



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA NO
ESTRUCTURAL 1 (NS1) DEL VIRUS DENGUE
SEROTIPO 2**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
DIANA RAQUEL AGUILAR MORALES**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN ERNESTO LUDERT LEÓN**

**ASESORA INTERNA:
DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA**



MÉXICO D.F.

MAYO 2010



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.



Cinvestav

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA NO
ESTRUCTURAL 1 (NS1) DEL VIRUS DENGUE
SEROTIPO 2**

TESIS QUE PRESENTA:

DIANA RAQUEL AGUILAR MORALES

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JUAN ERNESTO LUDERT LEÓN

ASESORA INTERNA:

DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

AGRADECIMIENTOS

AL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR
LABORATORIO DE VIROLOGÍA, POR LAS FACILIDADES PROPORCIONADAS
PARA LA REALIZACIÓN DE LAS ACTIVIDADES EXPERIMENTALES DE LA
PRESENTE TESIS DE LICENCIATURA.

AL LABORATORIO NACIONAL DE GENOMICA PARA LA BIODIVERSIDAD.
CINVESTAV-IRAPUATO., POR SU COLABORACIÓN PARA SECUENCIAR EL
ADN DEL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN RECOMBINANTE DE LA PROTEÍNA
NS1 DE DENV-2.

Y ESPECIALMENTE A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO, FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, QUE SE
ESFUERZA POR FORMAR PROFESIONISTAS CON SENTIDO HUMANISTA.

POR ÚLTIMO A MI FAMILIA CUYO APOYO HE REQUERIDO PARA
CUMPLIR MIS METAS, Y TAMBIEN GRACIAS A MIS COMPAÑEROS DE
LA CARRERA DE BIOLOGÍA CON QUIENES COMPARTI EXPERIENCIAS.

INDICE

	PÁG.
ABREVIATURAS	IV
1. RESUMEN	1
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	
2.1. Generalidades de la Fiebre por dengue.....	2
2.2. El virus dengue (DENV).....	3
Fig.1.Distribución geográfica de la enfermedad por DENV (1995-2005)...	3
Fig.2.Virión de dengue forma inmadura y madura	4
Fig.3.Estructura del genoma de virus dengue.....	5
Fig.4.Replicación de viriones de DENV	6
2.3. Proteínas estructurales y no estructurales del DENV.....	7
2.4. Patogénesis de la fiebre hemorrágica por el DENV.....	10
Fig.5.Patogénesis de la infección por el DENV.....	11
2.5. Diagnóstico de la Fiebre por Dengue.....	12
2.6. Producción de proteínas recombinantes	13
Fig.6.Anticuerpos detectados durante la infección por dengue virus.	13
Fig.7.Clonación de secuencias de ADN en plásmidos.....	14
Fig.8.Regulación de la expresión en el Operon <i>lac</i>	15
2.7. Superproducción de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	16
Fig.9.Membranas en las bacterias gram negativas.....	17
Fig.10.Plegamiento de proteínas en sistemas procariontes.....	18
2.8. Plásmido de clonación pCR [®] 2.1 TOPO [®] y plásmido de expresión pPROEX HTb	19
Fig.11.Plásmido de clonación y plásmido de expresión	20
2.9 <i>Escherichia coli</i> cepa <i>DH5α</i>	21
Fig.12.Interacción entre la bandera de histidinas y la resina Ni-NTA.....	21
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
4. JUSTIFICACIÓN	23
5. HIPÓTESIS	24
6. OBJETIVOS	
6.1 Objetivo general y objetivos particulares	25
7. METODOLOGÍA	
7.1 Amplificación de la secuencia de la proteína NS1 de dengue serotipo 2 (DENV-2)	26
Fig.13.Secuencia del gen codificador de la proteína NS1 de DENV-2	26
Fig.14.Mapa del sitio de clonación del plásmido pCR [®] 2.1 TOPO [®]	28
Fig.15.Mapa del sitio de clonación múltiple del plásmido pPROEX HTb	29
Tab.1. Reacción para la amplificación de la secuencia de la proteína NS1 de DENV-2	30
7.2 Ligación de la secuencia de la proteína NS1 en el plásmido de clonación....	31
Tab.2. Reacción de ligación del plásmido pCR [®] 2.1 TOPO [®] con el amplificado de PCR de la proteína NS1.....	31
Tab.3.Mezcla de reacción de PCR colony para amplificar el gen de la proteína NS1.	32
7.3 Subclonación de la secuencia de la proteína NS1 en el plásmido de expresión	33
7.3.1 Liberación del gen de la proteína NS1 y linearización del plásmido de expresión ...	34

Tab.4.Reacción enzimática del plásmido de clonación recombinante.....	35
Tab.5.Reacción enzimática del plásmido de expresión pPROEX HTb.....	35
7.3.2 Ligación de la secuencia de la proteína NS1 en el plásmido de expresión linearizado	36
Tab.6.Reacción de ligación de la secuencia de la proteína NS1 dentro del plásmido de expresión.....	36
7.4 Expresión e inducción en condiciones nativas de la proteína recombinante NS1 de DENV-2 en bacterias DH5 α	37
7.4.1 Inducción en gran escala de la proteína recombinante en forma nativa.....	40
7.4.2 Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad ...	42
8. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA.....	45
9. RESULTADOS	
9.1 Amplificación de la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2.....	46
Fig.16.Gel de agarosa con el amplicón de la secuencia de la proteína NS1	46
9.2 Ligación de la secuencia de la proteína NS1 con el plásmido de clonación pCR [®] 2.1 TOPO [®] y transformación de bacterias competentes.....	47
Fig.17.Gel de agarosa con la amplificación por PCR de la proteína NS1 de colonias transformadas con el plásmido pCR [®] 2.1 TOPO [®] -NS1 DENV-2...	48
9.3 Subclonación de la secuencia de la proteína NS1 en el plásmido de expresión....	49
Tab.7.Tamaño teórico calculado de la digestión enzimática (<i>BamHI</i> y <i>XhoI</i>), de los plásmidos de clonación y expresión	49
Fig.18. Gel de agarosa con los productos de la digestión enzimática con <i>BamHI</i> y <i>XhoI</i> , del plásmido pCR [®] 2.1 TOPO [®] -NS1 y del plásmido de expresión.....	50
9.3.1 Ligación de la secuencia de la proteína NS1 en el plásmido de expresión	51
Fig.19.Gel de agarosa con los productos de ligación de la secuencia de la proteína NS1 en el plásmido de expresión	52
9.3.2 Identificación y aislamiento de colonias transformadas con el plásmido de expresión ligado a la secuencia de la proteína NS1.....	53
Fig.20.Colonias desarrolladas de las bacterias transformadas con las reacciones de ligación	54
Fig.21.Gel de agarosa con los productos de restricción, con la enzima <i>BamHI</i> , de plásmidos pPROEX HTb- NS1 DENV-2 extraídos de bacterias ..	55
Fig.22.Gel de agarosa con el amplificado por PCR colony de la proteína NS1, de bacterias transformadas con el plásmido pPROEX HTb-NS1 DENV-2.....	56
Fig.23.Gel de agarosa con la amplificación por PCR de la secuencia de la proteína NS1 y reacción de doble digestión de plásmidos pPROEX HTb- NS1 DENV-2....	56
9.3.3 Análisis de las secuencias de plásmidos recombinantes pPROEX HTb- NS1 DENV-2 extraídos de colonias transformadas.....	57
Fig.24.Secuencias de los plásmidos de expresión pPROEX HTb- NS1 DENV-2 extraídos de la colonia 2 y 7	58
Fig.25.Alineamiento de las secuencias del ADN en antisentido, de los plásmidos recombinantes de las colonias 2 y 7	59
Fig.26.Alineamiento de la secuencia en antisentido del plásmido de expresión pPROEX HTb-NS1 DENV-2 con el genoma de DENV-2 16681...	60
Fig.27.Alineamiento de la secuencia en sentido del plásmido pPROEX HTb- NS1 DENV-2 obtenido de bacterias con la secuencia diseñada teóricamente....	61
9.4 Inducción de la expresión de la proteína recombinante en bacterias <i>E. coli</i> DH5 α ...	62
Fig.28.Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie con las proteínas totales obtenidas de cultivos de bacterias que expresan la proteína recombinante.	63

Fig.29. Gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie y placa de western blot probada contra Anti-NS1 de proteínas inducidas con 1 mM de IPTG a 37 °C /3 hrs.	64
Fig.30. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie con las proteínas totales producidas por bacterias inducidas 0,5 mM de IPTG a 16 °C	66
Fig.31. Western blot para detectar la proteína recombinante con la bandera de histidinas, en la fracción con las proteínas solubles totales	67
9.5 Purificación de la proteína recombinante NS1 por cromatografía de afinidad.	68
Fig.32. Gel de agarosa con la amplificación por PCR colony de la secuencia de la proteína NS1 de colonias resistentes a ampicilina que expresan la proteína NS1	69
Fig.33. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie en donde se muestra la serie de eluciones de la purificación de la proteína recombinante con Ni-NTA.	70
Fig.34. Western blot contra histidinas para confirmar la identidad de la proteína recombinante purificada con Ni-NTA.....	71
10. DISCUSIÓN.....	73
10.1 Construcción del plásmido de clonación y de expresión recombinantes...	75
10.2 Expresión y purificación de la proteína recombinante NS1 de DENV-2...	77
11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	82
12. ANEXO A: SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	
12.1 Soluciones para geles de agarosa.....	84
12.2 Soluciones para preparar células competentes.....	84
12.3 Soluciones de antibióticos.....	84
12.4 Medios nutritivos: medio de cultivo sólido y líquido.....	85
12.5 Soluciones para la inducción de proteínas recombinantes.....	85
12.6 Extracción y purificación de ADN plasmidico	86
12.7 Soluciones para la técnica de electroforesis en gel de acrilamida	87
12.8 Soluciones para la técnica de western blot.....	88
12.9 Soluciones para la purificación de la proteína recombinante soluble	89
13. ANEXO B: TÉCNICAS BÁSICAS	
13.1 Electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.....	91
13.2 Extracción y purificación usando el kit comercial QIAEX	92
13.3 Corte de ADNdc con enzimas de restricción.....	93
13.4 Método de cloruro de rubidio para preparación de bacterias competentes..	94
13.5 Transformación química de bacterias competentes	95
13.6 Purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina (Minipreparación)....	97
13.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para análisis de proteínas...	98
13.8 Técnica de Western Blot (WB) para identificar proteínas.....	100
13.9 Expresión e inducción de proteínas recombinantes en bacterias DH5α....	103
13.10 Purificación por cromatografía de afinidad con matriz de Ni-NTA.....	106
14. REFERENCIAS.....	108
14.1 Bases de datos y enlaces electrónicos.....	114
15. GLOSARIO.....	115

ABREVIATURAS

ADNdc	Ácido Desoxiribonucleico doble cadena
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
Br-Et	Bromuro de etidio
DC-SING	DC-specific intercellular adhesión molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin
DENV-2	Virus del dengue serotipo 2
dNTP	2'-desoxinucleósido-5'-trifosfato
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Etilén diamino tetraacetato
ELISA	Enzyme Linked Inmuno Sorbent Assay
FD	Fiebre Clásica por Dengue o Fiebre por Dengue
FHD	Fiebre Hemorrágica por Dengue
IAM	Institute of Applied Microbiology
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (C ₉ H ₁₈ O ₅ S)
KDa	Kilodalton
LB	Medio nutritivo Luria Broth
min	minutos
mM	Milimolar
nm	nanómetros
NTA	ácido nitrilotriacético
pb	Pares de bases nucleotídicas
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PoliA	Poliadenilato
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
rpm	Revoluciones por minuto
SCDH	Síndrome de Choque por Dengue Hemorrágico
SDS	Sodio dodecil sulfato
seg	segundos
TE	Tris-EDTA
V	Volts

1. RESUMEN

La fiebre hemorrágica por dengue es una enfermedad que principalmente afecta a países en desarrollo ubicados en zonas tropicales donde produce un impacto importante en salud pública. Situación acentuada en recientes décadas debido a la cocirculación de los 4 diferentes serotipos en una misma región, así como un aumento en el desarrollo de la fiebre hemorrágica por dengue, forma potencialmente fatal de esta enfermedad. Por lo tanto el estudio del dengue y su monitoreo es de primordial interés para los organismos de salud internacional. Se conocen parcialmente los mecanismos de patogénesis y del papel de las proteínas virales para la exitosa infección por el virus; sin embargo aun no se ha aclarado completamente la función de la proteína no estructural 1 (NS1). Algunos de los ensayos necesarios para ahondar en el conocimiento de la función de la proteína NS1 requieren su obtención y purificación en forma nativa, para asegurar la preservación de su función biológica. La investigación experimental llevada a cabo en este proyecto tiene como objetivo la obtención de la proteína NS1 de dengue 2 en forma recombinante en condiciones nativas. El gen completo de la proteína NS1 de dengue serotipo 2 se clonó y posteriormente se expresó en un sistema procarionte bacteriano (*Escherichia coli*), obteniendo de tal manera una proteína recombinante no glicosilada fusionada en su extremo amino terminal a una bandera de 6 residuos de histidina. La identidad de la proteína así como sus niveles de expresión se verificaron por ensayos de western blot utilizando anticuerpos específicos contra la proteína NS1 y contra la bandera de histidinas. Al modificar las condiciones estresantes frecuentemente utilizadas en los métodos de inducciones a gran escala y optar por una inducción a 16°C con 0,5 mM de IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) se obtuvo la proteína recombinante en la fracción soluble de lisados bacterianos inducidos. La proteína se semipurificó por cromatografía de afinidad, utilizando una columna con matriz de níquel (Ni-NTA). La proteína NS1 recombinante semipurificada será utilizada para la obtención de suero hiperinmune en ratones y la realización de ensayos biológicos.

2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

2.1 Generalidades de la Fiebre por Dengue

Entre las enfermedades producidas por virus, que afectan al ser humano, son de destacar las fiebres hemorrágicas virales (FHV), en las que se ha centrado la atención desde hace décadas principalmente por los índices de mortalidad. Su incidencia impacta en la economía de los países afectados, e implica un constante monitoreo ⁽¹⁻²⁾.

Los virus responsables de producir fiebres hemorrágicas pertenecen a 4 familias distintas: *Arenaviridae*, *F iloviridae*, *B unyaviridae*, y *Flaviviridae*. Entre las características que comparten los miembros de estas familias esta el poseer un material genético de ARN (ácido ribonucleico), cubierta o envoltura embebida en una capa lipídica, y la dependencia de sobrevivir en la naturaleza a través de algunos animales (reservorios naturales). El humano contrae las infecciones por contacto con el hospedero natural. Y con pocas excepciones no existe cura o una vacuna efectiva para las enfermedades que estos producen ⁽³⁻⁶⁾.

