra el gel de poliacrilamida de las diferentes fracciones obtenidas. En la fracción 1, es en donde se logró recuperar la mayor cantidad de VP7, esto se confirmó mediante Western-blotting.

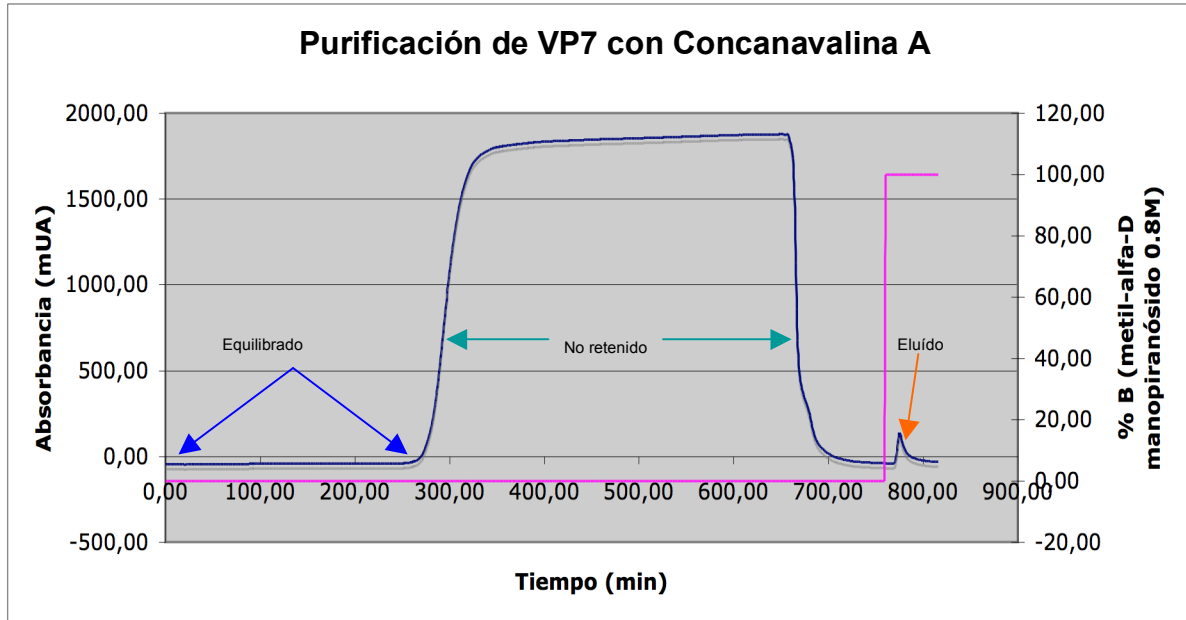


Figura 15. Cromatograma de afinidad (Concanavalina A, sefarosa B). En la escala de la derecha se lee la línea azul (Absorbancia) y en la izquierda se lee la curva rosa (% de metil-alfa-D-manopiranosido). La línea azul se lee en la escala de la izquierda y la línea rosa en la derecha. Buffer de carga: Tris 50 mM pH 7.4. Buffer de elución: igual que el buffer de carga con 0.8 M de metil-alfa-D-manopiranosido. Flujo de equilibrio: 0.9 mL/min. Flujo al cargar la muestra: 0.2 mL/min.

El Western-blot confirmó la presencia de VP7 en el eluido y el gel de poliacrilamida permitió confirmar que la Concanavalina A fue efectiva para mejorar la pureza de VP7 cuando se comparó con el gel correspondiente al sobrenadante de cultivo, ya que se utilizó densitometría para determinar la concentración relativa de VP7 con respecto al total de proteínas en el carril del gel de poliacrilamida. En el caso del sobrenadante, VP7 representa alrededor de un 1 % del total de las proteína y después del paso de purificación de Concanavalina A, este valor se incrementó a aproximadamente 10 %.

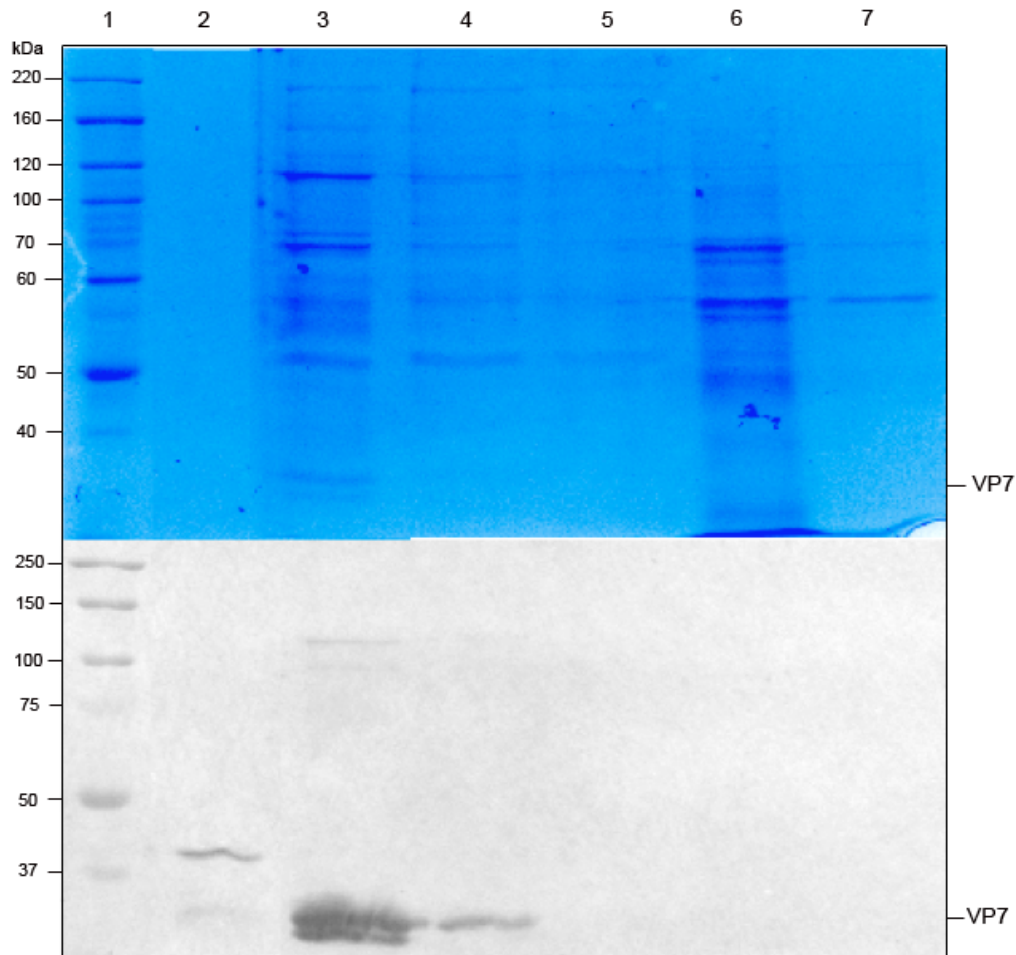


Figura 16. Gel de poliacrilamida y Western-blot de las fracciones eluidas de la columna empacada con ConA Sepharose.

1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Fracción eluida 1, 4.- Fracción eluida 2, 5.- Fracción eluida 3, 6.- No retenido, 7.- Control negativo. Peso molecular en kD. Como control positivo se utilizó una muestra de triple capa producida con anterioridad en el laboratorio (VP2, VP6 y VP7). Como control negativo se utilizó el sobrenadante de cultivo de la proteína BacRep producido en células de insecto.

Las fracciones que contienen VP7 eluidas de la columna de Concanavalina A fueron inyectadas en la columna de exclusión de tamaño. La exclusión por tamaño tiene dos propósitos; el primero de ellos es el de intercambiar buffer y preparar la muestra para el paso de intercambio iónico y el segundo propósito es el de mejorar la pureza de la muestra.

Las fracciones que contienen la mayor concentración de VP7 corresponden a las regiones comprendidas entre los 50 y 60 min (**Figura 17**).

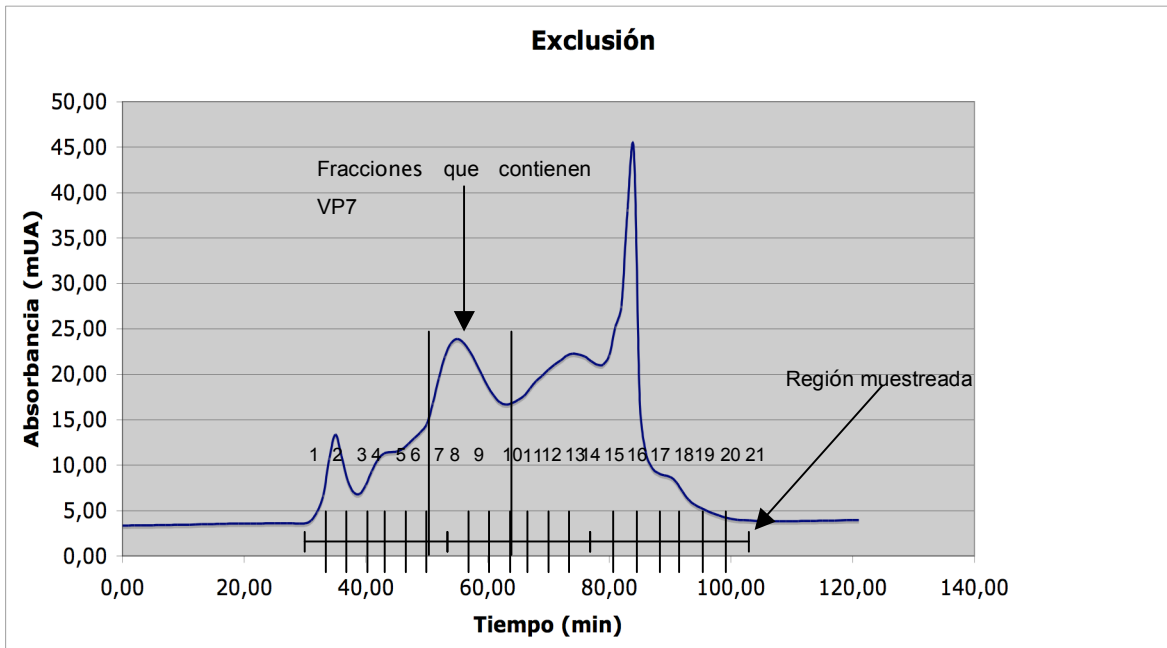


Figura 17. Cromatograma de exclusión por tamaño. Se muestran las zonas de muestreo correspondientes a las fracciones de 1 al 21.

En la **Figura 18** se muestran el gel de poliacrilamida y el Western-blot de las fracciones que mostraron contenido de VP7. Se aprecia que las fracciones 7, 8 y 9 son las que contienen mayor cantidad de VP7. Estas fracciones corresponden a los carriles 3, 4 y 5.

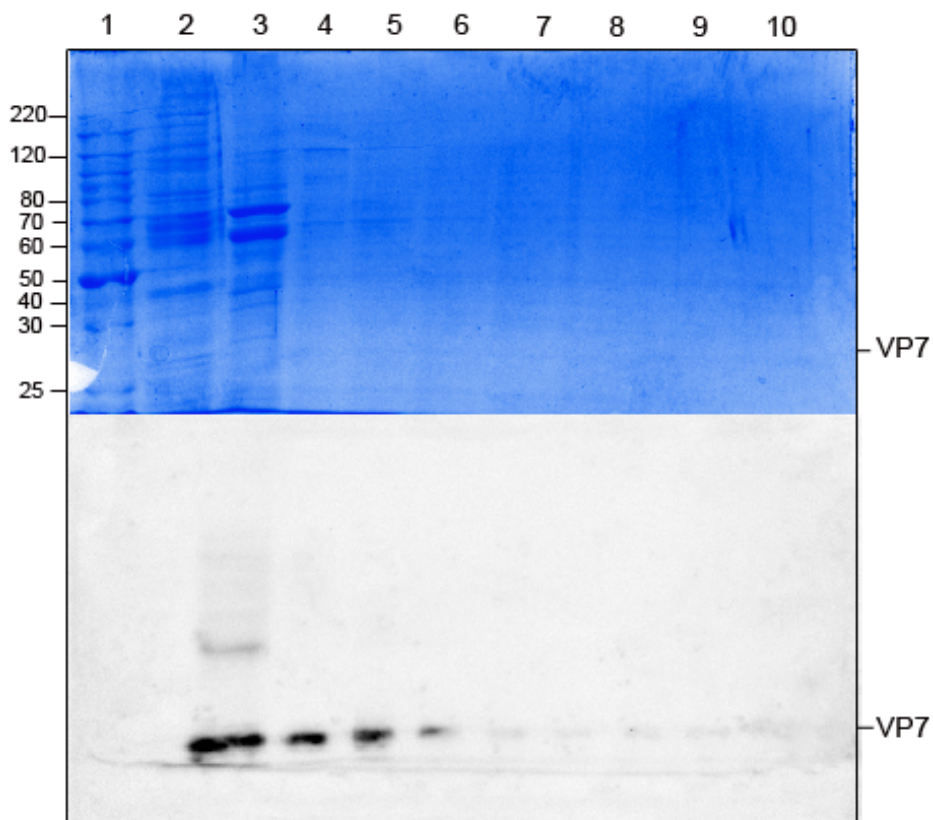


Figura 18. Análisis de la etapa de exclusión por tamaño .

SDS-Page desnaturizante de las fracciones obtenidas por exclusión por tamaño y su correspondiente western-blot.

1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- F7, 4.- F8, 5.- F9, 6.- F10, 7.- F11, 8.- F12, 9.- F13, 10.- Control negativo. Peso molecular en kDa. Como control positivo se utilizó un sobrenadante de VP7 producido en células de insecto, previamente comparado con partículas de triple capa. Como control negativo se utilizó el sobrenadante de cultivo de la proteína BacRep producido en células de insecto.

El siguiente paso que se llevó a cabo fue la optimización de la separación por intercambio iónico, descrita en la sección de metodología. La fracción 7 proveniente de la filtración en gel se concentró 3 veces, se tomaron 5 alícuotas de esta muestra y se intercambió el disolvente de cada una de ellas por cuatro distintas soluciones amortiguadoras a pH de: 4.3, 4.8, 5.2, 5.5 y 6 por medio de diálisis. Posteriormente se llevó a cabo el proceso de adsorción y desorción en la resina de intercambio iónico. Se concluyó que el mejor pH de entre los evaluados, para llevar a cabo la etapa de intercambio iónico en términos de retención es el de 6 ya que a este pH se recupera la mayor cantidad de VP7 en la resina después de eluir con NaCl 1M, con respecto a todos los pH's comparados (**Figura 19** y **Figura**

20). Esto indica que el pH de 6 es suficiente para permitir que la proteína se retenga de manera eficiente en la resina de intercambio iónico.

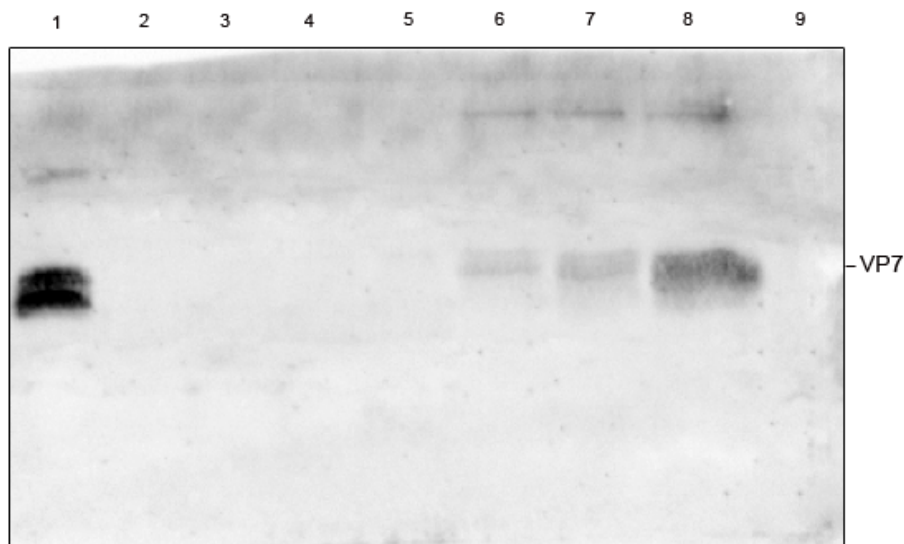


Figura 19. Western-blot de las pruebas de optimización del pH para el paso de intercambio iónico. 1.- Control positivo, 2.- Carril libre, 3.- Carril libre, 4.- Carril libre, 5.- Muestra a pH 4.3, 6.- Muestra a pH 4.8, 7.- Muestra a pH 5.2, 8.- Muestra a pH 5.5, 9.- Muestra a pH 6. Peso molecular en kDa. Las muestras analizadas representan los eluidos de cada tubo.

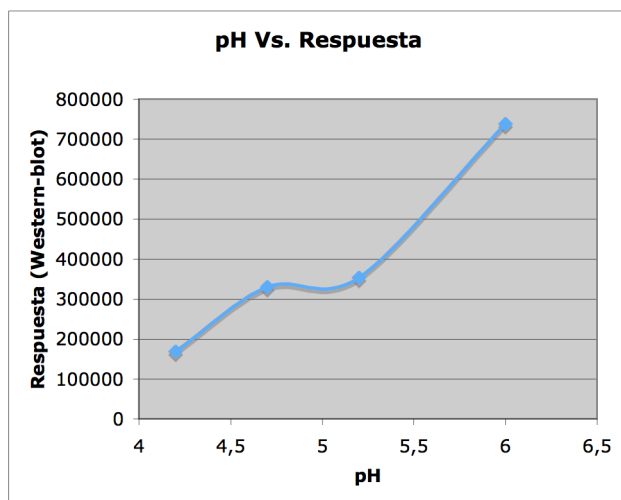


Figura 20. Efecto del pH en la retención utilizando la resina Eshmuno Q para VP7. Se observa que al incrementar el pH mejora la retención de VP7 en la resina. Se determinó la respuesta correspondiente de cada banda en el Western-blot de la Figura 19.

Adicionalmente se calculó el porcentaje de recuperación de VP7 a pH de 6.0 y este fue cercano al 100 % **Figura 21**. El porcentaje de recuperación se calculó utilizando densitometría en membranas de Western-blot, para este efecto, se midió la respuesta de la banda de la muestra que se cargó en el gel y se comparó con las bandas provenientes de la elución, siguiendo un procedimiento similar al utilizado para la optimización del pH (Ver Materiales y Métodos). Para la determinación de la respuesta en las bandas se utilizó el software Image Lab 2.0 (Bio-Rad, USA). El cálculo del volumen se lleva a cabo sumando todas las intensidades dentro del área definida para cada banda en el gel de poliacrilamida analizado (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10017218.pdf>).

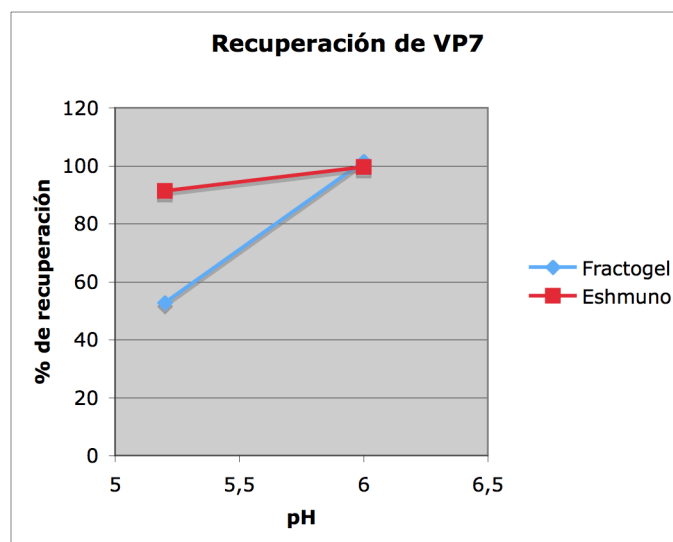


Figura 21. Recuperación de VP7 para dos pH's distintos.

Se evaluó la recuperación de VP7 comparando el eluido con respecto a la carga de muestra en las resinas de intercambio aniónico. A un pH de 6, la recuperación es cercana al 100% para ambas resinas.

Tomando como base las condiciones encontradas en las pruebas de optimización del intercambio iónico, se procedió a llevar a cabo la separación por medio de esta técnica. El cromatograma del paso de intercambio iónico se muestra en la **Figura 22**. Es de notar, que se obtiene un solo pico con un hombro cercano a los 27 minutos de corrida. Esto significa que la resolución (separación relativa entre distintas proteínas) obtenida en este paso de purificación necesitaría mejorarse

para lograr una separación completa entre los distintos componentes de la muestra. Para mejorar la resolución en este paso se podría utilizar una resina con un tamaño de partícula menor ya que a menor tamaño de partícula, mejor resolución (Dong 2006).

