



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Biología

Optimización de la Biosíntesis de la Proteína Cas12a
proveniente de *Acidaminococcus sp* para su aplicación
en CRISPR-Cas.

T E S I S

QUIEN PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

P R E S E N T A:

ORLANDO SEBASTIAN GOMEZ QUINTERO

Jurado de Examen

DIRECTOR: DR. ARMANDO HERNÁNDEZ GARCÍA

ASESOR: DR. HUGO LOPEZ MUÑOZ

ASESOR: DR. DANIEL OCTAVIO REYES HERNANDEZ

SINODAL: DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

SINODAL: DR. HUGO LOPEZ MUÑOZ

SINODAL (SUPLENTE): M EN C. REYNALDA ROLDÁN PEREZ

SINODAL (SUPLENTE): DR. DANIEL OCTAVIO REYES HERNANDEZ





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.

Agradecimientos

En el presente trabajo quiero agradecer al **Programa UNAM-PAPIIT IN210121** por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto de tesis.

Al Instituto de Química por darme la oportunidad de desarrollar dicho trabajo en sus instalaciones donde amplíe mis conocimientos y mi gusto por la ciencia. Al Doctor Armando Hernández por brindarme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, guiarme y acompañarme durante el proyecto en cuestión. Por ser una inspiración para mi desarrollo en la ciencia.

A Erika Deyanira y Luis Antonio por siempre acompañarme y brindarme todo su apoyo y amor incondicional en el trayecto de mi vida tanto estudiantil como en general. Gracias por estar conmigo durante todos los momentos que se han presentado. Por enseñarme que nunca debo rendirme y ser una inspiración y ejemplo para mejorar cada día .

A Orlando Gómez López que sin duda ha sido una de mis grandes inspiraciones y nunca me ha dejado solo en este recorrido, compartiendo sus conocimientos y aprendiendo junto conmigo. Gracias por siempre acompañarme en la búsqueda de soluciones que la vida nos presenta. A Teresa Torres quien sin importar las circunstancias siempre me ha escuchado y preocupado por mí.

A mis asesores el Dr. Hugo y el Dr. Octavio, quienes de igual manera me acompañaron durante este proceso, demostrando su apoyo y compartiendo sus valiosos conocimientos, de igual manera a la Maestra Reynalda y al Dr. Jorge Flavio.

A mis asesores del Bionano Gustavo Valdés y Melissa Morales, quienes sin dudarlos me acompañaron y compartieron sus conocimientos conmigo, nunca me dejaron solo y son la razón de que hoy este terminando este proyecto. Gracias por todas las risas y los momentos que se presentaron al realizar este proyecto. Sin dudarlos ustedes son una gran inspiración para mí y siempre tratare de ser como ustedes.

A los miembros del Bionano, Ximena, Odi, Eddie, Jesuso, Idalia, Andrés, Rouss, Karen, Marco y Mario, por todos los momentos que hemos compartido y las veces que han brindado su apoyo y me han hecho sentir parte del Lab. El tiempo que hemos compartido ha sido muy valioso para mí.

A todos mis amigos que han estado presentes y me han alentado a seguir. A Odiseo por ser ese amigo incondicional con el que se pueden compartir y pasar los momentos tanto buenos como malos, por todas las risas, los chistes y el apoyo. A Osmar, Alex y Roberto por recibirme como su amigo, por todos los planes y noches de juego que compartimos. A Mauricio Calderón por ser tan paciente, explicarme lo que no me quedaba claro y escucharme todas las veces que lo necesite. A Pedro Gutiérrez por siempre confiar en mí. A Alexa Robles por ser una amiga incondicional, siempre escuchar los problemas que se me presentaban y acompañarme en todos los momentos sin importar que tan difíciles fueran.

A Luis Abel Bastida por estar presente durante los momentos de estrés o de felicidad y siempre aconsejarme desde el conocimiento que posee del mundo académico, por impulsarme en este camino, preocuparse y siempre creer en mí. A Marian Bastida por siempre estar presente y hacerme reír en todos los momentos que compartimos.

A Pixqui y Nymeria por acompañarme en mis desvelos y darme aliento con su amor incondicional y esas sonrisas que siempre tienen, por estar conmigo en todo momento y recordarme que sin importar lo que pase ellas siempre estarán presentes para mí.

Índice

Introducción	5
Antecedentes	6
Sistemas CRISPR-Cas	9
Sistemas CRISPR-Cas Clase 2	10
AsCas12a (Cpf1)	12
Aplicaciones de la Proteína AsCas12a	12
Expresión de Proteínas Recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	14
Planteamiento del Problema	15
Pregunta de Investigación	15
Hipótesis	15
Objetivos	16
Generales	16
Particulares	16
Materiales y Métodos	16
Diseño de Estudio	16
Universo (Población o Muestra)	18
Variables	18
Técnicas o Instrumentos	18
Análisis Estadístico	18
Producción del Plásmido	19
Transformación de las Cepas de <i>E. coli</i>	19
Ensayos de SDS-PAGE	20
Análisis Densitométricos	20
Determinación de la Concentración Óptima de IPTG	20
Determinación de la Temperatura Óptima de Post- Inducción	21

Determinación del Medio de Cultivo Óptimo	22
Suplementación del Cultivo con Glucosa	23
Determinación de la Cepa Óptima	23
Cinéticas de DO y Biosíntesis de AsCas12a	24
Producción y Purificación de la Proteína en 1L de cultivo	25
Evaluación de la Actividad Nucleasa (<i>Cis</i>)	26
Evaluación de la Actividad Nucleasa (<i>Trans</i>) /	
Ensayo de Detección Molecular	27
Resultados y Discusión	27
Determinación de la Concentración Óptima de IPTG	27
Determinación de la Temperatura Óptima de Post-	30
Inducción	
Determinación del Medio de Cultivo Óptimo	32
Efecto de la Suplementación con Glucosa	34
Determinación de la Cepa de <i>E. coli</i>	35
Cinéticas de DO y Biosíntesis de AsCas12a	38
Biosíntesis en 1 L de cultivo y Purificación.	43
Evaluación de la Actividad Nucleasa (<i>cis</i>)	46
Evaluación de la Actividad Nucleasa (<i>trans</i>) /	48
Ensayo de Detección Molecular	
Conclusiones	50
Referencias	51

Introducción

El sistema *CRISPR*-Cas12a (anteriormente conocido como Cpf1) es una poderosa herramienta molecular utilizada para edición del genoma, diagnóstico molecular y muchas otras aplicaciones tanto biotecnológicas como biomédicas.^{1,2,3}

CRISPR-Cas12a posee propiedades importantes que han convertido a este sistema en una alternativa viable ante el ampliamente usado sistema *CRISPR*-Cas9.⁴ El crRNA presente en Cas12a es más corto que el que se usa en Cas9 (40-44 vs 100 nucleótidos). Además, corta de manera escalonada el DNA de doble cadena (dsDNA) y presenta una mayor afinidad por las secuencias de dsDNA con una constante de disociación (K_D) que se encuentra en el orden de femtomolar. Aunado a esto, presenta una actividad de corte *trans*, también conocida como actividad colateral, contra cualquier DNA de cadena sencilla (ssDNA) que se encuentre en el medio.^{5,6,7,8} Todas estas características convierten a la proteína Cas12a en una excelente opción para llevar a cabo investigación básica o para el desarrollo biotecnológico y biomédico.

Debido a la gran cantidad de aplicaciones que presenta el sistema *CRISPR*-Cas12a, la producción a pequeña escala y la obtención de un alto rendimiento de la proteína Cas12a resulta ser un asunto de gran interés para muchos laboratorios. Aunque hoy en día Cas12a se está convirtiendo en una proteína ampliamente utilizada alrededor del mundo, la falta de estudios enfocados en la producción recombinante, particularmente a escala de laboratorio es notoria. Diversos grupos de investigación han reportado la producción recombinante de proteínas Cas12a^{5,6,9,10}, pero muy pocos estudios se han dedicado a describir protocolos para la biosíntesis de Cas12^{11,12} (particularmente enfocados la proteína Cas12a proveniente de *Francisella novicida*, FnCas12a). Sin embargo, un estudio sistemático de la expresión y producción de Cas12 y de otros ortólogos relevantes como AsCas12a no han sido reportados a la fecha. Por todo esto, el estudio de la producción recombinante de las proteínas Cas12a es requerido para facilitar toda investigación relacionada con el sistema *CRISPR*-Cas12a.

En este proyecto estudiamos diversas condiciones que permiten la biosíntesis recombinante de AsCas12a usando *E. coli* como nuestro sistema de expresión y buscamos condiciones optimizadas que permitan mayor expresión. Ya que encontrar los valores óptimos para obtener un mejor rendimiento de expresión de la proteína AsCas12a supondría una mayor cantidad de materia prima para llevar a cabo tanto investigaciones básicas como investigaciones y desarrollo biomédico y biotecnológico. Finalmente comparamos las condiciones optimizadas con las condiciones que eran utilizadas en un inicio para la producción heteróloga de esta proteína. Se evaluaron condiciones tales como el efecto de la cepa de *E. coli* a utilizar, la concentración de IPTG, el medio de cultivo que se utiliza para la expresión, la suplementación del medio de cultivo con glucosa y la temperatura de post-inducción.

Antecedentes

Sistemas *CRISPR-Cas*

Los sistemas *CRISPR-Cas* son sistemas inmunes adaptativos de bacterias y arqueas ya que ayudan a combatir de manera activa los ataques de Agentes Genéticos Móviles (AGM) extraños, como lo son los bacteriófagos.¹³ El descubrimiento de este sistema reveló la capacidad de estos microorganismos para añadir a su genoma secuencias genéticas provenientes de los AGM's lo cual les permite generar un intercambio de información entre el ambiente y su genoma.¹³ Al integrar dichas secuencias provenientes de los AGM's a los conocidos "arreglos *CRISPR*" los organismos que cuentan con este sistema de defensa generan una memoria de los ataques genéticos extraños previos, permitiendo una rápida respuesta a eventos generados por los mismos AGM's (Figura 1).

La conformación de los arreglos *CRISPR* tiene dos elementos de gran importancia: por un lado, tenemos el *CRISPR*-locus conformado por repeticiones las cuales son secuencias cortas y conservadas que se encuentran colocadas de manera estratégica entre secuencias únicas conocidas como espaciadores, las

cuales provienen del material genético de los AGMs, por otro lado se encuentran las secuencias necesarias para la síntesis de las proteínas Cas las cuales llevan a cabo el proceso de integración del material genético de los AGMs a los espaciadores, así como el corte del material genético exógeno que es detectado durante un evento de infección tanto en arqueas como bacterias.¹⁴ La inmunidad adaptativa de los procariotas, dada por los sistemas *CRISPR-Cas*, es conseguida mediante la formación de complejos de nucleasas guiadas por RNA que actúan como complejos efectores que son capaces de detectar la infección causada por un DNA extraño que haya sido incorporado previamente a los arreglos *CRISPR* (Figura 1).¹⁵

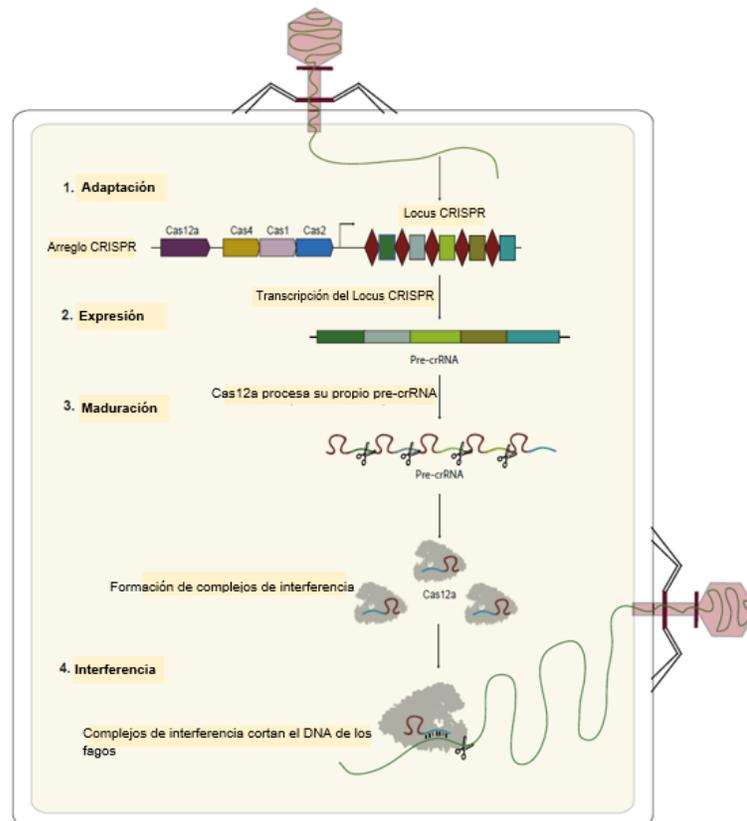


Figura 1. Esquema general de las etapas que siguen los sistemas CRISPR-Cas. Obtenida de: Paul, B., & Montoya, G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. Biomedical Journal. (2020).

Los sistemas *CRISPR-Cas* han sido clasificados en dos clases (clase 1 y clase 2) (Figura 2) dependiendo del número de proteínas Cas necesarias para la

formación del complejo ribonucleoproteico (RNP) y han sido subdivididos en seis tipos los cuales van del 1 al 6. Los sistemas de clase 1 (conformados por los tipos I, III y IV) usan diversas proteínas Cas para formar el RNP encargado de la integración y degradación del material genético de los AGMs mientras que los sistemas de clase 2 (conformados por los tipos II, V y VI) solo requieren de una sola proteína Cas. ¹⁶ Los sistemas de clase 1 han sido identificados tanto en arqueas como en bacterias y conforman aproximadamente el 90% de los *CRISPR*-locis identificados hasta hoy, mientras que los sistemas de clase 2 conforman aproximadamente el 10% restante de los *CRISPR*-locis, han sido identificados casi exclusivamente en bacterias y ensamblan su RNP con un *CRISPR* RNA (crRNA) el cual contiene la información para detectar una secuencia específica de DNA y una única proteína Cas. ¹⁵

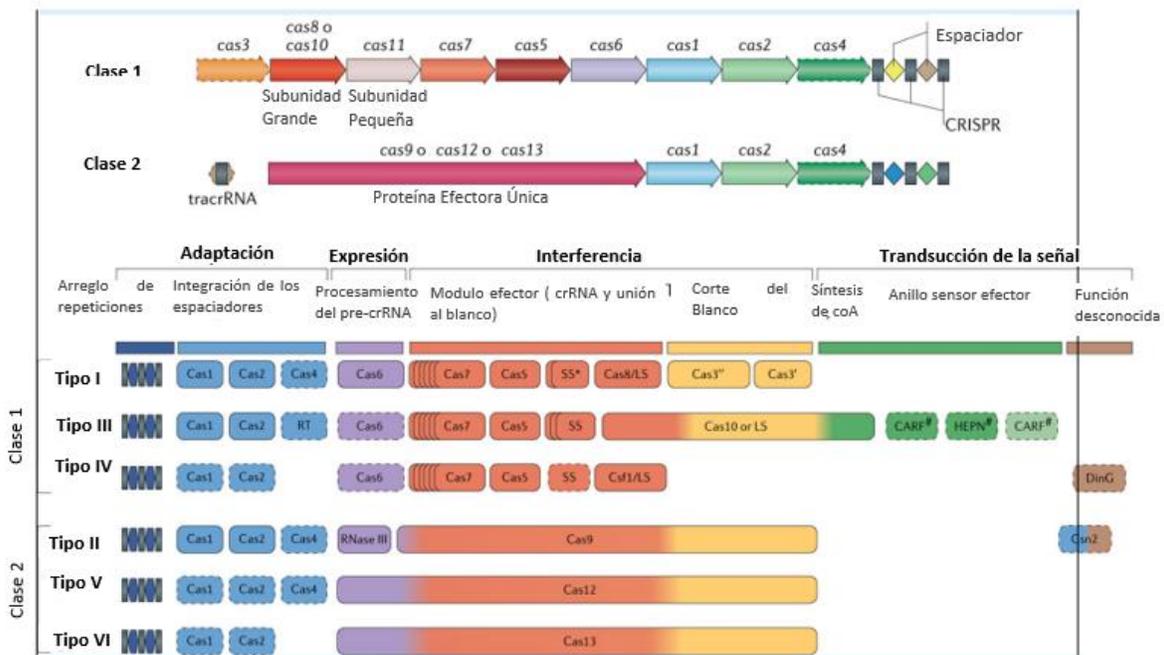


Figura 2. Aproximación de la clasificación de los sistemas *CRISPR*-Cas y principales características para su jerarquización. Imagen obtenida de: Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksnys, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., Yan, W., ... Koonin, E. V. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature reviews. Microbiology*, 18(2), 67–83. (2020).