Las FHV se caracterizan por provocar un síndrome multisistémico que incluye alteración en la homeostasis vascular, y cuyos síntomas frecuentemente se acompañan de manifestaciones de tipo hemorrágico. Dentro de este grupo de virus solo unos cuantos producen formas poco severas no fatales. El virus Dengue (**DENV**) forma parte de estas excepciones al generar una fiebre autolimitada, (**Fiebre Clásica por Dengue** o **Fiebre por Dengue**) que en ocasiones evoluciona a una forma severa con características hemorrágicas (**Fiebre Hemorrágica por Dengue**) que al prolongarse evoluciona hacia un choque vascular mortal (**Síndrome de Choque por Dengue Hemorrágico**) ⁽²⁻³⁾.

Los reportes indican que aproximadamente de 50 a 100 millones de personas anualmente adquieren la infección por dengue, y que entre 200,000 a 500,000 desarrollan la forma severa con característica hemorrágica, en la que el índice de mortalidad puede ser hasta de 5% para personas menores de 15 años. Los registros indican que en más de 100 países ubicados en áreas tropicales y subtropicales, el agente causal de esta enfermedad el virus dengue (**DENV**) es endémico (**Fig.1**), constante presencia que implica un riesgo de infección para 2.5 billones de personas. Esta alta incidencia en países en desarrollo, donde tiene una amplia distribución, la convierte en una de las principales preocupaciones de salud pública mundial ante las insuficientes medidas de prevención y tratamiento médico. Y es que en recientes décadas la variación en las condiciones

bioclimáticas ha afectado negativamente el esfuerzo sobre el control del vector, viéndose rebasadas las medidas previstas. Así se ha propiciado la proliferación de los mosquitos vectores (*Aedes aegypti* y *Aedes aldopictus*) y por ende la permanencia y co-circulación de los diversos serotipos⁽⁷⁻⁹⁾.

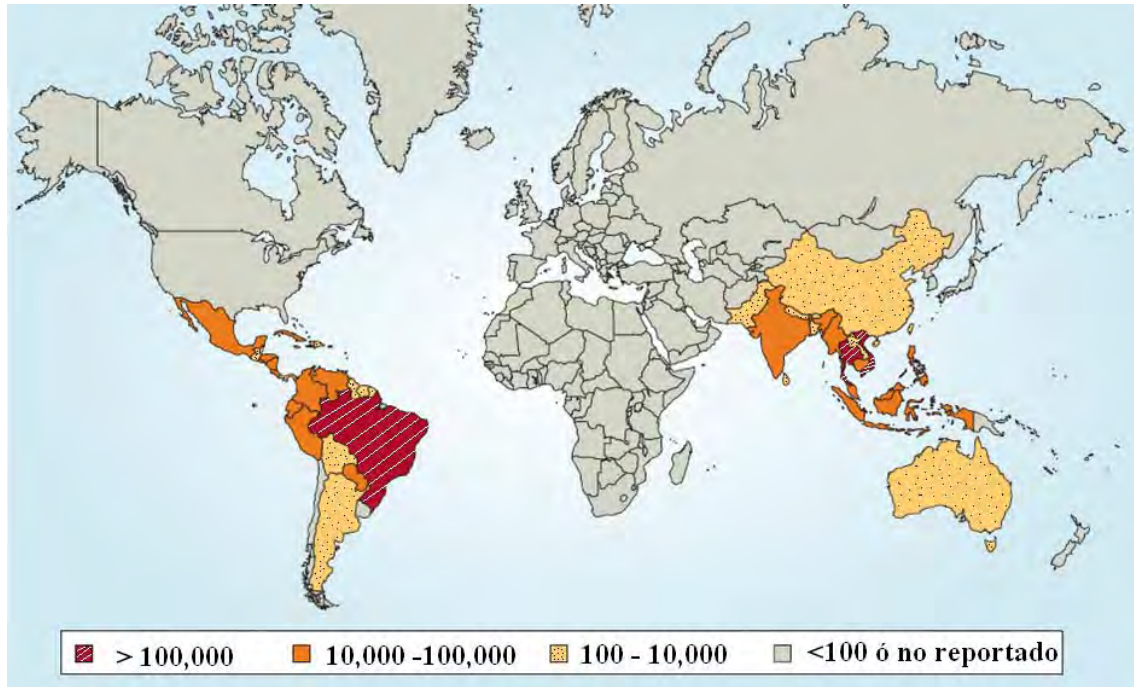


Fig.1 Distribución geográfica de la enfermedad por virus dengue durante los años 1995-2005. En países como Brasil donde cocirculan varios serotipos más de 100,000 mil casos de fiebre por dengue y dengue hemorrágico son reportados anualmente. Dada su distribución se considera que el virus dengue es endémico en la mayoría de las áreas tropicales y subtropicales del mundo^(9, 120, 121).

Este reto ha requerido la capacidad de diseñar y desarrollar adecuados sistemas de diagnóstico, tratamiento y elaboración de vacunas. Ello implica conocer los mecanismos de infección, siendo indispensable el conocimiento del agente viral. El producto de la investigación en varios sistemas experimentales ha revelado detalles tanto de la estructura como de las interacciones del virus con los organismos hospederos, lo cual ha permitido conocer aspectos de la biología y de la patogénesis del virus dengue⁽⁹⁾.

2.2 El virus dengue (DENV)

El **DENV** es un virus envuelto perteneciente a la familia *Flaviviridae* y al género *Flavivirus*. Este género destaca por que dentro de él se han clasificado otros patógenos relevantes para el hombre, tales como el virus del Oeste del Nilo (**WNV**), el virus de la Fiebre Amarilla y el virus de la Encefalitis Japonesa. En los diferentes brotes documentados de Fiebre Dengue se ha reconocido la existencia de cuatro serotipos (**DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4**), dato relevante ya que se ha asociado la

infección secundaria por diferentes serotipos con riesgo aumentado del desarrollo de la forma hemorrágica ⁽¹⁰⁾.

Estudios de cristalografía de rayos X y microscopia de fuerza atómica mostraron que durante el ciclo de infección, **DENV** presenta básicamente dos formas estructurales: la partícula viral inmadura y la partícula viral madura (**Fig.2**). En esta transición las proteínas cambian de conformación espacial dependiendo de las condiciones a que se verán sometidas durante los procesos de entrada y salida. La partícula viral inmadura de apariencia rugosa (600 Å de diámetro), esta conformada por el genoma viral de ARN contenido en una nucleocápside (300 Å de diámetro) de proteína C rodeada por una bicapa lipídica derivada del retículo endoplásmico (RE), donde se encuentran embebidas las proteínas prM (pre-Membrana) y E (Envoltura) que forman una cubierta en la que se proyectan al exterior 60 espículas, cada una de las cuales comprende heterodímeros de trímeros de ambas proteínas ⁽¹¹⁾.

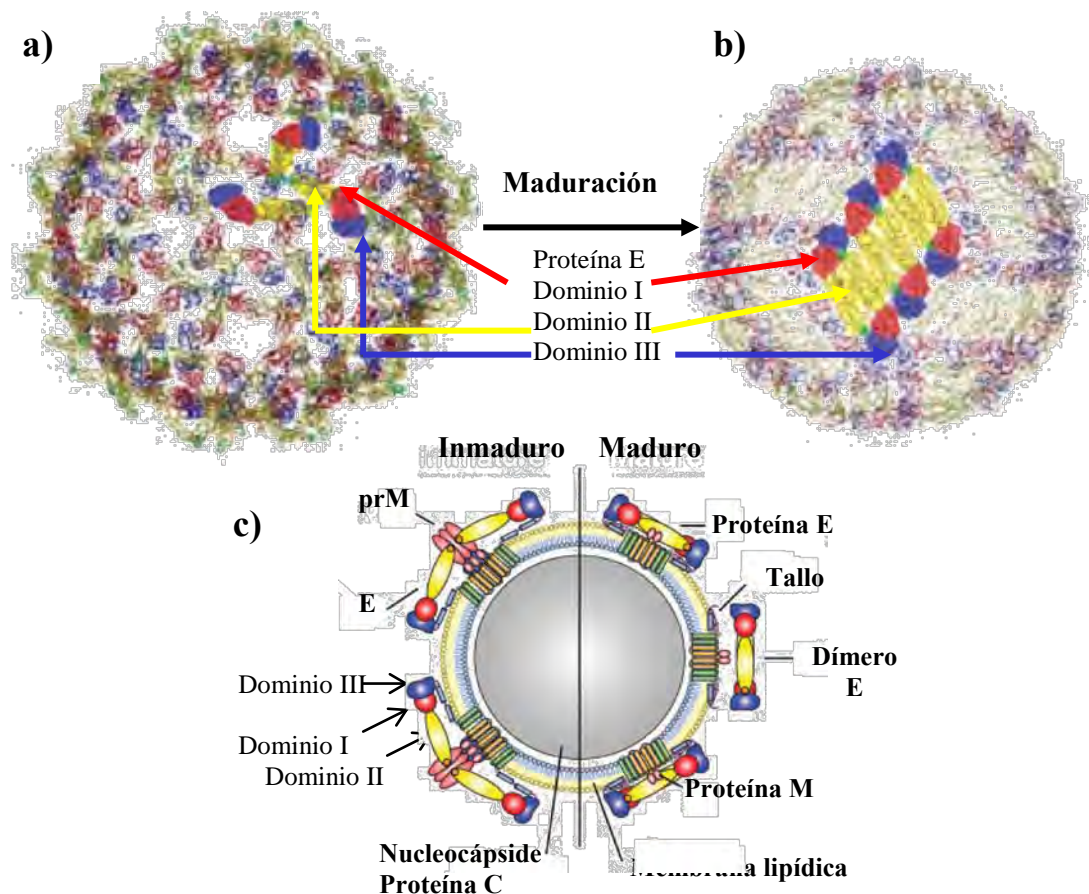


Fig.2. Virión de dengue forma inmadura y madura. a) Partícula inmadura con 60 espículas formadas por proteínas que sobresalen de la superficie y por tres dímeros paralelos de proteína E, conformada por un dominio I, dominio II y dominio III, y el péptido de fusión. b) En la forma madura de superficie aparentemente lisa, un escudo de proteína E en simetría icosaédrica rodea la membrana. c) Del lado izquierdo de la esfera que representa al virión, se observa la distribución de la proteína E antes del corte de prM, mientras que del lado derecho después del corte los homodímeros de E adquieren un acomodo que los expone mas a la superficie externa ^(12, 13).

Durante la maduración, las proteínas de la membrana (prM) son cortadas permitiendo así el rearrreglo de la proteína E en homodímeros alineados en 30 “aglomerados”, cada uno de los cuales contiene 3 dímeros antiparalelos acomodados en simetría icosaédrica (organizados en un patrón entramado). En esta redistribución el virión adquiere una apariencia mas lisa, en donde predomina la proteína E, optimizando así la interacción con receptores que median la entrada y la fusión. En la partícula inmadura la proteína E está cubierta por la proteína prM, protegiendo así el péptido de fusión el cual es vital para la invasión celular⁽¹²⁻¹³⁾.

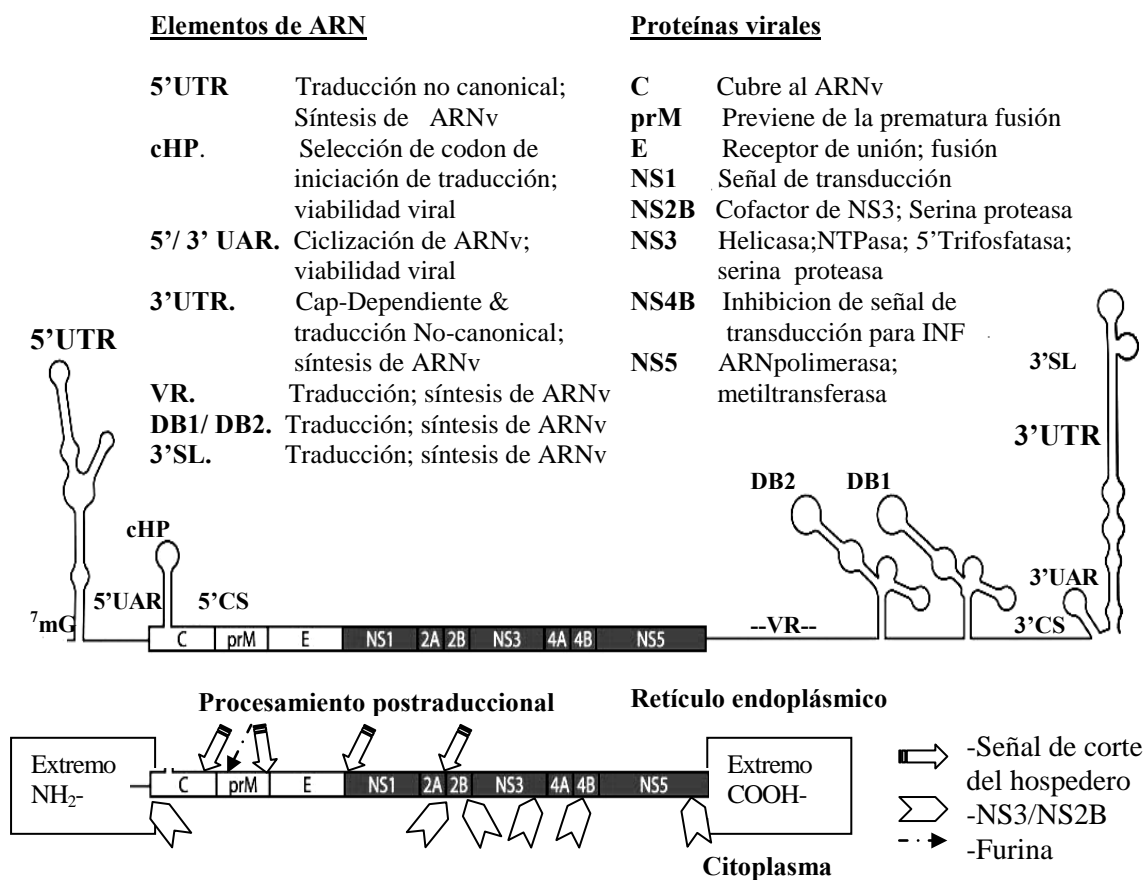


Fig.3. La estructura del genoma de virus dengue ARNv sentido positivo contiene una estructura tipo capucha en el extremo 5', y un solo marco de lectura abierta flanqueado por una regiones no traducidas en dirección 5' y 3' (UTRs). La estructura secundaria conservada de ARN en las UTRs y en la región que codifica se determina para ciertas funciones en varios estados del ciclo viral. La traducción resulta en una poliproteína precursora que es cortada tanto por señales del hospedero como por la proteasa viral, comenzando por el extremo amino terminal (corte postraduccional por el hospedero en flechas blancas delgadas y negras, y por las proteasas virales en flechas blancas anchas)^(10, 14).