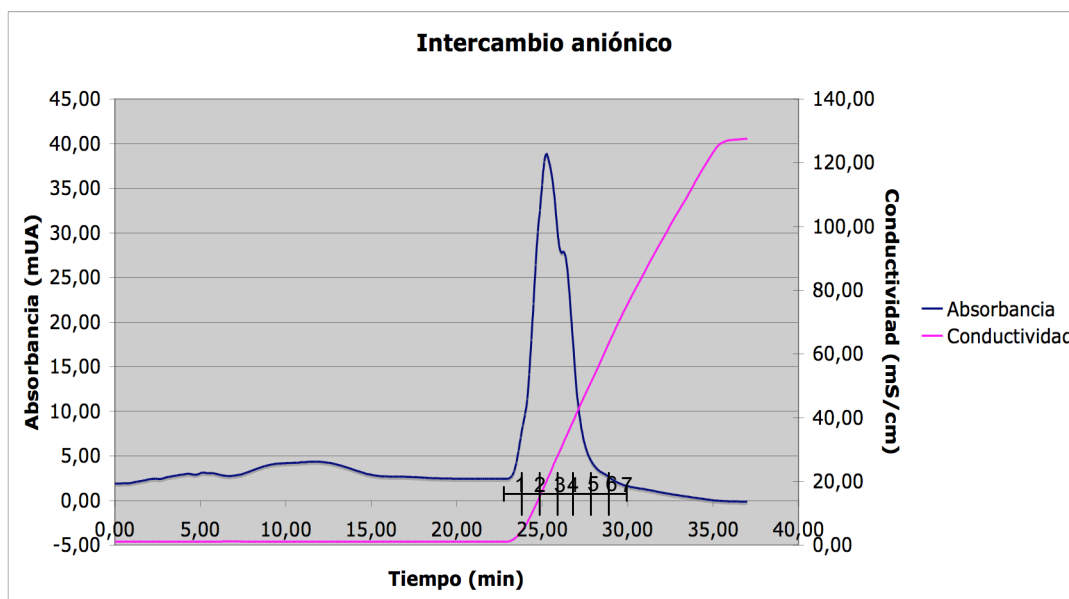


Figura 22. Cromatograma de intercambio iónico. Se muestra el gradiente en rosa y los puntos de colección de las fracciones. Buffer de equilibrio: Solución amortiguadora de histidina 20 mM pH 6.0. 1 mM de Cloruro de calcio. Buffer de elución: 2N de cloruro de sodio.

Se llevó a cabo el gel de poliacrilamida y su correspondiente Western-blot para las fracciones obtenidas en la separación por intercambio iónico (**Figura 23**). En el Western-blot se aprecia que la fracción 2 es la que presenta la mayor concentración de VP7. En las fracciones 1 y 3 también se detecta VP7, pero en mucho menores concentraciones ya que las intensidades de las bandas correspondientes a VP7 en estos carriles son mucho menores en relación a la obtenida en el carril 6. En todas las demás fracciones, no se detectó VP7.

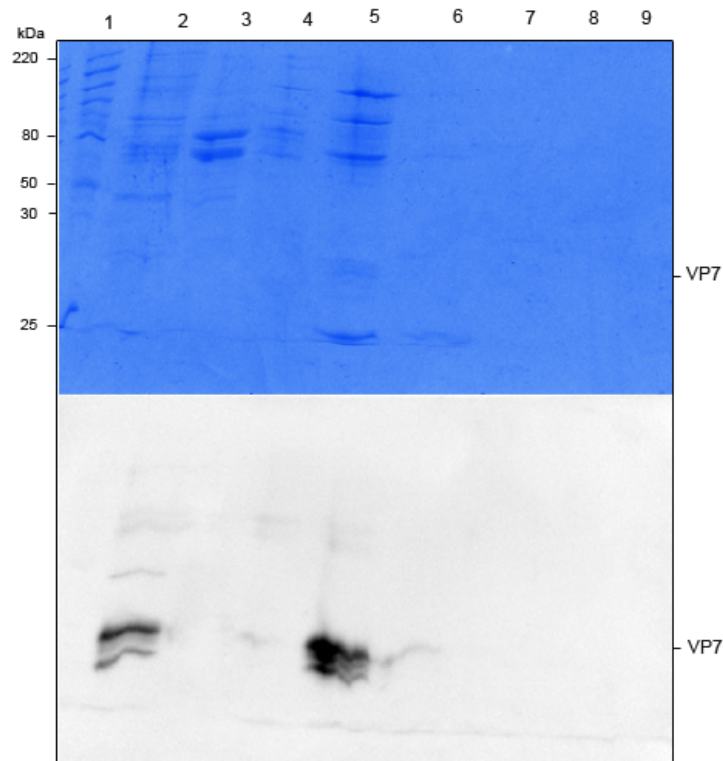


Figura 23. SDS-PAGE y su correspondiente Western-blot, para las fracciones obtenidas del paso de intercambio iónico.

1.- Marcador de peso molecular, 2.- Marcador de peso molecular, 3.- Control positivo, 4.- Control negativo, 5.- F1, 6.- F2, 7.- F3, 8.- F4, 9.- F5, 10.- Marcador de peso molecular. Peso molecular en kDa. Como control positivo se utilizó un sobrenadante de VP7 producido en células de insecto, previamente caracterizado. Como control negativo se utilizó el sobrenadante de cultivo de la proteína BacRep producido en células de insecto.

Se llevaron a cabo los análisis de proteína total de las fracciones de la purificación (Bradford 1976) y con mediciones de densitometría de las fracciones purificadas utilizando el programa image lab (BioRad) se estimó el porcentaje de pureza de c/u de ellos. Los resultados se resumen en la **Tabla 5**. En este resumen es posible apreciar que la mejor pureza obtenida con respecto a VP7 fue del 24 % (Fracción de VP7 de 0.24).

Resultados de la purificación mediante Concanavalina A, filtración en gel e intercambio iónico.

Paso	Proteína total (µg)	VP7 (µg)	Fracción de VP7	Factor de purificación	Recuperación (%)	Recuperación global (%)
Sobrenadante	110200	771	0.009	1.00	100	100
ConA	4182	418.2	0.100	11.1	54.0	54.0
SEC	2072	269.4	0.130	14.4	64.0	34.6
IE	1437	232.2	0.240	26.7	86.2	30

Tabla 5. Resumen de la purificación utilizando afinidad por concanavalina, filtración en gel e intercambio iónico. Fracción de VP7 se refiere a la fracción de VP7 con respecto al total de proteína en la muestra.

La pureza de las muestra obtenida a partir del intercambio iónico necesita incrementarse para lograr alrededor de 90 % de pureza de VP7 y así llevar a cabo estudios de ensamblaje.

El contaminante principal en la purificación de VP7 es la proteína GP64 del baculovirus. GP64 y VP7 tienen características muy similares, lo cual dificulta su separación (Mellado et al, 2008).

1. Tanto VP7, como GP64 son glicoproteínas, por lo cual el paso de separación por concanavalina no es capaz de discriminar entre ellas.
2. GP64 se presenta en forma de trímeros (192 kDa), y monómeros (64 kDa) y VP7 se presenta en forma principalmente de trímeros (102 kDa), por lo cual el paso de exclusión no es suficiente para discriminar entre ellos (Mellado et al., 2008).
3. Los puntos isoeléctricos de GP64 (3.15) y de VP7 (3.89) (Reportados a partir de la secuencia) son muy similares para llevar a cabo su separación utilizando intercambio aniónico (Dormitzer y Greenberg 2000, Mellado et al., 2008).

Se concluyó que para mejorar la pureza de VP7 a nivel adecuado se podría utilizar por ejemplo la estrategia de afinidad por metal inmovilizado, lo que permitiría dotar a VP7 de una propiedad diferenciable con respecto a sus contaminantes. Adicionalmente, el producir una mayor cantidad de VP7

mejoraría también la facilidad con la que podría purificarse. Otra posibilidad era la de buscar resinas de intercambio iónico que permitieran llevar a cabo la separación correspondiente. Por facilidad se implementaron las estrategias de mejorar la cantidad de VP7 producida mediante la utilización de otros medios de cultivo, precipitación del sobrenadante de cultivo, seguidas de la opción de probar otras resinas de intercambio iónico.

Diseño experimental para mejorar la pureza de VP7

Con base en los resultados anteriores, se concluye que la pureza de VP7 obtenida mediante la estrategia de purificación afinidad por Concanavalina/Exclusión de tamaño/intercambio iónico no es adecuada para llevar a cabo estudios de ensamblaje (pureza máxima del 24 %). Las posibles causas de esto son: la baja cantidad de VP7 con respecto a otras proteínas, y las propiedades fisicoquímicas que VP7 comparte por ejemplo con respecto a GP64 (Mellado et al, 2008). Para contender con este hecho, se buscó el cambiar de medio de cultivo para mejorar la producción y se llevó a cabo la comparación de tres medios de cultivo, ExCell 405 (Sigma, USA), Sf900 II (Invitrogen, USA) y un medio de cultivo utilizado por la compañía Protein Sciences (USA). También se probaron dos metodologías para precipitar proteínas del sobrenadante del cultivo, una de ellas precipitación ácida y otra precipitación básica. Adicionalmente se probó el efecto de la utilización de dos resinas de intercambio iónico distintas. Adicionalmente se compararon tres medios de cultivo diferentes en términos de la producción relativa de VP7, densidad celular y viabilidad.

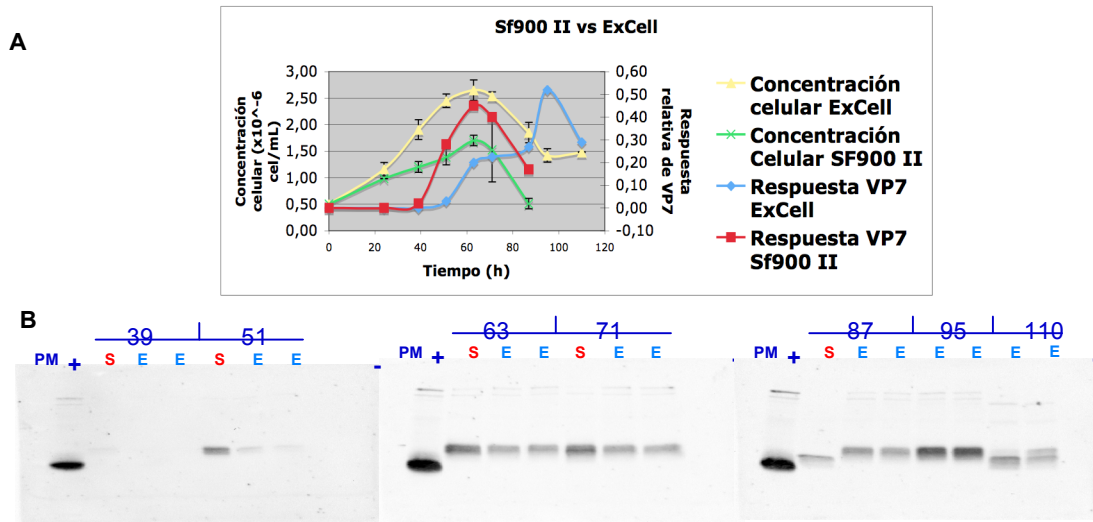


Figura 24. Comparación de la producción Sf900II vs ExCell 405
 A) Gráfica comparativa de las cinéticas de crecimiento celular para células infectadas y la respuesta relativa densitométrica para VP7. B) Western-blots para evaluar la respuesta relativa de VP7. Ex se refiere al medio ExCell 405, Sf se refiere al medio Sf900 II. En la parte superior se muestra el tiempo de muestreo.

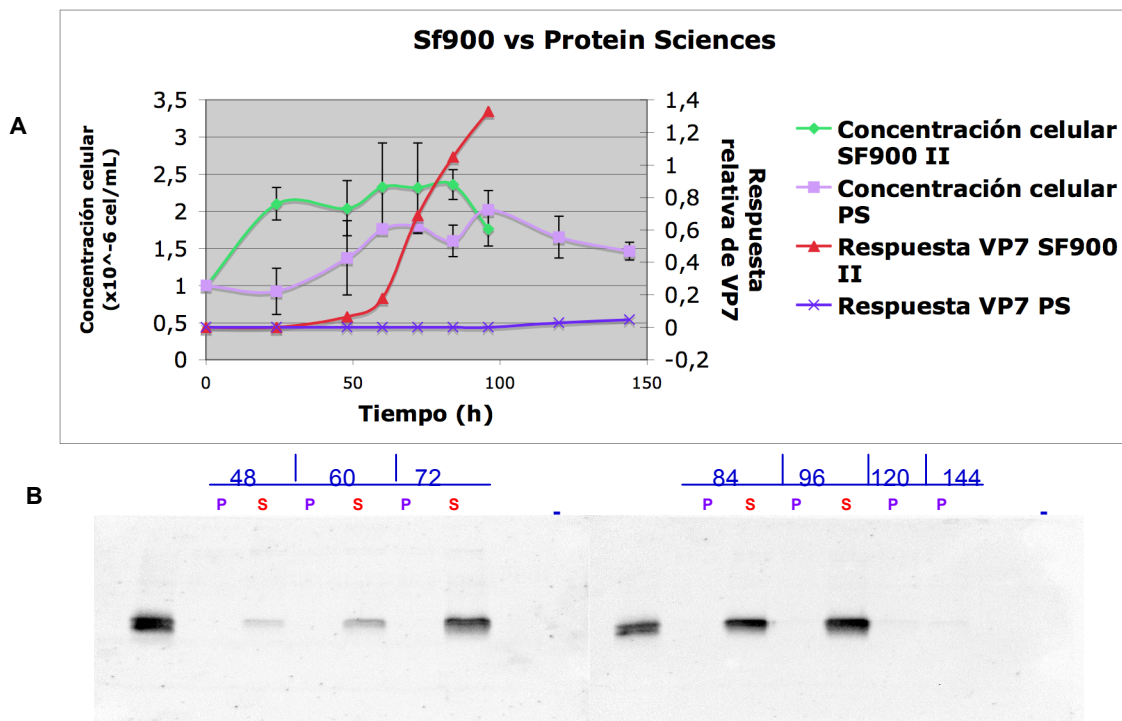


Figura 25. Comparación de la producción Sf900 II vs Medio de Protein Sciences.
 A) Gráfica comparativa de las cinéticas de crecimiento celular para células infectadas y la respuesta relativa densitométrica para VP7. B) Western-blots para evaluar la respuesta relativa de VP7. PS se refiere al medio de Protein Sciences, Sf se refiere al medio Sf900 II. En la parte superior se muestra el tiempo de muestreo.

En el medio de Protein Sciences prácticamente no se obtuvo producción de VP7 con respecto al medio Sf900 II. En el medio ExCell 405 se obtuvo un 20 % más de proteína que con respecto al medio Sf900 II, comparando el punto de máxima respuesta para cada uno de ellos. De igual manera, en el medio ExCell 405, la densidad celular máxima es alrededor de un 55 % mayor que con respecto al medio Sf900 II. Por lo tanto se eligió al medio ExCell 405 para llevar a cabo la producción de VP7 utilizando células H5.

Precipitación ácida y básica.

En la precipitación ácida se observa que gran cantidad de proteína se precipita, tanto VP7 como GP64, que es uno de los contaminantes principales y que se produce en gran cantidad (**Figura 26**). Por densitometría se determinó que aproximadamente 50 % de la VP7 presente originalmente se pierde en la pastilla precipitada en el proceso de precipitación ácida. Esto se llevó a cabo comparando las respuestas correspondientes a las bandas de la pastilla precipitada y del sobrenadante de la precipitación con el clarificado del cultivo. Uno de los aspectos positivos de la precipitación ácida, es que a pesar de que se pierde una cantidad importante de VP7 en la pastilla precipitada, la mayor parte de GP64 también se precipita. De hecho, la cantidad de GP64 que queda en el sobrenadante después de llevar a cabo la precipitación y centrifugar es indetectable en el Western-blot. Cuando se lleva a cabo la precipitación básica, se obtiene una cantidad apreciable de pellet. Sin embargo no se precipitan ni VP7 ni GP64 (**Figura 27**). Es posible que otras proteínas sí se estén precipitando, además de otros componentes no identificados.

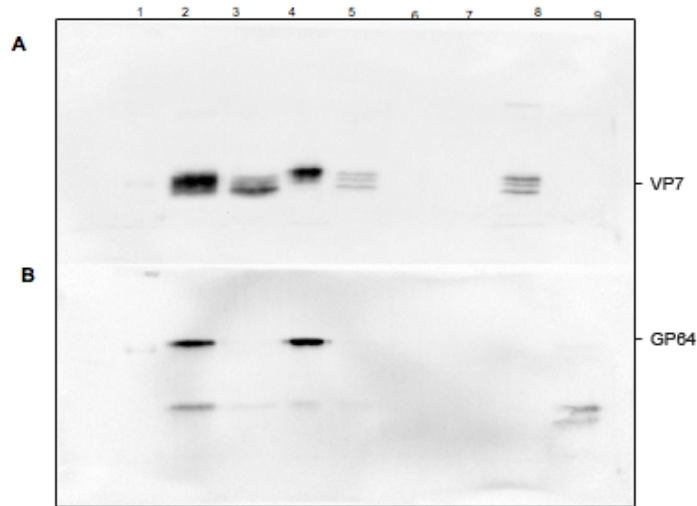


Figura 26. Western-blot del proceso de precipitación ácida

A) Anti VP7, B) Anti GP64. 1.- Control positivo, 2.- Clarificado del cultivo, 3.- Sobrenadante de la precipitación ácida concentrado 5X, 4.- Pastilla precipitada de la precipitación ácida, 5.- Sobrenadante de la precipitación ácida sin concentrar, 6.- Carril libre, 7.- Carril libre, 8.- Control positivo, 9.- Control negativo. GP64 no se observa en el carril del sobrenadante posterior a la precipitación ácida. Como control positivo se utilizó un sobrenadante previamente confirmado. Como control negativo se utilizó un sobrenadante utilizado para la producción de la proteína BacRep en células de insecto. Nota: Cuando se reveló el Western-blot contra GP64, se obtienen dos bandas en un peso molecular inferior al de GP64 (Y similar al de VP7) en el control negativo, esta respuesta se debe probablemente a degradación de GP64.

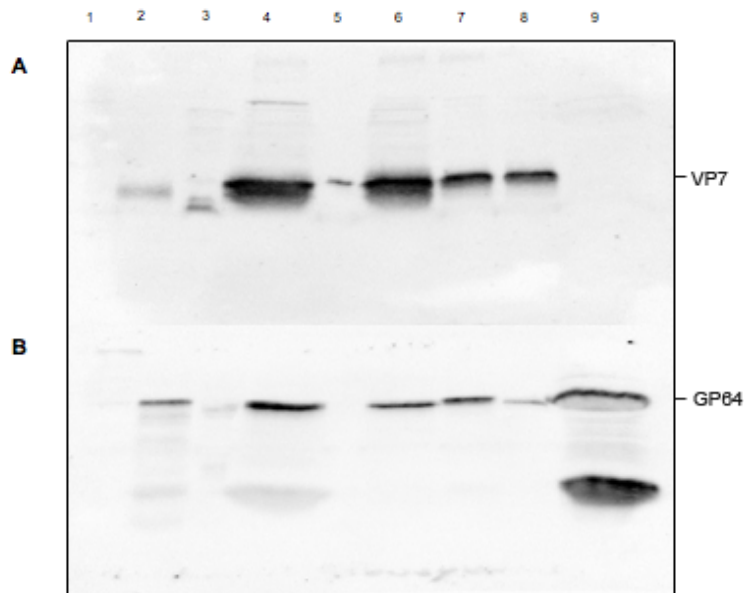


Figura 27. Western-blot del proceso de precipitación básica.

A) Anti VP7, B) Anti GP64. 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Control positivo, 4.- Clarificado del cultivo concentrado 5X, 5.- Pellet de la precipitación básica, 6.- Sobrenadante de la precipitación básica. 7.- Clarificado de cultivo sin concentrar, 8.- Sobrenadante de la precipitación (Proveniente del clarificado sin concentrar) 9.- Control negativo. Para los controles positivos se utilizaron muestras previamente confirmadas. Para el control negativo se utilizó un sobrenadante utilizado en la producción de la proteína BacRep en células de insecto. Nota: Cuando se reveló el Western-blot contra GP64, se obtienen una banda en un peso molecular inferior al de GP64 (Y similar al de VP7) en el control negativo, esta respuesta se debe probablemente a degradación de GP64.

Precipitación ácida seguida de Concanavalina A, medio de cultivo Sf900 II.

A continuación se tomó el sobrenadante de la etapa de precipitación ácida, se le intercambió el buffer de equilibrio para Concanavalina A (Materiales y métodos) y se llevó a cabo la cromatografía. La fracción que presenta la mayor pureza de VP7 es de alrededor del 20 %, esto se determinó mediante un Western-blot de las fracciones eluidas (**Figura 28**). En la **Figura 28** también se muestra el análisis llevado a cabo de las muestras correspondientes al proceso de precipitación.