Estas proteínas efectoras multidominio logran generar la interferencia mediante la complementariedad dada entre el crRNA y la secuencia diana posterior al reconocimiento de la secuencia del Motivo Adyacente al Proto-espaciador (PAM del inglés *Protospacer Adjacent Motif*) el cual se encuentra adyacente a la secuencia del DNA diana¹⁷ y permite la activación de la actividad nucleasa del complejo RNP, dando pie al corte del DNA de los AGM's involucrados en el proceso de infección.

Sistemas CRISPR-Cas de Clase 2

La gran versatilidad de los sistemas CRISPR-Cas clase 2 ha llevado a su aplicación como una poderosa herramienta de la biología molecular para diversos fines como la edición genética, el diagnóstico molecular, la bionanotecnología, entre otros. Esto debido a la gran programabilidad que presentan al ser provistos con crRNA's diseñados para reconocer específicamente secuencias de interés abriendo así una nueva gama de posibilidades para la biología molecular y otras disciplinas relacionadas¹⁸. El sistema de clase 2 que se encuentra mejor caracterizado hoy en día es el tipo II-A proveniente de *Streptococcus pyogenes* el cual usa la proteína SpCas9 (Figura 3) la cual fue la primera proteína *CRISPR* que se aplicó para edición genética.¹

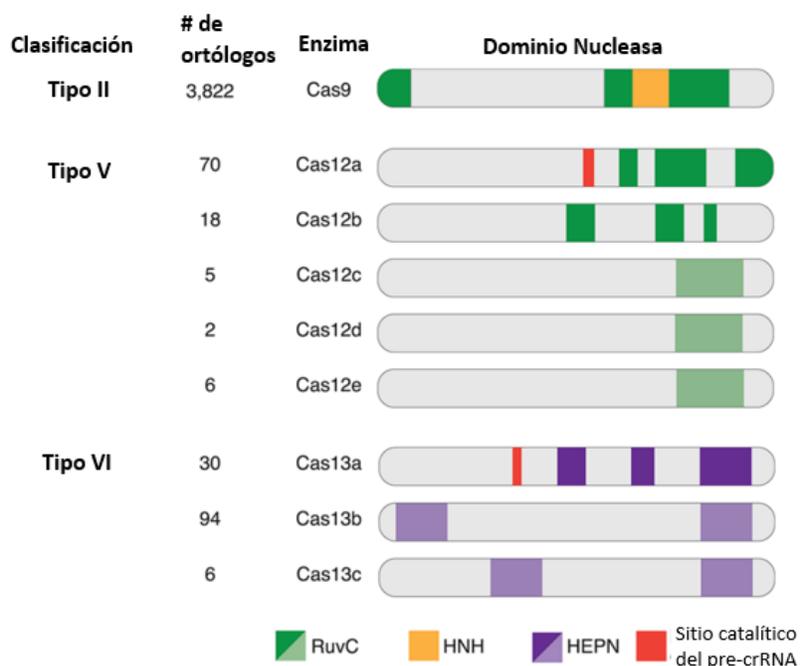


Figura 3. Representación esquemática de los sistemas CRISPR-Cas clase dos con una única proteína efectora y sus sitios catalíticos confirmados o predichos. Obtenida de: Pyzocha, N. K., & Chen, S. Diverse Class 2 CRISPR-Cas Effector Proteins for Genome Engineering Applications. ACS chemical biology, 13(2), 347–356. (2018).

Mientras que la clase 2 tipo V esta subdivida en 4 subtipos (V-A, V-B, V-C, V-U), de los cuales al día de hoy V-C y V-U no cuentan con información estructural relevante ni con una caracterización funcional que permita comprender de una mejor manera su funcionamiento. Por el otro lado V-A contiene a la proteína Cas12a (conocida previamente como Cpf1) la cual se encuentra bien caracterizada debido a la existencia de múltiples estructuras de alta resolución que permitieron un mejor entendimiento de su funcionamiento y conformación estructural (Figura 3).⁸

AsCas12a (Cpf1)

La endonucleasa AsCas12a se encuentra clasificada como parte del sistema CRISPR-Cas clase 2 tipo V esto debido a que es la única proteína efectora que es utilizada para el corte del DNA. Dicha proteína forma un RNP junto con un crRNA (también llamado RNA guía o gRNA) el cual guía al complejo RNP para realizar un corte altamente específico de las dos hebras de DNA posterior a la unión de alta afinidad que ocurre entre el complejo RNP y el dsDNA, cuyo K_D es de 54 fM.^{5,10}

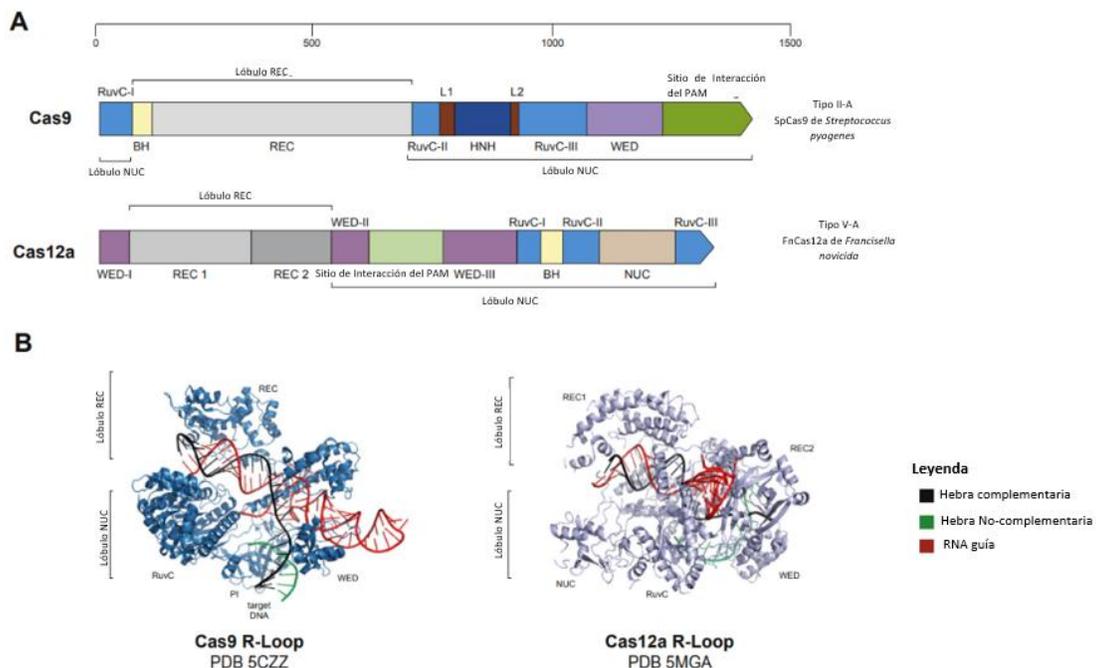


Figura 4. A) Organización de los Dominios de las Proteínas Cas9 y Cas12a. B) Estructura de las Proteínas Cas9 y Cas12. Obtenida de: Paul, B., & Montoya, G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. Biomedical Journal. (2020).

AsCas12a funciona particularmente bien para genomas que resultan ricos en timinas, ya que reconoce el sitio PAM 5' TTTV 3'¹⁹. Además, se encuentra conformada por 1,307 residuos de aminoácidos, lo que le confiere un peso molecular de 151.2 kiloDaltones (kDa). Es una proteína bilobular que se encuentra conformada por los lóbulos REC y NUC^{6,7} (Figura 4). El lóbulo NUC contiene los dominios RuvC-I, II y III los cuales son los responsables de llevar a cabo el corte del dsDNA, mientras que el lóbulo REC está conformado por Helical-I y Helical-II los cuales son los encargados del reconocimiento de la secuencia diana de dsDNA.⁷ AsCas12a presenta ciertas diferencias significativas cuando es comparada con SpyCas9 (Tabla 1).

Tabla 1. Diferencias entre las proteínas Cas9 y Cas12a

Proteína	Cas9	Cas12a
Masa (kDa)	158.3	151.2
Tipo de gRNA	crRNA-tracrRNA	crRNA
Longitud del gRNA	99-100 nt	42-44 nt
Secuencia PAM	5' NGG 3'	5' TTTV 3'
Constante de disociación (kD)	1.85 nM	54 fM

Además de lo mencionado en la Tabla 1 la proteína AsCas12a corta el dsDNA de manera escalonada en 5' y presenta una mayor distancia entre la secuencia semilla y el sitio de corte. Así mismo, su actividad nucleasa está dado por un solo sitio catalítico (RuvC), por lo que para que se lleve a cabo el corte de ambas hebras de DNA el dominio de reconocimiento del sitio PAM pasa por una serie de cambios conformacionales y adopta una forma de riel para eventualmente guiar a la hebra no complementaria al dominio catalítico^{1,4,5}. A pesar de estas diferencias la proteína AsCas12a corta de manera eficiente el dsDNA en células humanas y ha

presentado además una actividad de corte *on-target* similar a la de la ampliamente utilizada SpyCas9.^{5,20}

Aplicaciones de la proteína AsCas12a

No solo se ha empleado a la proteína AsCas12a con fines de edición genética, sino que también se aprovecha la capacidad de corte indiscriminado de ssDNA. Usando esto se han desarrollado nuevos métodos de detección molecular y múltiples aplicaciones biomédicas tales como la represión transcripcional, etc.^{21,22,23,27}

Un ejemplo de la aplicación de la proteína AsCas12a puede ser observado en el artículo de Kleinstiver y colegas²⁰ en 2019 , donde no solo se empleó la proteína AsCas12a para edición de células humanas sino que también mediante ingeniería de proteínas se aumentó la cantidad de sitios PAM “raros” que podían ser reconocidos por la proteína AsCas12a. Posteriormente a la generación de nuevas proteínas Cas12 que presentaban una mayor flexibilidad al momento de reconocer sitios PAM no canónicos, se llevaron a cabo ensayos para determinar si los cambios realizados afectaban la actividad de las proteínas AsCas12a modificadas para el reconocimiento de una variedad más amplia de sitios PAM. Los resultados mostraron que las proteínas mejoradas eran capaces de mantener el reconocimiento de los sitios PAM canónicos y además reconocer sitios que para la proteína AsCas12a silvestre era imposible el reconocimiento.

Durante la pandemia causada por el SARS-CoV-2, complejos ribonucleoproteicos formados por la proteína AsCas12a y RNAs guías capaces de reconocer secuencias de dsDNA obtenidos mediante RT-LAMP fueron empleados para su detección molecular.

Añadiendo una sonda fluorescente de ssDNA que solo sería degradada en presencia de la secuencia diana y como fue observado en el artículo publicado por Morales-Moreno y colaboradores²⁷ las pruebas realizadas fueron capaces de detectar de manera precisa el 100% de las muestras clínicas tanto positivas como

negativas en aproximadamente 25 minutos cuando se emplea un lector de fluorescencia de placas y en ~45 minutos cuando se emplearon tiras de flujo lateral, convirtiendo a la proteína Cas12a en una gran alternativa para la detección de patógenos de interés (Figura 5).

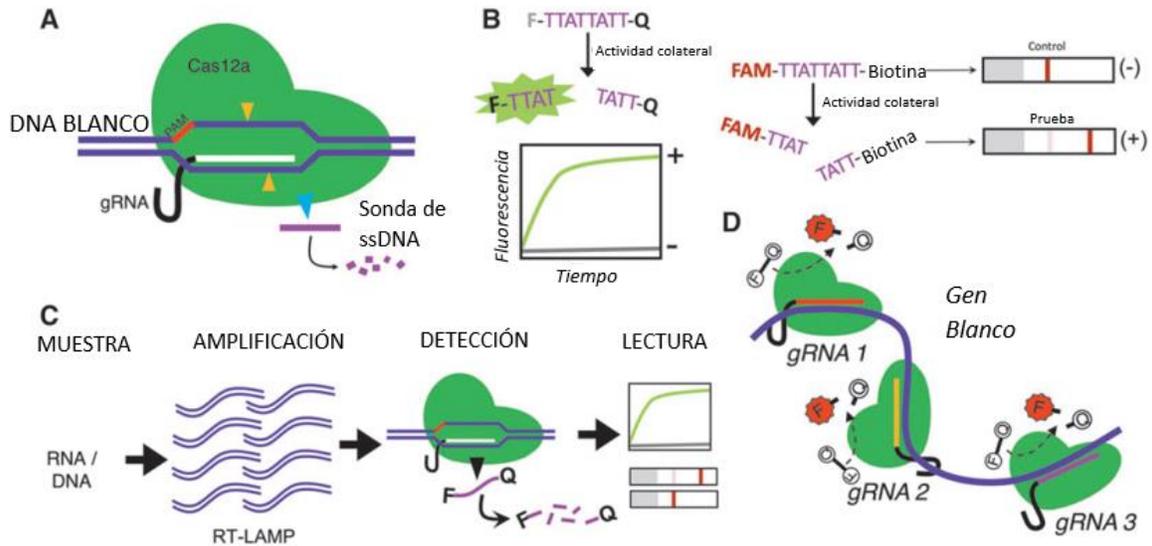


Figura 5. Esquema general de la detección molecular empleando a la proteína AsCas12a. A) Actividad de Corte en *trans* que se da después del reconocimiento del DNA diana. B) Formas más comunes de detectar si se da el corte de la sonda (fluorescencia a la izquierda y tiras de flujo lateral a la derecha). C) Pasos para la detección con CRISPR-Cas12a. D) El uso de múltiples gRNA's mejora la detección de manera sinérgica. Tomada de: Morales-Moreno, M. D., Valdés-Galindo, E. G., Reza, M. M., Fiordeliso, T., Peon, J., & Hernandez-Garcia, A. Multiplex gRNAs Synergically Enhance Detection of SARS-CoV-2 by CRISPR-Cas12a. *The CRISPR journal*, 6(2), 116–126, (2023).