El genoma de DENV consiste de una cadena simple de ARN de sentido positivo (con función de mensajero), cuya longitud es de aproximadamente 10,7 Kb. Utilizando la maquinaria del hospedero codifica un solo polipéptido de 3400 aminoácidos que al ser co- y postraduccionalmente procesado por las proteasas celulares y la serina proteasa viral da como resultado las proteínas estructurales C (cápside), prM (membrana) y E (envoltura). Posteriormente se procesan las proteínas no estructurales (NS); NS1, NS2A,

NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 que no forman parte del virión, pero se ha descrito son importantes en el proceso de replicación del virus (**Fig.3**). Similar a un ARN mensajero (ARNm) celular, este genoma, contiene una estructura de Capucha 1-7 metil-guanosina tipo 1 en sentido 5', una región no traducida 5'(UTR), un marco de lectura abierto, y una región no traducida 3'(UTR), pero a diferencia de todos los mensajeros celulares, este no es poliadenilado ⁽¹⁴⁾.

Una vez dentro de la célula, el genoma viral primero debe iniciar con la traducción y replicación de la hebra positiva del virus en el retículo endoplásmico. A partir de la hebra positiva de ARN se copia una hebra negativa, o intermediario de replicación para producir mas copias de sentido positivo que actuarán como mensajeros para la traducción de nuevas proteínas virales o como moldes para nuevas cadenas negativas, y cuando estén presentes los elementos y condiciones requeridos, algunas se encapsidarán dentro del virión como genoma (**Fig.4**) ⁽¹⁵⁾.

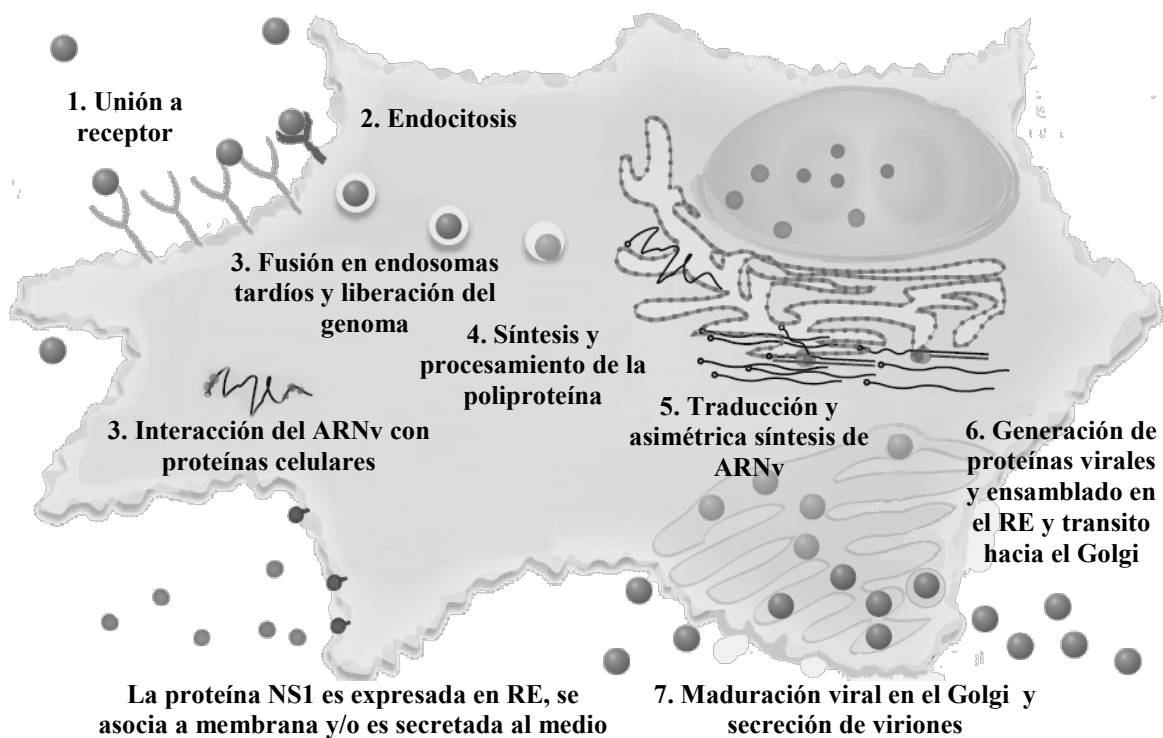


Fig.4. El virión de dengue se une a la superficie celular hospedera (macrófago) y entra por endocitosis mediada por receptor o por fusión directa con la membrana. En la endocitosis se involucran un receptor de baja afinidad (Ejem. DC-SIGN) que realiza la captura en la superficie, y otro de alta afinidad que media la internalización. Dentro del endosoma el cambio conformacional de las proteínas de envoltura se da cuando el ambiente dentro de este se ha acidificado, en ese momento se fusionan las membranas del virión y del endosoma formando un poro por donde escapa el ARN viral (ARNv). En el citoplasma el ARNv (+) es traducido en una poliproteína que al ser co- y post-traduccionalmente procesada, por proteasas hospederas y virales, da como resultado 3 proteínas estructurales y 7 proteínas no estructurales. En tanto la replicación genómica ocurre en membranas intracelulares. El ensamblado viral ocurre en la superficie del (retículo endoplásmico) RE cuando las proteínas estructurales y el recién sintetizado ARNv brotan dentro del lumen del RE, y después son transportados por la red del Trans-golgi. Posterior al corte por la furina proteasa del hospedero la forma madura del virión así como partículas subvirales, son liberadas por exocitosis ⁽¹⁰⁾.

La replicación del virus dengue es optimizada por la presencia de algunas estructuras secundarias y terciarias adoptadas por la interacción entre secuencias de bases nucleotídicas. Así la interacción entre los extremos 5'UTR y 3'UTR dada por complementariedad permite la circularización del genoma mientras que la presencia de falsos nudos en formas de asa (stem-loop) juegan un rol importante en la síntesis del ARN, principalmente para la hebra de sentido negativo ⁽¹⁶⁾.

2.3 Proteínas estructurales y no estructurales del DENV

Aunque no se ha elucidado completamente el papel e interacciones de las proteínas virales de DENV, algunos estudios han implicado a algunas de ellas en actividades más allá de la constitución del virión, o de la síntesis del ARN viral y proteólisis, ya sea interviniendo en la inhibición de la producción de interferón (IFN) mediado por señales de transducción, o en la organización de estructuras de membranas ⁽¹⁷⁾.

De las proteínas estructurales, la **proteína prM** protege a la proteína E previniendo cualquier cambio prematuro que pudiera ser inducido por el pH al momento de ser secretado el nuevo virión. Además se le ha atribuido una función de chaperona colaborando en el apropiado plegamiento y ensamblado de la proteína de envoltura. La proteína prM (165 aminoácidos, 26 kDa) es sintetizada en el lumen del retículo endoplásmico (**RE**) y junto con la proteína E, se halla integrada en la bicapa lipídica del virión, por dos regiones transmembranales que rodean a la nucleocápside ^(18, 19).

La unión, entrada y fusión del virión a través de la membrana plasmática de la célula hospedero es mediada por la **glicoproteína E** (53 kDa). Esta comprende tres dominios y un péptido de fusión tipo II, el cual se encuentra inaccesible en la forma madura pero una vez que la proteína E adquiere la conformación trimérica después de exponerse al pH ácido en los endosomas tardíos, este es expuesto sobre la proteína. El patrón de glicosilación de esta proteína, se ha asociado con el receptor de unión y fusión endosomal, pues es diferente dependiendo del serotipo y la célula en la que el virus es propagado ^(12, 20).

La nucleocápside del virión esta conformada por múltiples copias de homodímeros de la **proteína C** (11 kDa), la cual a partir del lumen brota para formar, en conjunto con las proteínas prM y E, la partícula viral. Su localización y acumulación en núcleo durante los primeros momentos de la infección podría facilitar el tráfico de ARNm celulares

hacia fuera del núcleo y modular la función de proteínas nucleares (procesamiento de ARNm, replicación de ADN (ácido desoxiribonucleico), regulación de ciclo celular) para favorecer una óptima replicación viral ⁽²¹⁻²²⁾.

La **proteína NS1** producida por los flavivirus es una glicoproteína altamente conservada de carácter parcialmente hidrofóbico, que parece ser esencial para la viabilidad del virus, aunque no se ha establecido su actividad biológica. Se presume que NS1 participa en el proceso de replicación y que forma parte del complejo de replicación viral, ya que por estudios de microscopía electrónica se ha visto que colocaliza con ARN de doble cadena. Los dos sitios conservados N-glicosilados (N130 y N207) y 12 residuos variantes de cisteína son requeridos para la replicación viral en células de mosquito y para la neurovirulencia en ratón, ya que la completa ablación de la glicosilación resulta en virus inestables genéticamente cuya progenie viral mutada presenta fenotipo alterado ⁽²³⁻²⁷⁾.

En principio sintetizada como un monómero, la proteína NS1 (50 a 45 kDa), es dimerizada (80 kDa) en el lumen del retículo endoplásmico (ER). Luego es modificada postransduccionalmente y cortada co-traduccionalmente por la acción de señales celulares para generar el extremo amino terminal de la proteína, y en células de mamífero posteriormente puede ser transportada a la superficie celular donde es liberada en forma soluble como hexámero (240 kDa) al medio extracelular en asociación con micropartículas pero no con el virión. Alternativamente, la proteína NS1 permanece anclada a la membrana plasmática en forma dimérica por medio de una unión covalente a glicosilfosfatidilinositol (GIP) ^(24, 28-29).

Se ha sugerido que la proteína NS1 soluble (NS1s) podría activar vías específicas de señalización que podrían sobrerregular la expresión en la superficie celular de receptores al virus, alterar la maquinaria proteolítica celular y prevenir la degradación de partículas virales, facilitando el proceso de fusión de las partículas de dengue con membranas endosomales ^(23,30-32).

La **proteína NS2A** (22 kDa) es una proteína hidrofóbica poco caracterizada, que se requiere para el apropiado procesamiento del extremo C-terminal de NS1. Se ha hipotetizado que forma parte del complejo de replicación ya que se une a NS3, NS5 y a la 3'UTR, y posiblemente también este involucrada en el proceso de empaquetamiento y morfogénesis viral, pues la mutación de su residuo 190 resulta en viriones sin

nucleocápside. En menor medida junto con la proteína NS4A es capaz de bloquear la señal de transducción que media la producción de IFN⁽³³⁻³⁵⁾.

En el procesamiento de la poliproteína viral la **proteína NS2B** de 14 kDa, es de gran importancia, ya que interacciona con la proteína NS3 actuando como cofactor y aumentador de la actividad serina proteasa de esta última. En su asociación al complejo proteasa y a la membrana de la célula infectada probablemente intervengan los tres residuos hidrofóbicos que flanquean NS2B, mientras que para la activación del dominio proteasa solo se requiere el dominio hidrofílico conservado, de tan solo 40 aminoácidos, entre estas regiones⁽³⁶⁻³⁷⁾.

Entre las proteínas virales de los flavivirus ampliamente caracterizada se encuentra la **proteína NS3** (70 KDa), la cual realiza una función de nucleósido trifosfatasa, helicasa (requeridas en la síntesis del ARN viral) y 5' trifosfatasa. Al unirse a NS2B se potencializa la actividad de serina proteasa que realiza. Interactúa con receptores nucleares de unión a proteína, los cuales modulan el tráfico intracelular entre el RE y el compartimento de Golgi, lo que impacta en la distribución celular induciendo la formación de estructuras membranosas, típicamente observadas en la infección por flavivirus. Los epitopos de la proteína NS3 son reconocidos y son comúnmente encontrados en el repertorio de Linfocitos T citotóxicos específicos contra el DENV, por lo que se cree podría estimular la actividad de células T, CD4⁺ y CD8⁺ anti-dengue, con lo que podría contribuir con la producción de IFN- γ , y del factor de necrosis tumoral- α (TNF) y TNF- β ⁽³⁸⁻⁴¹⁾.

De carácter hidrofóbico la pequeña **proteína NS4A** (16 kDa) junto con la proteína NS1 se ha encontrado asociada a membranas de retículo endoplásmico (derivado de estructuras citoplasmáticas) que también contiene ARN de cadena doble y otras proteínas virales lo que ha hecho suponer su participación en el complejo de replicación viral asociado a membranas. En menor medida y en asociación con las otras proteínas virales tal como NS2A, bloquea la producción de IFN mediado por señales de transducción. Dada la pobre caracterización que se tiene de esta proteína poco se sabe sobre su función en el ciclo de replicación viral^(34, 42-43).

La **proteína NS4B** (248 aminoácidos, 27 kDa) es una proteína que presenta un carácter hidrofóbico, reside principalmente en el citoplasma, originalmente concentrado en retículo endoplásmico, y con NS3 colocaliza junto con los intermediarios de replicación

de ARN de doble cadena, por lo que podría formar parte del complejo de replicación viral y posiblemente participar en el mantenimiento del balance en la eficiente replicación entre vector y hospedero. Posee una gran capacidad para bloquear la producción de IFN mediado por señales de transducción, y particularmente es un potente inhibidor de la señalización de interferon beta (IFN- α/β) e interferon gamma (IFN- γ), además se piensa que de manera indirecta por activación de inhibidores celulares de las vías JAK/STAT, específicamente evitando la fosforilación de STAT-1 ⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾.

La función de ARN-polimerasa viral dependiente de ARN y metiltransferasa es realizada por la **proteína NS5** (900 a 905 aminoácidos, 104 a 106 kDa). Como regiones importantes presenta un dominio metiltransferasa amino terminal para la formación de la estructura de capucha en dirección 5' del genoma viral y la presencia de una secuencia de localización nuclear que además actúa como sitio de asociación con NS3 para formar el complejo replicasa. Además esta proteína se ha reportado induce transcripción y traducción de interleucina-8 (IL-8) ⁽⁴⁶⁻⁴⁷⁾.

2.4 Patogénesis de la fiebre hemorrágica por el DENV

La fiebre hemorrágica por dengue y el síndrome de choque por dengue son comúnmente asociadas a una infección secundaria con un serotipo diferente al de la primera infección. No obstante, casos de FHD/SCDH también ocurren por infección primaria y esto depende principalmente del serotipo o del genotipo infectante, entre otros factores. Los virus DEN-2 y DEN-3 son los que más casos severos causan seguidos por el DEN-1 y DEN-4. Sin embargo, el riesgo de epidemias de FHD también está relacionado con cambios en la dominancia de los serotipos del virus y con cambios en la carga inmune de la población ⁽⁴⁸⁻⁴⁹⁾.