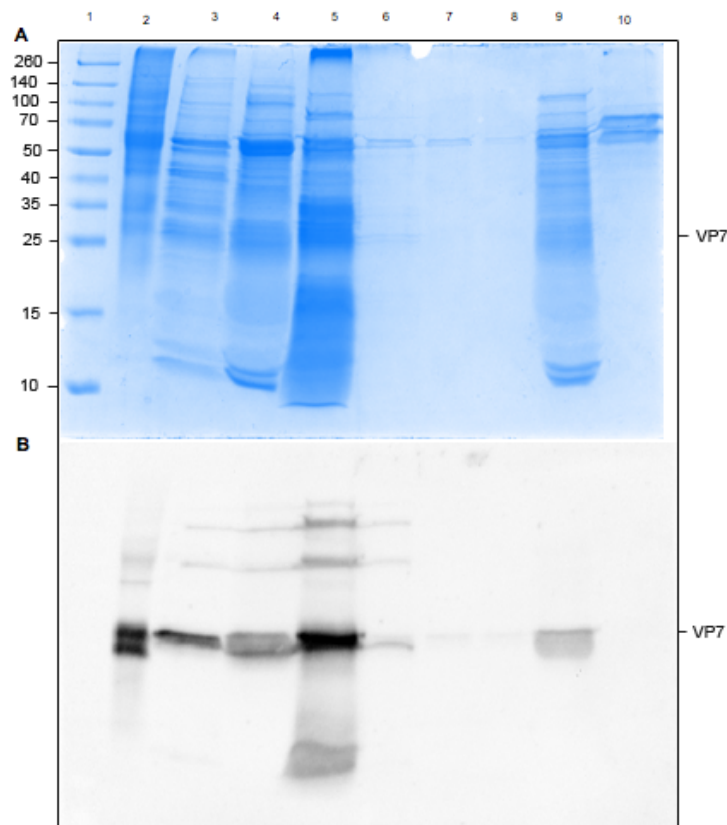


Figura 28. Precipitación ácida seguida de Concanavalina A, medio de cultivo Sf900 II. A) SDS-PAGE, B) Western-blot. 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Sobrenadante del cultivo, 4.- Sobrenadante de la precipitación, 5.- Pellet de la precipitación, 6.- Fracción 1, 7.- Fracción 2, 8.- Fracción 3, 9.- No retenido en la cromatografía, 10.- Control negativo. Las fracciones se concentraron 10X. Como control positivo se utilizó un sobrenadante previamente confirmado. Como control negativo se utilizó un sobrenadante utilizado para la producción de la proteína BacRep en células de insecto.

Precipitación ácida seguida de Concanavalina A, medio de cultivo ExCell 405.

Las etapas del proceso fueron iguales que en el caso del medio Sf900 II. En el gel de poliacrilamida se aprecia que la cantidad de proteínas en el gel es mayor, de la

misma manera, la pureza es ligeramente inferior que en el caso anterior, esta fue de aproximadamente el 15 % (**Figura 29**). En la **Figura 29** también se muestra el análisis llevado a cabo de las muestras correspondientes al proceso de precipitación.

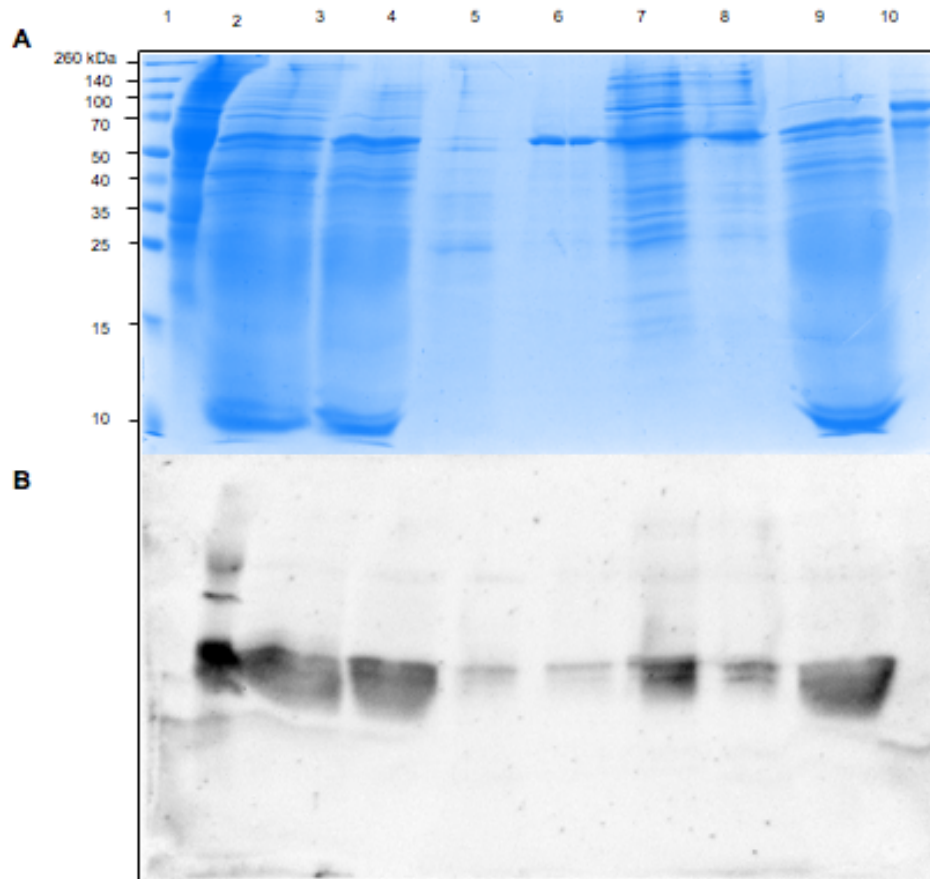


Figura 29. Precipitación ácida seguida de Concanavalina A, medio de cultivo ExCell 405
A) SDS-PAGE, B) Wester-blot. 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Clarificado del cultivo concentrado 5X, 4.- Centrifugado de la precipitación concentrado 5X, 5.- Pellet de la precipitación, 6.- Fracción 1, 7.- Fracción 2, 8.- Fracción 3, 9.- No retenido, 10.- Control negativo. Tanto las fracciones como el no retenido se refieren a la cromatografía con Concanavalina A. Las fracciones se concentraron 10X. La pureza de VP7 en el carril 8 es de aproximadamente 15 %. Como control positivo se utilizó un sobrenadante previamente confirmado. Como control negativo se utilizó un sobrenadante utilizado para la producción de la proteína BacRep en células de insecto.

Etapa de cromatografía de exclusión por tamaño comparando ambos medios de cultivo.

La cromatografía de exclusión arrojó los resultados que se muestran en **Figura 30**. En general se observa en el SDS-PAGE de los carriles correspondientes al medio de cultivo ExCell 405, presentan bandas mas intensas y en mayor número. Otro aspecto que llama la atención es que la pureza obtenida para las fracciones

eluidas en el paso de exclusión en gel es que tienen una menor pureza que las obtenidas en la etapa de la cromatografía con Concanavalina. Esto se puede deber a que VP7 se está adsorbiendo en las superficies, por ejemplo de la columna utilizada para llevar a cabo la separación (Rabe y Seeger 2011).

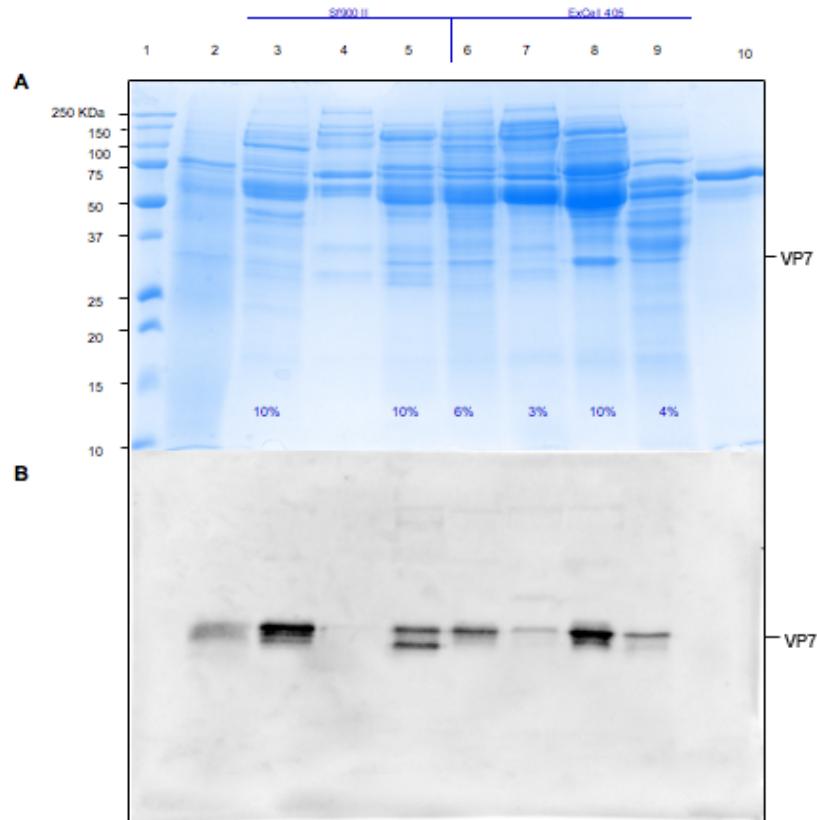


Figura 30. Etapa de cromatografía de exclusión por tamaño comparando ambos medios de cultivo A) SDS-PAGE, B) Western-blot. 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Fracción de Concanavalina A Sf900 II, 4.- Fracción 1 SEC, 5.- Fracción 2 SEC, 6.- Fracción Concanavalina A ExCell 405, 7.- Fracción 1 SEC, 8.- Fracción 2 SEC, 9.- Fracción 3 SEC, 10.- Control negativo. Las fracciones de Concanavalina A se concentraron 10X. Las fracciones de SEC se concentraron 50X. En la parte baja de los carriles del gel de poliacrilamida se muestran las purezas de VP7 determinadas con densitometría. Como control positivo se utilizó un sobrenadante previamente confirmado. Como control negativo se utilizó un sobrenadante utilizado para la producción de la proteína BacRep en células de insecto.

Intercambio iónico.

En general en las etapas de intercambio iónico, si se consiguió una mejoría en la pureza con respecto a las etapas anteriores de purificación, sin embargo este incremento es marginal y solo supera de manera ligera a lo obtenido en la purificación con Concanavalina A. En la **Figura 31**, se muestran las fracciones

eluidas de la etapa de intercambio aniónico fuerte con la resina Eshmuno, para el medio Sf900 II previa precipitación ácida.

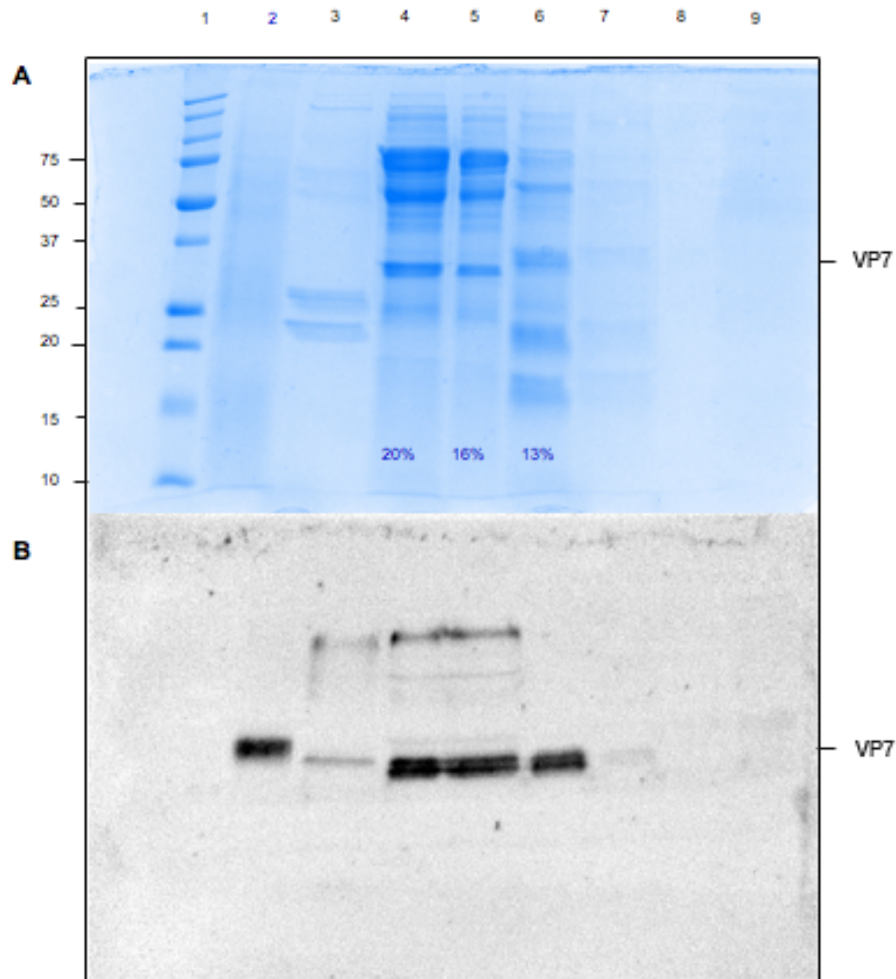


Figura 31. Intercambio iónico resina Eshmuno. A) SDS-PAGE, B) Western-blot. 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Fracción 2, 4.- Fracción 3, 5.- Fracción 4, 6.- Fracción 5, 7.- Fracción 6, 8.- Fracción 7, 9.- Control negativo. Las fracciones se refieren al intercambio iónico. Las fracciones se concentraron 50X. En la parte baja de los carriles del gel de poliacrilamida se muestran las purezas de VP7 determinadas con densitometría. Como control positivo se utilizó un sobrenadante previamente confirmado. Como control negativo se utilizó un sobrenadante utilizado para la producción de la proteína BacRep en células de insecto.

En la **Figura 32** se presentan los resultados de la purificación para intercambio aniónico fuerte con la resina Fractogel, para el medio Sf900 II previa precipitación básica. Mientras que en la **Figura 33** se aprecian los resultados para el proceso para intercambio aniónico fuerte con la resina Fractogel, para el medio ExCell 405, previa precipitación básica

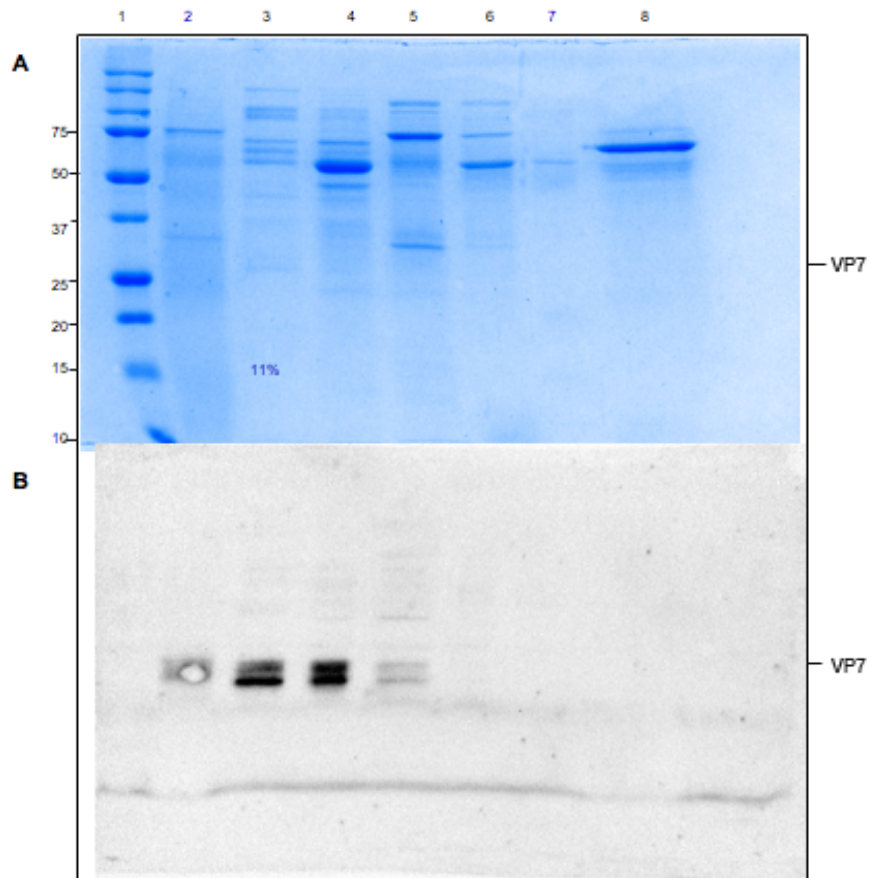


Figura 32. Purificación para intercambio aniónico con la resina Fractogel
 A) SDS-PAGE, B) Western-blot. 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Fracción 2, 4.- Fracción 3, 5.- Fracción 4, 6.- Fracción 5, 7.- Fracción 6, 8.- Control negativo. Las fracciones se refieren al intercambio iónico. Las fracciones se concentraron 50X. En la parte baja del carril 3 del gel de poliacrilamida se muestra la pureza de VP7 determinada con densitometría. Como control positivo se utilizó un sobrenadante previamente confirmado. Como control negativo se utilizó un sobrenadante utilizado para la producción de la proteína BacRep en células de insecto.

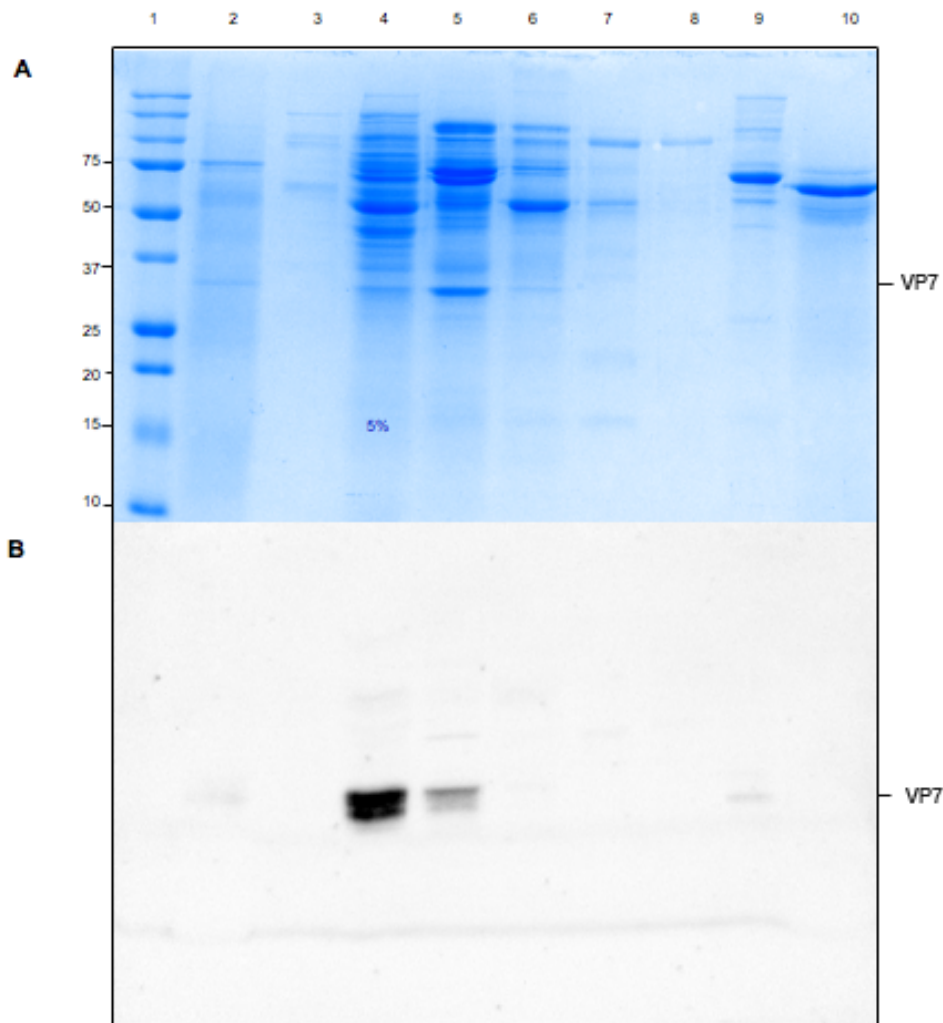


Figura 33 Intercambio aniónico fuerte con la resina fractogel, para el medio ExCell 405 previa precipitación básica

A) SDS-PAGE, B) Western-blot, 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Fracción 1, 4.- Fracción 2, 5.- Fracción 3, 6.- Fracción 4, 7.- Fracción 5, 8.- Fracción 6, 9.- Fracción 7, 10.- Control negativo. Las fracciones se refieren al intercambio aniónico. Las fracciones se concentraron 50X. Como control positivo se utilizó un sobrenadante previamente confirmado. Como control negativo se utilizó un sobrenadante utilizado para la producción de la proteína BacRep en células de insecto. Se indica que la pureza de VP7 es de alrededor del 5%.