Todas estas aplicaciones (edición genética, detección, etc.) convierten a la proteína AsCas12a en un ortólogo de gran relevancia para el estudio, el desarrollo de investigación básica pero también para el desarrollo de nuevas aplicaciones tanto biotecnológicas como biomédicas^{1,2,3} y la falta de estudios enfocados en la optimización de su expresión recombinante en *E. coli*²⁴ quien resulta el sistema de biosíntesis más común para la producción recombinante de AsCas12a da pie a una oportunidad de investigación relevante.

Expresión de Proteínas Recombinantes en *Escherichia coli*

Uno de los aportes más importantes que nos ha brindado la biotecnología sin duda alguna es la expresión de proteínas recombinantes,²⁵ también conocida como expresión heteróloga debido a que la proteína que será expresada por el hospedero comúnmente es producida por otro organismo con el cual puede o no guardar cierta relación.

Uno de los hospederos más importantes para el desarrollo de esta técnica es sin duda *E. coli*, esto debido a los cortos ciclos de replicación que presenta ya que, al otorgarle el medio óptimo de sales, glucosa y las condiciones ambientales óptimas, su tiempo de replicación es de alrededor de 20 minutos²⁴. La basta información que se tiene sobre ella, la facilidad que presenta para la introducción de diversos plásmidos relacionados con la biosíntesis tanto de proteínas como de otros compuestos y su simpleza a la hora de manipularla.

La producción de proteínas recombinantes en bacterias es una tecnología que surgió hace cerca de 50 años y respondió a una necesidad de proveer proteína con un abasto asegurado (que no dependiera de fuentes animales) y calidad constante.²⁵ Aunque con el paso del tiempo esta técnica también ha sido empleada para la producción de proteínas necesarias para metodologías relacionadas con la biología molecular, la bionanotecnología, etc.

Existe una gran variedad de cepas que pueden ser empleadas para la producción recombinante de proteínas y cada una de ellas ofrece ventajas únicas que pueden ser aprovechadas dependiendo de la naturaleza de la proteína a producir. Una de las cepas ampliamente utilizadas para la biosíntesis heteróloga de proteínas es BL21(DE3), la cual presenta modificaciones genéticas importantes como es su deficiencia en la expresión de la proteasa Lon la cual está relacionada con la degradación de múltiples proteínas extrañas para *E. coli*. Además, la pérdida o rechazo del plásmido es prevenida por la mutación *hsdSB* la cual estaba presente en la cepa parental B834 y dio pie a BL21, como resultado de esto la metilación y degradación del DNA se ve interrumpida.²⁶ Esta cepa cuenta también con un gen para la expresión de un promotor T7 proveniente del profago λ DE3 que se encuentra

bajo la regulación de un promotor lacUV5 lo cual permite la fácil inducción de los cultivos usando Isopropilo- β -D-1-tiogalactopiranosido (conocido como IPTG), el cual es un homólogo de la alolactosa y al no ser metabolizable por *E. coli* la concentración que se agregue al inicio de la inducción será la misma que esté presente al final de la misma.²⁴

Planteamiento del Problema

Aunque hoy en día el sistema CRISPR-Cas12a es ampliamente producido recombinantemente y utilizado alrededor del mundo, no existe un protocolo optimizado para la producción recombinante de la proteína AsCas12a, lo cual puede representar una limitante al momento de realizar investigación básica en laboratorios o para el desarrollo biomédico y biotecnológico. Por lo tanto, encontrar valores óptimos de parámetros importantes de la biosíntesis recombinante de la proteína AsCas12a podría suponer un aumento en el rendimiento de la proteína obtenida por litro de cultivo de *E.coli*.

Pregunta de Investigación

¿Si variamos diversos parámetros relacionados con la biosíntesis recombinante de la proteína AsCas12a podremos identificar los parámetros óptimos para mejorar el rendimiento de la producción de AsCas12a en *E. coli*?

Hipótesis

Al variar la temperatura, el tiempo de post-inducción, el medio de cultivo, la cepa de *E. coli* y la concentración de IPTG mencionadas en la literatura para el proceso de producción de la proteína AsCas12a, se podrán encontrar los valores y condiciones que permitan aumentar la expresión de la proteína.

Objetivos

General

Optimizar parámetros físicos y biológicos relacionados con la producción de la proteína AsCas12a.

Particulares

1. Optimizar la concentración de IPTG.
2. Optimizar la temperatura de producción.
3. Probar diversas cepas de *E. coli*.
4. Comparar la producción en medio LB y TB.
5. Evaluar el efecto de la suplementación con glucosa.
6. Realizar la cinética de la producción de AsCas12a para los parámetros seleccionados.
7. Realizar la purificación de un litro de cultivo con los parámetros optimizados.
8. Probar la actividad de la proteína AsCas12a producida con los parámetros optimizados.

Materiales y Métodos

Diseño del Estudio-Estrategia Experimental General

Se llevaron a cabo múltiples ensayos para determinar las condiciones óptimas para la biosíntesis de la proteína AsCas12a en matraces de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo que será inoculado con bacterias transformadas con el plásmido que contiene la secuencia necesaria para la producción de la proteína AsCas12a. Una vez que un parámetro sea identificado como óptimo según la intensidad relativa de la banda que esté presente en el gel de poliacrilamida, la cual será determinada por ensayos de densitometría usando el Software Image J, se

mantendrá para los análisis de condiciones posteriores hasta haber analizado todas las variables. Posteriormente se realizará una cinética de producción de 24 hrs tanto de las condiciones iniciales como de las condiciones optimizadas de la proteína para determinar el tiempo de post-inducción en el cual se alcanza la máxima expresión de la proteína y se cuantificará por análisis con Nanodrop, densitometría y análisis de la densidad óptica del cultivo bacteriano (Figura 6).

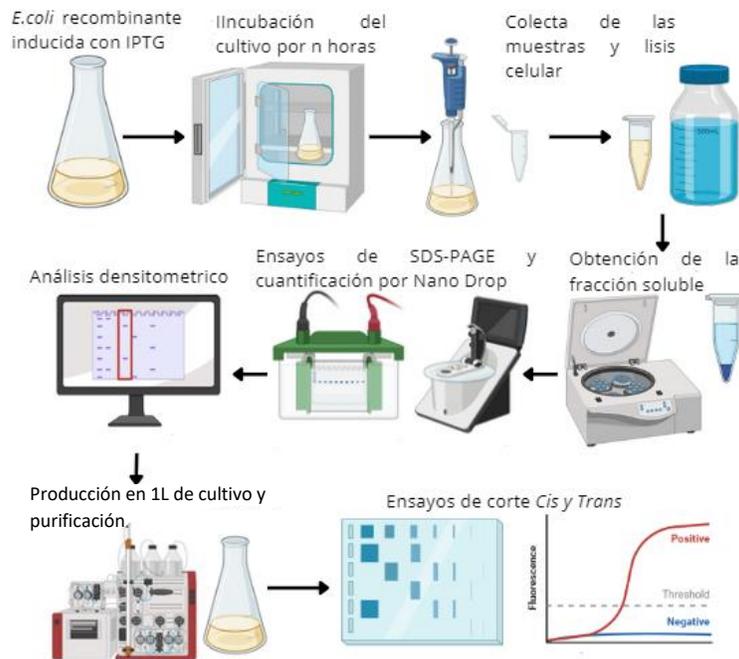


Figura 6. Flujo de trabajo general para la evaluación de parámetros físicos y biológicos relacionados con la biosíntesis de AsCas12a.

Una vez que todas las variables fueron optimizadas se realizó un ensayo en gran escala (1L de cultivo) para posteriormente seguir el protocolo de purificación por cromatografía de columna de níquel, heparina y por exclusión molecular. Con la proteína ya purificada se llevaron a cabo ensayos de corte *cis* en agarosa y de detección molecular (corte *trans*) con lector de placas (*Cytation 5*) para determinar si la proteína AsCas12a obtenida mantiene su actividad nucleasa (Figura 6).

Universo (Población o Muestra)

Se usó como población a *E. coli* la cual ha sido ampliamente utilizada para la expresión recombinante de proteínas. Se propone el análisis de la expresión de proteína de las cepas: BL21 (DE3), BL21 (Tuner), NiCo (DE3), Rosetta (DE3) y BL21 (DE3) pLysS.

Variables

Se propone analizar la concentración de IPTG, la temperatura y tiempo de post-inducción, medio de cultivo, suplementación con glucosa (1% m/v) y cepa de *E.coli*.

Técnicas o Instrumentos

1. Extracción de DNA por Kit mini-prep
2. Transformación por choque térmico
3. Lisis celular
4. *SDS-PAGE*
5. Análisis Densitométricos
6. Cuantificación de proteína por Nano Drop
7. *Western Blot*
8. Cromatografías de columna (Níquel, Heparina y Exclusión molecular)
9. Ensayos de corte del Gen N de SARS-CoV-2 en agarosa (Actividad *Cis*)
10. Ensayos de detección molecular del Gen N de SARS-CoV-2 (Actividad *Trans*)

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de las densitometrías fueron analizados estadísticamente por ANOVA unidireccional.

Producción del Plásmido

Se creció durante 16 horas un cultivo de *E. coli* (DH5 α) que contenía el plásmido pMBP-AsCas12a o pPET28a-SARS-CoV-2-genN (Figura 7) en 5 mL de medio *Luria Bertani* (LB) con 100 μ g/mL de ampicilina o kanamicina respectivamente para asegurar la selección de bacterias que presenten el plásmido de interés. Se purificó el plásmido del cultivo utilizando el *kit ZymoPURE Plasmid Mini-prep* y se cuantificó la cantidad de plásmido mediante Espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop.

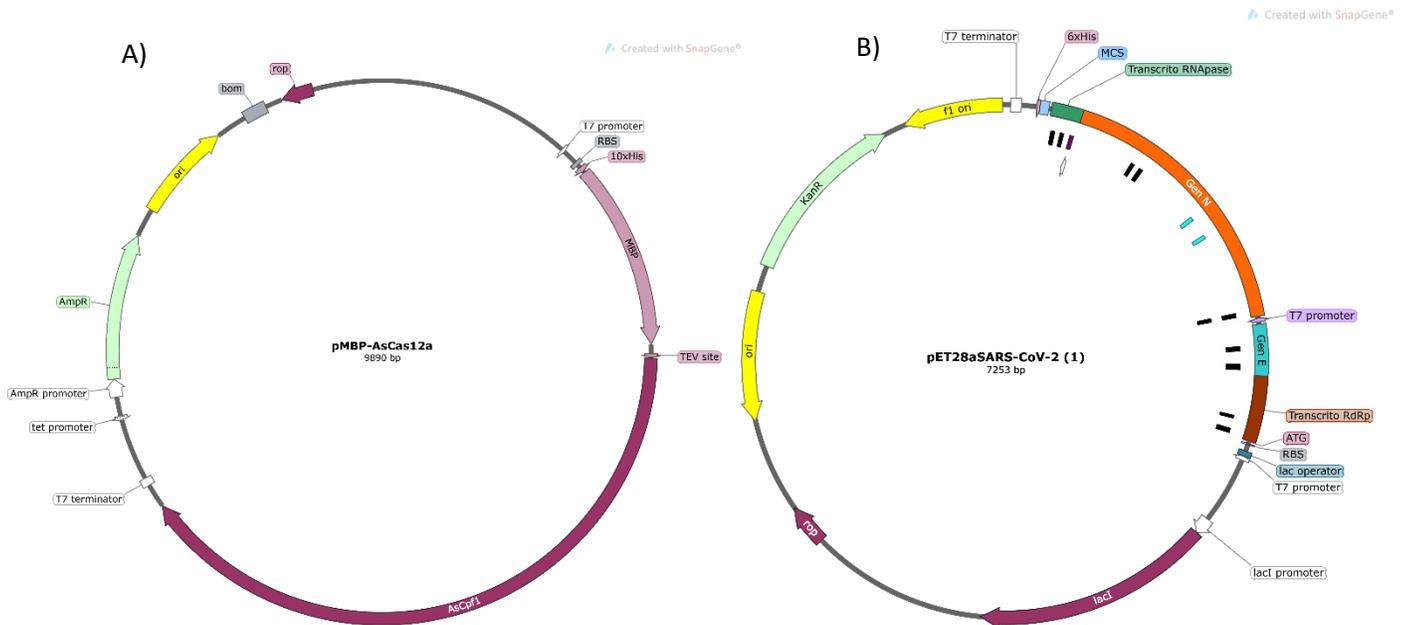


Figura 7. Conformación de los plásmidos empleados para la producción de la proteína AsCas12a (A) y para la obtención del plásmido que contiene la secuencia de interés del SARS-CoV-2 (B).

Transformación de las Cepas de *E. coli*

Las cepas competentes de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (Tuner), NiCo (DE3), Rosetta (DE3), BL21 (DE3) pLysS y DH5 α fueron transformadas por choque térmico. Posteriormente se añadieron 2 μ L del plásmido y se dejó reposar el microtubo que contenía a las bacterias durante 5 minutos en hielo. Posteriormente la mezcla se calentó a 42°C durante 30 segundos y a continuación se enfrió en hielo

durante 5 minutos. Después se agregaron 100 μ L de medio LB y se dejó incubar a 37°C durante una hora para la recuperación de las bacterias y finalmente se dejó incubar durante 16 horas en una placa Petri con medio LB solido que contenía 100 μ g/mL de ampicilina (pMBP-AsCas12a) o 100 μ g/mL de kanamicina (pPET28a-SARS-CoV-2-genN).

Ensayos de SDS-PAGE

Se realizaron ensayos de *SDS-PAGE* al 7.5% en el cual se cargaron 5 μ L de la fracción soluble de cada una de las muestras de cada uno de los parámetros evaluados a lo largo del estudio. Como marcador de peso molecular se usaron 3 μ L de *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards*. El gel se corrió a 160 V durante 40 minutos, una vez transcurrido ese tiempo los geles se lavaron 3 veces usando agua destilada y fueron teñidos usando *SimplyBlue™ Safe Stain* y se documentaron.

Análisis Densitométricos

Haciendo uso del software Image, se analizó la intensidad de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a. Se determinó la intensidad de la banda de Cas12a y se obtuvo el porcentaje relativo en función de la intensidad total del carril del gel de poliacrilamida.

Determinación de la Concentración Óptima de IPTG

Se creció *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformada con el plásmido pMBP-AsCas12a en matraces de 250 mL que contenían 100 mL de medio LB hasta alcanzar una densidad óptica (DO, a 600 nm) entre 0.6 – 0.8 unidades de absorbancia (UA) a 37°C. Posteriormente se disminuyó la temperatura a 12°C por 30 minutos para atemperar el cultivo a la temperatura de inducción reportada con anterioridad. Una vez que transcurrieron los 30 minutos se indujo la expresión de la proteína con las siguientes concentraciones de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido

(IPTG): 0.3, 0.6, 1, 1.3 y 1.6 mM. Para asegurar la selección de bacterias que contenían el plásmido pMBP-AsCas12a fueron añadidos 100 µg/mL de ampicilina.

Una vez transcurridas las 24 horas de post-inducción se recuperó una muestra de 1 mL y se obtuvo el pellet celular por centrifugación (13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C). El pellet fue resuspendido usando 100 µL de buffer de lisis 500 µL de 2-mercaptoetanol, 25 mL de glicerol, 20 mL de dodecilsulfato sódico al 10%, 12.5 mL de 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 2 mL de azul de bromofenol al 0.5% y 35.5 mL de agua destilada. Posteriormente fue calentado a 95°C durante 5 minutos en un termoblock. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble del lisado.