La severidad de la FHD/SCDH parece correlacionar principalmente con el aumento en los niveles de citocinas IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-18, IFN- γ , TNF- α y MCP-1 producidas por macrófagos (**Fig. 5**) y posiblemente también por una expansión de reacción cruzada de baja-afinidad de células T, específicas para DENV, con lo que se producen además citocinas vasoactivas ⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. A este fenómeno se le conoce como “tormenta de citocinas”. Se ha encontrado que la concentración en suero de la proteína NS1s en muestras de pacientes infectados con DENV depende del serotipo viral y del tiempo de infección del hospedero. Y además, se ha observado es más elevada en los

casos de FHD que en los de FD durante los primeros 3 a 5 días de la infección. Reportes indican que los individuos con un nivel en suero de 500 a 600 ng/ml de NS1s presentan riesgo aumentado de desarrollar FHD ⁽⁵³⁻⁵⁴⁾.

Por demás el aumento en la concentración de la proteína NS1s y del complejo del complemento SC5b-9 correlacionarían con la severidad de la enfermedad al contribuir en la activación de la cascada del complemento dependiente de anticuerpos en los sitios de pérdida vascular. Los anticuerpos anti-NS1 asociados con la producción de óxido nítrico pueden jugar un rol en la disrupción de vasos endoteliales, efecto que contribuye con el desarrollo de la vasculopatía ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾.

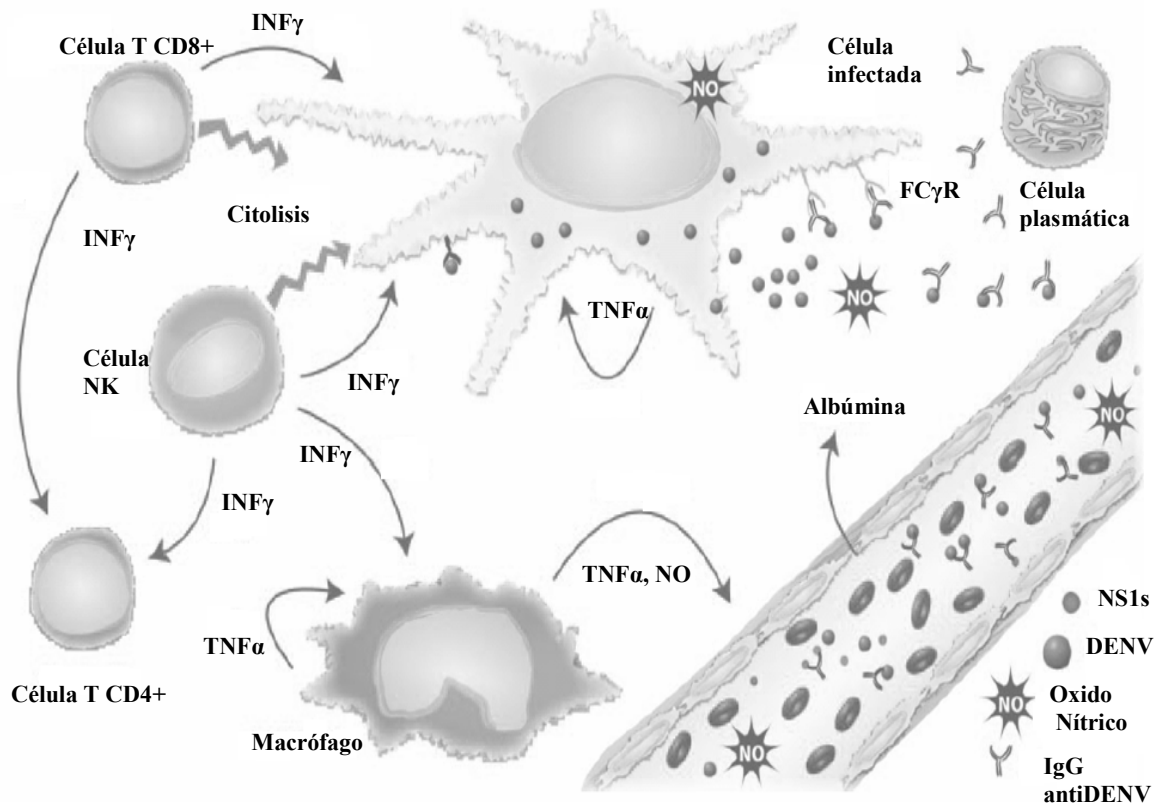


Fig. 5. Patogénesis de la infección por el DENV. Las células del linaje monocítico (dendríticas /macrófagos); son las primeras en contener la infección por DENV, producen varias citocinas y factores quimioatrayentes, entre los cuales TNF- α y NO (óxido nítrico) se han asociado con la activación de las células endoteliales lo cual podría contribuir con el incremento en la permeabilidad vascular (medido por monitoreo de niveles de albúmina en plasma). El IFN- γ producido por las células NK y T CD8⁺ activa a los macrófagos así como a las células T CD4⁺, de esta forma se da una retroalimentación en la activación celular. Los altos niveles de DENV y NS1 que circulan como complejos inmunes producen un efecto de reacción cruzada, que se ha asociado al daño en células endoteliales ⁽¹⁶⁾.

Adicionalmente se ha implicado a la proteína NS1 como un posible inductor de procesos hemorrágicos ya que se ha demostrado presentan alta homología de dominios con adhesinas e integrinas, (proteínas que interactúan con elementos del citoesqueleto y del complejo de uniones célula-célula). Por otro lado posee una habilidad para inducir IL-6

activando las señales de aumento o disminución de STAT-3 β (transductores de señal y activadores de transcripción) ⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾.

Al igual que la proteína E, la proteína NS1 provoca una fuerte respuesta inmunogénica, por lo que se piensa que la producción de anticuerpos anti-NS1 puede jugar un papel importante contra la enfermedad. De hecho se ha observado que anticuerpos anti-NS1 protegen a ratones lactantes de los síntomas causados por la inoculación con dengue. Sin embargo, también se ha sugerido que anticuerpos anti-NS1 pueden causar la reducción de factores de coagulación, daño de células endoteliales y filtración vascular (predominantemente en cavidades pleural y peritoneal), ya que la formación de complejos inmunes de anti-NS1 y NS1s unido a células endoteliales, se ha propuesto como un factor potencial en la patogénesis de FHD ⁽⁶⁰⁻⁶¹⁾.

2.5 Diagnóstico en laboratorio de la Fiebre por Dengue

La confirmación en laboratorio del diagnóstico clínico para dengue es fundamental ya que provee información sobre los serotipos circulantes y su incidencia en la población. Convencionalmente para confirmar el diagnóstico se requiere la realización de ensayos de detección de anticuerpos específicos presentes en el suero, o también es necesaria la realización del aislamiento del virus, sin embargo esto último requiere un tiempo relativamente prolongado, lo cual no es conveniente ⁽⁶²⁾.

Entre los métodos de diagnóstico más recurrentemente utilizados está disponible la detección de ARN viral por la PCR transcriptasa inversa (RT-PCR) y también las pruebas de serología, tales como el enzimoimmunoensayo (ELISA) para IgG y para IgM (MAC-ELISA). Entre las desventajas de los métodos mencionados anteriormente, en el caso de la RT-PCR se encuentra el costo y la dificultad para su utilización rutinaria a gran escala, en tanto que para los ensayos de detección de anticuerpos IgM su presencia se evidencia solo hasta el 4 y 5 día de la enfermedad ⁽⁶³⁻⁶⁵⁾.

Para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico temprano las principales moléculas proteínicas que han sido utilizadas esta la proteína de envoltura y la proteína NS1. Ya que se ha reconocido la producción de la proteína NS1 desde los primeros días y durante toda la infección por DENV se ha enfocado el uso de inmunoenzayos contra esta

partícula. Tal es su relevancia que los algoritmos para confirmar los casos sigue una serie de ensayos en los que se incluye la detección de esta proteína viral (**Fig. 6**)⁽⁶⁶⁻⁶⁷⁾.

Infección por Dengue: Respuesta Inmune

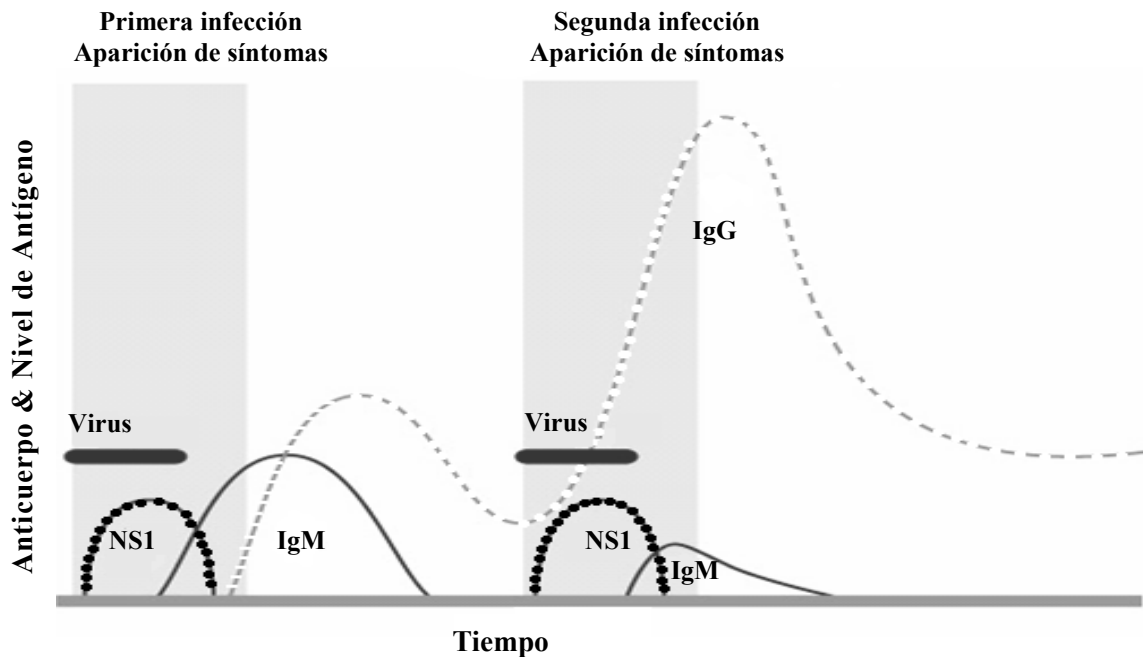


Fig. 6 Principales tipos de anticuerpos detectados durante la infección por dengue virus. Durante la infección primaria se detectan antígenos de la proteína NS1 (....) desde el día 1 hasta el día 9 post-infección, estas partículas circulan en el suero en niveles elevados hasta que los anticuerpos IgG (- - -) son producidos. Los anticuerpos de la clase IgM (—) son producidos 5 días después de la aparición de los primeros síntomas. La producción de estos anticuerpos se eleva entre las primeras 3 semanas y pueden persistir hasta por 60 días post-infección y pueden ser detectables hasta por seis meses. En tanto que los anticuerpos de memoria IgG aparecen a los 14 días después de iniciados los síntomas, para posteriormente permanecer en niveles basales. Durante la reinfección o infección secundaria en los primeros días se detectan antígenos de la proteína NS1. En tanto que los anticuerpos de clase IgM son producidos hasta el día 20 después de adquirida la infección, y son producidos por periodos de tiempo corto en concentración baja por lo que pueden ser indetectables. Rápidamente durante los primeros 2 días se producen los anticuerpos IgG en cantidades mayores a la presente en la primera infección, persistiendo por 30 a 40 días, para después declinar a niveles basales⁽¹²³⁾.

2.6 Producción de proteínas recombinantes

En los procesos de elaboración de estuches de diagnóstico y en el desarrollo de vacunas se utilizan grandes cantidades de antígenos de proteína viral. Una solución a este requerimiento consiste en la producción de proteínas por tecnología recombinante, en la que se manipula el ADN de la secuencia codificadora de la proteína de interés insertándola en un vector (vehículo molecular) que presenta promotores regulables y que además le confiere alguna característica que facilita su recuperación. De esta forma se pueden construir proteínas fusionadas en sus extremos (carboxiterminal o aminoterminal) a una etiqueta de residuos de aminoácidos como histidina, que permiten la purificación por métodos de cromatografía aprovechando la afinidad que presentan los residuos por una matriz específica⁽⁶⁸⁻⁶⁹⁾. No obstante la calidad y rendimiento en el

proceso de elaboración mucho dependen de los sistemas de expresión utilizados así como de la naturaleza de la proteína a recuperar.

Los sistemas de expresión más utilizados han sido las bacterias, levaduras, hongos filamentosos y células animales, los cuales han sido explorados con el propósito de utilizarlos como bio-fabricas, aprovechando sus habilidades específicas de procesamiento de proteínas. Los sistemas procariontes, tales como las bacterias, presentan varias ventajas en la producción de proteínas recombinantes debido a su fácil manipulación, mínimos costos de mantenimiento, y altos niveles de expresión con respecto a los sistemas eucariontes. Las restricciones en el uso de estos sistemas estriban en la deficiencia de la maquinaria celular para procesar postraduccionalmente (glicosilación) las proteínas ⁽⁷⁰⁻⁷¹⁾.

La producción de proteínas endógenas en las bacterias ha dependido del conocimiento de los mecanismos de regulación de la información genética contenida en el genoma bacteriano circular y en los varios elementos extracromosómicos (plásmidos, episomas). De los plásmidos se sabe que pueden controlar la expresión de genes de resistencia a antibióticos, producción de toxinas y síntesis de estructuras. Al ser unidades discretas con capacidad de replicación autónoma, se han utilizado como vectores de clonación de genes (**Fig.7**), ya que dentro de su estructura se pueden incorporar secuencias ajenas a la célula, cuya expresión puede ser dirigida por una serie de grupos de secuencias reguladoras como promotores que permiten la regulación de genes a nivel de la transcripción y traducción ⁽⁷²⁻⁷⁶⁾.