En la **Figura 34** se muestran las purezas obtenidas mediante los procesos de purificación empleados en la estrategia experimental inicial (Concanavalina A/exclusión/intercambio iónico). La pureza más alta se obtuvo en el proceso que no implica precipitación y en donde se utilizó el medio Sf900 II. A partir de esto es posible concluir que las estrategias de precipitación utilizadas en este trabajo no aportaron beneficios netos en el proceso de purificación de VP7

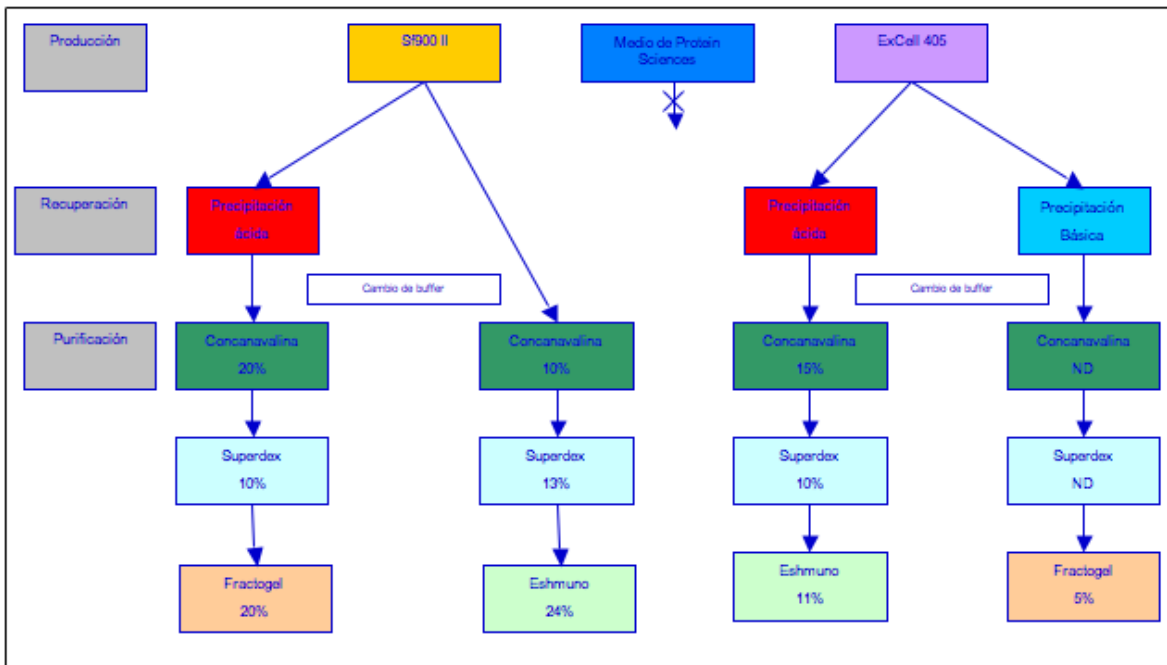


Figura 34. Resumen de puridades obtenidas en los pasos de la purificación utilizados.

Producción de VP7 con cola de histidinas.

Para mejorar la purificación de VP7 se decidió utilizar la técnica de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado. Para este objetivo, fue necesario construir un baculovirus recombinante conteniendo el gen de VP7 fusionado con una cola de histidinas.

Análisis de restricción del plásmido pGEM 3Z

El plásmido pGEM 3Z fue utilizado como templado para obtener un producto de PCR de VP7, este producto de PCR se utilizó en pasos posteriores. Para caracterizar el plásmido a ser utilizado, se llevó a cabo un análisis de restricción del mismo y posteriormente se llevó a cabo su secuenciación. En la **Figura 35** se presenta el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en donde se cargaron las diferentes muestras del plásmido pGEM 3Z digeridas con diferentes enzimas de restricción. En este gel se aprecia que las bandas de los plásmidos linealizados corresponden con los tamaños esperados para cortes específicos de cada enzima

mostrados en la **Tabla 6**, así como de las mezclas de ellas. El hecho de que los pesos moleculares tanto de los plásmidos linealizados con las enzimas de restricción, como los fragmentos obtenidos al combinar dos de ellas coincidan con los esperados, significa que el gen de VP7 se encuentra dentro del plásmido pGEM 3Z. Adicionalmente el BLAST llevado a cabo entre los datos que arrojó la secuenciación del gen de VP7 contra el gen correspondiente depositado en el GeneBank corresponden al 100 %. Esto indica que no existen mutaciones en el gen y que el marco abierto de lectura es adecuado para su expresión. La confirmación de estos resultados asegura que el gen de VP7 se encuentra estructuralmente intacto y por lo tanto es adecuado para la construcción del baculovirus recombinante.

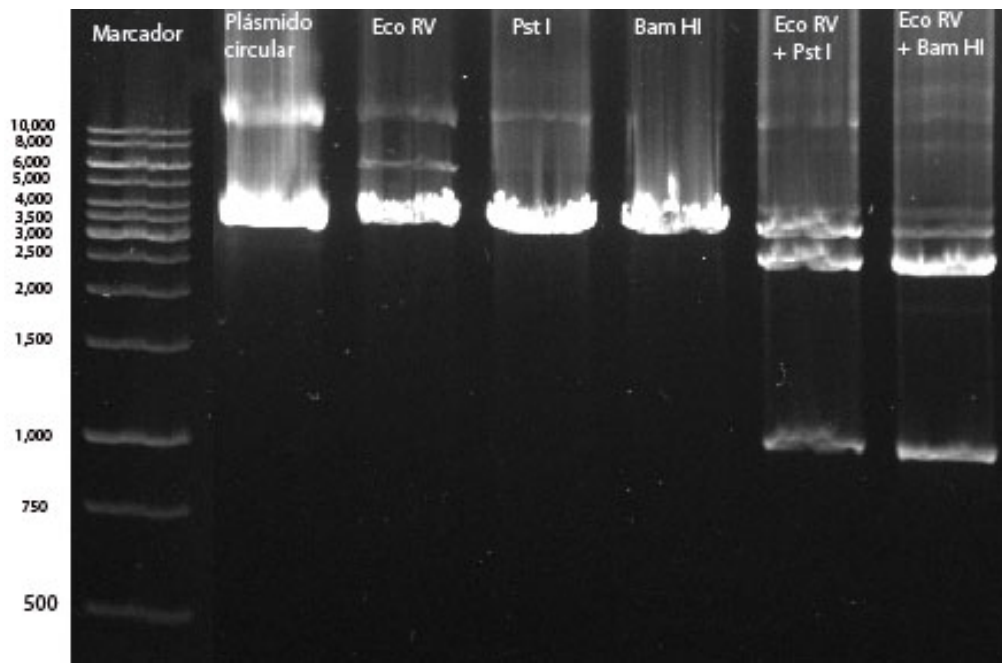


Figura 35. Análisis de restricción de pGEM 3Z
Gel de agarosa del análisis de restricción del vector pGEM-3Z con la secuencia clonada de VP7 RRV. Se muestran las enzimas utilizadas y el tamaño de los fragmentos esperados

Enzimas	Sitios de corte	Tamaño esperado de los fragmentos (pb)
Eco RV	112	3,805
Pst I	1110	3,805
Bam HI	1088	3,805
Eco RV + Pst I	112 + 1110	2,807 + 998
Eco RV + Bam HI	111 + 1088	2,829 + 976

Tabla 6. Análisis de restricción de pGEM 3Z. Se muestran las enzimas utilizadas y los tamaños de los fragmentos esperados.

El siguiente paso fue la generación de un producto de PCR con extremos romos utilizando la polimerasa Phusion® de alta fidelidad (New England Biolabs, USA). Una vez obtenido el producto de PCR se procedió a purificarlo y después cuantificarlo por espectrofotometría, confirmando su peso molecular mediante un gel de agarosa (**Figura 36**). Se observa que el peso esperado de 991 pb coincide con la banda obtenida.

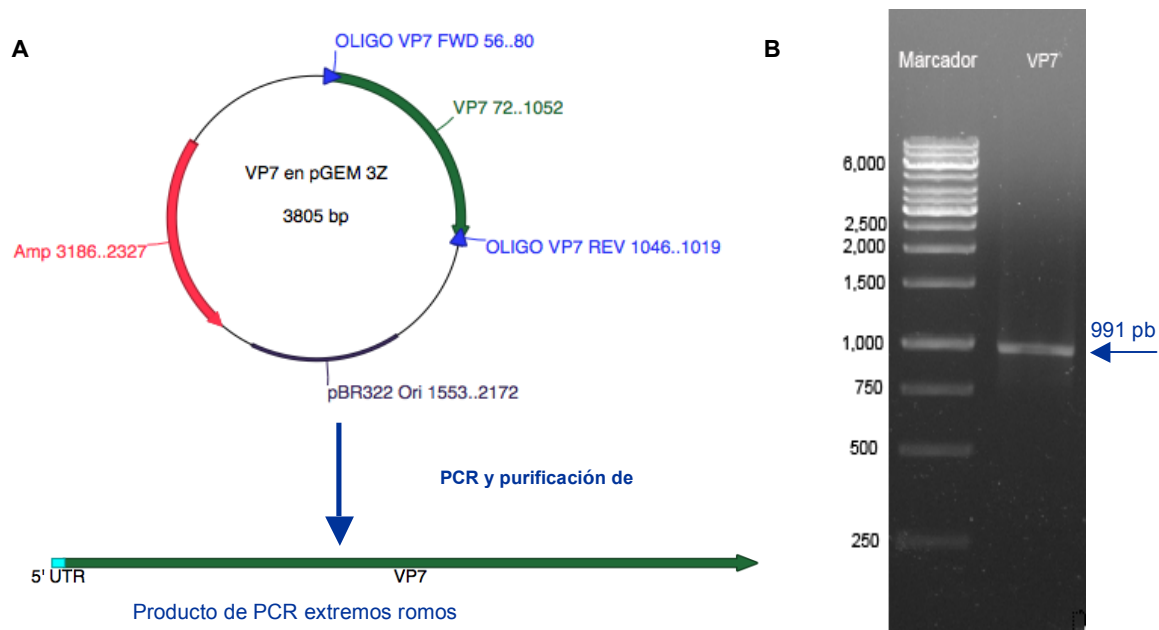


Figura 36. Obtención del producto de PCR de VP7. A) Generación del producto de PCR de extremos romos a partir del vector pGEM-3Z. B) Gel de agarosa del producto de PCR ya purificado. No se observan bandas adicionales al producto esperado.

Así se corroboró que la purificación fue exitosa ya que no se aprecian bandas secundarias que pudieran indicar la presencia de DNA contaminante. Con el producto de PCR de VP7 se procedió a llevar a cabo la reacción de ligación con el vector TOPO C-His activado. Posteriormente se transformaron las células químico-competentes de *E. coli* One Shot Mac1™. La confirmación de las clonaciones positivas se verificó mediante PCR de colonia, (**Figura 37**). Dicho PCR se llevó acabo utilizando el par de oligos VP7 FWD con SV40_PA REV. Con ello se asegura tanto la presencia del gen de VP7 en el sitio de clonación, como el que su dirección con respecto al vector sea la adecuada. El peso esperado es de 1,080 pb, lo cual coincide con la banda del gel de agarosa de los productos del PCR de colonia.

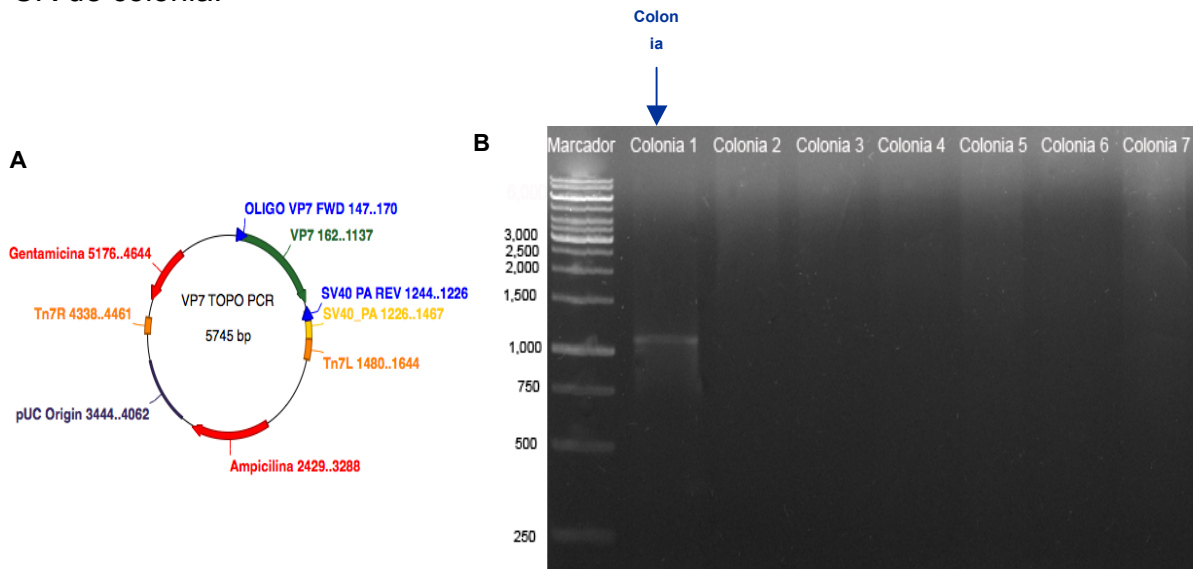


Figura 37. Confirmación de clonas positivas en el vector TOPO.

A) Amplificación del gen de VP7 dentro del vector TOPO, tomando un oligo interno (VP7 FWD) y un oligo externo (SV40_PA). B) Gel de agarosa de los productos de PCR de colonia para la identificación de clonaciones positivas

Posteriormente se cultivó la colonia positiva, se purificó el plásmido y se corrió el respectivo gel de agarosa (**Figura 38**). Con este paso se aseguró que el plásmido se encuentra puro.

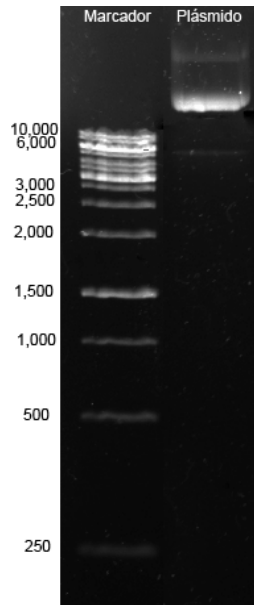


Figura 38. Gel de agarosa de la purificación del vector TOPO conteniendo el gen de VP7.

Con el plásmido del paso anterior se procedió a llevar a cabo la transformación de las células de *E. coli* DH10 Bac químico-competentes. Enseguida se confirmaron las colonias positivas mediante PCR y se llevó a cabo el gel de agarosa con los productos obtenidos. El tamaño esperado del producto de PCR es de 3200 pb (**Figura 39**). Para el PCR se utilizaron los oligos pUC/M13 que hibridan en el bácmido. Es esta figura se aprecian 8 colonias positivas como resultado de la transformación. En el PCR se utilizó un oligo interno y otro externo al gen de VP7, por lo que se confirma tanto la presencia del gen en el vector, como su posición y dirección adecuadas. De doce colonias blancas analizadas se obtuvieron resultados positivos en ocho de ellas, esto podría indicar que el sistema de selección con el gen reportero LacZ y la resistencia a antibióticos en el casete de expresión tiene una eficiencia para discriminar falsos positivos del 67 %. Donde un falso positivo es una colonia blanca que no contiene el casete de expresión en la posición adecuada.

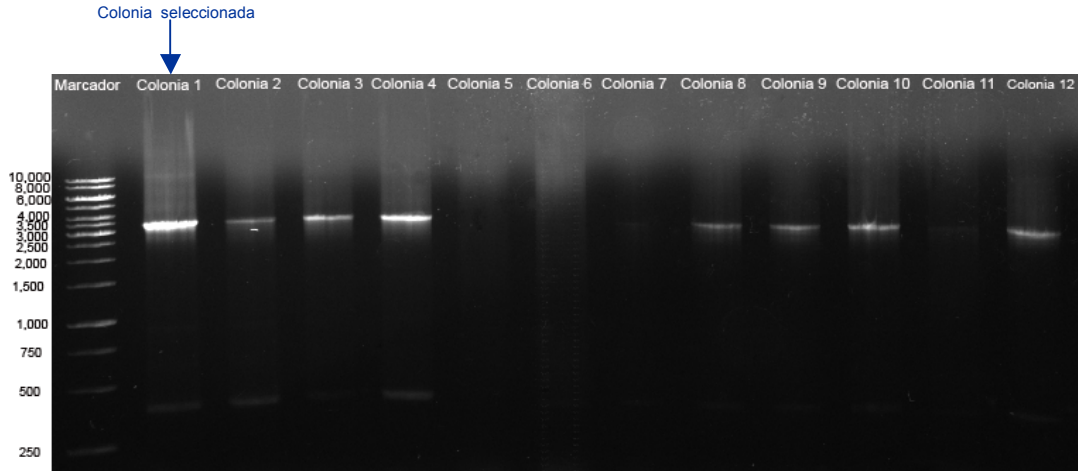


Figura 39. Identificación de colonias positivas para la clonación del gen de VP7 en *E. coli* DH10 Bac.

Después de confirmar las colonias positivas, se seleccionó una de ellas, se cultivó en suspensión y se purificó el plásmido para su evaluación por medio de geles de agarosa (**Figura 40**).

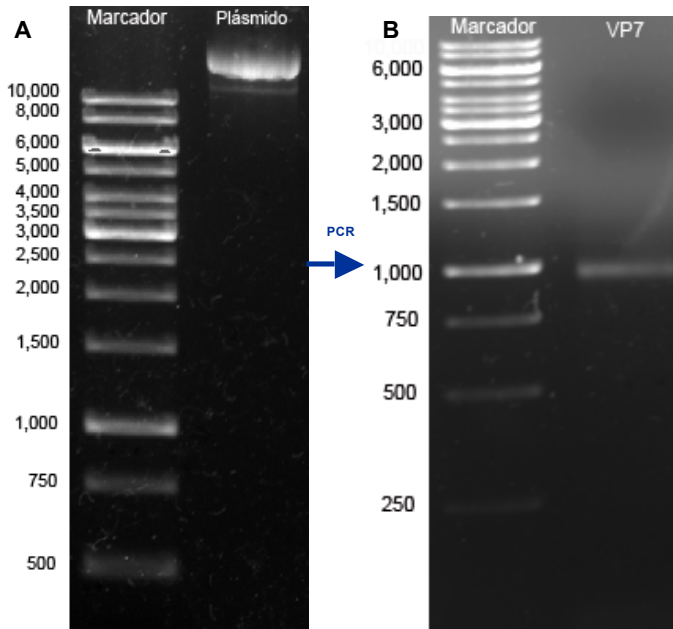


Figura 40. Resultado de la producción y purificación del Bácmido conteniendo VP7. A) Purificación del bácmido y B) PCR para confirmar la presencia del gen de VP7. La confirmación por PCR se llevó a cabo de nuevo para asegurar que el plásmido purificado contenía VP7.

Transfección de las células de insecto

El siguiente paso fue la transfección de células de insecto con el bÁcrido purificado y confirmado para el gen de VP7. La transfecci3n exitosa se comprob3 que mediante la realizaci3n de Western-blots utilizando anticuerpo primario anti GP64 para comprobar la infecci3n y con anticuerpo primario anti TLP's para evaluar la producci3n de VP7 (**Figura 41**). Como marcador de infecci3n se llev3 a cabo un Western-blot ante GP64 ya que esta prote3na es parte de la cÁpside de los baculovirus. Para verificar la presencia de VP7 se utiliz3 un anticuerpo anti triple capa de rotavirus (anti TLP's) policlonal. Ambas prote3nas fueron confirmadas en todos los pozos, por lo que se concluy3 que la transfecci3n fue exitosa en todos ellos. Posteriormente se llev3 a cabo la amplificaci3n del abasto viral utilizando el pozo 3 (P3).