Finalmente, la fracción soluble correspondiente a las muestras se evaluó por *SDS-PAGE* y se realizó un análisis densitométrico para determinar la expresión relativa de AsCas12a según la intensidad de la banda presente en el gel de poliacrilamida. Se determinó la concentración óptima de IPTG (0.3 mM), la cual se mantuvo constante para los ensayos posteriores.

Determinación de la Temperatura Óptima de Post- Inducción

Se creció *E. coli* BL21 (DE3), previamente transformada con el plásmido pMBP-AsCas12a, en matraces de 250 mL que contenían 100 mL de medio LB y 100 µg/mL de ampicilina hasta alcanzar una DO (600 nm) entre 0.6 – 0.8 UA a 37°C. Posteriormente se disminuyó la temperatura a 12°C, 18°C, 30°C y 37°C durante 30 minutos para atemperar el cultivo a las diversas temperaturas de inducción que se evaluaron. Entonces se indujo el cultivo con 0.3 mM de IPTG.

Una vez transcurridas las 9 horas de post-inducción se recuperó una muestra de 1 mL y se obtuvo el pellet celular por centrifugación (13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C). El pellet fue resuspendido usando 100 µL de buffer de lisis y se lisaron las células, posteriormente se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble del lisado.

Finalmente, la fracción soluble correspondiente a la fracción soluble de las muestras se evaluó por *SDS-PAGE* y se realizó un análisis densitométrico para

determinar la expresión relativa de AsCas12a según la intensidad de la banda presente en el gel de poliacrilamida. Se determinó la temperatura óptima (30°C) de la biosíntesis de la proteína AsCas12a, la cual se mantuvo como constante para los ensayos posteriores.

Determinación del Medio de Cultivo Óptimo

Se prepararon dos medios de cultivo y se analizó su efecto en la expresión de la proteína AsCas12a. El primero fue el medio LB para el cual se disolvieron 12.5 g de medio LB en polvo en 500 mL de agua destilada, también se preparó *Terrific Broth* (TB) disolviendo 6 g de triptona, 12 g de extracto de levadura, 4.75 g de K₂HPO₄, 1.1 g de KH₂PO₄ y 2 mL de glicerol en 500 mL. Cuando se disolvieron todos los componentes los medios fueron esterilizados.

Se creció *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformada con el plásmido pMBP-AsCas12a en matraces de 250 mL que contenían 100 mL de medio LB o TB y 100 µg/mL de ampicilina hasta alcanzar una DO (600 nm) entre 0.6 – 0.8 UA a 37°C. Posteriormente se disminuyó la temperatura a 30°C y se indujo el cultivo con 0.3 mM de IPTG una vez transcurridos 30 minutos para atemperar el cultivo.

Una vez transcurridas las 9 horas de post-inducción se recuperó una muestra de 1 mL y se obtuvo el pellet celular por centrifugación (13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C). El pellet fue resuspendido usando 100 µL de buffer de lisis y se lisaron las células, posteriormente se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble del lisado.

Finalmente, la fracción soluble correspondiente a la fracción soluble de las muestras se evaluó por *SDS-PAGE* y se realizó un análisis densitométrico para determinar la expresión relativa de AsCas12a según la intensidad de la banda presente en el gel de poliacrilamida. Se determinó el medio de cultivo óptimo (TB) para la biosíntesis de la proteína AsCas12a el cual se mantuvo como constante para los ensayos posteriores.

Suplementación del Cultivo con Glucosa

Se preparó 1 litro de solución de glucosa que contenía 200 g/L y se esterilizó usando filtros de 0.22 micras dentro de la campana de flujo laminar. Se creció *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformada con el plásmido pMBP-AsCas12a en matraces de 250 mL que contenían 100 mL de medio TB o LB, 100 µg/mL de ampicilina y 1% de glucosa (M/V) hasta alcanzar una DO (600 nm) entre 0.6 – 0.8 UA a 37°C, posteriormente se disminuyó la temperatura a 30°C y se indujo el cultivo con 0.3 mM de IPTG una vez que el cultivo se atemperó durante 30 minutos.

Una vez transcurridas las 9 horas de post-inducción se recuperó una muestra de 1 mL y se obtuvo el pellet celular por centrifugación (13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C). El pellet fue resuspendido usando 100 µL de buffer de lisis y se lisaron las células, posteriormente se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble del lisado.

Finalmente, la fracción soluble correspondiente a la fracción soluble de las muestras se evaluó por *SDS-PAGE* y se realizó un análisis densitométrico para determinar la expresión relativa de AsCas12a según la intensidad de la banda presente en el gel de poliacrilamida. Se determinó que la adición de glucosa resulto beneficiosa para la biosíntesis de la proteína AsCas12a.

Determinación de la Cepa Óptima

Se creció de *E. coli* BL21 (DE3), BL21 (Tuner), NiCo (DE3), Rosetta (DE3) y BL21 (DE3) pLysS previamente transformadas con el plásmido pMBP-AsCas12a en matraces de 250 mL que contenían 100 mL de medio TB suplementado con 1% de glucosa (M/V) y 100 µg/mL de ampicilina, hasta alcanzar una DO (600 nm) entre 0.6 – 0.8 UA a 37°C, posteriormente se disminuyó la temperatura a 30°C y se indujo el cultivo con 0.3 mM de IPTG una vez que el cultivo se atemperó durante 30 minutos.

Una vez transcurridas las 9 horas de post-inducción se recuperó una muestra de 1 mL y se obtuvo el pellet celular por centrifugación (13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C). El pellet fue re suspendido usando 100 µL de buffer de lisis y se

lisaron las células, posteriormente se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble del lisado.

Finalmente, la fracción soluble correspondiente a la fracción soluble de las muestras se evaluó por *SDS-PAGE* y se realizó un análisis densitométrico para determinar la expresión relativa de AsCas12a según la intensidad de la banda presente en el gel de poliacrilamida, encontrados la banda de interés entre las bandas de 150 y 250 kDa del marcador de peso molecular, lo cual indica la presencia de AsCas12a que tiene un peso molecular de 151.2 kDa. Se determinó la cepa óptima (BL21 (DE3)) para la biosíntesis de la proteína AsCas12a.

Cinéticas de Densidad Óptica y Biosíntesis de AsCas12a

Se preparó un buffer de lisis especial para las muestras obtenidas en este apartado, la composición del buffer es la misma que la del que fue usado con anterioridad, simplemente se omitió la adición del azul de bromofenol para evitar que su presencia afectara la cuantificación de proteína total realizada por Nano Drop.

Se crecieron dos cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) previamente transformadas con el plásmido pMBP-AsCas12a en matraces de 250 mL, en uno de los matraces se colocó medio TB suplementado con 1% de glucosa (m / v) (parámetros optimizados) mientras que el otro simplemente contenía medio LB (parámetros iniciales) a ambos se le adiciono 100 µg/mL de ampicilina, hasta alcanzar una DO (600 nm) entre 0.6 – 0.8 UA a 37°C, posteriormente ambos cultivos se dejaron atemperar durante 30 minutos a 30°C para los parámetros optimizados y a 12°C para los parámetros iniciales y a continuación se indujo la expresión en ambos cultivos con 0.3 mM de IPTG para los cultivos optimizados y con 1 mM para los cultivos iniciales.

Se tomó una muestra cada hora durante las primera 15 horas y una muestra de las 21 a las 24 horas de post-inducción de ambos cultivos, se analizó la DO (600

nm) de cada una de las muestras obtenidas y se obtuvo la cinética de crecimiento de ambos cultivos.

Se recuperó una muestra de 1 mL cada 3 horas desde el momento que se indujo la expresión en ambos cultivos hasta las 15 horas y posteriormente se obtuvo una muestra correspondiente a las 21 y 24 horas de post-inducción. Dichas muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C al momento de ser obtenidas. Los pellets celulares generados con 100 µL de buffer de lisis y se lisaron las células posteriormente se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó la fracción soluble del lisado.

Se analizó la cantidad de proteína total de la fracción soluble de los lisados obtenidos en ambas cinéticas (parámetros optimizados e iniciales) mediante el uso de Nano Drop, empleando el programa de proteínas A280 se colocaron aproximadamente 1.5 µL de la muestra y se obtuvieron las cuantificaciones.

Finalmente, la fracción soluble correspondiente a la fracción soluble de las muestras se evaluó por *SDS-PAGE* y se realizó un análisis densitométrico para determinar la expresión relativa de AsCas12a según la intensidad de la banda presente en el gel de poliacrilamida. Se compararon los datos de DO, proteína total y expresión relativa de AsCas12a para los parámetros optimizados y los parámetros iniciales.

Producción y Purificación de la Proteína en 1 L

Se creció 1L de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) en medio TB suplementado con 1% de glucosa (M / V) y 100 µg/mL de ampicilina en un matraz Erlenmeyer (2.5L) hasta una DO de entre 0.6 – 0.8 UA a 37°C, posteriormente se disminuyó la temperatura a 30°C. Pasados 30 minutos a 30°C se indujo la expresión de AsCas12a con 0.3 mM de IPTG y durante 9 h.

Se generó el pellet celular centrifugando el cultivo durante 10 minutos a 6,000 RCF a 4°C, se re suspendió en buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 10 mM imidazol) y se sonicó con una potencia de 765 Watts durante 6 minutos en hielo con ciclos On/Off de 5/25 s. La muestra obtenida tras la sonicación se

centrifugó durante 35 minutos a 35,000 g, se recuperó cuidadosamente la fracción soluble y se clarificó usando un filtro de 0.22 μm para posteriormente ser inyectada en una columna de cromatografía de afinidad Ni-NTA (Cytiva). La columna se lavó con buffer 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 20 mM imidazol y a continuación se eluyó la proteína total que fue atrapada por la columna usando buffer de elución (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 250 mM imidazol). La muestra recuperada fue colocada en una membrana para diálisis con un corte de 50 kDa y finalmente se colocó en un vaso de precipitado con buffer de diálisis (20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM KCl, 10% glicerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) y proteasa TEV, se dializó durante toda la noche para la remoción de la etiqueta de histidinas y MBP.

La muestra dializada se filtró con una membrana de 0.22 μm se inyectó en una columna *Heparin Sepharose High Performance* (Cytiva) y se eluyó empleando una solución de KCL 2M. La muestra que contenía la proteína total se concentró hasta un volumen aproximado de 500 μL mediante centrifugación empleando unidades de filtración con un tamaño de corte de 100 kDa. La muestra concentrada se inyectó en una columna de exclusión molecular HiLoad 16/600 Superdex. Las fracciones correspondientes a AsCas12a purificada se combinaron y concentraron hasta aproximadamente 27.64 μM . Se hicieron alícuotas en tubos de PCR que contenían 6 μL de muestra, finalmente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . La pureza de la proteína AsCas12a se comprobó mediante *SDS-PAGE* y la identidad mediante *Western Blot* con anti-Cpf1 el cual es un anticuerpo policlonal.

Evaluación de la Actividad Nucleasa (*cis*)

Se ensamblaron complejos RNP AsCas12a:crRNA incubando durante 30 minutos a 37°C una mezcla 1:1 molar de la proteína AsCas12a purificada y un crRNA diseñado para el reconocimiento del gen N del SARS-CoV-2 en buffer NEB 2.1 1x. Posteriormente los complejos RNP fueron mezclados con el pDNA diana (pPET28a-SARS-CoV-2-genN) para tener una concentración final de 33 nM de RNP y 3.3 nM de DNA plasmídico respectivamente y se incubaron en un baño seco a 37°C durante 1 hora y una vez transcurrido este tiempo la muestra se calentó a

85°C durante 5 minutos para inactivar a la proteína AsCas12a. Las muestras se mezclaron con Buffer de carga para DNA y se corrieron en un gel de agarosa 1% el cual fue preteñido con SYBR™ *Safe DNA Gel Stain*. Finalmente, el gel fue foto documentado. La actividad nucleasa se puede observar ya que las muestras de pDNA que fueron cortadas por los complejos RNP se super enrollan, lo cual se ve representado en el peso molecular de las bandas.

Evaluación de la Actividad Nucleasa (*trans*) / Ensayo de Detección Molecular

Se evaluó la actividad de corte en *trans* siguiendo un protocolo previamente reportado²⁷. Se ensamblaron complejos RNP de igual manera que en la evaluación del corte en *Cis* y se mezclaron con el dsDNA diana (pPET28a-SARS-CoV-2-genN) a una concentración final de 33 nM de RNP y 3.3 nM de DNA plasmídico respectivamente (proporción molar RNP:pDNA de 10:1) en buffer NEB 2.1. Se empleó como sonda 250 nM de un ssDNA unido a FAM y a un *quencher*. La actividad de corte en *trans* del ssDNA sonda se evaluó de manera continua durante 1 hora a 37°C usando un lector de placas Cytation 5. Las muestras fueron excitadas a 480 nm y la emisión de la fluorescencia se midió a 528 nm. Finalmente, los datos de fluorescencia obtenidos por el lector de placas se gráfican usando el programa PRISM-GraphPad 10.

Resultados y Discusión

Determinación de la Concentración Óptima de IPTG

Se realizaron ensayos para evaluar el efecto de la concentración de IPTG (Figura 8) en la expresión de la proteína de interés, ya que múltiples protocolos en los cuales se produce y emplea la proteína AsCas12a o sus homólogos empleaban diversas concentraciones de este inductor^{5,6,9,10}. Además que el plásmido empleado solo podía ser inducido con dicha molécula.

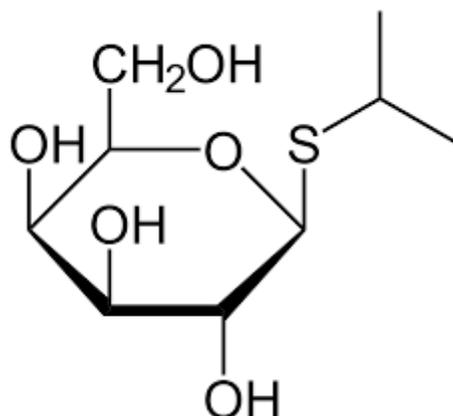


Figura 8. Estructura del isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) molécula inductora de la producción de AsCas12a.

Se evaluaron múltiples concentraciones de IPTG (0.3 a 1.6 mM) para la inducción de la expresión de AsCas12a en *E. coli* BL21 (DE3) en matraces con 100 mL de medio LB posterior a 24 horas de inducción a una temperatura de post-inducción de 12°C. Los datos de % relativo de AsCas12a se obtuvieron por un análisis densitométrico de la intensidad de la banda correspondiente a la proteína Cas en relación a la intensidad de todo el carril presente en los SDS-PAGE 7.5% (Figura 9a).