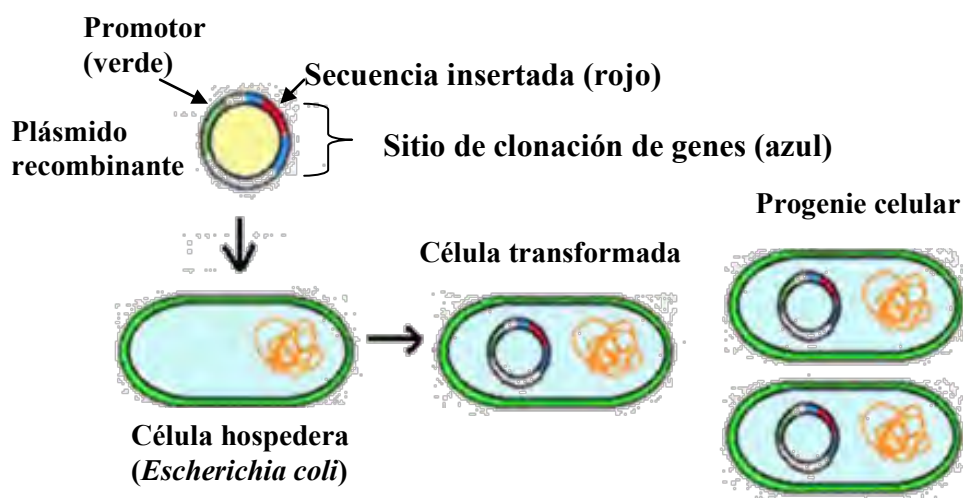


Fig.7. Clonación de secuencias de ADN en plásmidos. En general para clonar secuencias de genes los plásmidos y la secuencia nucleotídica de interés deben cortarse con las mismas enzimas de restricción para obtener extremos complementarios. Posteriormente el fragmento de ADN es ligado dentro de la estructura del plásmido. Estos plásmidos recombinados o híbridos son moléculas autoreplicables portadoras de genes (vectores) que al introducirse en bacterias (transformación) se replican y una copia es transferida durante la división celular. Finalmente miles de copias del plásmido y el gen de interés son obtenidos al alcanzar la población un número alto de células ^(72, 77).

Un gen se expresa cuando se transcribe en ARN, y en general cuando se traduce en proteínas. La mayoría de genes de una célula se expresan continuamente estando sujetos a una expresión constitutiva, en tanto que los genes que solo se expresan bajo determinadas condiciones presentan una expresión regulada. La transcripción de un gen es una de los primeros controles de la actividad de los genes y se encuentra determinada por la interacción de secuencias específicas entre el ADN y proteínas específicas, que se unen a estas secuencias llamados centros reguladores, estimulando o reprimiendo la expresión del gen⁽⁷⁸⁾.

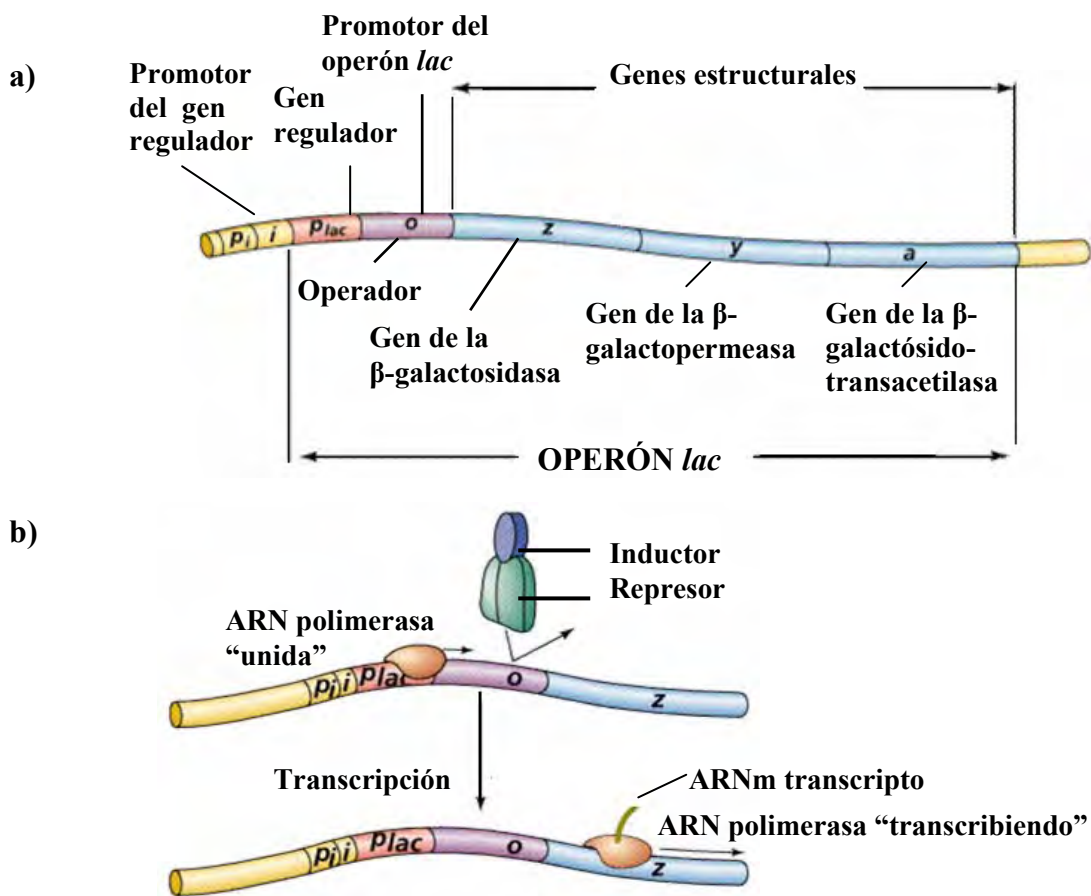


Fig.8. Regulación de la expresión en el Operón lac. La introducción de lactosa en la célula es seguida por su transformación en alolactosa (un isómero del primero con enlaces 1-6 en lugar de 1-4) mediada por cantidades basales de β -galactosidasa. La lactosa, una vez en el citoplasma bacteriano, es transformada en alolactosa por la β -galactosidasa. a) La alolactosa tiene la capacidad de interaccionar con la molécula represora, modificando su conformación e incapacitándola para unirse al operador, por lo que se inicia la transcripción de los genes estructurales de las enzimas que el operón requiere para utilizar la lactosa como fuente de carbono. Así, la molécula de alolactosa se comporta como inductora. b) Esta capacidad inductora está también presente en moléculas sintéticas como el IPTG (isopropiltiogalactósido)⁽⁷⁸⁻⁷⁹⁾.

La incorporación de la unidad de expresión génica operón *lac* (lactosa) en los vectores es una de las múltiples opciones para el control de la transcripción y expresión en bacterias. Este sistema es conveniente ya que su regulación es sencilla pues depende de la presencia de lactosa en el medio o de un inductor apropiado. El inductor desencadena la expresión de los genes estructurales del operón, al impedir que el represor *lac* se una al

operador, pues al unirse a este cambia su estructura conformacional, con lo que se reducen las afinidad del represor hacia el ADN operador. Con el lugar operador desocupado la ARN polimerasa puede entonces transcribir el resto de los genes *lac* para que la bacteria produzca las proteínas para utilizar la lactosa ^(76, 78). En ausencia de inductor, la proteína represora *Lac I* mantiene su elevada afinidad por la región operadora, impidiendo que la ARN polimerasa transcriba los genes estructurales **(Fig.8)**.

En el laboratorio, la inducción se suele lograr añadiendo al medio un inductor gratuito como el IPTG, isopropil- β -D-tiogalactósido, que a diferencia de la lactosa, no se metaboliza, pero se une al represor, inactivándolo ⁽⁷⁹⁾.

2.7 Superproducción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

La superproducción de proteínas se refiere a la síntesis de concentraciones anormalmente altas de proteínas específicas –generalmente proteínas heterólogas (exógenas)- bajo condiciones experimentales Cuando se utilizan sistemas procariontes como la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) para la superproducción de proteínas recombinantes es común, que las proteínas no adquieran la correcta conformación por lo que generalmente experimentan degradación proteolítica o son asociadas entre si como agregados insolubles (cuerpos de inclusión) contenidos principalmente dentro del citoplasma y periplasma **(Fig. 9)** ^(72, 80).

La productividad de la traducción de proteínas heterólogas es afectada por varias actividades resultado del estrés generado en la maquinaria celular que no soporta todas las modificaciones postraduccionales que una proteína requiere para plegarse. Entre estas actividades destaca la expresión de proteínas de choque térmico y de grupos de genes de estrés que son activados sobre la expresión de los genes recombinantes. Se ha encontrado que a niveles muy altos de proteína innecesaria las bacterias degradan sus propios ribosomas y ARN ribosómico (ARNr), dando lugar de esta manera a una inhibición de la traducción que puede incluso ser mortal ⁽⁸¹⁾.

El plegamiento incorrecto puede resultar de una prematura terminación de la traducción, errores en la síntesis de una nueva cadena o de la pérdida de la estructura activada por el estrés ambiental, efecto que es incrementado por el rutinario uso de promotores fuertes y altas concentraciones de inductor ⁽⁸²⁾.

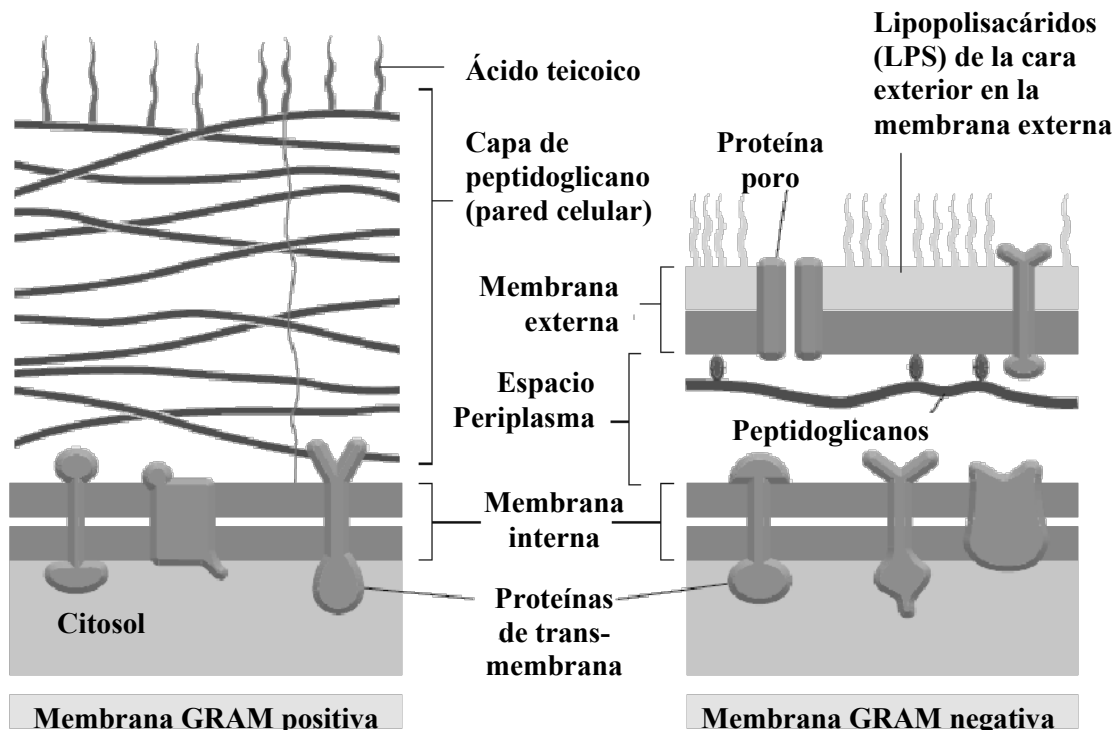


Fig .9. Membranas en las bacterias Gram positivas y Gram negativas. En las bacterias como *Streptococcus* y *Staphylococcus* tienen una simple membrana y una pared celular gruesa, ellas retiene el colorante violeta en el procedimiento de tinción Gram por lo que son llamadas Gram positivas, por consecuencia las bacterias que no retiene el colorante son llamadas Gram negativas. *Escherichia coli* y *Salmonella* son dos bacterias del tipo Gram negativo, tienen dos membranas, separadas por un espacio periplásmico el cual contiene enzimas requeridas para la nutrición; la capa de peptidoglicanos en la pared celular de estos organismos se localiza en este espacio y es delgada en comparación con las de bacterias Gram positivas. La membrana interna de las bacterias Gram negativas es una bicapa de fosfolípidos; de manera similar la cara interna en la membrana externa esta compuesta principalmente por fosfolípidos y en la cara externa de un único lípido glicosilado llamado lipopolisacárido (LPS) ⁽⁷⁶⁾.

La degradación de proteínas mal plegadas por parte de las proteasas del hospedero garantiza que polipéptidos anormales no se acumulen dentro de la célula y permite el reciclamiento de los aminoácidos. Principalmente los blancos de la degradación incluyen polipéptidos terminados prematuramente, intermediarios y proteínas parcialmente plegadas que han fallado en adoptar la conformación nativa después de múltiples ciclos de interacción con los moduladores de plegamiento **(Fig.10)** ⁽⁸⁰⁾.

Sin embargo la agregación puede ser minimizada a través del control de parámetros; como es la reducción de la temperatura durante la inducción; reducción del índice de expresión del gen recombinante, usando promotores moderados y reduciendo la concentración de inductor; o por ajustes adicionando secuencias de codones y por la coexpresión de plásmidos codificadores de genes para chaperonas (proteínas acompañantes o asistentes) requeridas en el plegamiento de las proteínas ^(80, 83-85).

Las proteínas que se encuentran en los cuerpos de inclusión no están disponibles para su uso inmediato, y para recuperarlas es necesario realizar procedimientos de

solubilización, replegamiento y purificación, con la finalidad de recuperar la actividad biológica funcional del producto. Los procedimientos clásicos de solubilización y replegamiento de proteínas contenidas en cuerpos de inclusión, utilizan agentes desnaturalizantes y generación de un ambiente oxidativo, en el que se da la pérdida de la estructura secundaria y por tanto la exposición de la superficie hidrofóbica, con lo que se incrementan las interacciones inespecíficas en la formación de enlaces para adquirir la estructura terciaria. Con los métodos convencionales de recuperación de proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión se puede esperar obtener solo un 15 % a 20% de proteínas con actividad biológica ⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾.