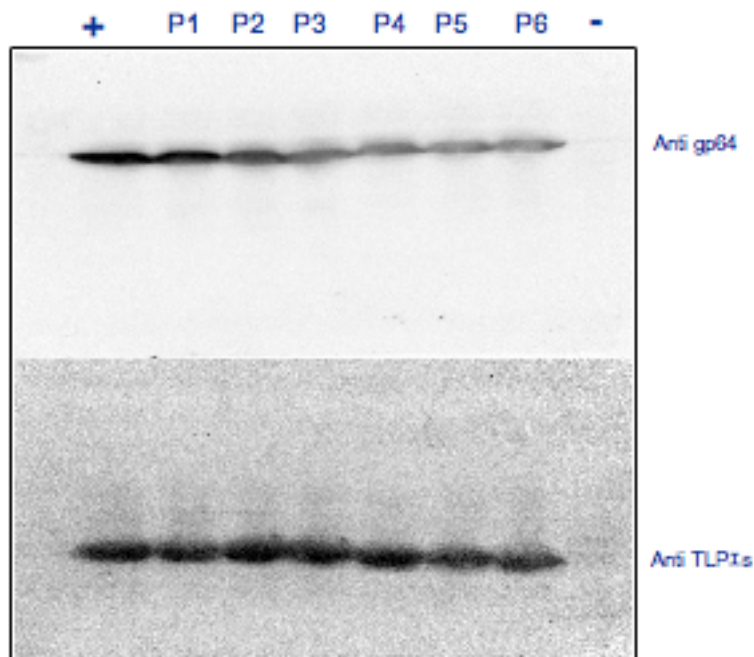


Figura 41. AnÁlisis de la transfecci3n de c3lulas Sf9 mediante western-blot.

P1 hasta P6 denotan los nÚmeros de pozo de la caja utilizada para la transfecci3n de P1 a P6 se cargaron los sobrenadantes correspondientes a cada pozo. "+" es el control positivo y "-" el control negativo. Como control positivo se utiliz3 un sobrenadante de cultivo para producir VP7 previamente confirmado. Como control negativo se utiliz3 un sobrenadante de cultivo utilizado para producir la prote3na BacRep.

Hasta este punto, la infecci3n de las c3lulas y la producci3n de VP7 estaba ya confirmada, sin embargo hac3a falta comprobar la presencia de la cola de

histidinas en VP7. La corroboración de la presencia de la cola de histidinas unida a VP7 se efectuó utilizando un anticuerpo anti cola de histidinas monoclonal en el respectivo western-blot **Figura 42**. Mediante esta prueba, la presencia de la cola de histidinas en VP7 fue confirmada, permitiendo seguir adelante con la purificación de VP7 mediante CAMI.

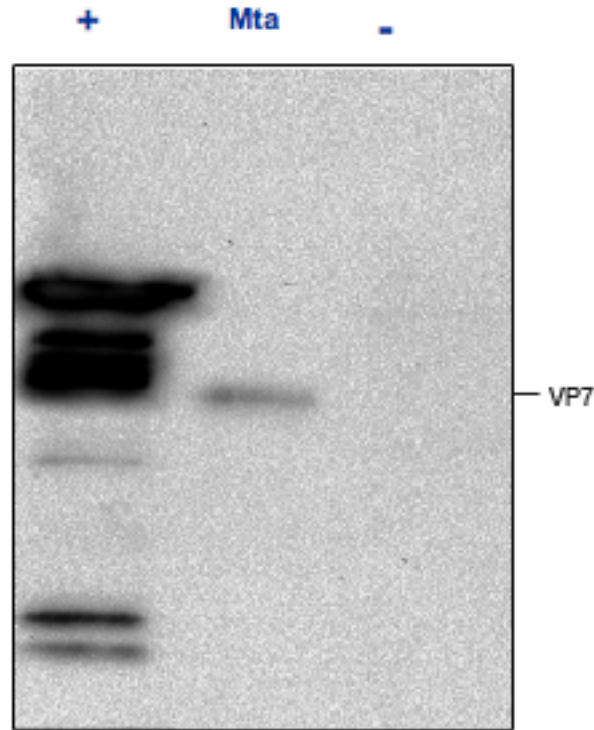


Figura 42. Western blot anti-His tag. Para detectar la presencia de la cola de histidina. “+” es el control positivo, “Mta” se refiere al sobrenadante del cultivo utilizado en la transfección y “-” es el control negativo.

Pruebas preliminares de purificación por IMAC.

Para evaluar la retención de VP7 en la resina IMAC, se llevaron a cabo pruebas preliminares. También se probaron lavados con concentraciones crecientes de imidazol que fueran suficientes para remover GP64, pero que permitieran mantener retenida a VP7 (**Figura 43**).

La importancia de llevar a cabo esto es que una de las proteínas expresadas en mayor cantidad por las células de insecto tanto Sf9 como High Five es GP64. De la misma manera GP64 guarda muchas similitudes desde el punto de vista fisicoquímico con VP7, lo que dificulta su separación. Por lo anterior GP64 es uno

de los contaminantes principales y más difíciles de remover. Como se muestra en la **Figura 43**, las pruebas preliminares muestran que esta estrategia de purificación es eficaz para remover al menos la mayor parte de GP64.

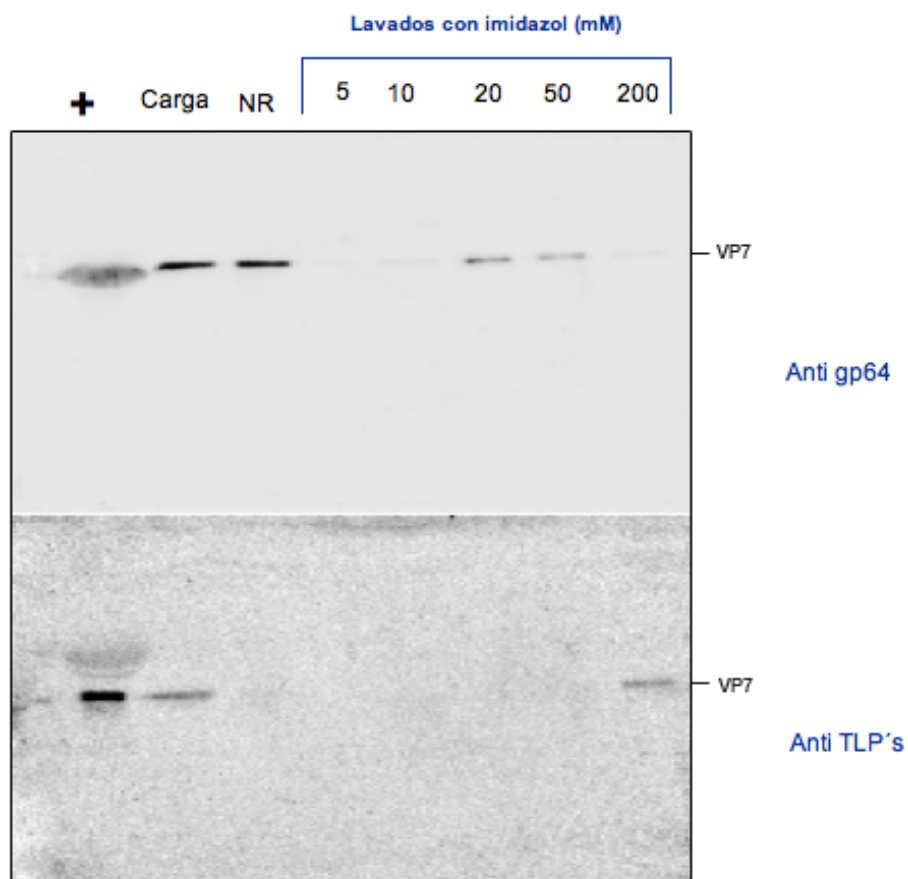


Figura 43. Pruebas preliminares de purificación con CAMI
“+” es el control positivo, “-” es el control negativo, “Carga” es el sobrenadante de cultivo que se puso en contacto con la resina, “NR” es la fracción no retenida en la resina de afinidad. Los números del 5 al 200 indican las concentraciones de imidazol (mM) utilizadas para llevar a cabo lavados y/o elución de la resina.

Con base en la prueba anterior, se seleccionó la concentración de 50 mM de imidazol para llevar a cabo el lavado de la columna de afinidad por metal inmovilizado. Una vez seleccionada la concentración adecuada para llevar a cabo la etapa de lavado, se procedió a efectuar la purificación. En la **Figura 44** se muestran las fracciones obtenidas en el proceso de purificación. Para calcular la

pureza se utilizó densitometría y tinción con plata. Esto se muestra en la **Figura 45**. Para este caso la pureza obtenida fue de alrededor del 80 %.

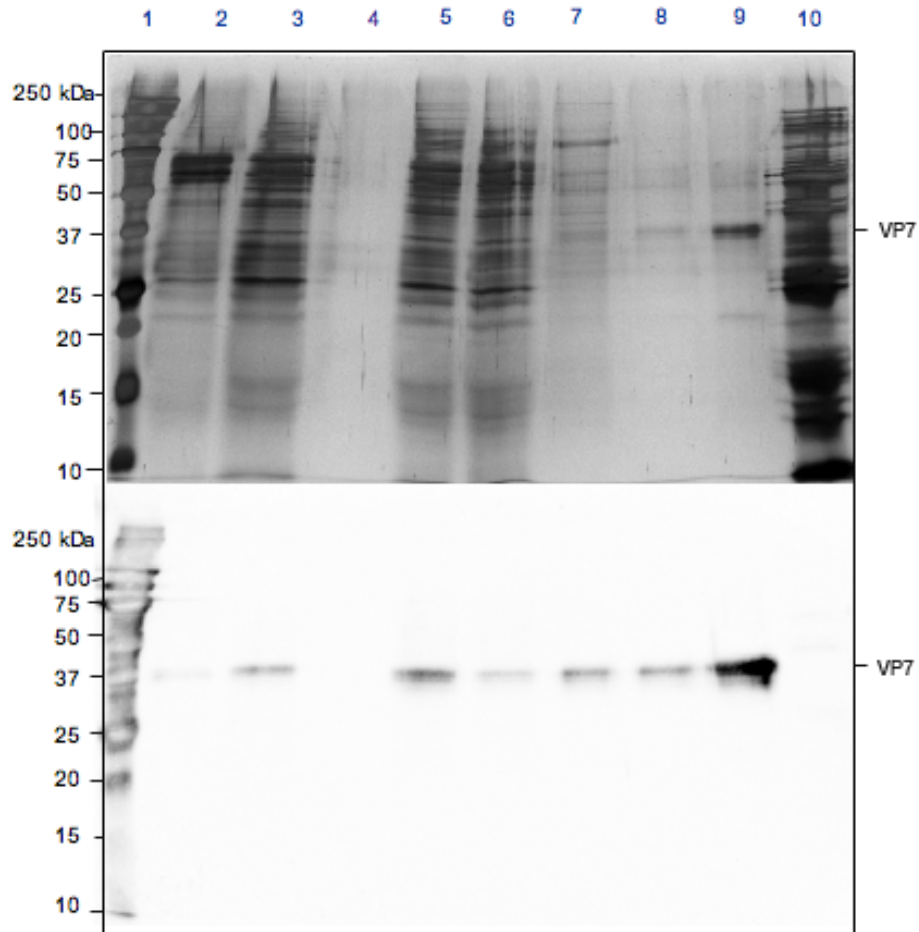


Figura 44. Purificación de VP7 mediante CAMI. Se llevó a cabo la confirmación mediante Western-blot utilizando un anticuerpo anti cola de histidinas.
1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Control positivo, 4.- Carril sin carga para evaluar el ruido de fondo en el gel, 5.- Carga a la columna, 6.- No retenido en la columna, 7.- Lavado con imidazol 50 mM, 8.- Fracción 1 eluída, fracción 2 eluída.

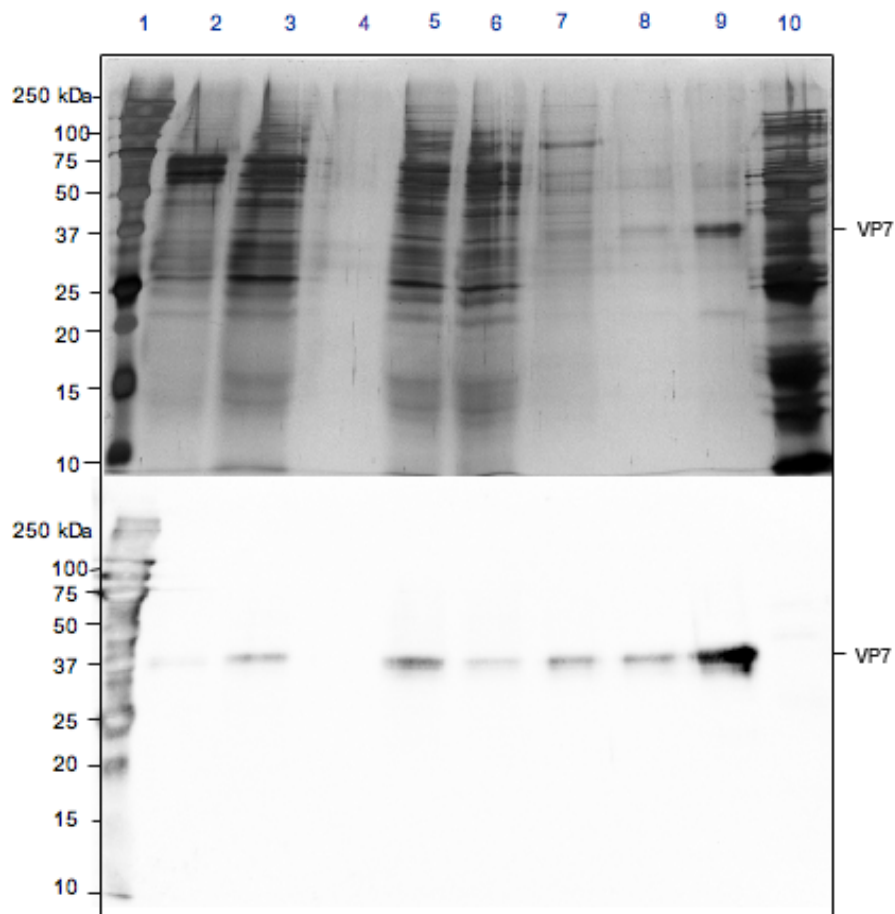


Figura 45. Ejemplo de gel de poliacrilamida utilizado para calcular la pureza de la proteína. A) Gel de poliacrilamida. Se utilizó tinción con plata y B) western-blot anti TLP's. 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Carril sin carga para apreciar el ruido de fondo, 4.- Fracción 2 eluída de la columna, 5.- Fracción 3 eluída de la columna, 6.- Control negativo. Se utilizó un anticuerpo anti TLP's.

De tres repeticiones del proceso de purificación se obtuvieron las siguientes purezas: 87 %, 72.3 % y 80 %, resultando en un promedio del 80 % con una desviación estándar de 6.8 % y un coeficiente de variación del 8.6 %. Un resumen de los datos se presenta en la **Tabla 7**.

Paso	Proteína total (µg)	VP7 (µg)	Fracción VP7*	Recuperado (%)	Recuperación global (%)	Factor de purificación
Sobrenadante	165,300	2,480	0.015	100	100	1.00
Cambio de buffer	122,280	1,590	0.013	64	64	0.87
CAMI	1,250	1,000	0.8	63	40	53.3

Tabla 7. Resumen de la purificación utilizando CAMI.

* "Fracción de VP7" se refiere a la relación de la cantidad de VP7 con respecto al total de proteína.

Optimización de la Cromatografía de Afinidad por metal inmovilizado (CAMI)

Para mejorar la pureza de VP7 se incrementó la concentración de imidazol inicial (5 mM) a 10 mM durante la carga de la columna. Esto se concluyó con base en dos observaciones en los experimentos iniciales. La primera observación fue que GP64 eluye a 10 mM de imidazol (uno de los contaminantes más importantes como ya se discutió). La segunda observación fue que a pesar de utilizar una concentración de 50 mM para lavar la columna (utilizando siete volúmenes de columna), no toda la proteína GP64 era eliminada de la columna en esta etapa y que seguía siendo un contaminante en las fracciones después de la elución con 350 mM de imidazol. Esto llevó a definir una condición más severa en la etapa de carga para evitar que GP64 se retuviera de manera inicial en la columna. Lo anterior permitió obtener una pureza del 96 % de VP7 (**Figura 46**).

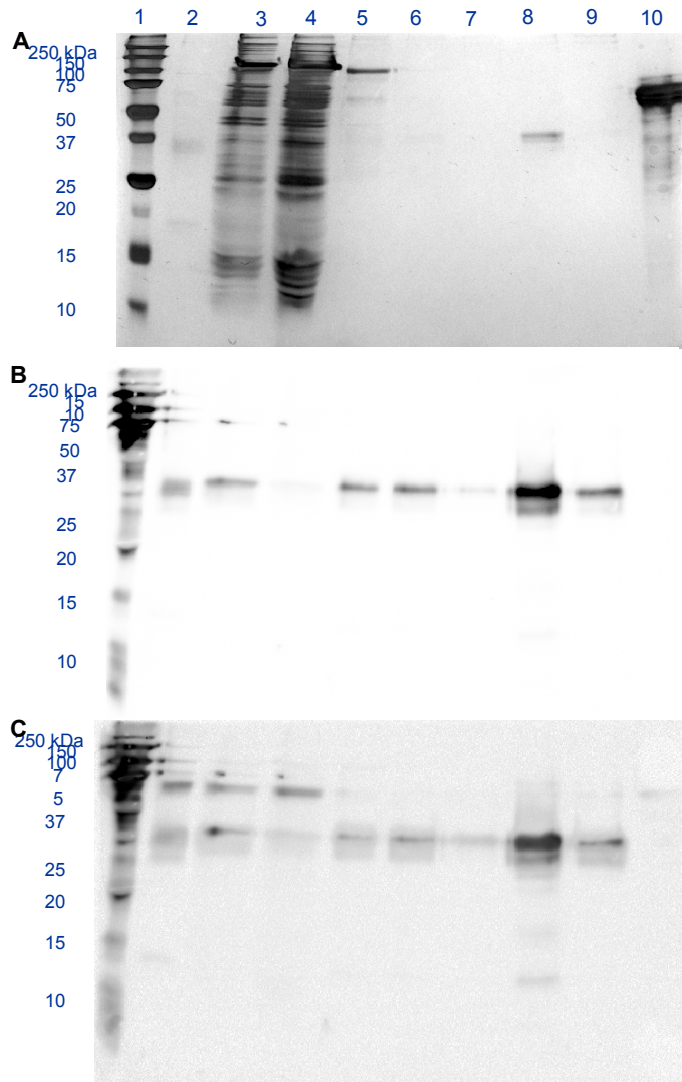


Figura 46. Gel de poliacrilamida y Western blots del proceso de purificación de VP7. 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Carga a la columna de IMAC, 4.- No retenido en la columna, 5.- Lavado de la columna con una concentración de 30 mM de imidazol, 6.- Lavado de la columna con una concentración de 50 mM, 7.- Fracción 1 de elución, 8.- Fracción 2 de la elución, 9.- Fracción 3 de la elución, 10.- Control negativo. A) Gel de poliacrilamida teñido con plata, B) Western-blot anti TLP's, C) Western-blot anti TLP's y anti GP64. Como control negativo se utilizó una muestra de sobrenadante para la producción de la proteína BacRep.

En la **Tabla 8** se presentan los resultados del proceso de purificación.

Paso	Proteína total (µg)	VP7 (µg)	Fracción VP7*	Recuperación (%)	Recuperación global (%)	Factor de purificación
Sobrenadante	389,500	6,232	0.016	100	100	1
Cambio de buffer	265,900	5,050	0.019	81	81	1.2
CAMI	2,645	2,526	0.96	50.3	40.7	60

Tabla 8. Resumen de la purificación utilizando CAMI, después de la optimización del protocolo.
 * "Fracción de VP7" se refiere a la relación de la cantidad de VP7 con respecto al total de proteína.

Verificación de la glicosilación de VP7

Para determinar la presencia de glicosilaciones en VP7 se llevó a cabo un Western-blot para detección de glicanos (**Figura 47**). Con esto se confirmó que VP7 fusionada con la cola de histidinas y producida en células de insecto H5 se encuentra glicosilada.

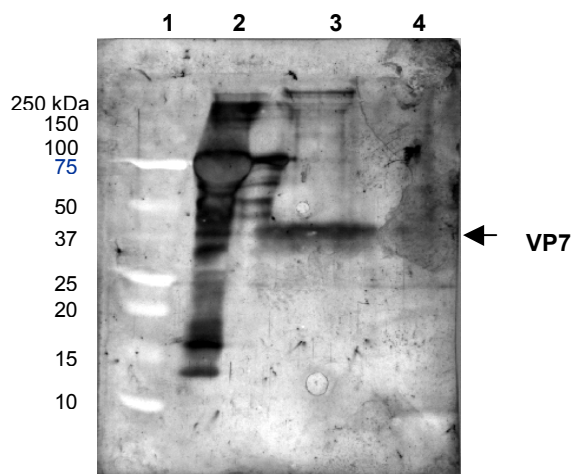


Figura 47. Western-blot para determinar la presencia de residuos glicosilados en VP7.
 1.- Marcador de peso molecular, 2.- Control positivo, 3.- Muestra de VP7 purificada, 4.- Control negativo. Como control positivo se utilizó transferrina (glicosilada), como control negativo se utilizó VP6 de rotavirus (no glicosilada).