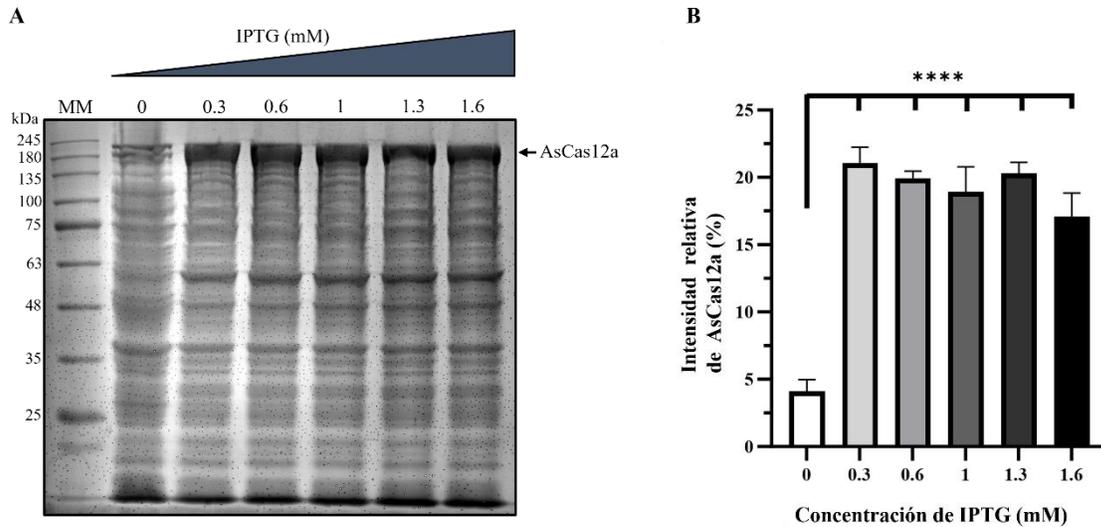


Figura 9. Ensayo para la determinación de la concentración óptima de IPTG para la biosíntesis de la proteína AsCas12a A) SDS- PAGE al 7.5% en el cual se cargaron las muestras obtenidas de la fracción soluble de cada uno de los ensayos realizados para la determinación de la concentración óptima de IPTG. B) Gráfica que muestra el porcentaje de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a.

Los datos desplegados por el análisis densitométrico (Figura 9b) señalan que no existe una diferencia significativa entre las concentraciones de IPTG de 0.3 mM y 1 mM como lo muestra la tabla 2.

Tabla 2. Promedio de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a obtenidos por análisis densitométricos.

Concentración de IPTG (mM)	PROM ± de la Expresión Relativa de AsCas12a (%)
0	4.12 ± 0.008
0.3	21.08 ± 0.011
0.6	19.95 ± 0.005
1	18.93 ± 0.018
1.3	20.31 ± 0.007
1.6	17.10 ± 0.017

Aunque el IPTG resulta el inductor por excelencia para la expresión de aquellas proteínas bajo la regulación de un operón lactosa, en altas concentraciones resulta tóxico y puede conducir al estrés metabólico de las células (*E. coli*), provocando así un efecto negativo en el crecimiento de las bacterias y su viabilidad.^{28,29,39} Al no existir una diferencia significativa entre emplear 0.3 mM o 1 mM de IPTG, disminuir la concentración de este se puede traducir a una mayor DO de nuestro cultivo y, por ende, una mayor expresión de la proteína AsCas12a. Después de los ensayos se determinó que la concentración óptima de IPTG para la expresión de la proteína AsCas12a es 0.3 mM valor que se encuentra alejado al reportado por Mohanraju y colaboradores (0.33 mM) y este parámetro se mantuvo como constante para los ensayos posteriores.

Determinación de la Temperatura Óptima de Post-Inducción

Se propuso realizar ensayos de determinación de la temperatura ya que la modulación de la temperatura de post-inducción del cultivo resulta una de las formas más sencillas de manipular la tasa de crecimiento de las bacterias. A su vez la temperatura puede llevar a la formación de cuerpos de inclusión lo cual puede representar pérdidas al momento de expresar una proteína de manera recombinante.^{24,28}

Se evaluaron múltiples temperaturas de post-inducción (12°C, 18°C, 30°C y 37°C) para la expresión de AsCas12a en *E. coli* BL21 (DE3) en matraces con 100 mL de medio LB posterior a 9 horas de inducción a las diferentes temperaturas de post-inducción previamente determinadas. En el gel de poliacrilamida podemos observar que a medida que aumenta la temperatura, el porcentaje relativo de AsCas12a soluble aumenta. Esto puede deberse a que la tasa de crecimiento de *E. coli* aumenta conforme a la temperatura (Figura 10a). Una vez alcanzados los 37°C la biosíntesis de la proteína decae de una manera drástica lo cual puede deberse a que a una temperatura fisiológica *E. coli* centra su atención en su crecimiento y no en la producción de una proteína heteróloga.²⁸

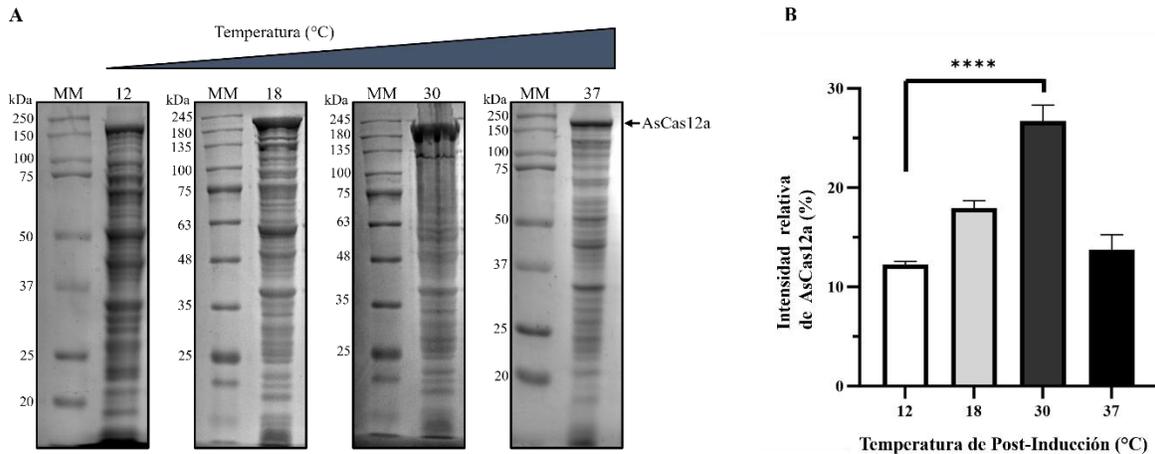


Figura 10. Ensayo para la determinación de la temperatura de post-inducción óptima para la biosíntesis de la proteína AsCas12a. A) SDS- PAGE al 7.5% en el cual se cargaron las muestras obtenidas de la fracción soluble de cada uno de los ensayos realizados para la determinación de la temperatura óptima de post-inducción del cultivo. B) Gráfica que muestra el porcentaje de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a.

Los datos desplegados por el análisis densitométrico del gel de *SDS-PAGE* (Figura 10b) señalan que existe una diferencia significativa entre la temperatura de 12°C y la de 30°C como se señala en la Tabla 3

Tabla 3. Promedio de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a obtenidos por análisis densitométricos.

Temperatura (°C)	PROM ± de la Expresión Relativa de AsCas12a (%)
12	12.25 ± 0.003
18	17.95 ± 0.007
30	26.71 ± 0.015
37	13.74 ± 0.015

Aumentar la temperatura de post-inducción para la expresión de la proteína AsCas12a a 30°C aumenta considerablemente el porcentaje relativo de proteína Cas presente en el carril. De igual manera, es importante mencionar que ante un aumento de temperatura se recomienda una disminución en el tiempo de post-inducción para disminuir la formación de cuerpos de inclusión de la proteína heteróloga.²⁹ Por lo tanto el tiempo de post-inducción para este ensayo y ensayos posteriores se estableció en 9 horas. Finalmente, se determinó que la temperatura de post-inducción óptima para la expresión de AsCas12a es de 30°C y se mantuvo este parámetro como constante para los siguientes ensayos.

Determinación del Medio de Cultivo Óptimo

Se realizó la comparación entre dos medios de cultivo comúnmente utilizados para la expresión recombinante de proteínas que además ya habían sido reportados para la producción y purificación de AsCas12a a escala de laboratorio.^{5,6,9,10} Se evaluó el efecto que un medio de cultivo de lisogenia (LB), el medio de cultivo más común para el crecimiento de *E. coli*, ya que promueve el rápido crecimiento celular, así como proporcionar un buen rendimiento cuando es utilizado para producir plásmidos. Un medio de cultivo altamente enriquecido (TB) el cual es más rico que el medio LB, contiene glicerol el cual es utilizado por las bacterias como fuente de carbono conduciendo a un rápido crecimiento y a su vez a un mayor rendimiento de bacterias por volumen.³⁰ Además, el medio TB contiene fosfato de potasio, lo cual disminuye la posibilidad de muerte celular debido a un cambio en el pH del cultivo.³⁰

Tabla 4. Diferencias en la composición de los medios LB y TB.

Medio (.5 L)	Triptona	Extracto de levadura	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	Glicerol
LB	5 g	2.5 g	--	--	--
TB	6 g	12 g	4.75 g	1.1 g	2 mL

Los ensayos se llevaron a cabo en matraces que contenían 100 mL de medio LB o TB, las muestras se recuperaron 9 horas de post-inducción después a 30°C.

En el gel de poliacrilamida (Figura 11a) podemos observar que la banda correspondiente a AsCas12a muestra un mayor grosor cuando es empleado el medio TB en comparación con el cultivo que creció en medio LB. Se comprobó con los ensayos densitométricos (Figura 11b) que la expresión relativa de AsCas12a se incrementó cuando se empleó el medio enriquecido (27.19%) en comparación con la expresión relativa con medio LB (16.94%).

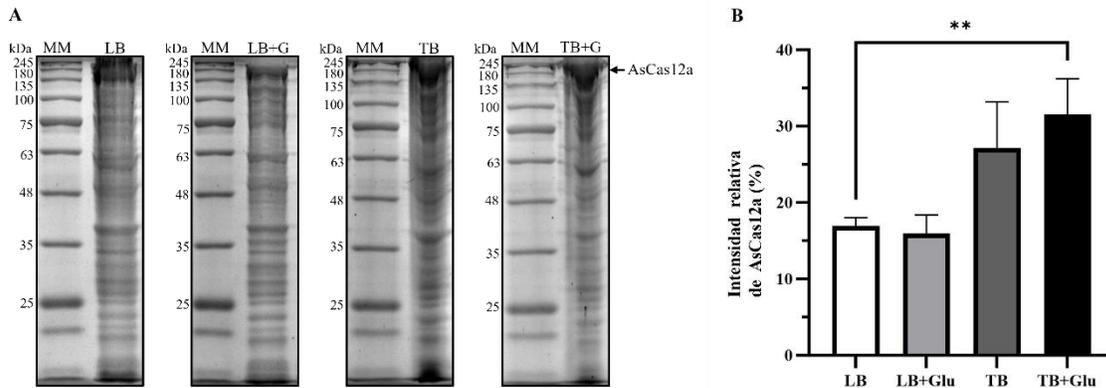


Figura 11. Ensayo para la determinación del medio de cultivo óptimo para la biosíntesis de la proteína AsCas12a A) SDS- PAGE al 7.5% en el cual se cargaron las muestras obtenidas de la fracción soluble de cada uno de los ensayos realizados para la determinación del medio de cultivo óptimo. B) Gráfica que muestra el porcentaje de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a.

Emplear un medio enriquecido (TB) aumentó la expresión de la proteína AsCas12a, lo cual se debe principalmente a la composición del medio ya que contiene seis veces más de extracto de levadura que LB. Además, la presencia de glicerol como una fuente alternativa de carbono permitió obtener una mayor densidad celular por volumen y la adición de fosfato de potasio pudo haber aumentado la sobrevivencia celular, ya que actúa como una solución tampón que disminuye la posibilidad de muerte de las bacterias por un cambio abrupto en el pH.^{29,30} Finalmente se determinó a TB como el medio de cultivo óptimo para la expresión recombinante de AsCas12a y se mantuvo constante dicho parámetro en los experimentos subsecuentes.

Efecto de la Suplementación con Glucosa

Se propuso la adición de glucosa como fuente de carbono alternativa para ambos medios (LB y TB) debido a que en un estudio anteriormente publicado en el cual se evaluó la expresión de la proteína SpCas9 empleando medio *HDF*, el cual contiene glucosa 1% (m / v). Los resultados de dicho estudio mostraron que las bacterias que crecieron en medio *HDF* presentaron una mayor expresión de la proteína heteróloga cuando fueron comparados con aquellas bacterias que crecieron en medio de lisogenia.³¹

Se evaluó el efecto de la suplementación de los medios de cultivo LB y TB con 1% de glucosa (m / v) en matraces conteniendo 100 mL de medio después de 9 horas de post-inducción a 30°C. En los ensayos de *SDS-PAGE* (Figura 12a) se observó un aumento drástico en la expresión de la proteína AsCas12a cuando el medio TB fue suplementado con glucosa. Mientras en el carril correspondiente al medio LB suplementado se observa una disminución de la expresión de la proteína de interés en comparación con la expresión presente tanto en medio LB sin suplementar, como con TB o TB suplementado.

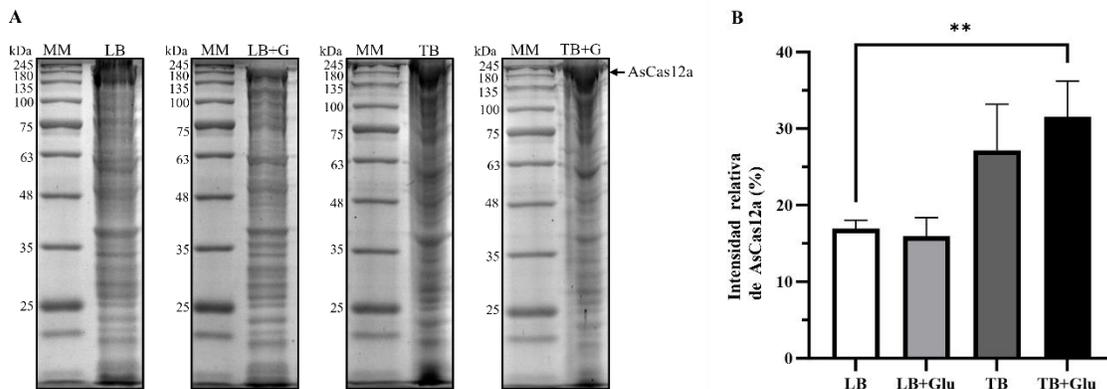


Figura 12. Ensayo para determinar el efecto de la suplementación de glucosa en la biosíntesis de la proteína AsCas12a A) *SDS-PAGE* al 7.5% en el cual se cargaron las muestras obtenidas de la fracción soluble de cada uno de los ensayos realizados para la determinación del medio de cultivo óptimo y el efecto de la suplementación con 1% de glucosa (m / v). B) Gráfica que muestra el porcentaje de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a.

Se comprobó con los análisis densitométricos (Figura 12b) que la expresión de AsCas12a se benefició con medio TB suplementado con glucosa 1% (m / v), mientras que la expresión en medio LB se vio afectada de manera negativa cuando se suplementó con glucosa (Tabla 5).

Tabla 5. Promedio de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a obtenidos por análisis densitométricos.

Medio	PROM ± de la Expresión Relativa de AsCas12a (%)
LB	16.94 ± 0.010
LB + Glu	15.95 ± 0.024
TB	27.19 ± 0.060
TB + Glu	31.54 ± 0.046

Suplementar el medio con glucosa resultó beneficioso para el cultivo que creció en medio TB ya que la fuente principal de carbono para las bacterias resulta ser el glicerol y la glucosa solo es utilizada como un nutriente secundario. Además la presencia de glicerol en el cultivo previene la formación de acetatos dada por el metabolismo de la glucosa por *E. coli*.³² Por otro lado, la baja expresión de AsCas12a en el medio LB + Glu puede deberse a que la producción de acetatos en el cultivo limita el crecimiento celular aun a concentraciones tan bajas como 0.5 g/L.³² Finalmente, se determinó que la suplementación con glucosa del medio TB aumentó la expresión relativa de AsCas12a por lo que se mantuvo constante dicho parámetro.