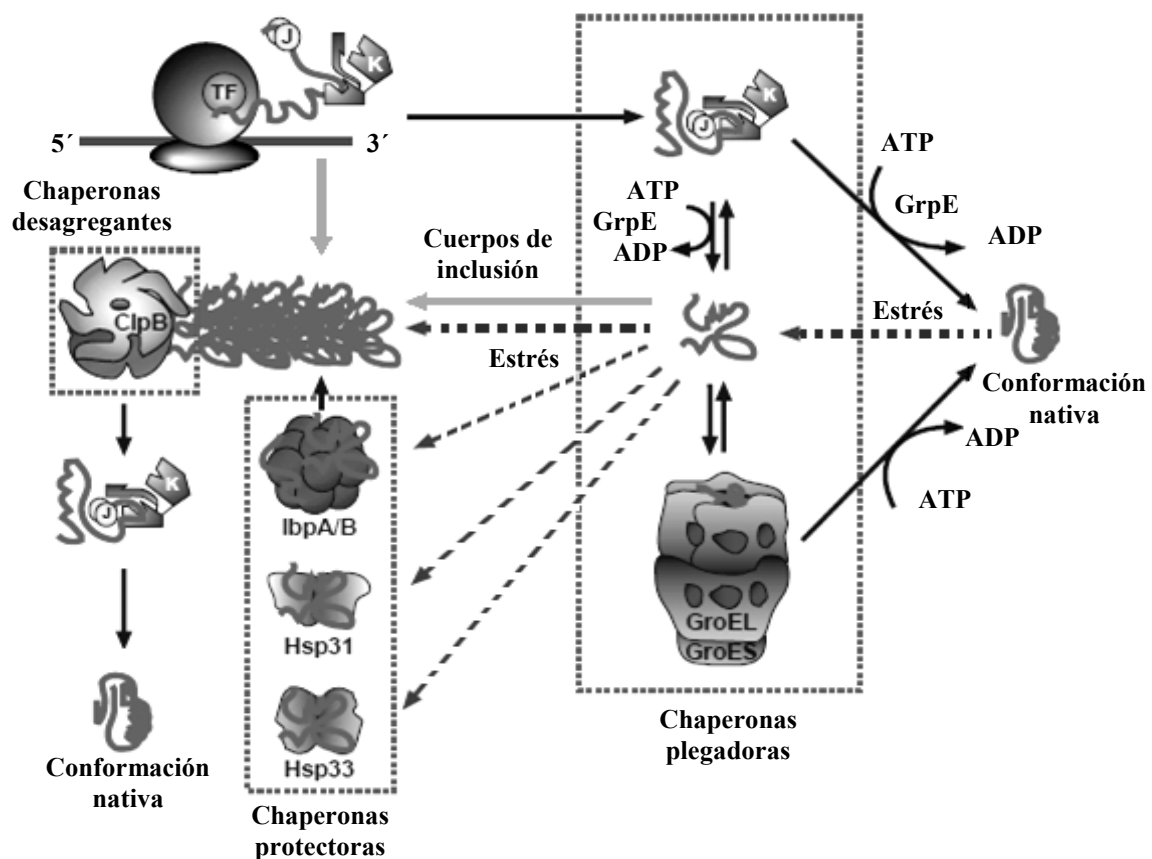


Fig.10. Plegamiento de proteínas en sistemas procariontes. Proteínas acompañantes (Chaperonas) asisten el plegamiento de proteínas en el citoplasma de *E.coli*. Los nacientes polipéptidos requieren inicialmente la asistencia de acompañantes moleculares, TF (Factor Activador) y DnaK-DnaJ, ambos acompañantes atrapan extendidos aminoácidos hidrofóbicos desplegados que están expuestos a solventes, protegiéndolos de si mismos. Después el desacoplamiento de TF o GrpE, media la liberación de DnaK, entonces el plegadizo intermediario puede alcanzar una conformación natural (nativa), regresa al ciclo hacia DnaK-DnaJ o es transferido a la cámara central de GroEL para el plegamiento a infinitas diluciones sobre GroES. En momentos de estrés (flechas discontinuas) proteínas termolabiles no son plegadas y se forman los agregados. En su superficie IbpB (acompañante protector) se une a proteínas parcialmente plegadas para servir como un reservorio de intermediarios no plegados hasta que los acompañantes plegadores disponen y se intercalan entre los grandes agregados. Los chaperonas protectoras tales como las proteínas Hsp33 y Hsp31 (Hot Shock protein) llegan a ser importantes bajo severo estrés oxidativo y térmico, respectivamente. ClpB promueve el despojo y desagregación de proteínas anfitrionas no plegadas y coopera con DnaK-DnaJ-GrpE para reactivarlas una vez que el estrés ha sido abatido. Proteínas recombinantes que no consiguen una temprana interacción con TF o DnaK/DnaJ, que experimentan múltiples ciclos de truncadas interacciones con los acompañantes plegadores, se acumulan en cuerpos de inclusión (flechas grises) ⁽⁸⁰⁾.

2.8 Plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®] y plásmido de expresión pPROEX HTb

La utilización de un plásmido como vector de clonación de ADN es recurrente para obtener un alto número de copias de secuencias. El plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®] (**Fig.11.a**) se ha utilizado como una herramienta de tecnología recombinante para clonar ADN de productos de PCR⁽⁸⁸⁾.

El sistema TOPO utiliza una ADN polimerasa, que funciona como una enzima de restricción y como una ligasa. Durante la replicación su actividad consiste en cortar y unir ADN. La topoisomerasa I derivada de *Vaccinia* virus específicamente reconoce la secuencia pentamérica 5'-(C/T)CCTT-3' y forma una unión covalente con el grupo fosfato 3' de la timidina (3'-T). Al cortar en una cadena de ADN, se propicia el desenrollamiento del ADN. La enzima entonces religa los extremos de la cadena cortada y se libera así misma del ADN. Para redirigir la actividad de religación de la topoisomerasa, el vector es linearizado con topoisomerasa I covalentemente unido a cada fosfato 3'. Esto capacita al vector para fácilmente ligar las secuencias de ADN con extremos compatibles de los productos de PCR en los que la *Taq* polimerasa (actividad de Transferasa Terminal) adiciona una única 3' adenosina (3'-A) a cada extremo final de la secuencia amplificada⁽⁸⁸⁾.

Las características más destacadas del vector pCR[®] 2.1 TOPO[®] son: la presencia de los sitios *EcoR* I que flanquean el sitio de inserción del producto de PCR para una fácil remoción del inserto; y para la selección de los clones en *E. coli* el plásmido presenta los genes que codifican para la resistencia a los antibióticos kanamicina y ampicilina; el sitio/promotor T7 iniciador para transcripción in vitro; un sitio para oligonucleótidos iniciadores M13 en sentido y M13 antisentido útiles para secuenciación⁽⁸⁸⁾.

En tanto que para expresar proteínas en *E. coli* es ventajoso la utilización de vectores que adicionan secuencias que codifican para sitios de corte ó aminoácidos que fusionados a la proteína de interés funcionan como señal (banderas) útiles para la purificación o también como marcadores en posteriores ensayos experimentales. En el caso de los sistemas de expresión procariótico pPROEX HT (**Fig11. b**) estos presentan una secuencia que codifica para 6 aminoácidos de histidina (6X His) y que son una

alternativa para mantener el marco de lectura de la secuencia codificadora de la proteína a partir de la cual se realizara la traducción a aminoácidos ⁽⁸⁹⁾.

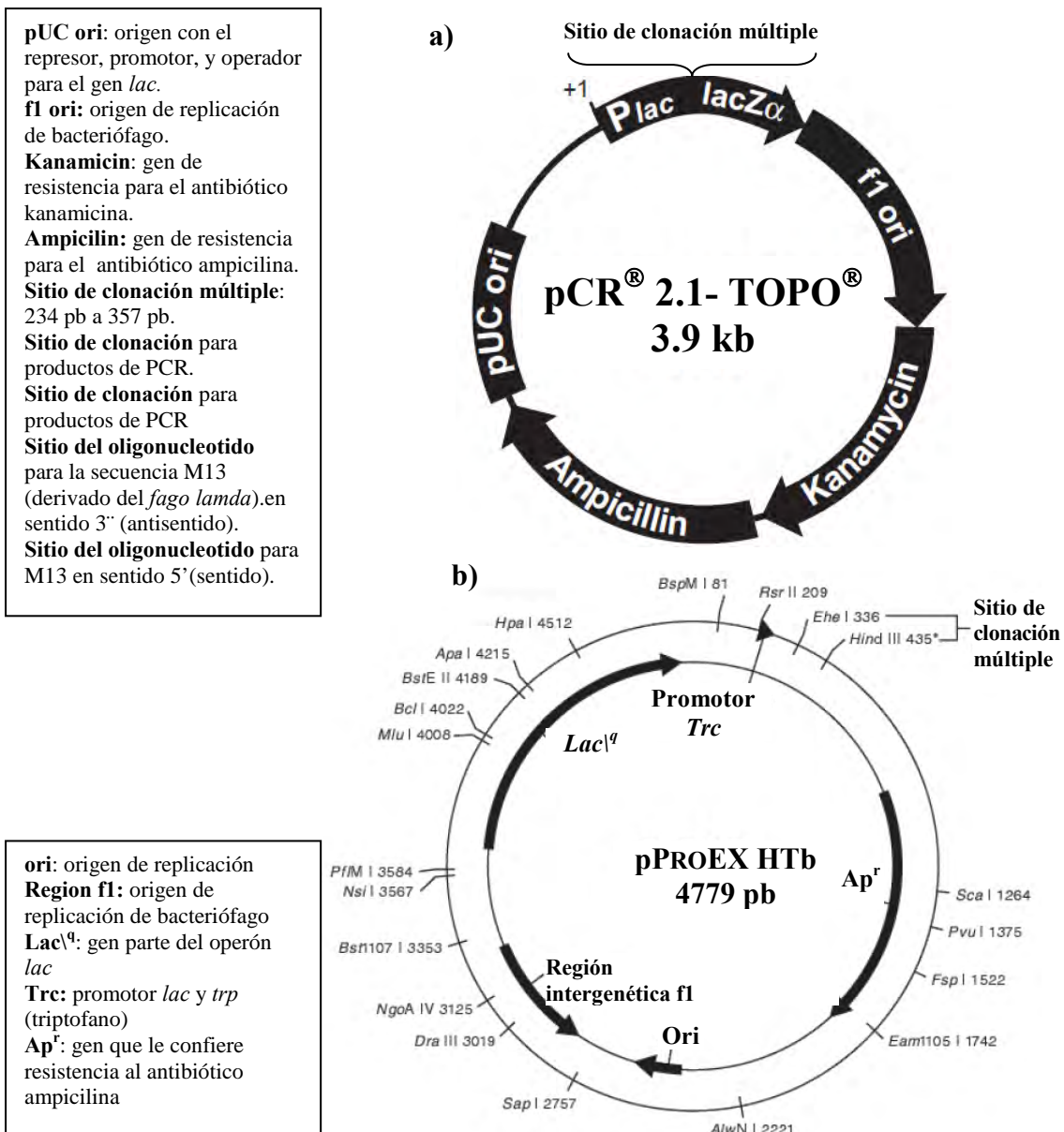


Fig. 11. Plásmido de clonación y plásmido de expresión de proteínas. a) Mapa del plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®], este presenta un sitio de clonación donde se introducen los productos de PCR a los que la *Taq* polimerasa adiciona en ambos extremos terminación en nucleótido de Adenina (A). b) Mapa del plásmido de expresión pPROEX HTb, el sitio de clonación contiene varios sitios de restricción que son utilizados para introducir secuencias de genes de proteínas. Los diversos elementos del plásmido de expresión permiten la especificidad en la selección de clones (con resistencia a ampicilina) y la facilidad de utilizar el inductor IPTG ^(88,124).

Los tres plásmidos del sistema pPROEX HT (a, b, c) contienen una secuencia que codifica para una cola de 6X His para facilitar la purificación a través de cromatografía de afinidad con columna de níquel (**Fig.12**), seguida de una secuencia de 7 aminoácidos con un sitio de reconocimiento TEV (virus del tabaco) para proteasa que permite eliminar las histidinas. El promotor *trc* y el gen *lac^q* son usados para la expresión del gen

clonado utilizando IPTG como inductor. El plásmido también contiene el origen de replicación del plásmido pBR322, el gen β -lactamasa, y el gen que le confiere resistencia a ampicilina (Ap^r), y el origen de replicación del bacteriófago F1 para la síntesis de cadenas de ADN⁽⁸⁹⁻⁹⁰⁾.

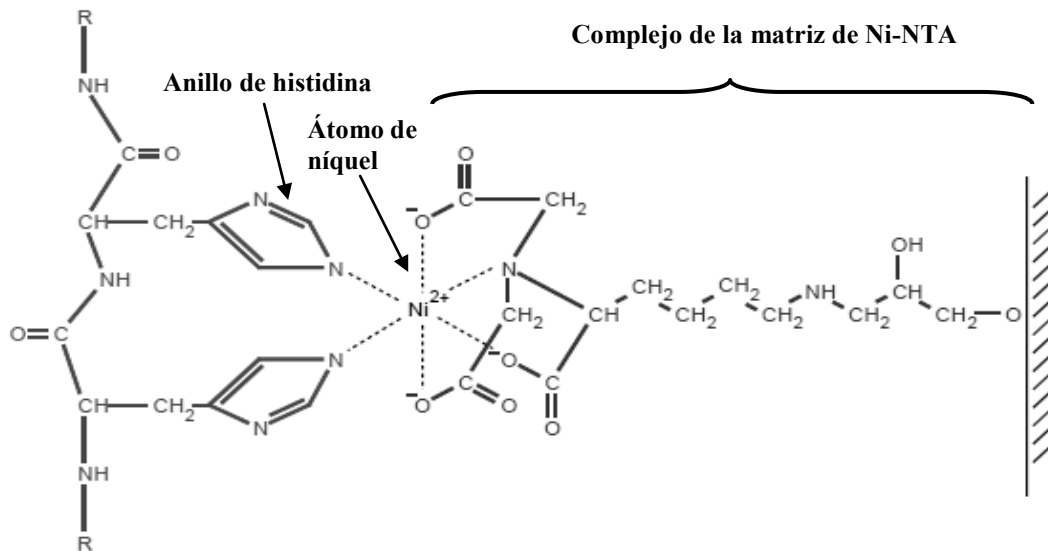


Fig.12. Interacción entre residuos de aminoácidos de histidina y el átomo de níquel en el complejo de la matriz de afinidad Ni-NTA. La resina Ni-NTA (Ácido Nitrilotriacético) es un complejo que aprovecha la afinidad que le confieren los 6 residuos de histidina a la proteína recombinante. Este absorbente quelante tetradentado está cargado con un ión metálico de Ni, cuya unión se da a través de 4 de los 6 sitios de los ligandos de la esfera de coordinación del ión., por lo que dos de los sitios se encuentran libres para interactuar con las 6 consecutivas histidinas de la proteína fusionada. La capacidad de unión de la resina Ni-NTA con las proteínas recombinantes fusionadas a histidinas es 0,3 $\mu\text{mol/mL}$ (8,0 mg/mL), por lo que se considera un buen método de purificación⁽⁶⁸⁻⁶⁹⁾.