Determinación del perfil de glicosilación de VP7

Las pruebas para determinación del perfil de glicosilación de VP7 se basaron en la digestión de los glicanos con la enzima PNG-asa F, su posterior derivatización con 2-AB y su análisis con cromatografía de interacción hidrofílica. A diferencia de las proteínas, los oligosacáridos no absorben fuertemente luz UV. Sin embargo los glicanos liberados de la proteína poseen un extremo amino reductor libre por donde pueden ser marcados con colorantes fluorescentes. Los glicanos marcados resultantes pueden entonces ser detectados, separados y cuantificados. Los fluoróforos 2-AA (ácido antranílico) y 2-AB son muy útiles en el análisis de glicanos debido a su sensibilidad y estabilidad cuando se acoplan a los glicanos. El uso de este método tiene varias ventajas; es seguro, aumenta considerablemente la sensibilidad de detección pudiendo identificar concentraciones picomolares de oligosacáridos, la pérdida de ácidos siálicos es despreciable y finalmente dado que el marcado se da en una relación de una molécula de colorante por una molécula de glicano, la intensidad de fluorescencia de un pico de oligosacárido detectado está directamente relacionada con un determinado número de moléculas, haciendo al método cuantitativo. En la **Figura 48** se presenta el cromatograma de la escalera de glicanos utilizado para determinar la relación entre unidades de glucosa y tiempo de retención. En la **Figura 49** se muestra el ajuste utilizando regresión no lineal.

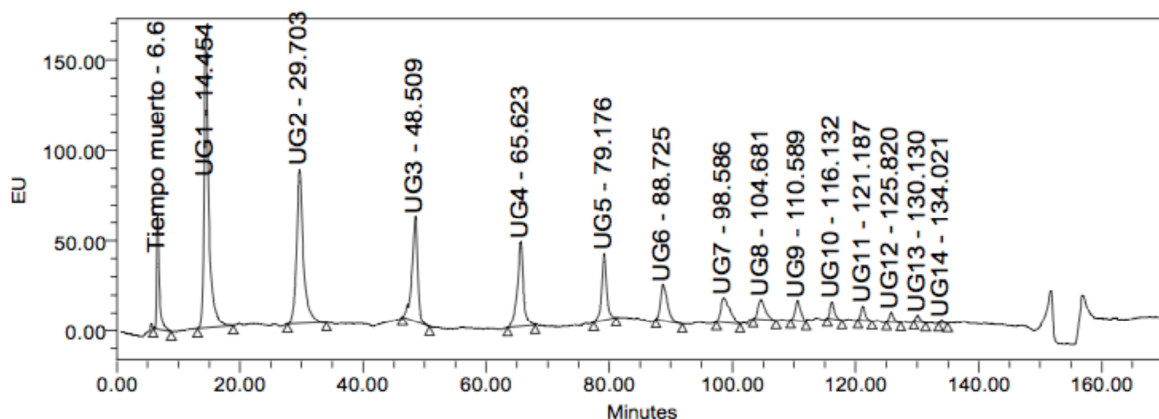


Figura 48. Escalera de glicanos.

La escalera de glicanos se utilizó para correlacionar tiempo de retención con estructura de las muestras analizadas. Gradiente Acetonitrilo:Formato de amonio. HILIC en columna amino pH 4.4

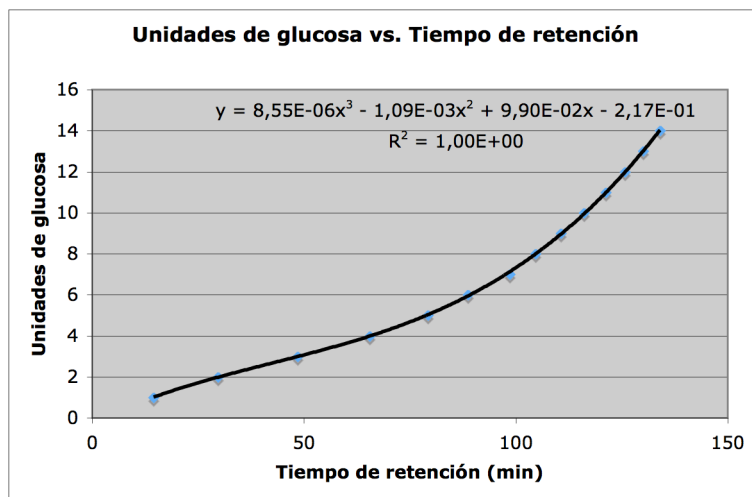


Figura 49. Ajuste de la curva para correlacionar el tiempo de retención con las unidades de glucosa. Se utilizó un polinomio de tercer orden.

La correlación entre las unidades de glucosa y el tiempo de retención se utilizó posteriormente para proponer estructuras para los glicanos encontrados en la muestra de VP7.

En la **Figura 50** se presenta el cromatograma correspondiente a la muestra derivatizada de VP7.

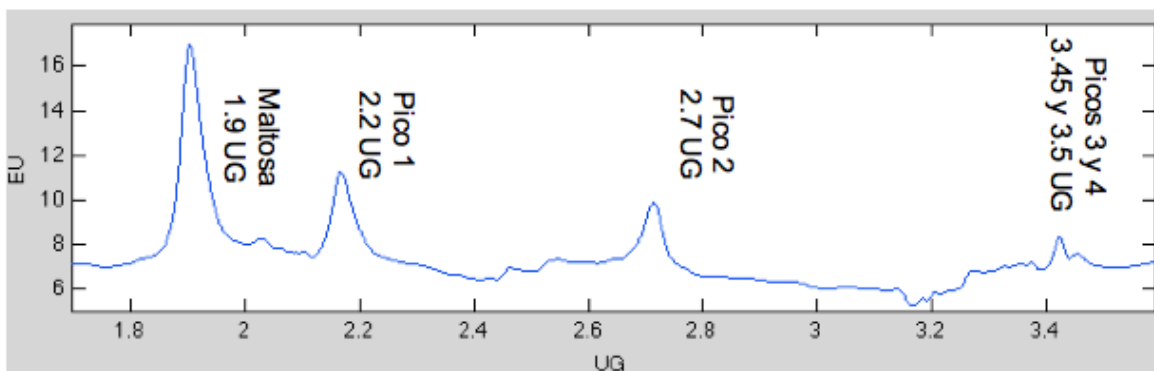


Figura 50. Cromatograma para la determinación del perfil de glicosilación en una muestra de VP7 purificada.

Las probables estructuras para los glicanos se presentan en la **Figura 51**.

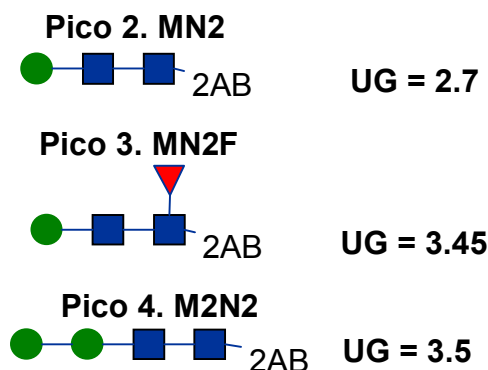


Figura 51. Estructuras probables para los glicanos de VP7.

Las estructuras propuestas en la **Figura 51** son típicas de las encontradas en otras proteínas glicosiladas producidas en células de insecto (Palomares et al. 2003). Sin embargo, será necesario incrementar la señal de los picos para confirmar estos datos. Esto podría lograrse procesando una mayor cantidad de VP7.

Se llevó a cabo la determinación del perfil de glicosilación de la proteína VP7 de rotavirus producida en células de insecto High Five®, de la misma muestra anterior pero ahora utilizando PNGasa A. Lo que motivó a utilizar la enzima PNGasa-A para llevar a cabo la hidrólisis de los glicanos presentes en VP7 fue que los resultados obtenidos mediante la utilización de la enzima PNGasa-F no era típica para una proteína producida en células de insecto (**Figura 50**) (Palomares et al. 2003). La distribución de glicanos obtenida a partir del tratamiento de VP7 utilizando PNGasa-A es mucho más amplia que la obtenida utilizando PNGasa-F.

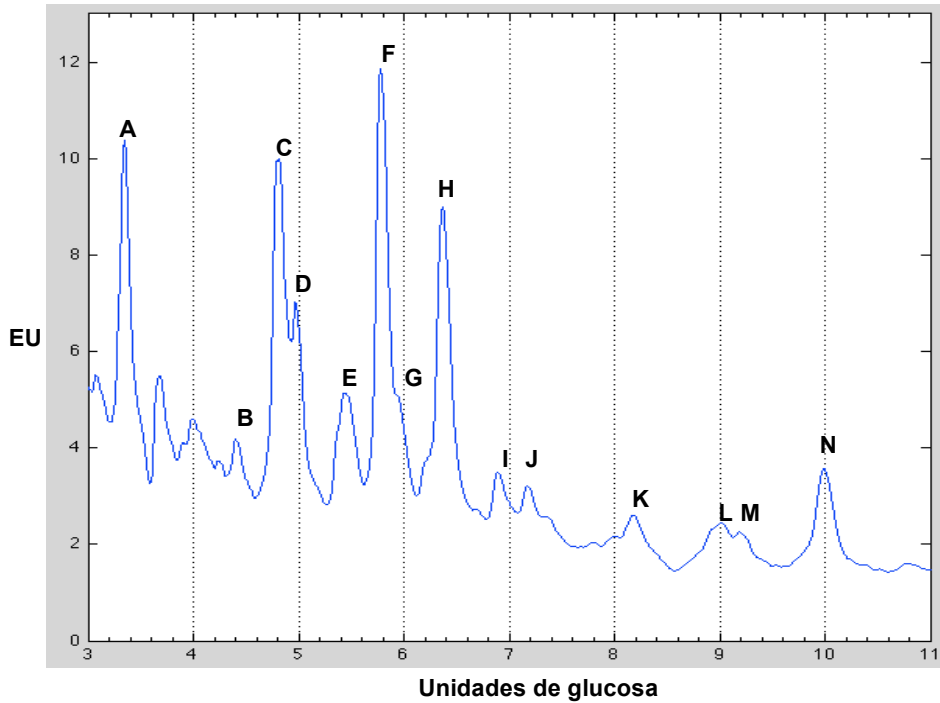


Figura 51. Cromatograma de los glicanos encontrados en VP7.

Considerando que la misma muestra de VP7 fue la utilizada en ambos casos, la diferencia podría explicarse debido a las diferencias en el proceso de tratamiento de las muestras. En el caso de la PNGasa-A se llevó a cabo la proteólisis de VP7 con tripsina, mientras que con la PNGasa-F solamente se desnaturizó la proteína. Después de llevar a cabo el tratamiento con PNGasa-A a la misma muestra se le procesó con manosidasa para liberar los residuos de manosa de las cadenas de glicanos y de esta manera permitir una mejor identificación de los glicanos (**Figura 52**). Este procedimiento facilita la asignación de estructuras debido a que los glicanos que contienen manosas son cortados y disminuye su intensidad en el cromatograma. Los datos obtenidos a partir de los cromatogramas

se compararon con los de la base de datos Glycobase: <http://glycobase.nibr.ie/cgi-bin/public/glycobase.cgi>. En esta base de datos se reportan las unidades de glucosa correspondientes a las estructuras de cientos de glicanos. Con base en los datos obtenidos para ambas muestras (tratada y sin tratar con manosidasa) se procedió a proponer estructuras para los glicanos presentes en VP7.

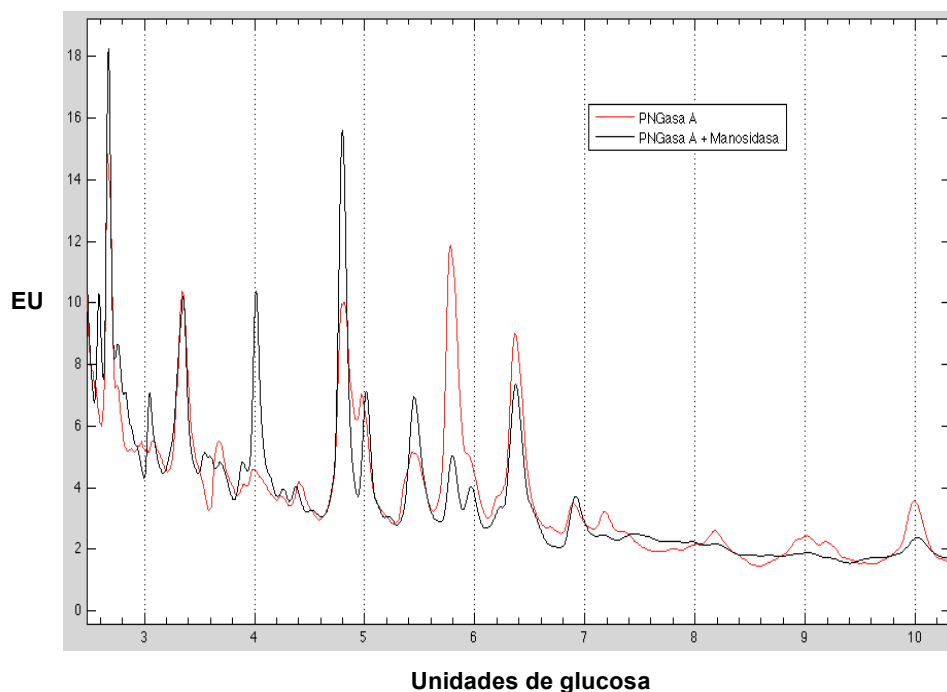


Figura 52. Tratamiento de VP7 con PNGasa –A y posteriormente con Manosidasa.

Estos resultados se resumen en la **Tabla 9**. En la parte superior se muestra la clasificación de los glicanos encontrados y su porcentaje correspondiente con respecto al total. En la parte inferior de esta figura se presentan las estructuras propuestas para los glicanos encontrados y su abundancia relativa.

Glycan type	%
Paucimannose	59.8
High manose	23.3
Hibrid	14.3
N.D.	2.6

Pico	GU	Estructura propuesta.	% del total de glicanos
A	3.35	M2N2	20.2
B	4.4	M3N2	2.1
C	4.8	M3N2F	18.5
D	5.0	NM3N2	8.6
E	5.4	NM3N2F(6)	5.7
F	5.8	M4N2F	19.0
G	6.0	N.D.	2.6
H	6.4	M5N2	13.5
I	6.9	M6N2	1.3
J	8.2	M7N2	1.3
K	9.0	M8N2	2.2
L	9.2	M9N2	1.2
M	10.0	NM9N2	3.8

Tabla 9. Perfil de glicosilación de VP7.

Las letras A-M se refieren a los picos de la figura 51.

Pruebas de dispersión dinámica de luz de VP7

Se efectuaron pruebas de dispersión dinámica de luz para determinar algunas condiciones fisicoquímicas que provocan que VP7 se agregue o autoensamble. El objetivo de este análisis fue el de detectar cambios en el tamaño de agregados/ensamblados de VP7 con diferentes condiciones. Se evaluó la concentración de VP7, el efecto de la temperatura, la presencia de iones de níquel

y de iones cobre. Para esto, el resto de las condiciones se compararon contra la condición estándar definida como 14 $\mu\text{g/mL}$ de VP7 en 30 mM Tris pH 8. 150 mM de NaCl (TBS) y 4 mM de CaCl_2 . La **Figura 52** se obtuvo utilizando una concentración de VP7 de 14 $\mu\text{g/mL}$ (Condición estándar). En la **Tabla 9** se presentan los resultados asociados a este experimento. El principal parámetro utilizado para comparar los resultados entre las distintas condiciones utilizadas es el promedio z (el “promedio z” se define en materiales y métodos) ya que este valor provee información de la distribución en su conjunto.

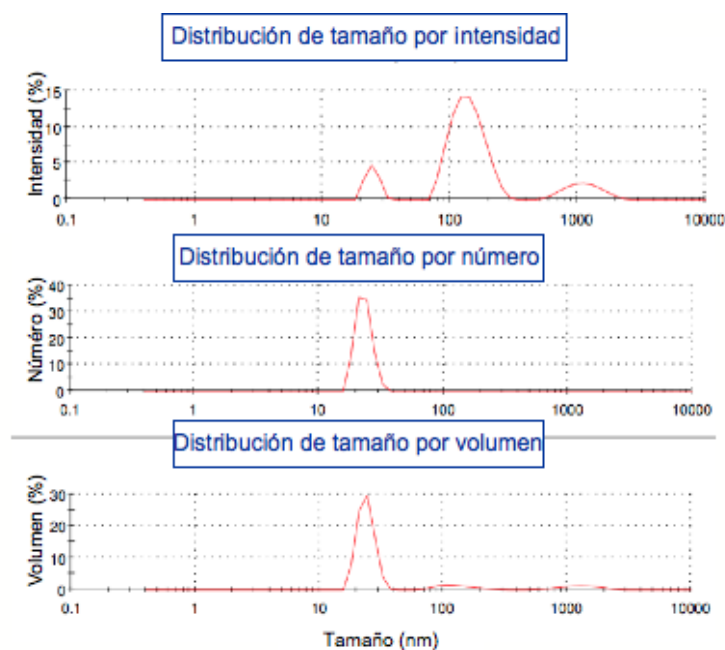


Figura 52. Dispersión dinámica de luz.VP7 14 $\mu\text{g/mL}$ Tris buffer salino (TBS) y 4 mM de CaCl_2 . (Condición estándar)

	Diámetro (nm)	% intensidad	Ancho (nm)	Promedio z
Pico 1	141.6	76.0	41.28	
Pico 2	1146	13.4	365.4	
Pico 3	24.8	10.6	2.891	
				104.9

Tabla 9. Resultados del análisis de dispersión dinámica de luz para VP7 en condición estándar.

Al aumentar la concentración de VP7 a 60 $\mu\text{g/mL}$ se observa que la distribución de pesos moleculares se desplaza hacia diámetros mayores de manera muy

importante (**Figura 53**) en relación al experimento realizado con una concentración de VP7 de 14 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 52**). Esto podría deberse a que VP7 se está autoensamblando o simplemente a un proceso de agregación causado por el incremento de concentración de VP7. Los resultados de este experimento se presentan en la **Tabla 10**. En este caso el promedio z pasó de ser 104.9 nm en la condición estándar con concentración de 14 $\mu\text{g/mL}$ a ser de 203.5 nm al incrementar la concentración de VP7 a 60 $\mu\text{g/mL}$.

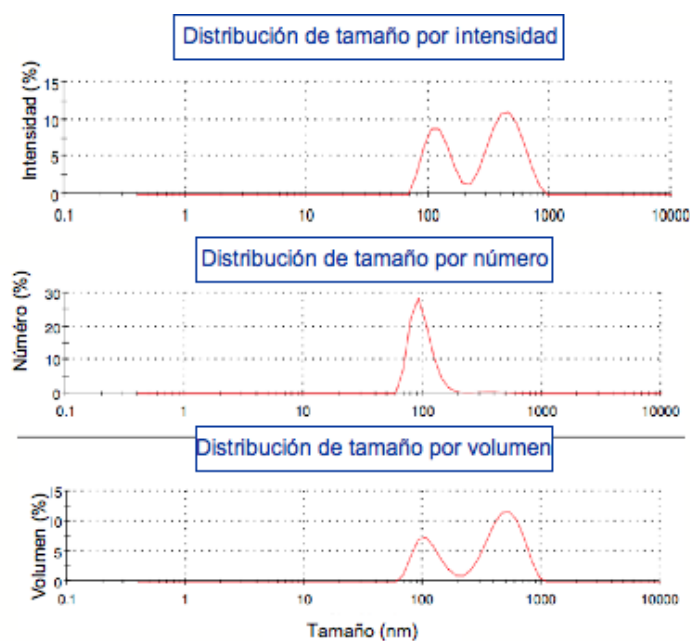


Figura 53. VP7 60 $\mu\text{g/mL}$ TBS y 4 mM de CaCl_2 . (Incremento de concentración de VP7 de 14 $\mu\text{g/mL}$ a 60 $\mu\text{g/mL}$).

	Diámetro (nm)	% intensidad	Ancho (nm)	Promedio z (nm)
Pico 1	449.9	60.0	134.5	
Pico 2	124.3	39.1	32.82	
Pico 3	0.000	0.0	0.000	
				203.5

Tabla 10. Resultados de la dispersión dinámica de luz para VP7 al incrementar la concentración de proteína.

Calentando la muestra de 14 $\mu\text{g/mL}$ hasta 60 $^{\circ}\text{C}$ también se observa que la distribución de diámetros se desplaza hacia la derecha (**Figuras 54 y 55**). Estos resultados se resumen en la **Tabla 11**. La derivada del conteo en la **Figura 55** se refiere al cambio en los fotones que impactan al fotomultiplicador del equipo de dispersión de luz dinámica. Cuando la derivada del conteo baja podría indicar precipitación de la muestra ya que ese está dispersando menos luz. El promedio z en la condición estándar fue de 104.9 nm y al calentar, este se incrementó a 221.5 nm. De la misma manera que en el aumento de concentración, esto podría deberse ya sea a un proceso de autoensamblaje o a una agregación de VP7.