Determinación de la Cepa de *E. coli*

Se analizó el efecto de 5 cepas de *E. coli* en la biosíntesis de AsCas12a (BL21 (DE3), BL21 (Tuner), NiCo (DE3), Rosetta (DE3) y BL21 (DE3) pLysS). Cada una de ellas fue seleccionada debido a las mejoras o ventajas específicas que presentaban. BL21 (DE3) es una de las cepas comúnmente utilizadas para la

expresión de proteínas recombinantes que se encuentran bajo el control de un promotor T7, además una mutación específica la vuelve deficiente en la producción de proteasas para la degradación de proteínas exógenas.²⁹ Por otra parte, BL21 (Tuner) es una mutante que presenta una delección en *lacZY* permitiendo un ingreso uniforme del IPTG a las bacterias debido a la ausencia de la permeasa LacY, dando la oportunidad de regular la expresión de la proteína de interés según la concentración de inductor que sea añadida al medio.^{28,33} NiCo (DE3) es una cepa derivada de BL21 (DE3), la cual fue modificada para expresar las proteínas endógenas de *E. coli* SlyD, Can, ArnA y AceE con el dominio de unión a quitina fusionado en su C terminal y la proteína GlnS la cual normalmente presenta seis histidinas superficiales que han sido reemplazadas por alaninas. Dichas modificaciones fueron realizadas para eliminar la cantidad de proteínas propias de *E. coli* que resultan contaminantes al momento de producir una proteína recombinante y purificarla por cromatografías de inmovilización por afinidad metálica.^{28,34} Rosetta (DE3) es una cepa que presenta un plásmido que permite la co-expresión de genes que codifican para tRNAs raros en *E. coli*, esta cepa compensa los tRNAs para los codones AGG, AGA, AUA, CUA y CCC, los cuales son comunes para diversos organismos eucariotas, pero son raramente utilizados por *E.coli*.^{35,36} Finalmente, BL21 (DE3) pLysS contiene un plásmido pLysS que confiere resistencia al cloranfenicol y permite reducir la expresión basal de la proteína recombinante. De igual manera esta cepa fue diseñada para la producción de proteínas recombinantes tóxicas.²⁸

Se evaluó el efecto de las 5 cepas en la expresión de la proteína AsCas12a en matraces conteniendo 100 mL de medio TB suplementado con glucosa 1% (m / v) después de 9 horas de post-inducción a 30°C. En los geles de poli-acrilamida (Figura 13a) se observa que la banda correspondiente a BL21 (DE3) es más intensa cuando es comparada con las demás cepas analizadas.

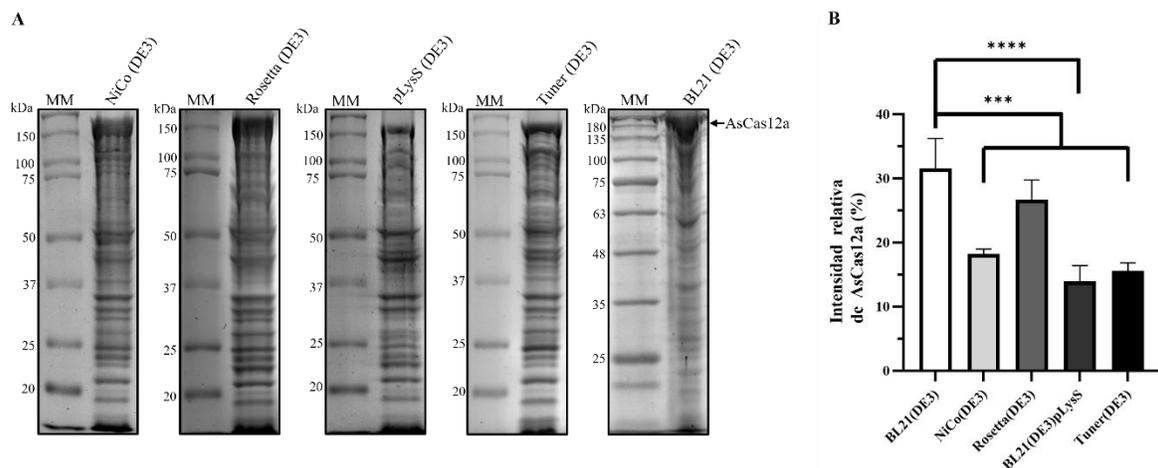


Figura 13. Ensayo para la determinación de la cepa de *E. coli* óptima para la biosíntesis de la proteína AsCas12a A) SDS- PAGE al 7.5% en el cual se cargaron las muestras obtenidas de la fracción soluble de cada uno de los ensayos realizados para la determinación de la cepa óptima para la producción de la proteína AsCas12a B) Gráfica que muestra el porcentaje de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a.

Con los análisis densitométricos (Figura 13b) se comprobó que la cepa BL21 (DE3) presentó la mayor expresión de proteína AsCas12a cuando se usaron las condiciones seleccionadas como óptimas (Tabla 6).

Tabla 6. Promedio de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a obtenidos por análisis densitométricos.

Cepa	PROM \pm de la Expresión Relativa de AsCas12a (%)
BL21 (DE3)	31.54 \pm 0.046
BL21 (Tuner)	15.54 \pm 0.012
NiCo (DE3)	18.20 \pm 0.007
Rosetta(DE3)	26.72 \pm 0.030
BL21(DE3)pLysS	13.96 \pm 0.024

Posterior a probar el efecto de las 5 cepas antes mencionadas para la expresión de AsCas12a, se observó que la cepa que se usó desde el principio para la optimización de los demás parámetros presentó la expresión relativa más alta.

Finalmente, se determinó a la cepa BL21 (DE3) como óptima para la expresión recombinante de AsCas12a y se mantuvo dicho parámetro como constante.

La selección de una cepa apropiada para la producción de una proteína recombinante, en este caso AsCas12a, resulta un punto crucial al momento de optimizar la biosíntesis de una proteína de interés, debido a las diferentes características que las cepas con ciertas mutaciones pueden ofrecer para aumentar la eficiencia de la biosíntesis, como se ha observado en diversos estudios.^{28,34,35,36} BL21 (DE3) presentó la expresión relativa de AsCas12a en comparación con las otras cepas analizadas, esto puede deberse a que además de ser una de las cepas más comúnmente utilizadas para la biosíntesis de proteínas recombinantes, la mayoría de las cepas seleccionadas son derivadas de la misma BL21 (DE3) y han sido modificadas para cumplir con propósitos específicos como la producción de proteínas tóxicas (pLysS) o regular la expresión de proteínas que a altas concentraciones se pueden agregar (Tuner). Dichas modificaciones resultan beneficiosas cuando se trabaja con proteínas que presentan características específicas que dificultan su biosíntesis, pero en el caso de AsCas12a al no presentar ninguna de estas características, la cepa BL21 (DE3) resulta la mejor opción.

Cinéticas de Biosíntesis de AsCas12a

Una vez que todos los parámetros establecidos como variables fueron optimizados se realizaron ensayos para determinar el efecto que dichos cambios tendrían en la DO del cultivo, la concentración de proteína total presente en la fracción soluble y la expresión relativa de AsCas12a. Además, un ensayo de biosíntesis con las condiciones iniciales se llevó a cabo y se realizó la comparación de los resultados obtenidos en ambos experimentos.

Se evaluó el efecto de la optimización de los parámetros de biosíntesis de AsCas12a en matraces conteniendo 100 mL de cultivo optimizado y el cultivo inicial. Las mediciones de DO muestran que el crecimiento de las bacterias con los parámetros optimizados es más rápido que con los parámetros iniciales, indicando

que el cultivo presenta una mayor biomasa bacteriana, lo cual fue comprobado pesando el pellet generado por la centrifugación de un litro de cultivo tanto optimizado como inicial, teniendo un peso aproximado de biomasa húmeda de 7.6 0g para el optimizado y de 2.27 g para el inicial. Aproximadamente a las 9 horas de post-inducción el cultivo optimizado alcanzó una DO máxima de 6.63 UA, mientras que el cultivo con parámetros iniciales a las 24 horas alcanzó una DO de aproximadamente 2.61 UA presentando así una DO 2.54 veces mayor en solo 9 horas de post-inducción con los parámetros optimizados. El comportamiento de la DO de ambos cultivos en función del tiempo se puede observar en la Figura 14.

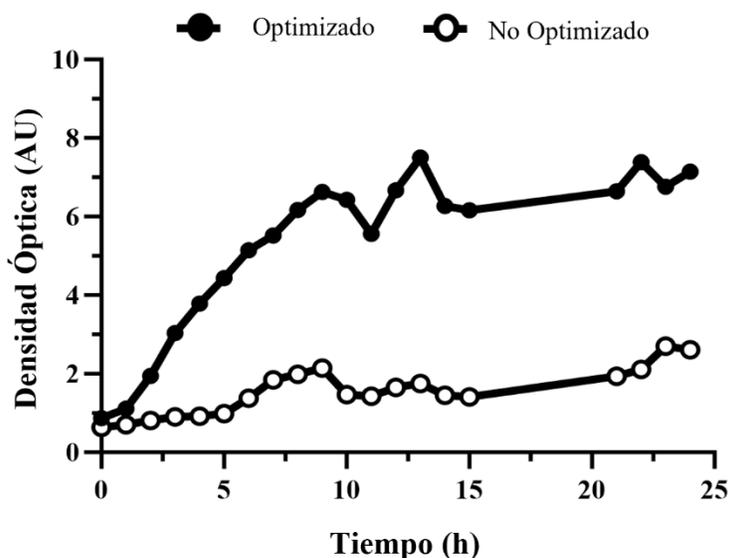


Figura 14. Ensayo para analizar el comportamiento de la densidad óptica de los cultivos optimizados y con condiciones iniciales. Gráfica del comportamiento de la densidad óptica de los cultivos con las condiciones optimizadas y las condiciones iniciales.

Posteriormente se analizó la concentración de proteína total presente en la fracción soluble de las muestras recuperadas de los cultivos optimizados e iniciales por mediciones realizadas con el programa Protein A / 280 de Nano Drop. Se observó que la concentración total de proteínas presente en la fracción soluble del cultivo optimizado alcanzó un valor máximo de entre 38 y 42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a las 9 horas de post-inducción. Mientras que a las 24 horas la concentración total de proteínas de la fracción soluble del cultivo con parámetros iniciales fue de aproximadamente 17.10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, teniendo una concentración 2.45 veces mayor a las 9 horas de post-inducción con los parámetros optimizados. El comportamiento de la concentración total de proteína presente en la fracción soluble con los parámetros optimizados e iniciales en función del tiempo se puede observar en la Figura 15.

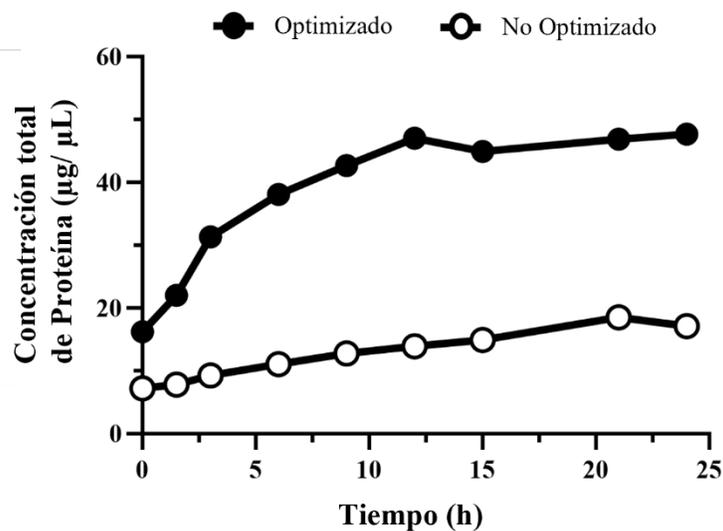


Figura 15. Ensayo de cuantificación mediante Nano Drop de la cantidad total de proteína presente en las muestras obtenidas de los cultivos con condiciones optimizadas y originales
Gráfica del comportamiento de la concentración total de proteína presente en las muestras obtenidas de la fracción soluble de las condiciones optimizadas y las condiciones iniciales.

Se analizó por SDS-PAGE la expresión relativa de AsCas12a tanto con los parámetros optimizados como con los parámetros iniciales (Figura 16). Se observó que, entre las 6 y 9 horas de post-inducción con los parámetros iniciales, la intensidad de la banda correspondiente a AsCas12a alcanza un máximo y no varía de manera notable en los tiempos posteriores. Además, la intensidad de la banda a las 6-9 horas de post-inducción con los parámetros optimizados es mucho mayor que aquella que se observó con los parámetros iniciales posterior a 24 horas de inducción.

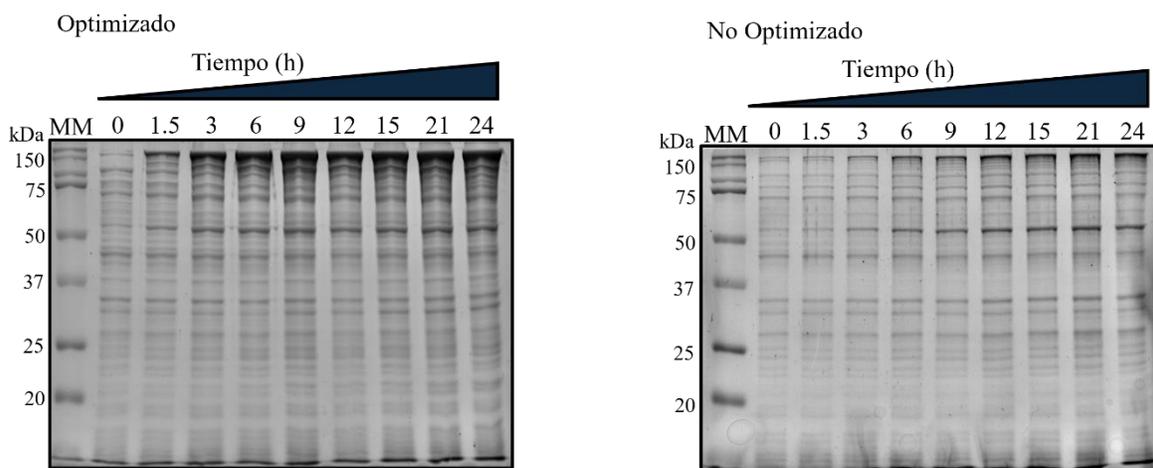


Figura 16. Determinación del porcentaje relativo de AsCas12a en las muestras obtenidas mediante análisis densitométricos Ensayos SDS-PAGE para evaluar la cinética de producción de la proteína AsCas12a tanto de las condiciones originales como de las condiciones optimizadas durante 24 hrs.

Con los análisis densitométricos se comprobó que la banda correspondiente a la expresión relativa de la proteína AsCas12a soluble con los parámetros optimizados alcanza un máximo de ~30.5% con relación a la intensidad total del carril entre las 6 y las 9 horas de post-inducción mientras que la expresión relativa máxima de la proteína AsCas12a con los parámetros iniciales fue de ~17.6% a las 24 horas de post-inducción. El comportamiento de la expresión relativa de la proteína recombinante se puede observar en la Figura 17.