2.9 *Escherichia coli* cepa DH5 α

Escherichia coli DH5 α es una cepa de enterobacteria de tipo Gram negativa, que ha sido una de las tantas utilizadas para trabajos de clonación molecular y propagación de plásmidos de ADN. Esta cepa modificada fue obtenida a partir de la *Escherichia coli* K12⁽⁹¹⁻⁹²⁾, y como principales características presenta una alta eficiencia para ser transformada (1×10^6 a $>1 \times 10^9$ transformantes por μg), una mutación en endA1 que inactiva una endonucleasa intracelular, lo que es ventajoso en los métodos de aislamiento de plásmidos⁽⁹³⁾.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La proteína NS1 es uno de los principales productos secretados durante la infección por dengue. Su localización en la membrana y en el citoplasma, como en el medio extracelular y en suero de pacientes indican una multifuncionalidad tanto en los mecanismos de replicación, como en la patogénesis y también posiblemente en protección.

La participación en la proteína NS1 en la patogénesis de la forma severa de dengue se ha asociado con la producción de anticuerpos que parecen producir una reacción cruzada que daña las células del endotelio vascular, además de la activación del complemento, factores que se han señalado como responsables de las alteraciones homeostáticas vasculares.

Sin embargo aún se deben realizar estudios para aclarar completamente los mecanismos de acción de la proteína NS1, para lo cual se requiere el establecimiento de condiciones adecuadas para su obtención en grandes cantidades. El establecimiento de condiciones adecuadas para la producción de la proteína NS1 en forma soluble desde un sistema bacteriano, permitirá obtener en abundante cantidad una proteína recombinante con actividad biológica, que podrá ser utilizada en diversos ensayos y en la producción de anticuerpos para pruebas de diagnóstico.

4. JUSTIFICACIÓN

Desde su introducción en México hace más de 20 años, la infección por virus dengue se ha extendido a más de 29 estados donde circulan los 4 serotipos, presentando una alta incidencia de casos principalmente en niños. Además hay que destacar que en los últimos años se ha reportado un aumento en la incidencia de la forma severa, el dengue hemorrágico, con respecto al número de casos reportados de pacientes con fiebre por dengue ⁽⁹⁴⁾. Este panorama indica mayores riesgos para la población y mayores gastos para los sistemas de salud pública, por lo que se requiere ahondar en el estudio de esta enfermedad y el desarrollo de métodos efectivos de detección que resulten rápidos, fáciles y accesibles económicamente.

Indudablemente sí NS1 es una proteína de importancia en la patogénesis de la fiebre hemorrágica por dengue, y además circula en el suero de pacientes, su detección será relevante en el diagnóstico para confirmar de manera rápida y sencilla la infección por dengue. Por otra parte, su papel en el mantenimiento y propagación de la infección aun no se ha elucidado completamente, aunque se le ha asignado un papel importante en la replicación del dengue. Por lo que sería de utilidad realizar ensayos específicos, donde se estudie la interacción de la proteína NS1 recombinante con proteínas celulares.

Finalmente, NS1 es una proteína con capacidad para inducir la producción de anticuerpos protectores contra la enfermedad, así que su utilidad como vacuna merece ser evaluada.

Ya que para estos fines se requiere la producción de cantidades suficientes de la proteína NS1 recombinante, es indispensable establecer las condiciones mas adecuadas para una producción en gran escala, que además garanticen su actividad biológica y el mantenimiento de sus propiedades inmunogénicas.

5. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- Es posible producir la proteína NS1 del virus dengue 2 en forma recombinante en bacterias *Escherichia coli* utilizando plásmidos de expresión procarióticos, de tal manera que dicha proteína mantenga sus características biológicas e inmunogénicas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general y objetivos particulares

Objetivo general

- Clonación y expresión de la proteína NS1 del virus dengue, serotipo 2 (DENV-2), en enterobacterias *Escherichia coli* cepa DH5 α .

Objetivos particulares

- Amplificación de la secuencia que codifica para la proteína NS1 DENV-2 de la cepa 16681.
- Clonación del producto amplificado de la proteína NS1 y posterior expresión en bacterias *Escherichia coli*.
- Comprobar que el gen clonado y la proteína recombinante expresada corresponden a la proteína NS1 de DENV-2.
- Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad utilizando resinas de níquel (Ni-NTA).

7. METODOLOGÍA

7.1 Amplificación de la secuencia de la proteína NS1 de dengue serotipo 2 (DENV-2)

Con el programa de software DNAMAN se realizó el análisis de la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2 cepa 16681 (Clon 1015, donado por el Dr. Richard Kinney del CDC, Fort Collins, Colorado, USA) (**Fig.13**), el gen se obtuvo de la base de datos del NCBI, a la cual se puede acceder vía electrónica en la siguiente dirección <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ⁽¹²⁵⁾ con el No. Acceso U87411 y en el GenBank con el número de acceso NC_001474. Se identificaron y enlistaron los sitios y las enzimas que cortan dentro del gen codificador de la proteína NS1 de DENV-2. Consecuentemente se analizaron los mapas de las secuencias de los plásmidos vectores pCR[®] 2.1 TOPO[®] (InvitrogenTM) ⁽⁸⁸⁾ y pProEX HTb (InvitrogenTM) ^(90, 124) (**Fig.14 y Fig. 15**), para identificar los sitios de restricción presentes entre ambos plásmidos, pero ausentes en la secuencia de la proteína NS1.

Se diseñó un par de oligonucleótidos iniciadores para PCR, que abarcaron el gen completo que codifica para la proteína NS1 (cuyo tamaño teórico se calculó en 1055 pares de bases (pb), y en cuyos extremos se incorporaron secuencias correspondientes a los sitios de restricción enzimática *BamHI* y *XhoI* ⁽¹²²⁾. Para realizar el posterior subclonaje en el plásmido de expresión, el sitio de corte restrictivo para la enzima *BamHI* se localizó en el iniciador del sentido dirección 5', mientras el sitio de corte restrictivo para la enzima *XhoI* se localizó en el iniciador del antisentido dirección 3'.

SEQ ns1 strain 16681: 1055 bp;						
Composition 365 A; 220 C; 245 G; 225 T; OTHER						
Percentage 34.6 % A; 20.9 % C; 23.2 % G; 21.3 % T; 0.0 % OTHER						
Molecular Weight (kDa): ssDNA: 326.83 dsDNA: 650.35						
ORIGIN						
1	GATAGTGGTT	GCGTTGTGAG	CTGGAAAAAC	AAAGAAGTGA	AATGTGGCAG	TGGGATTTTC
61	ATCACAGACA	ACGTGCACAC	ATGGACAGAA	CAATACAAGT	TCCAACCAGA	ATCCCCTTCA
121	AAACTAGCTT	CAGTATCCA	GAAAGCCCAT	GAAGAGGGCA	TTTGTGGAAT	CCGCTCAGTA
181	ACAAGACTGG	AGAATCTGAT	GTGGAAAAACA	ATAACACCAG	AATTGAATCA	CATTCTATCA
241	GAAAATGAGG	TGAAGTTAAC	TATTATGACA	GGAGACATCA	AAGGAATCAT	GCAGGCAGGA
301	AAACGATCTC	TGCGGCCTCA	GCCCACTGAG	CTGAAGTATT	CATGGAAAAAC	ATGGGGCAAAA
361	GCAAAAATGC	TCTCTACAGA	GTCTCATAAC	CAGACCTTTC	TCATTGATGG	CCCCGAAACA
421	GCAGAATGCC	CCAACACAAA	TAGAGCTTGG	AATTCGTTGG	AAGTTGAAGA	CTATGGCTTT
481	GGAGTATTCA	CCACCAATAT	ATGGCTAAAA	TTGAAAGAAA	AACAGGATGT	ATTCTGCGAC
541	TCAAAACTCA	TGTCAGCGGC	CATAAAAGAC	AACAGAGCCG	TCCATGCCGA	TATGGGTTAT
601	TGGATAGAAA	GTGCACTCAA	TGACACATGG	AAGATAGAGA	AAGCCTCTTT	CATTGAAGTT
661	AAAAACTGCC	ACTGGCCAAA	ATCACACACC	CTCTGGAGCA	ATGGAGTGCT	AGAAAGTGAG
721	ATGATAATTC	CAAAGAATCT	CGCTGGACCA	GTGTCTCAAC	ACAACATATAG	ACCAGGCTAC
781	CATACACAAA	TAACAGGACC	ATGGCATCTA	GGTAAGCTTG	AGATGGACTT	TGATTCTGT
841	GATGGAACAA	CAGTGGTAGT	GA CTGAGGAC	TGCGGAAATA	GAGGACCCTC	TTTGAGAACA
901	ACCCTGCCT	CTGGAAAACT	CATAACAGAA	TGGTGCTGCC	GATCTTGAC	ATTACCACCG
961	CTAAGATACA	GAGGTGAGGA	TGGGTGCTGG	TACGGGATGG	AAATCAGACC	ATTGAAGGAG
1021	AAAGAAGAGA	ATTTGGTCAA	CTCCTTGGTC	ACAGC		

Fig.13. Secuencia del gen codificador de la proteína NS1 de DENV-2. Esta secuencia se analizó con el programa DNAMAN, para obtener los sitios de restricción que no cortan dentro de la secuencia. De entre los sitios de restricción se eligió el sitio *BamHI* para el sentido 5' y el sitio *XhoI* para la dirección 3'.

Durante la amplificación el iniciador correspondiente al extremo en dirección 5' anexa el sitio de corte para la enzima endonucleasa *BamHI* (BioLabs[®] Inc) y el iniciador correspondiente al extremo en dirección 3' anexa el sitio de corte restrictivo para la enzima endonucleasa *XhoI* (BioLabs[®] Inc).

La secuencia del par de iniciadores con los sitios de corte para *BamHI* y *XhoI*, resaltados en negrilla, es la siguiente:

D2NS1sen (sentido) 5'- **GGATCC** **GATAGTGG TTGCGTTGTGA**-3'
39368534-010
(SIGMA[®]-ALDRICH) Sitio de Restricción para *BamHI*

D2NS1asen (antisentido) 5'- **CTCGAGCAA** **GCTGTGACCAAGGAGTTG**-3'
39368534-010
(SIGMA[®]-ALDRICH) Sitio de Restricción para *XhoI*

En el servidor ExPASy Proteomics Server de libre acceso publico cuya dirección electrónica es <http://www.expasy.ch/tools/> ⁽¹²⁶⁾, con las herramientas de análisis en línea, se realizó la simulación de la traducción de la proteína NS1 recombinante con los marcos de lectura del sitio de clonación múltiple del plásmido de expresión en el que se acopló la secuencia de la proteína viral (incluyendo los extremos adhesivos de corte enzimático seleccionados). El análisis confirmó que el diseño era adecuado porque permitía la expresión de la proteína recombinante con los residuos de histidina (en el extremo amino-terminal), y a la vez mantenía el marco de lectura en sentido correcto y sin desplazamientos, evitando la generación de sitios de terminación prematura de la traducción.

SITIO DE CLONACIÓN PLÁSMIDO pCR® 2.1 TOPO®

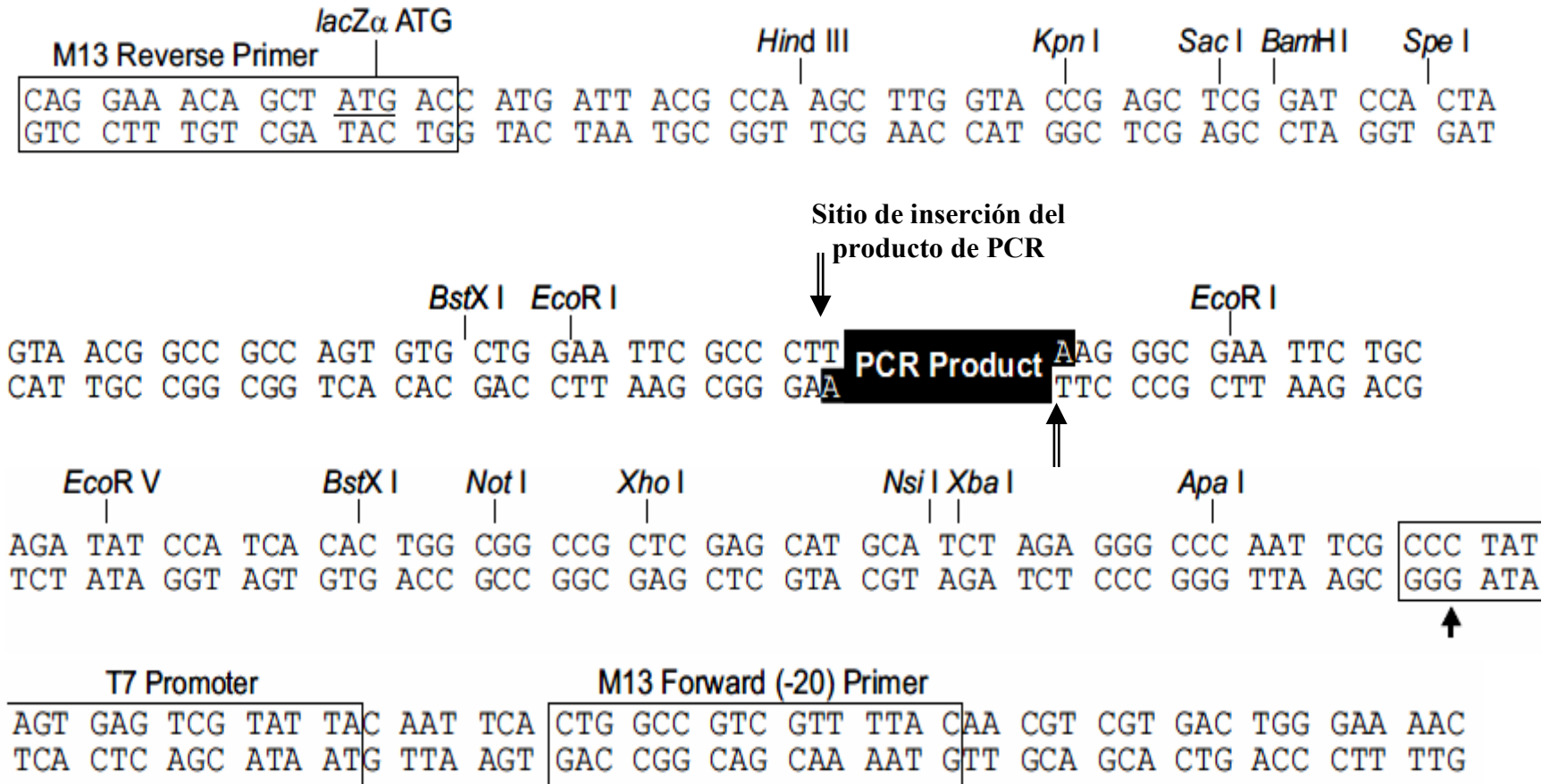


Fig.14. Mapa del sitio de clonación del plásmido pCR[®] 2.1 TOPO[®] en donde se observan los extremos adhesivos con bases de nucleótidos de Timina, afines con la secuencia codificadora para la proteína NS1 DENV-2 amplificada por PCR en cuyos extremos la enzima *Taq* DNA Polimerasa anexó bases de nucleótidos de Adenina.