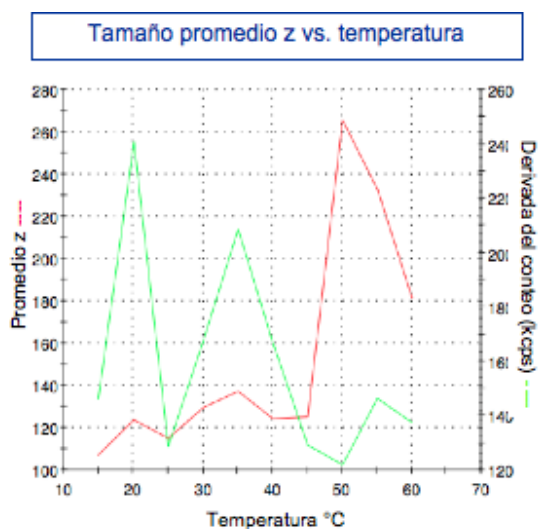


Figura 54. Tamaño promedio z en función de la temperatura para VP7 14 mM en TBS y 4 mM de CaCl_2 .

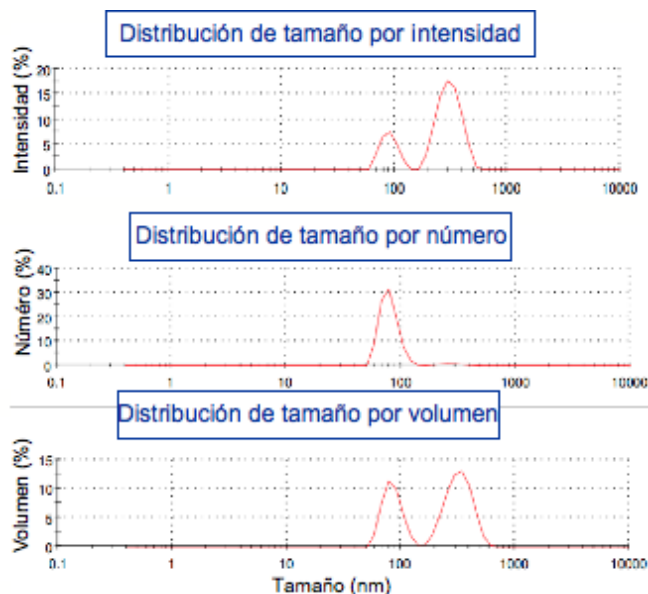


Figura 55. VP7 14 mM en TBS y 4 mM CaCl₂. Temperatura = 60 °C. (Aumento de temperatura).

	Diámetro (nm)	% intensidad	Ancho (nm)	Promedio z
Pico 1	311.7	76.3	71.87	
Pico 2	90.36	23.7	14.94	
Pico 3	0.000	0.0	0.000	
				221.5

Tabla 11. Resultados de la dispersión dinámica de luz para VP7 después de calentar a 60 °C.

Cuando se agrega NiSO₄ para llegar a una concentración de 40 mM, se observa que el tamaño de las especies presentes se incrementa de manera considerable, sugiriendo ya sea agregación o ensamblaje como en los casos anteriores (**Figura 56** y **Tabla 12**). En este caso el promedio z se incrementó de 104.9 nm a 212.3 nm.

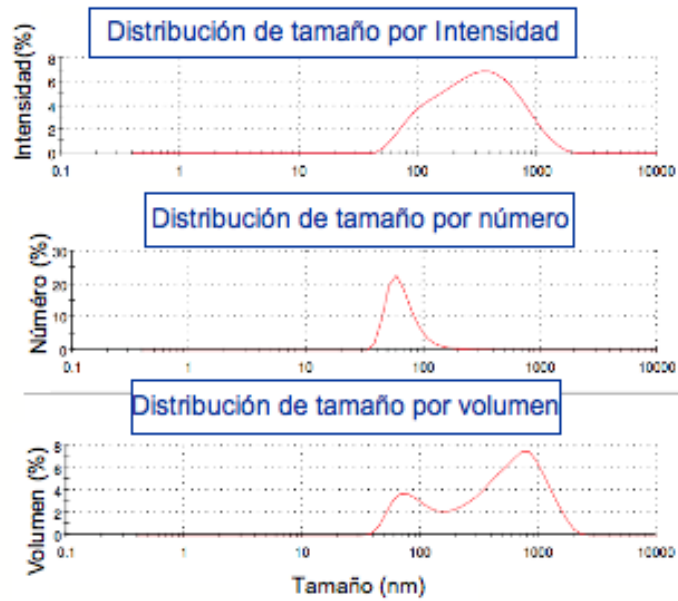


Figura 56. VP7 14 mM en TBS, 4 mM de CaCl₂ y 40 mM de NiSO₄. (Adición de NiSO₄).

	Diámetro (nm)	% intensidad	Ancho (nm)	Promedio z
Pico 1	382.8	100	293.1	
Pico 2	0.000	0.0	0.000	
Pico 3	0.000	0.0	0.000	
				212.3

Tabla 12. Resultados de la dispersión dinámica de luz para VP7 al agregar NiSO₄.

Al utilizar una concentración de 40 mM de CuSO₄ se observa un efecto similar a los casos anteriores en donde también se observaba un desplazamiento de las poblaciones hacia la derecha pero más pronunciado, alcanzando un valor para el promedio z de 1519 nm (Tabla 13 y Figura 57).

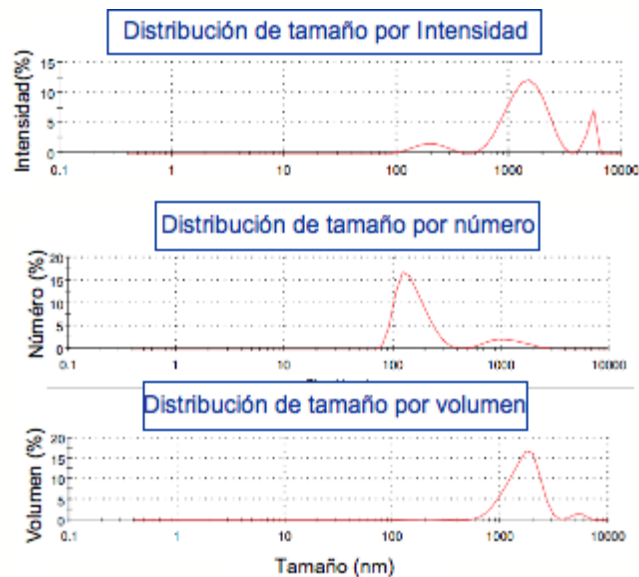


Figura 57. VP7 14 mM en TBS, 4 mM de CaCl₂ y 40 mM de CuSO₄. (Adición de CuSO₄).

	Diámetro (nm)	% intensidad	Ancho (nm)	Promedio z
Pico 1	1475	80.7	526.3	
Pico 2	5276	10.7	423.4	
Pico 3	202.5	8.6	57.80	
				1519

Tabla 13. Resultados de la dispersión dinámica de luz para VP7 al agregar CuSO₄.

En la **Tabla 14** se resumen los experimentos realizados en donde se muestra el promedio z para cada uno de ellos.

Figura	Promedio z (nm)	Concentración de VP7 (µg/mL)	Presencia de iones metálicos	Condiciones especiales
45	104.9	14	No	Ninguna
47	221.5	60	No	Ninguna
48	203.5	14	No	Se calentó la muestra a 60 °C y se enfrió a 15 °C
49	212.3	14	40 mM NiSO ₄	Ninguna
50	1519	14	40 mM CuSO ₄	Ninguna

Tabla 14. Resumen de las condiciones utilizadas en los experimentos de dispersión dinámica de luz. Se presenta el promedio z en cada caso.

En el caso del incremento en el tamaño de las poblaciones debido a la adición de iones metálicos, este fenómeno podría estar mediado por la interacción de la cola de histidinas con estos iones.

La dispersión de luz dinámica es una buena técnica para determinar radios hidrodinámicos así como para detectar cambios en el tamaño de las partículas. Sin embargo no provee mucha información sobre la forma de las partículas analizadas. Para este efecto es necesario utilizar técnicas complementarias. Por lo tanto de los experimentos fue posible concluir que las partículas formadas por VP7 sufrieron un aumento de tamaño tanto al incrementar la concentración de VP7, al calentar la muestra y al agregar iones metálicos. Pero para tener información estructural fue necesario utilizar microscopía electrónica.

Microscopía electrónica

La microscopía electrónica es una técnica de mucha utilidad en la caracterización de virus así como de agregados y ensamblados de proteínas, ya que permite no solo medir el tamaño de las partículas, sino ayudar en la caracterización e

identificación de su forma y estructura. Por este motivo se llevaron a cabo experimentos con microscopía electrónica de transmisión (MET) para las muestras que contienen cobre. Se escogió la mezcla de VP7 y CuSO_4 ya que presentó el efecto más marcado en cuanto al desplazamiento de la población en los experimentos de dispersión de luz dinámica. Se utilizaron las mismas concentraciones de proteína y sales que para las muestras utilizadas para los experimentos de dispersión dinámica de luz. En la **Figura 58** se muestra que se forman estructuras con una morfología similar.

En la **Figura 59**, se muestra el control negativo de la muestras que contienen cobre, pero en este caso no tienen VP7. Se observan estructuras muy electrodensas agregadas, probablemente debidas al cobre.

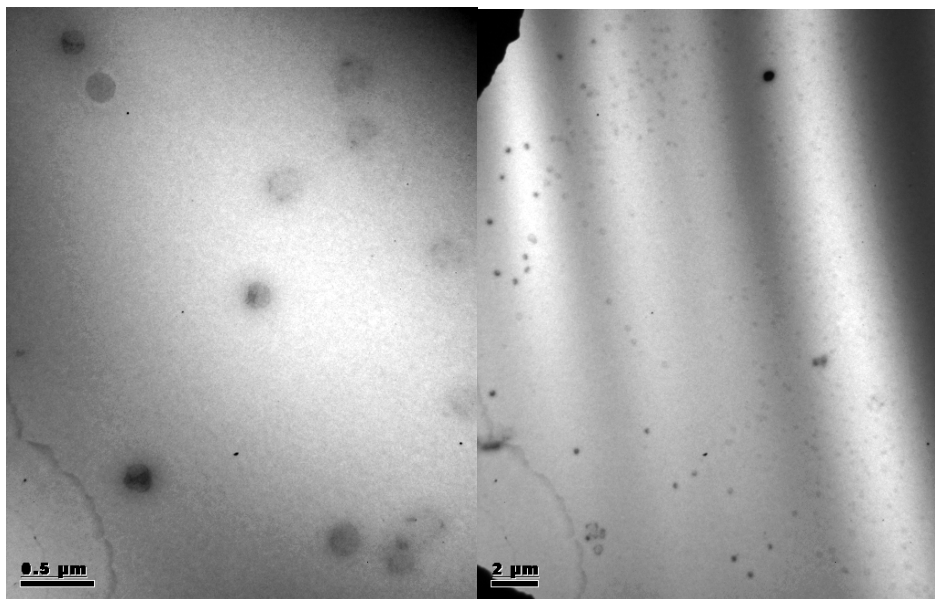


Figura 58. Microscopía electrónica de transmisión de una muestra de VP7 en TBS conteniendo CuSO_4 .

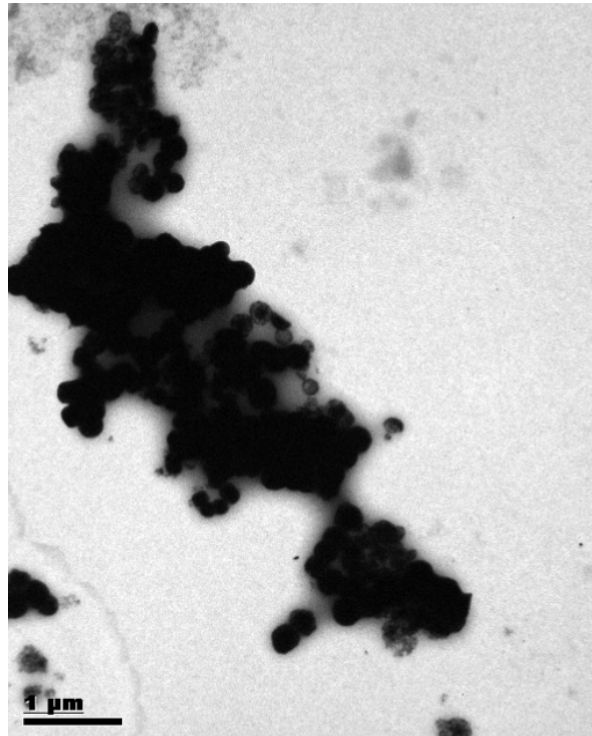


Figura 59. Control negativo sin VP7.
La muestra está en el mismo solvente que la de la figura 53, pero no contiene VP7.

Para comprobar que estas estructuras estuvieran compuestas por VP7, se llevó a cabo una inmuno-tinción con nano oro y tinción negativa con uranilo **Figura 60**. En la **Figura 61** se muestra el correspondiente control negativo. De la **Figura 60** es posible concluir que VP7 está formando estructuras aparentemente esféricas.

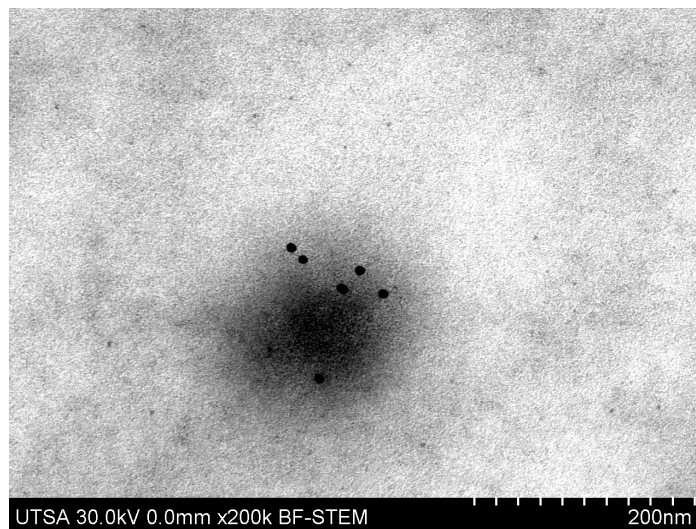


Figura 60. Inmuno-tinción con oro de una muestra que contiene VP7 y CuSO_4 .

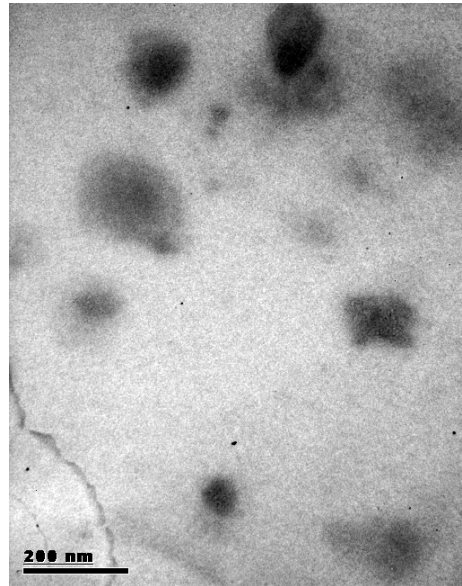


Figura 61. Control negativo de la inmunotinción correspondiente a la muestra con cobre.

Conclusiones

Las estrategias iniciales para obtener VP7 en cantidad y pureza adecuadas para llevar a cabo estudios de ensamblaje se dividieron en 3 grupos; la etapa de producción, en la cual se evaluaron 3 distintos medios de cultivo; la etapa de recuperación, en donde el enfoque principal consistió en la utilización de precipitación de proteínas y otros contaminantes mediante el uso de ácido o de base y la tercera etapa, que se enfocó a la purificación mediante cromatografía de afinidad con concanavalina, exclusión por tamaño e intercambio iónico.

En la etapa de cultivo, los dos medios en los que se logró producir VP7 fueron el Sf900 II y el Excell 405. Utilizando Excell 405, se obtiene alrededor de un 20 % más de proteína que con respecto a la utilización del medio Sf900 II. Sin embargo también se observó que con el medio Excell 405 la producción de otras proteínas también aumentó y el grado de pureza final no era significativamente diferente. Es decir, la ganancia en la producción de proteína recombinante, se opacó por el aumento en la producción de otros contaminantes.

Dentro de la etapa de recuperación, la utilización de la precipitación ácida mostró que gran parte de VP7 se precipita en este paso. Sin embargo el aspecto positivo fue que GP64 se eliminó prácticamente en su totalidad del sobrenadante. Esto es conveniente ya que como se mencionó con anterioridad, GP64 es uno de los contaminantes principales y además es muy difícil de eliminar debido a las similitudes fisicoquímicas con respecto a VP7. La utilización de la precipitación básica no provoca la pérdida de VP7 ni de GP64, y aparentemente no se precipitan otras proteínas tampoco. La pastilla sedimentada formada en este paso de precipitación se compone probablemente de ácidos nucleicos y lípidos aunque esto no se comprobó.

En cuanto a los procesos llevados a cabo con las diferentes cromatografías, se concluyó que el grado de pureza final obtenido no fue satisfactorio (En la primera estrategia de purificación) ya que en el mejor de los casos se alcanzó una pureza del 24 %. Si se analiza este proceso de purificación, se aprecia que el paso que aporta el mejor incremento de pureza es el de la Concanavalina A con un factor de purificación alrededor de 11. La Concanavalina A permite retener las proteínas

glicosiladas (como lo es VP7), este paso de purificación se utiliza en las dos estrategias reportadas hasta el momento para la purificación de VP7 (Dormitzer et al., 2000, Mellado et al., 2007). La cromatografía de exclusión por tamaño también ha sido utilizada ya en el proceso de purificación de VP7 y más que lograr un incremento de pureza apreciable, se ha empleado como una etapa para cambio de solución amortiguadora (Mellado et al., 2007). En el presente trabajo tampoco se observó un incremento importante de la pureza debido al uso de esta técnica. En el caso de GP64 (uno de los contaminantes principales y producido en altas cantidades), la cromatografía de exclusión no permitió su separación de VP7 debido que probablemente GP64 se presenta en forma de dímeros y trímeros, lo cual la coloca en tiempos de elución muy similares a VP7, la cual también forma dímeros y trímeros. Por estos motivos, a pesar de que podría pensarse que VP7 (34 kDa) podría separarse de GP64 (64 kDa) por esta técnica, en la práctica esto no sucede. La etapa final de la estrategia utilizada inicialmente fue la de intercambio iónico, esta ya había sido reportada en la literatura para llevar a cabo la purificación de VP7 (Mellado et al., 2007), sin embargo en los experimentos llevados a cabo en el presente trabajo el factor de purificación obtenido mediante el uso de esta técnica no fue satisfactorio y la pureza final de este tren de purificación fue de solo un 24 %. En particular, la separación de VP7 con respecto a GP64 resulta complicada debido a que sus puntos isoeléctricos son muy similares.

La siguiente estrategia utilizada fue la CAMI, que se basa en la afinidad del grupo imidazol de la histidina por metales como el níquel. Para ello se emplearon técnicas de biología molecular para lograr la fusión de VP7 con una cola de seis histidinas en el C-terminal. Para ello se partió del gen de VP7 de RRV clonado en el vector pGEM 3z con base al cual se generó un producto de PCR que fue ligado en un vector conteniendo la cola de histidinas y conteniendo sitios de transposición sitio-específica. En seguida se clonó este vector en el genoma del baculovirus. Después de transfectar células de insecto, fue posible obtener baculovirus recombinantes y generar un abasto viral. A partir de este nuevo baculovirus se llevaron a cabo pruebas de producción a pequeña escala en matraz

de 50 mL. Las pruebas de purificación preliminares en la cromatografía de afinidad por metal inmovilizado muestran que se elimina GP64 casi en su totalidad y que la retención de VP7 en la columna de níquel fue buena. Además se evaluó la presencia de la cola de histidinas en VP7 mediante el uso de un anticuerpo monoclonal anti 6X His.

Con base en esto se generaron abastos virales y se titularon. Posteriormente se llevó a cabo la producción de VP7 y su purificación mediante esta técnica. La pureza alcanzada mediante este proceso llegó a ser de hasta un 87 %. Llevando a cabo una optimización adicional, al incrementar la cantidad de imidazol en la carga de la columna de 5 mM a 10 mM se logró llegar a una pureza del 96 %.

Si se contrastan los procesos utilizados de manera inicial con los obtenidos a partir de CAMI, resulta que la segunda estrategia resultó en una pureza considerablemente mayor. Adicionalmente, el proceso fue mucho más rápido ya que implica un solo paso de cromatografía. La recuperación global de VP7 es de alrededor del 40 % para el proceso que utiliza CAMI y de un 30 % para el proceso que implica el uso de Concanavalina/Exclusión/Intercambio (CEI) iónico, esto representa un aumento del 33 % en la recuperación si se compara CAMI con CEI. La desventaja de la CAMI es que implica el uso de biología molecular para llevar a cabo la fusión y clonación del gen de interés. Otra posible desventaja en el uso de la fusión con la cola de histidinas resulta de que su presencia pueda modificar la actividad y/o estructura de la proteína a ser estudiada, aunque esto no fue estudiado en el presente trabajo. Sin embargo, la mayoría de las proteínas purificadas mediante esta técnica no presentan modificaciones estructurales y si se elimina la cola de histidinas mediante una proteasa, este riesgo se minimiza.