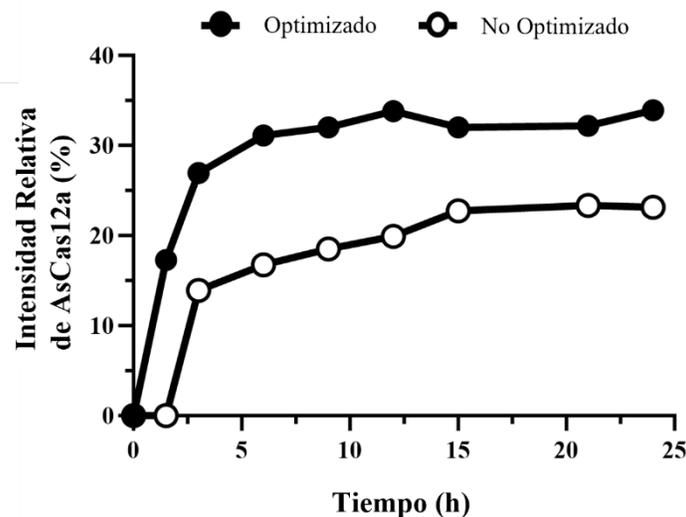


Figura 17. Determinación de la cantidad relativa de AsCas12a en función del tiempo. Gráfica que muestra el comportamiento de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a en función del tiempo.

Tabla 7. Promedio de la intensidad relativa de la banda correspondiente a la proteína AsCas12a obtenidos por análisis densitométricos.

Tiempo (hrs)	0	0.5	3	6	9	12	15	21	24
% de AsCas12a (Optimizada)	0	17.39	25.21	29.62	30.49	33.21	29.37	31.27	33.68
% de AsCas12a (Inicial)	0	0	13.9	16.74	18.53	19.92	22.75	23.35	23.16

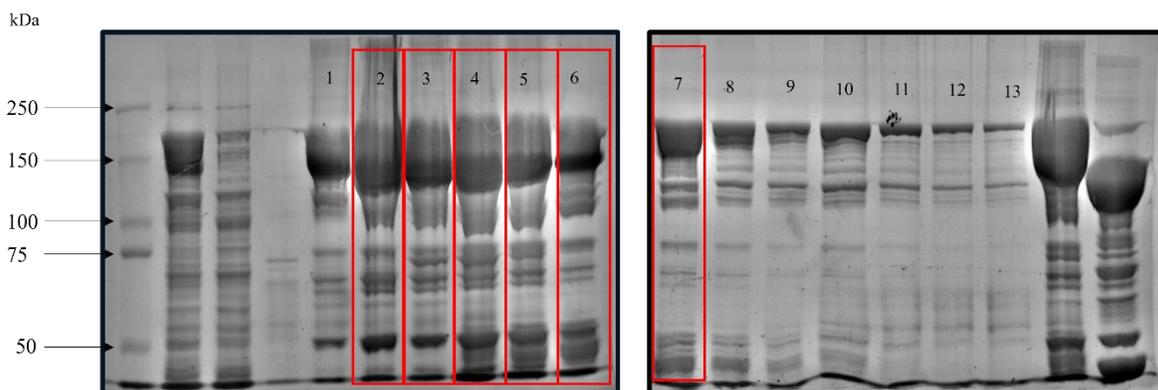
Con los análisis realizados se observó que el cambio de todos los parámetros seleccionados condujo a la optimización de la biosíntesis de la proteína AsCas12a ~1.62 veces cuando se comparó con la expresión relativa con los parámetros iniciales. Además, la optimización redujo el tiempo de post-inducción ~2.66 veces, pasando de 24 a solo 9 horas. El aumento en la biosíntesis de la proteína AsCas12a está sujeta a los múltiples parámetros que fueron evaluados, al aumentar la temperatura la tasa de crecimiento de *E. coli* también aumenta. Por otro lado, emplear un medio enriquecido y suplementarlo con glucosa asegura que las bacterias tendrán acceso a suficientes nutrientes para crecer y producir la proteína

AsCas12a. Además, la selección de una cepa especializada en la producción de proteínas recombinantes aseguró un alto rendimiento por litro de cultivo.

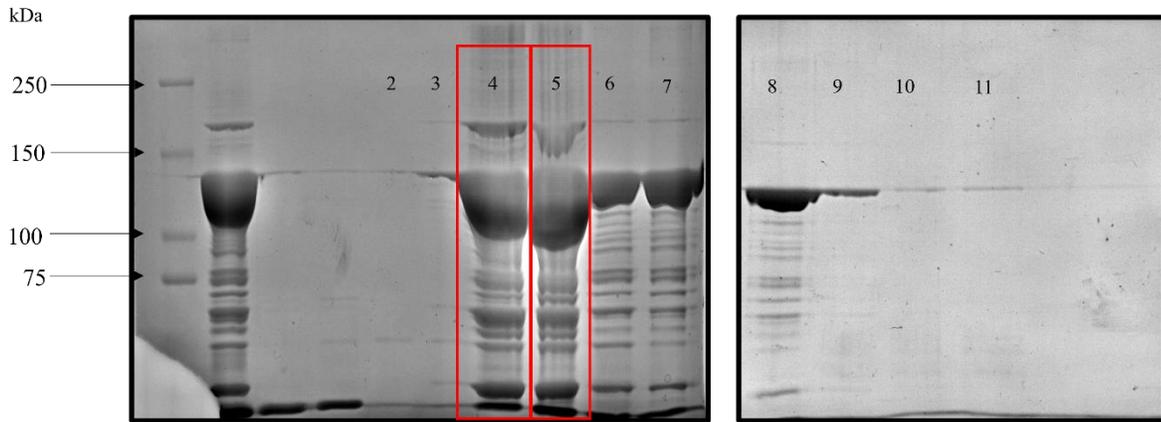
Biosíntesis en 1 L de cultivo y Purificación

La proteína AsCas12a se aisló de la fracción soluble del lisado celular de *E. coli* BL21 (DE3) y se purificó mediante tres cromatografías de columna: afinidad a níquel (figura 18a), heparina (Figura 18b) y exclusión molecular (SEC) (Figura 18c). La primera purificación por afinidad a níquel se realizó haciendo uso de la etiqueta de seis histidinas que se encuentra en la región amino terminal de AsCas12a, dicha etiqueta fue cortada por la acción de la enzima proteasa TEV y posteriormente se removió mediante el proceso de diálisis. Aprovechando las características electrostáticas de la proteína AsCas12a, la cual presenta una carga positiva, se realizó una purificación por intercambio iónico empleando una columna de heparina que presenta grupos carboxilato (COO^-) y sulfonato (SO_3^-) que interactúan con la carga de AsCas12a siempre y cuando se emplee un buffer con un pH menor al punto isoeléctrico (pI) de AsCas12a (pI = 8.01). Finalmente, las proteínas se purificaron según su tamaño empleando una técnica de cromatografía de columna por exclusión molecular.

A)



B)



C)

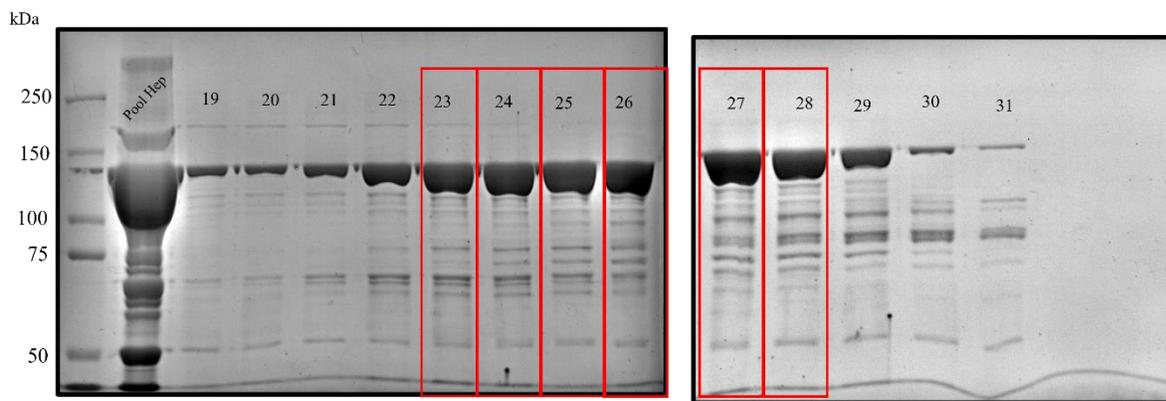
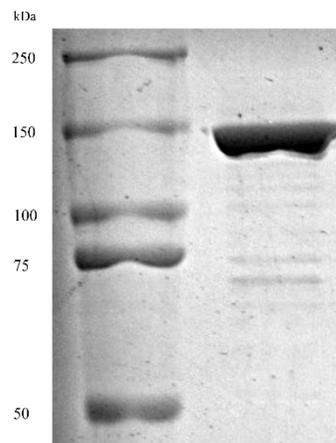
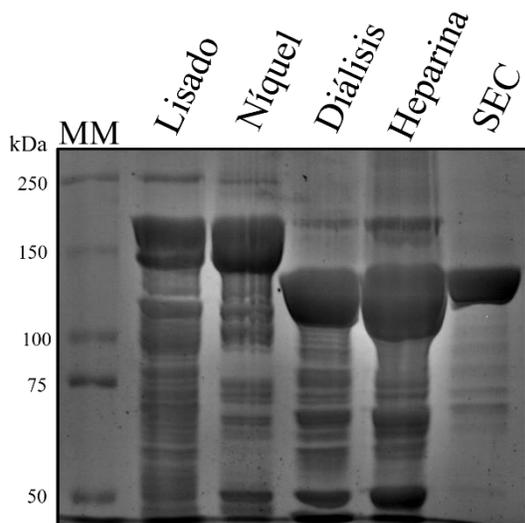


Figura 18. SDS-PAGE 7.5% correspondiente a las purificaciones por cromatografía de columna. A) Níquel. B) Heparina. C) Exclusión molecular (SEC). Las fracciones que fueron recuperadas se encuentran señaladas con un rectángulo rojo.



Pureza relativa: 88.88%

Figura 19. Ensayo de purificación mediante cromatografías de columna de 1 litro de cultivo y determinación de la pureza relativa de AsCas12a. A) Resumen de la purificación de la proteína AsCas12a. B) *SDS-PAGE* en el que se cargó en cada carril un microgramo de la proteína AsCas12a para determinar su pureza relativa.

Posteriormente se comprobó la identidad y pureza de las proteínas por *Western Blot* y *SDS-PAGE*, respectivamente. En el *SDS-PAGE* correspondiente al análisis de pureza de AsCas12a y con un posterior análisis densitométrico podemos observar que contamos con una pureza relativa de ~88.88% la cual no se encuentra tan alejada a la de la proteína AsCas12a que se obtiene con PI (Figura 19).

Para confirmar la identidad de las proteínas purificadas se llevó a cabo un WB empleando un anticuerpo policlonal anti-Cpf1 (Figura 20). En dicho ensayo podemos observar que tanto la proteína purificada fue reconocida exitosamente por el anticuerpo, al igual que la proteína AsCas12a previamente producida con el protocolo inicial, así como las proteínas AsCas12a catalíticamente inactivas que de igual manera son producidas y purificadas en el laboratorio. La proteína que fue empleada como control en este caso fue una proteína completamente no relacionada y como se observa en el WB (Figura 20) el anticuerpo anti-Cpf1 no reconoció el control. La presencia de la pequeña banda que se encuentra por debajo de la banda correspondiente a la de la proteína AsCas12a puede deberse a que al momento de la producción de la proteína existe cierto porcentaje de proteína Cas12 que no se produce de manera exitosa o por la presencia de fragmentos hidrolizados de la proteína por el proceso de biosíntesis o algún error relacionado con la metodología.

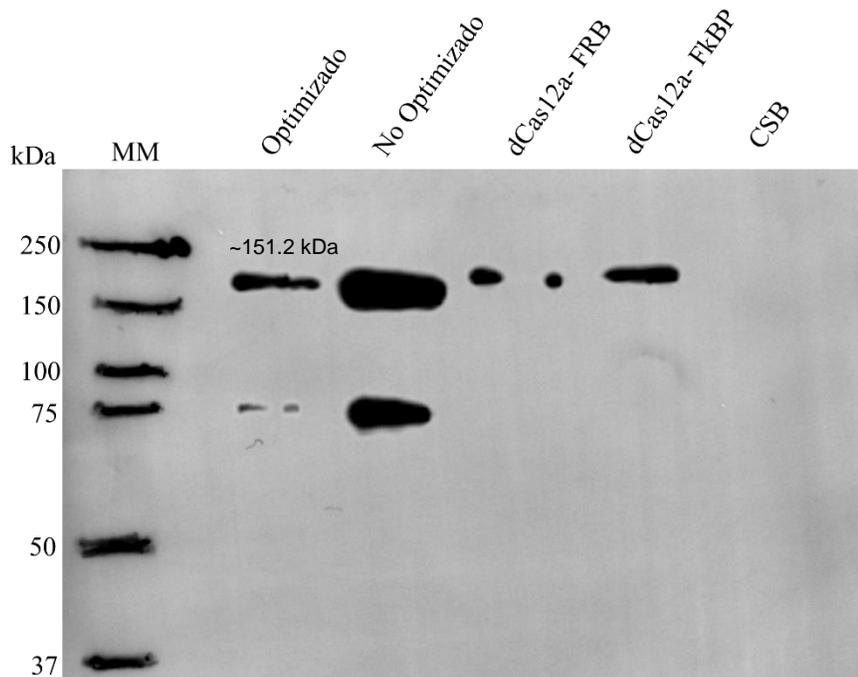


Figura 20. Ensayo de *Western Blot* para comprobar la identidad de la proteína AsCas12a con un peso molecular de 151.2 kDa.

Aunque para este punto la identidad y pureza de la proteína AsCas12a ya había sido confirmada, se requirió realizar una caracterización funcional de la misma ya que al aumentar la temperatura de post-inducción hasta 30°C corríamos el riesgo de que el plegamiento de la proteína de interés no fuera el correcto por el acelerado ensamblaje que las proteínas experimentan a dicha temperatura en comparación con la biosíntesis a 12 °C.^{28,29,30}

Evaluación de la Actividad Nucleasa (*Cis*)

Una vez que la proteína AsCas12a fue purificada correctamente y se realizaron las alícuotas se analizó si el cambio de todos los parámetros que fueron optimizados a lo largo de esta investigación afectaría la actividad nucleasa de la proteína, impidiendo su desempeño en el corte de dsDNA una vez que se formara

el complejo RNP^{5,14}. Para comprobar esto se evaluó la habilidad del complejo RNP de la proteína AsCas12a y su gRNA para cortar el gen N del SARS-CoV-2 contenido en el plásmido pPET28a-SARS-CoV-2-genN(Figura 21).

En el primer pozo del gel de agarosa se colocó el marcador de peso molecular, en el segundo pozo se colocó el pDNA conteniendo la secuencia del gen N del SARS-CoV-2 y el complejo RNP formado por la proteína AsCas12a y con el gRNA diseñado para la detección del gen N, en el tercer pozo se colocó simplemente el plásmido pPET28a-SARS-CoV-2-genN , en el cuarto pozo se colocó el complejo RNP con el gRNA diseñado para la detección del gen N y el plásmido pMBP-AsCas12a como control negativo de la actividad de corte del complejo RNP y finalmente en el quinto pozo se cargó el plásmido pMBP-AsCas12a.

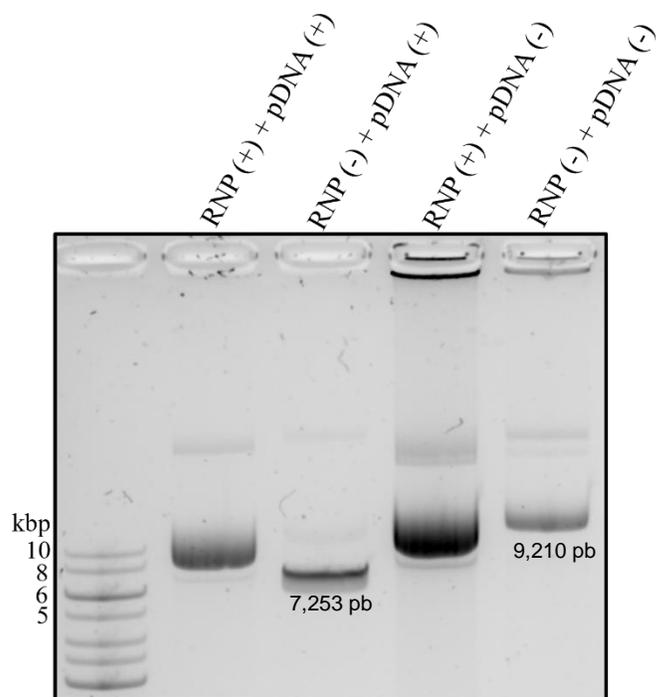


Figura 21. Ensayo de corte *cis* del gen N del SARS-CoV-2 en gel de agarosa 1%.

Como se puede observar en el gel de agarosa (Figura 21), el complejo RNP digirió de manera exitosa y eficiente el pDNA diana que contiene la secuencia del

gen N del SARS-CoV-2 y que se encontraba superenrollado, el cual presenta un peso molecular de 7,253 pares de bases (pb). El pDNA usado como control negativo que tiene un peso molecular de 9,210 pb permaneció intacto debido a que la proteína AsCas12a no fue capaz de reconocerlo con el gRNA empleado para la formación de los RNP.

Después de este análisis se comprobó que ninguno de los parámetros optimizados para la biosíntesis AsCas12a afectó la actividad de corte en *cis* de la proteína obtenida del ensayo de producción a gran escala y purificación por cromatografías de columna. La proteína fue capaz tanto de interactuar con el gRNA necesario para el reconocimiento del pDNA diana, así como de reconocer y cortar el pDNA que contenía al gen N del SARS-CoV-2.

Evaluación de la Actividad Nucleasa (*Trans*) / Ensayo de Detección Molecular

El último paso para determinar que la proteína obtenida con los parámetros optimizados era completamente funcional es la evaluación de la actividad de corte colateral (*trans*) que presenta la proteína AsCas12a, cualidad que la ha llevado a ser ampliamente utilizada para la detección molecular de patógenos de interés.^{9,27,37,38}

Se evaluó si la actividad de corte en *trans* de AsCas12a se había visto afectada por el cambio en los diversos parámetros aquí evaluados mediante el seguimiento del aumento de fluorescencia en consecuencia del corte de una sonda conformada por una secuencia corta de ssDNA acoplada al fluoroforo FAM y a una molécula quencher, corte que se da posterior al correcto reconocimiento de la secuencia del dsDNA diana por el complejo RNP (Figura 22).

Para este ensayo de detección molecular se colocó el volumen total de reacción (27 μ L) en la placa de 256 pocitos y posteriormente se siguió el cambio en la fluorescencia de manera continua durante 60 minutos. Se midió continuamente la fluorescencia de tres reacciones distintas, una positiva que contenía al pDNA con la secuencia respectiva del gen N SARS-CoV-2 y el complejo RNP conformado por la proteína AsCas12a y el gRNA diseñado para la detección del gen N. Una negativa que contenía al pDNA necesario para la biosíntesis de la proteína AsCas12a y el complejo RNP con el gRNA diseñado para la detección del gen N. Finalmente una tercera reacción que contenía simplemente el complejo RNP sin ningún pDNA. (Figura 22)

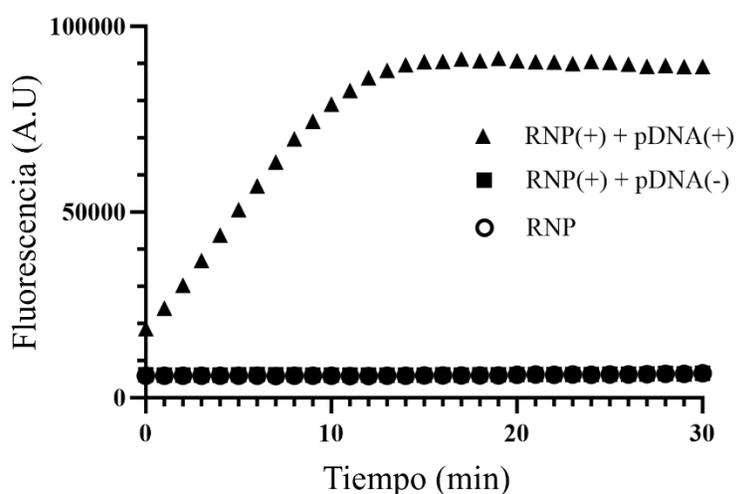


Figura 22. Ensayo de corte *Trans* para la detección molecular del gen N del SARS-CoV-2 determinado por el aumento en la fluorescencia dado por el corte indiscriminado de la sonda de ssDNA.

Como se puede observar en la Figura 22, las reacciones correspondientes al control negativo y al control sin pDNA no muestran un aumento en la fluorescencia de FAM durante los 60 minutos de incubación del ensayo de detección molecular. Por otra parte, el rápido aumento en la intensidad de fluorescencia de FAM de la reacción que contiene el RNP y el pDNA con la secuencia para detectar el gen N del SARS-CoV-2 indica que la proteína AsCas12a purificada presenta una actividad de corte colateral completamente funcional la cual puede ser empleada para la detección genética.

Después de este análisis se comprobó que ninguno de los parámetros optimizados afectó la actividad de corte en *trans* de la proteína AsCas12a esto debido a que la proteína fue capaz de reconocer y cortar a su dsDNA diana de manera eficiente y específica. De igual manera fue capaz de cortar de manera indiscriminada la sonda de ssDNA presente en la reacción de detección molecular, lo cual significa que la proteína AsCas12a producida con los parámetros optimizados y purificada por cromatografías de columna es completamente funcional.

Conclusiones

1. Se optimizó la concentración de IPTG de 1 mM a 0.3 mM, la temperatura de post-inducción de 12°C a 30°C , el medio de cultivo de LB a TB suplementado con glucosa y la cepa empleada para la biosíntesis de la proteína AsCas12a, la cual se mantuvo como BL21 (DE3). Esto fue comprobado por el aumento en la densidad óptica del cultivo, la concentración total de proteína y la expresión relativa de la proteína AsCas12a.
2. La pureza de la proteína AsCas12a obtenida con los parámetros optimizados se encuentra dentro del porcentaje de pureza obtenido en otros artículos de investigación relacionados.^{5,6,9,10}
3. Se comprobó que la proteína AsCas12a producida con las condiciones optimizadas mantiene su actividad nucleasa tanto en *Cis* como en *Trans*.
4. Los ensayos de detección molecular del gen N del SARS-CoV-2 demostraron que la proteína AsCas12a presenta una actividad nucleasa en *trans* eficiente, ya que se generó la señal máxima de fluorescencia a los 15 minutos de incubación.

Referencias

1. Paul, B., & Montoya, G. CRISPR-Cas12a: Functional overview and applications. *Biomedical Journal*. (2020)
2. Shi, Y., Fu, X., Yin, Y., Peng, F., Yin, X., Ke, G., & Zhang, X. CRISPR-Cas12a System for Biosensing and Gene Regulation. *Chemistry, an Asian journal*, 16(8), 857–867. (2021)
3. Khan, S., Sallard, E. Current and Prospective Applications of CRISPR-Cas12a in Pluricellular Organisms. *Mol Biotechnol* 65, 196–205. (2023)
4. Swarts, D. C., & Jinek, M. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure-function comparisons and implications for genome editing. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 9(5), e1481. (2018)
5. Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S., Essletzbichler, P., Volz, S. E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E. V., & Zhang, F. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell*, 163(3), 759–771. (2015)
6. Dong, D., Ren, K., Qiu, X., Zheng, J., Guo, M., Guan, X., Liu, H., Li, N., Zhang, B., Yang, D., Ma, C., Wang, S., Wu, D., Ma, Y., Fan, S., Wang, J., Gao, N., & Huang, Z. X. The crystal structure of Cpf1 in complex with CRISPR RNA. *Nature*, 532(7600), 522–526. (2015)
7. Gao, P., Yang, H., Rajashankar, K. R., Huang, Z., & Patel, D. J. Type V CRISPR-Cas Cpf1 endonuclease employs a unique mechanism for crRNA-mediated target DNA recognition. *Cell research*, 26(8), 901–913. (2016)
8. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816–821. (2012)
9. Chen, J. S., Ma, E., Harrington, L. B., Da Costa, M., Tian, X., Palefsky, J. M., & Doudna, J. A. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science (New York, N.Y.)*, 360(6387), 436–439. (2018)
10. Strohkendl, I., Saifuddin, F. A., Rybarski, J. R., Finkelstein, I. J., & Russell, R. Kinetic Basis for DNA Target Specificity of CRISPR-Cas12a. *Molecular cell*, 71(5), 816–824.e3. (2018)
11. Mohanraju, P., Van Der Oost, J., Jinek, M., & Swarts, D. C. Heterologous Expression and Purification of CRISPR-Cas12a/Cpf1. *Bio-protocol*, 8(9), e2842. (2018)
12. Martin, L.; Rostami, S.; Rajan, R. *Optimized Protocols for the Characterization of Cas12a Activities*, 1st ed.; Elsevier Inc., Vol. 679. (2023)

13. Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. et al. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol* 60, 174–182. (2005)
14. Nuñez, J. K., Kranzusch, P. J., Noeske, J., Wright, A. V., Davies, C. W., & Doudna, J. A. Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature structural & molecular biology*, 21(6), 528–534. (2014)
15. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39), E2579–E2586. (2012)
16. Nishimasu, H., & Nureki, O. Structures and mechanisms of CRISPR RNA-guided effector nucleases. *Current opinion in structural biology*, 43, 68–78. (2017)
17. Stella, S., Alcón, P., & Montoya, G. Class 2 CRISPR-Cas RNA-guided endonucleases: Swiss Army knives of genome editing. *Nature structural & molecular biology*, 24(11), 882–892. (2017)
18. Doudna, J. A., & Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), 1258096. (2014)
19. Kim, H. K., Song, M., Lee, J., Menon, A. V., Jung, S., Kang, Y. M., Choi, J. W., Woo, E., Koh, H. C., Nam, J. W., & Kim, H. In vivo high-throughput profiling of CRISPR-Cpf1 activity. *Nature methods*, 14(2), 153–159. (2017)
20. Kleinstiver, B. P., Tsai, S. Q., Prew, M. S., Nguyen, N. T., Welch, M. M., Lopez, J. M., McCaw, Z. R., Aryee, M. J., & Joung, J. K. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nature biotechnology*, 34(8), 869–874. (2016)
21. Kleinstiver, B. P., Sousa, A. A., Walton, R. T., Tak, Y. E., Hsu, J. Y., Clement, K., Welch, M. M., Horng, J. E., Malagon-Lopez, J., Scarfò, I., Maus, M. V., Pinello, L., Aryee, M. J., & Joung, J. K. Engineered CRISPR-Cas12a variants with increased activities and improved targeting ranges for gene, epigenetic and base editing. *Nature biotechnology*, 37(3), 276–282. (2019)
22. Li, B., Zhao, W., Luo, X., Zhang, X., Li, C., Zeng, C., & Dong, Y. Engineering CRISPR-Cpf1 crRNAs and mRNAs to maximize genome editing efficiency. *Nature biomedical engineering*, 1(5), 0066. (2017)
23. Liu, Y., Han, J., Chen, Z., Wu, H., Dong, H., & Nie, G. Engineering cell signaling using tunable CRISPR-Cpf1-based transcription factors. *Nature communications*, 8(1), 2095. (2017)
24. Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology*, 5, 172. (2014)

25. Lara, Álvaro R. Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista mexicana de ingeniería química*, 10(2), 209-223. (2011)
26. Grodberg, J., and Dunn, J. J. ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* 170, 1245–1253. (1988)
27. Morales-Moreno, M. D., Valdés-Galindo, E. G., Reza, M. M., Fiordelisio, T., Peon, J., & Hernandez-Garcia, A. Multiplex gRNAs Synergically Enhance Detection of SARS-CoV-2 by CRISPR-Cas12a. *The CRISPR journal*, 6(2), 116–126. (2023)
28. Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein science: a publication of the Protein Society*, 28(8), 1412–1422. (2019)
29. Hayat, S. M. G., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What We Need to Know. *Current pharmaceutical design*, 24(6), 718–725. (2018)
30. Lessard, J. C. Growth Media for *E. coli*. *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate*, 181–189. (2013)
31. Carmignotto, G. P.; Azzoni, A. R. On the Expression of Recombinant Cas9 Protein in *E. Coli* BL21(DE3) and BL21(DE3) Rosetta Strains. *J. Biotechnol.* 2019, 306, 62–70. (2019)
32. Wong, M. S.; Wu, S.; Causey, T. B.; Bennett, G. N.; San, K.-Y. Reduction of Acetate Accumulation in *Escherichia Coli* Cultures for Increased Recombinant Protein Production. *Metab. Eng.* 10 (2), 97–108. (2008)
33. Hartinger, D., Heini, S., Schwartz, H. E., Grabherr, R., Schatzmayr, G., Haltrich, D., & Moll, W. D. Enhancement of solubility in *Escherichia coli* and purification of an aminotransferase from *Sphingopyxis* sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisin B(1). *Microbial cell factories*, 9, 62. (2010)
34. Robichon, C., Luo, J., Causey, T. B., Benner, J. S., & Samuelson, J. C. Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Applied and environmental microbiology*, 77(13), 4634–4646. (2011)
35. Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., & Persson, A. Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3). *Protein Expression and Purification*, 69(2), 159–167. (2010)
36. Fu, W., Lin, J., & Cen, P. 5-Aminolevulinate production with recombinant *Escherichia coli* using a rare codon optimizer host strain. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(4), 777–782. (2007)

37. Yang, Y.; Wang, D.; Lü, P.; Ma, S.; Chen, K. Research Progress on Nucleic Acid Detection and Genome Editing of CRISPR/Cas12 System. *Mol. Biol. Rep.* 50 (4), 3723–3738. (2023)
38. Lee Yu, H.; Cao, Y.; Lu, X.; Hsing, I.-M. Detection of Rare Variant Alleles Using the AsCas12a Double-Stranded DNA Trans-Cleavage Activity. *Biosens. Bioelectron.* 189, 113382. (2021)
39. Gomes, L., Monteiro, G., & Mergulhão, F. The Impact of IPTG Induction on Plasmid Stability and Heterologous Protein Expression by *Escherichia coli* Biofilms. *International journal of molecular sciences*, 21(2), 576. (2020).