La determinación experimental del perfil de glicosilación de VP7 producido en células de insecto (H5) podría ser utilizada como una base para comenzar a explorar el efecto que tiene la glicosilación en las propiedades fisicoquímicas de VP7 así como continuar el estudio de sus características biológicas relacionadas a la presencia y al tipo de glicanos.

Se sabe que en otras proteínas el efecto de la glicosilación incrementa su estabilidad tanto frente a la degradación de proteasas, como desde el punto de

vista termodinámico; este último efecto mediante la disminución su energía conformacional. Así mismo, la glicosilación juega papeles muy importantes en el reconocimiento molecular y en la estructura proteica. Generalmente la glicosilación juega diferentes papeles en una misma proteína (Bosques et al., 2004; Imperiali et al., 1999).

En el caso de VP7 se ha sugerido mediante reconstrucciones estructurales obtenidas a partir de datos de cristalografía de rayos X combinados con resultados de crioelectromicroscopía que la cadena correspondiente al amino terminal podría estar implicada en el anclaje de VP7 con VP6 en el rotavirus y también en las interacciones entre trímeros de VP7 (**Figuras 5 y 7**). Y es este amino terminal donde precisamente se encuentra el sitio de glicosilación (**Figura 6**) (Chen et al., 2009). En algunos estudios se ha demostrado que la glicosilación modifica la rigidez de las cadenas proteicas, limitando los estados conformacionales que pueden tomar (Imperiali et al., 1999) Si la glicosilación de VP7 está implicada en la interacción de VP7 y VP6 o en el autoensamblaje de trímeros de VP7, su modificación podría ser utilizada para ajustar la estabilidad de las partículas de doble o triple capa así como de los trímeros. Ninguna de estas posibilidades se ha estudiado hasta donde yo conozco. Estos ajustes se podrían efectuar mediante la modificación química de los glicanos encontrados, la mutación del gen para alterar ya sea la posición o la presencia del sitio de glicosilación, utilizando diferentes medios de cultivo para la producción de la proteína o incluso produciendo VP7 en diferentes hospederos.

En trabajos anteriores se ha demostrado que uno de los papeles de la glicosilación en VP7 es la de facilitar su correcto plegamiento, mejorando su interacción con la proteína disulfuro isomerasa del retículo endoplásmico (Mirazimi y Svensson 1998; Mirazimi y Svensson 2000). Esto aparentemente limitaría la producción de VP7 en bacterias como E. coli. Sin embargo se ha demostrado en estudios recientes utilizando una variedad de proteínas que es posible llevar a cabo el plegamiento mediante el uso de chaperonas unidas de manera covalente a resinas cromatográficas (Antonio-Perez et al. 2012). Esto permitiría producir VP7 sin glicosilación y plegarla posteriormente, además posiblemente incrementa los

títulos de VP7 obtenidos con respecto al sistema de células de insecto/baculovirus.

En cuanto a la diferencia tan marcada en los perfiles de glicosilación obtenidos utilizando PNGasa-F y PNGasa-A, se propone que fue causada por el paso de proteólisis utilizado en el caso de la PNGasa-A (por recomendación del proveedor) que incrementó la eficiencia de corte de la enzima. Esto se explicaría si hubiera impedimento estérico en el sitio de corte, impidiendo que la PNGasa-F desglucosidara de manera eficiente. Esto daría indicios de que la cadena donde se encuentra la glicosilación se encuentra estéricamente impedida cuando VP7 no se encuentra ensamblada sobre VP6. Esto contrasta con las reconstrucciones obtenidas a partir de datos de crioelectromicroscopía, donde se muestra que esta cadena se extiende hacia VP6 en forma de gancho (**Figura 5**) (Chen et al., 2009, Trask et al. 2012). Para comprobar esto sería necesario llevar a cabo otro tipo de experimentos como resonancia magnética nuclear o utilizar simulación molecular.

En cuanto a los resultados de agregación/ensamblaje, los experimentos de dispersión dinámica de luz mostraron que la adición tanto de cobre como de níquel provocaron que el peso molecular de las especies aumentara, esto ya sea por agregación o favoreciendo el ensamblaje. Se ve un efecto similar al aumentar la concentración de la proteína y al aumentar la temperatura. Para el caso de la adición de cobre, las muestras se analizaron por microscopía y en las imágenes se observa que se forman estructuras aparentemente esféricas. Para comprobar si estas estructuras estaban formadas por VP7 se llevó a cabo una inmuno-tinción con nano oro, comprobando que sí están formadas por VP7. Este efecto podría ser explicado debido a la presencia de la cola de histidinas y su gran afinidad por el cobre. En estudios anteriores con otras proteínas se ha demostrado que es posible utilizar la presencia de una cola de histidinas para lograr autoensamblaje (Wang et al. 2006). En cualquier caso, la formación de estas estructuras, ya sea debido a la presencia de la cola de histidinas o a las propiedades intrínsecas de VP7, resulta interesante ya que estas formaciones no han sido reportadas con anterioridad. Para definir si el efecto de agregación o ensamblaje es causado por la interacción del cobre con la cola de histidinas es necesario llevar a cabo un

corte proteolítico de la fusión (en la construcción se incluyó un corte para la enzima TEV) o utilizar otro tipo de técnicas como microscopía electrónica de alta resolución. Si se comparan las estructuras observadas por medio de microscopía electrónica en el caso de las muestras que contienen cobre y VP7 con el control negativo (que no tiene VP7), en ambos casos se observa formación de partículas, pero en el caso del control negativo, estas tienen una decidida tendencia a agregarse. Es posible que la presencia de VP7 evite dicha agregación, tal vez recubriéndolas y estabilizándolas.

Perspectivas

- Llevar a cabo el corte proteolítico de la cola de histidinas en VP7 utilizando la enzima TEV y efectuar los mismos experimentos ya evaluados tanto de dispersión dinámica de luz como de microscopía para dilucidar si los efectos de agregación o ensamblaje se deben a la presencia de la cola de histidinas o son causados por propiedades intrínsecas de VP7.
- Mediante el uso de microscopía electrónica de alta resolución, dilucidar si las estructuras formadas por VP7 presentan un orden particular o se trata de agregados.
- Llevar a cabo estudios de ensamblaje cuantitativos de doble y triple capa (VP6-VP7 y VP2-VP6-VP7). El tener purificada la proteína VP7 abre la posibilidad de llevar a cabo este tipo de estudios con concentraciones conocidas de cada una de las proteínas.

Referencias

- Antonio-Pérez A, Rivera-Hernández T, Aldaz-Martínez LM, Ortega-López J. 2012. Oxidative refolding of lysozyme assisted by DsbA, DsbC and the GroEL apical domain immobilized in cellulose. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **17**:703–710.
- Aoki ST, Settembre EC, Trask SD, Greenberg HB, Harrison SC, Dormitzer PR. 2009. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. *Science* **324**:1444–7.
- Arnau J, Lauritzen C, Pedersen J. 2006. Cloning strategy, production and purification of proteins with exopeptidase-cleavable His-tags. *Nature Protocols* **1**:2326–33.
- Berg, JM. Biochemistry The Purification of Proteins Is an Essential First Step in Understanding Their Function. En: Biochemistry. 2002. W H Freeman. New York. USA.
- Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**:1513–23.
- Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schäfer F. 2011. Reprint of: Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. *Protein Expression and Purification*.
- Boisgérault F, Morón G, Leclerc C. 2002. Virus-like particles: a new family of delivery systems. *Expert Review of Vaccines* **1**:101–9.
- Bosques CJ, Tschampel SM, Woods RJ, Imperiali B. 2004. Effects of glycosylation on peptide conformation: a synergistic experimental and computational study. *Journal of the American Chemical Society* **126**:8421–5.

- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:248–54.
- Butler PJG, Durham ACH, Klug A. 1972. Structures and roles of the polymorphic forms of tobacco mosaic virus protein. *Journal of Molecular Biology* **72**:1–18.
- Calhoun SL, Speir JA, Rao ALN. 2007. In vivo particle polymorphism results from deletion of a N-terminal peptide molecular switch in tobacco mosaic virus capsid protein. *Virology* **364**:407–21.
- Carter, J. y Saunders, V., 2007. *Virology: Principles and Applications*. Wiley, Hoboken, New Jersey. USA.
- Ceres P, Zlotnick A. 2002. Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry* **41**:11525–31.
- Charlton A, Zachariou M. 2008. Immobilized metal ion affinity chromatography of histidine-tagged fusion proteins. *Methods in Molecular Biology*. **421**:137–49.
- Chen JZ, Settembre EC, Aoki ST, Zhang X, Bellamy AR, Dormitzer PR, Harrison SC, Grigorieff N. 2009. Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:10644–8.
- Dong, M. 2006. *Modern HPLC for practicing scientists*. Wiley, Hoboken, New Jersey. USA.
- Dormitzer PR, Greenberg HB, Harrison SC. 2000. Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology* **277**:420–8.
- Douglas T, Young M. 2006. Viruses: making friends with old foes. *Science* **312**:873–5.

- Dyall-Smith ML, Holmes IH. 1984. Sequence homology between human and animal rotavirus serotype-specific glycoproteins. *Nucleic Acids Research* **12**:3973–82.
- Endres D, Zlotnick A. 2002. Model-based analysis of assembly kinetics for virus capsids or other spherical polymers. *Biophysical Journal* **83**:1217–30.
- Erickson HP. 2009. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online* **11**:32–51.
- Estes MK, Cohen J. 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews* **53**:410–49.
- Fischlechner M, Donath E. 2007. Viruses as building blocks for materials and devices. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **46**:3184–93.
- Friskén BJ. 2001. Revisiting the Method of Cumulants for the Analysis of Dynamic Light-Scattering Data. *Applied Optics* **40**:4087.
- Fromantin C, Jamot B, Cohen J, Piroth L, Pothier P, Kohli E. 2001. Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally in mice, with or without the mucosal adjuvants cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin, induce a Th1/Th2-like immune response. *Journal of Virology* **75**:11010–6.
- Gaberc-Porekar V. 2001. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **49**:335–360.
- Gaussier H, Yang Q, Catalano CE. 2006. Building a virus from scratch: assembly of an infectious virus using purified components in a rigorously defined biochemical assay system. *Journal of Molecular Biology* **357**:1154–66.

- Goldmann C, Petry H, Frye S, Ast O, Ebitsch S, Jentsch KD, Kaup FJ, Weber F, Trebst C, Nisslein T, Hunsmann G, Weber T, Lüke W. 1999. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *Journal of Virology* **73**:4465–9.
- Gonçalves MAF V. 2005. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology Journal* **2**:43.
- Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, Hallberg BM, Bray J, Gileadi O, Knapp. 2008. Protein production and purification. *Nature Methods* **5**:135–46.
- Hu YC, Bentley WE, Edwards GH, Vakharia VN. 1999. Chimeric infectious bursal disease virus-like particles expressed in insect cells and purified by immobilized metal affinity chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* **63**:721–9.
- Imperiali B, O'Connor SE. 1999. Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Current Opinion in Chemical Biology* **3**:643–9.
- Jiang B, Barniak V, Smith RP, Sharma R, Corsaro B, Hu B, Madore HP. 1998. Synthesis of rotavirus-like particles in insect cells: comparative and quantitative analysis. *Biotechnology and Bioengineering* **60**:369–74.
- Johnson JE, Speir JA. 1997. Quasi-equivalent viruses: a paradigm for protein assemblies. *Journal of Molecular Biology* **269**:665–75.
- Josic D, Kovac S. 2010. Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of proteins. En: *Current protocols in protein science* . John E. Coligan (Ed): Wiley. Hoboken, New Jersey. USA.
- Kakani K, Reade R, Katpally U, Smith T, Rochon D. 2008. Induction of particle polymorphism by cucumber necrosis virus coat protein mutants in vivo. *Journal of Virology* **82**:1547–57.

- Kanesashi S -n. 2003. Simian virus 40 VP1 capsid protein forms polymorphic assemblies in vitro. *Journal of General Virology* **84**:1899–1905.
- Katen S, Zlotnick A. 2009. The thermodynamics of virus capsid assembly. *Methods in enzymology*. Elsevier. Vol. 455.
- Kay MA. 2011. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nature reviews. Genetics* **12**:316–28.
- Kipikian A., Chanock R. 1996. Rotaviruses. En: Fields Virology. 3 Edition;. Fields B., Knipe D., Howley P., (Eds). Lippincott-Raven. Philadelphia, Pennsylvania. USA.
- Koppel DE. 1972. Analysis of macromolecular polydispersity in intensity correlation spectroscopy: The Method of cumulants. *Journal of Chemical Physics*. **57**:4814-21
- Kuusinen A, Arvola M, Oker-Blom C, Keinanen K. 1995. Purification of Recombinant GluR-D Glutamate Receptor Produced in Sf21 Insect Cells. *European Journal of Biochemistry* **233**:720–726.
- Kühn S, Zipfel PF. 1995. The baculovirus expression vector pBSV-8His directs secretion of histidine-tagged proteins. *Gene* **162**:225–229.
- Lai CM, Lai YKY, Rakoczy PE. 2002. Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA and Cell Biology* **21**:895–913.
- Lee HH, Miller LK. 1978. Isolation of genotypic variants of Autographa californica nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology* **27**:754–67.
- Lichty JJ, Malecki JL, Agnew HD, Michelson-Horowitz DJ, Tan S. 2005. Comparison of affinity tags for protein purification. *Protein Expression and Purification* **41**:98–105.

- Linn S. 2009. Strategies and considerations for protein purifications. *Methods in Enzymology* **463**:9–19.
- Mateu MG. 2010. Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Engineering, Design & Selection*. **24**:53–63.
- Mathieson W, Thomas GA. 2013. Simultaneously extracting DNA, RNA, and protein using kits: is sample quantity or quality prejudiced? *Analytical Biochemistry* **433**:10–8.
- Mathieu M, Petitpas I, Navaza J, Lepault J, Kohli E, Pothier P, Prasad B V, Cohen J, Rey FA. 2001. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. *The EMBO Journal* **20**:1485–97.
- Mellado MCM, Peixoto C, Cruz PE, Carrondo MJT, Alves PM. 2008. Purification of recombinant rotavirus VP7 glycoprotein for the study of in vitro rotavirus-like particles assembly. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **874**:89–94.
- Mena, J.A. 2007. Desarrollo de estrategias racionales de producción de pseudopartículas virales en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis doctoral. Programa de posgrado en ciencias bioquímicas. (Instituto de Biotecnología-UNAM).
- Mirazimi A, Svensson L. 1998. Carbohydrates facilitate correct disulfide bond formation and folding of rotavirus VP7. *Journal of Virology* **72**:3887–92.
- Mirazimi A, Svensson L. 2000. ATP is required for correct folding and disulfide bond formation of rotavirus VP7. *Journal of Virology* **74**:8048–52.
- Monie A, Hung C-F, Roden R, Wu T-C. 2008. Cervarix: a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. *Biologics: Targets and Therapy* **2**:97–105.

- Nobmann U, Connah M, Fish B, Varley P, Gee C, Mulot S, Chen J, Zhou L, Lu Y, Shen F, Yi J, Harding SE. 2007. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* **24**:117–28.
- O'Reilly D, Miller L, Luckow V. 1994. Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. Oxford university press. New York, New York. USA.
- Patton JT, Spencer E. 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* **277**:217–25.
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. 2006. Principles and Applications of the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System En: Cell culture technology for pharmaceutical and cell-based therapies. Ozturk SS, Wu WS. (Eds). CRC Press. Boca Raton, Florida. USA.
- Palomares LA, Joosten CE, Hughes PR, Granados RR, Shuler ML. 2003. Novel insect cell line capable of complex N-glycosylation and sialylation of recombinant proteins. *Biotechnology progress* **19**:185–92.
- Palomares, Laura A., Estrada-Mondaca, Sandino., Ramírez, Octavio T. 2004. Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions En: Methods in Molecular Biology: Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols. Balbás P. And Lorence A. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. USA.
- Plascencia-Villa G, Saniger JM, Ascencio JA, Palomares LA, Ramírez OT. 2009. Use of recombinant rotavirus VP6 nanotubes as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. *Biotechnology and Bioengineering* **104**:871–81.
- Rabe M, Verdes D, Seeger S. 2011. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* **162**:87–106.

- Rhiel M, Mitchell-Logean CM, Murhammer DW. 1997. Comparison of *Trichoplusia* ni BTI-Tn-5B1-4 (high five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **55**:909–20.
- Royle L, Dwek RA, Rudd PM. 2006. Determining the structure of oligosaccharides N- and O-linked to glycoproteins. En: *Current protocols in protein science* . John E. Coligan (Ed): Wiley. Hoboken, New Jersey. USA.
- Rosenberg I. 2005. Protein analysis and purification: benchtop techniques. Birkhäuser. Boston, Massachusetts USA.
- Ruiz MC, Charpilienne A, Liprandi F, Gajardo R, Michelangeli F, Cohen J. 1996. The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *Journal of Virology* **70**:4877–83.
- Saugar I, Irigoyen N, Luque D, Carrascosa JL, Rodríguez JF, Castón JR. 2010. Electrostatic interactions between capsid and scaffolding proteins mediate the structural polymorphism of a double-stranded RNA virus. *The Journal of Biological Chemistry* **285**:3643–50.
- Serrato JA, Palomares LA, Meneses-Acosta A, Ramírez OT. 2004. Heterogeneous conditions in dissolved oxygen affect N-glycosylation but not productivity of a monoclonal antibody in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **88**:176–88.
- Schmidt M, Tuominen N, Johansson T, Weiss SA, Keinänen K, Oker-Blom C. 1998. Baculovirus-mediated large-scale expression and purification of a polyhistidine-tagged rubella virus capsid protein. *Protein Expression and Purification* **12**:323–30.
- Siddiqui MAA, Perry CM. 2006. Human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine (Gardasil). *Drugs* **66**:1263–71; discussion 1272–3.

- Smith M, Jessee J, Landers T, Jordan J. 1990. High efficiency bacterial electroporation: 1×10^{10} *E. coli* transformants/ μg , *Focus*, **12**, 38
- Singh S, Zlotnick A. 2003. Observed hysteresis of virus capsid disassembly is implicit in kinetic models of assembly. *The Journal of Biological Chemistry* **278**:18249–55.
- Singh P, Gonzalez MJ, Manchester M. 2006. Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Development Research* **67**:23–41.
- So LL, Goldstein IJ. 1967. Protein-carbohydrate interaction. IV. Application of the quantitative precipitin method to polysaccharide-concanavalin A interaction. *The Journal of Biological Chemistry* **242**:1617–22.
- Thomas H., Carman W. F. 2000. Hepatitis B vaccine. United States Patent. No. 6,099,840.
- Toriniwa H, Komiya T. 2011. Comparison of viral glycosylation using lectin blotting with Vero cell-derived and mouse brain-derived Japanese encephalitis vaccines. *Vaccine* **29**:1859–62.
- Trus BL, Cheng N, Newcomb WW, Homa FL, Brown JC, Steven AC. 2004. Structure and polymorphism of the UL6 portal protein of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* **78**:12668–71.
- Tsai S-M, Chiang Y-C, Chin L-T, Liu H-J, Wang C-Y. 2011. Novel post-translational modifications of the hemagglutinin and neuraminidase proteins of avian influenza virus expressed by *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Virological Methods*.
- Urabe M, Ding C, Kotin RM. 2002. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Human Gene Therapy* **13**:1935–43.

- Wang AA, Lee J, Jenikova G, Mulchandani A, Myung N V, Chen W. 2006. Controlled assembly of multi-segment nanowires by histidine-tagged peptides. *Nanotechnology* **17**:3375–9.
- Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson A-L, Clements JD, Rose RC. 2003. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *Journal of Virology* **77**:8702–11.
- Waugh DS. 2005. Making the most of affinity tags. *Trends in Biotechnology* **23**:316–20.
- Whitford, David. 2005. Protein expression, purification and characterization. In: *Proteins: structure and function*. Wiley
- Wong KTK, Peter CH, Greenfield PF, Reid S, Nielsen LK. 2000. Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: The cell yield concept. *Biotechnology and Bioengineering* **49**:659–666.
- Zhang W, Carmichael J, Ferguson J, Inglis S, Ashrafian H, Stanley M. 1998. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *Escherichia coli*: denaturation, renaturation, and self-assembly of virus-like particles in vitro. *Virology* **243**: 423-31.
- Zhou H, Yao G, Cui S. 2010. Production and purification of VP2 protein of porcine parvovirus expressed in an insect-baculovirus cell system. *Virology Journal* **7**:366.
- Zlotnick A, Johnson JM, Wingfield PW, Stahl SJ, Endres D. 1999. A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. *Biochemistry* **38**:14644–52.
- Zlotnick, Adam. 2003. Are weak protein-protein interactions the general rule in capsid assembly? *Virology* **315**: 269-74.