SITIO DE CLONACIÓN MÚLTIPLE DEL PLÁSMIDO pPROEX HTb

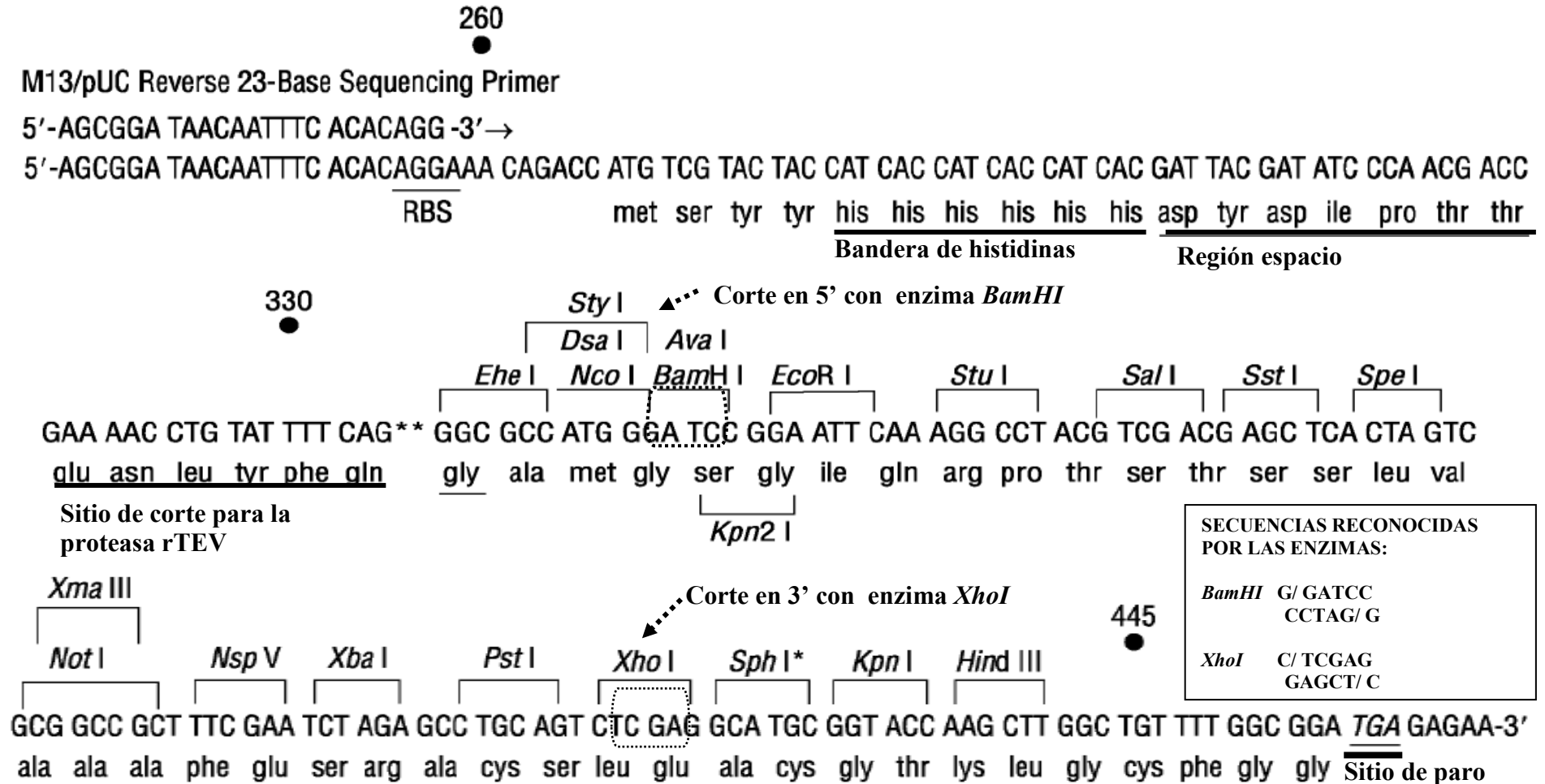


Fig.15. Mapa del sitio de clonación múltiple del plásmido de expresión pPROEX HTb donde se muestran los sitios de corte enzimático (*BamHI* en sentido 5' y *XhoI* en sentido 3') donde se insertó la secuencia de la proteína NS1 de DENV-2. La propiedad del plásmido es expresar la proteína recombinante anexando una serie de 6 aminoácidos de histidina en el extremo amino-terminal. Los residuos de histidina son indispensables para lograr la purificación por cromatografía de afinidad, ya que permiten la interacción con la matriz de Ni-NTA (QUIAEX).

Para la amplificación de la secuencia de la proteína NS1 del DENV-2 con sitios de restricción *BamHI* y *XhoI*, se realizó una PCR en la que se usó como templado el clon 1015 de ADN (que posee el genoma completo del DENV-2 cepa 16681). Se preparó la mezcla de reacción de acuerdo con las condiciones y concentraciones óptimas recomendadas para la actividad de la enzima *Taq* DNA Polimerasa (BioLabs[®] Inc.) así como de los oligonucleótidos iniciadores (SIGMA[®]-ALDRICH). El volumen final en cada tubo de reacción para PCR (Eppendorf) fue de 20 μ L (microlitros), y las proporciones de los reactivos usados se describen a continuación:

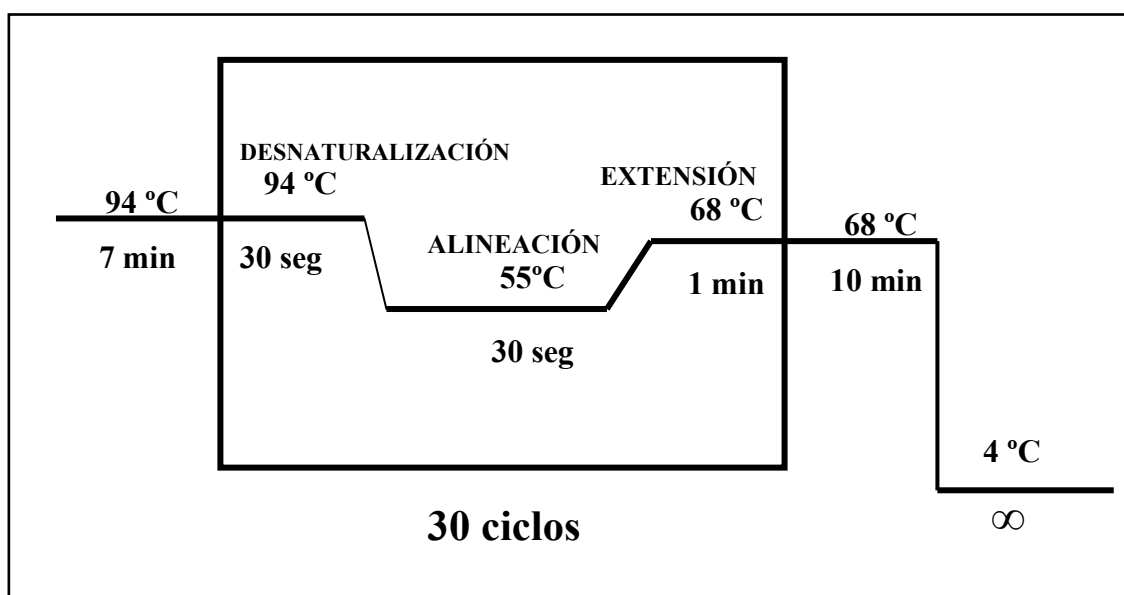
Tabla 1 .Mezcla de reacción y condiciones para la amplificación de la secuencia de la proteína NS1 del DENV-2

Reactivo	μ L
H ₂ O para PCR (BioLabs [®] Inc)	14,6
dNTP's (BioLabs [®] Inc)	1,0
Amortiguador de PCR 10x (BioLabs [®] Inc)	2,0
Oligo D2NS1 sen (sentido) 20 μ M (SIGMA [®] -ALDRICH)	0,5
Oligo D2NS1 asen (antisentido) 20 μ M (SIGMA [®] -ALDRICH)	0,5
Plásmido Clon 1015 DENV-2 cepa 16681 (CDC) como Templado	0,5
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerasa (BioLabs [®] Inc)	0,4
Volumen final	20,0

(Los reactivos y la mezcla de reacción se mantienen en hielo para conservar la actividad)

Después de homogenizar la reacción, los tubos se colocaron en un termociclador (BioRad), previamente programado para ejecutar la siguiente serie de condiciones de amplificación:

Condiciones de amplificación de la secuencia de la proteína NS1



El producto de la reacción de amplificación se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen™) al 0,8% con Bromuro de Etidio (Br-Et), al que se aplicó una corriente de 80 Volts (V) (ANEXOB). La separación de bandas se observó en un transiluminador con luz ultravioleta (UV) (Kodak) para verificar que el tamaño de la secuencia obtenida correspondiera a los 1068 pb, tamaño calculado teóricamente para la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2 flanqueada por los sitios de restricción enzimática adicionados. En el mismo gel y en carriles separados se corrió 1 µL de la reacción obtenida por PCR y 1 µL de marcador de pares de bases de 1 Kb (Invitrogen™).

Los productos de PCR fueron conservados a 4°C hasta su uso. Del volumen restante de la reacción (19 µL) que contenía el amplificado que presentó la banda cuyo tamaño coincidió con los 1055 pb, se realizó una purificación para aislar el producto de la PCR utilizando el QIAEX® II Gel Extraction kit (150) (QIAGEN®), siguiendo las indicaciones del instructivo establecidas por el fabricante en el QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol (ANEXO B).

7.2 Ligación de la secuencia de la proteína NS1 en el plásmido de clonación

La ligación de la secuencia codificadora para la proteína NS1 de DENV-2 dentro del plásmido pCR® 2.1 TOPO® (3931 pb) se realizó de forma directa (sin previa interacción con enzimas de restricción), ya que el plásmido presenta entre sus características una Topoisomerasa que posibilita la ligación en el sitio de clonación de productos de PCR. Se utilizaron los reactivos incluidos en el sistema de clonación TOPO TA Cloning® Kits (Invitrogen™) y la reacción de ligación se preparó según el protocolo de clonación química sugerida, establecida a continuación:

Tabla 2. Reacción de ligación del plásmido pCR® 2.1 TOPO® con el amplificado de PCR de la proteína NS1 de DENV-2

Reactivo	µL
Secuencia de la proteína NS1 DENV-2 Amplificada por PCR	3,0
Sal Solución (Invitrogen™)	1,0
Agua estéril (Invitrogen™)	1,0
Plásmido pCR® 2.1 TOPO® (Invitrogen™)	1,0
Volumen final	6,0

(Los reactivos y la mezcla de reacción se mantienen en hielo para conservar la reactividad)

La preparación de la reacción se realizó en ambiente estéril, los reactivos y el plásmido se depositaron en un tubo de 1,5 mL (Eppendorf), se mezclaron suavemente e inmediatamente se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente (25°C). Finalizado el tiempo de incubación el tubo con la reacción se transfirió a un recipiente con hielo para continuar con el protocolo de transformación (ANEXO B) de las bacterias competentes *Escherichia coli DH5α One Shot* (Invitrogen™) con el reconstruido plásmido de clonación ligado con el inserto codificador de la proteína NS1.

Las bacterias transformadas se sembraron por espatulación en cajas Petri con medio solidó LB-Agar (invitrogen™) con antibiótico kanamicina (30 µg/mL) (Invitrogen™) en una concentración de 30 µg/mL, e incubaron en oscuridad por 16 hrs (horas) a 37°C en un mini-incubador (BioRad). Las cajas petri con los cultivos de las colonias de bacterias se almacenaron a 4°C, protegidas de la luz, hasta su uso.

Se seleccionaron de forma aleatoria 10 colonias transformadas con el plásmido pCR® 2.1 TOPO® - NS1 DENV-2 (4986 pb) que crecieron en el medio sólido con el antibiótico de restricción (kanamicina). Por cada colonia se tomó una muestra con asa bacteriológica para subcultivar en estríado sobre una nueva caja Petri con medio sólido-kanamicina 30 µg/mL, y a la par el resto de la muestra se utilizó como templado en una PCR (PCR Colony) con el kit de la *Taq* DNA Polimerasa (BioLabs® Inc.), para comprobar la presencia de la secuencia codificadora completa de la proteína NS1 en las colonias bacterianas.

Tabla.3. Mezcla de Reacción de PCR colony para la amplificación de la secuencia de la proteína NS1 del DENV-2 de colonias transformadas

Reactivo	µL
H ₂ O para PCR	15,1
dNTP's	1,0
Amortiguador de PCR 10x	2,0
Oligo D2NS1 sen (sentido) 20 µM	0,5
Oligo D2NS1 asen (antisentido) 20 µM	0,5
Bacterias transformadas (muestra tomada con asa bacteriológica)	0,05
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerasa	0,4
Volumen final por muestra	20,0

(Los reactivos y la mezcla de reacción se mantienen en hielo para conservar la reactividad)

Se preparó 200 µL de mezcla de reacción para PCR con enzima *Taq* DNA Polimerasa en un tubo de 0,6 mL. La mezcla se centrifugó por 5 seg y se resuspendió 3 veces,

enseguida se distribuyeron 20 μ L por cada tubo para PCR (colocados en hielo), previamente etiquetados con el número de colonia bacteriana a probar.

En ambiente estéril con una asa bacteriológica se tomó la muestra de cada colonia, el asa se depositó y giro 3 veces dentro del tubo de PCR que contenía la mezcla de reacción. En una microcentrifuga (Eppendorf) cada mezcla con el templado correspondiente se centrifugó por 5 seg. (13000 rpm), después se resuspendió 3 veces y, coloco en hielo hasta que se trasladaron dentro del termociclador. Las condiciones programadas para el desarrollo de la PCR con templado de colonias bacterianas fueron las mismas que previamente se establecieron para la amplificación de la secuencia de la proteína NS1 a partir del clon de ADN.

Los amplificados por PCR de las colonias transformadas se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 0,8% (Br-Et), 1 μ L de muestra de cada colonia se colocó en un pozo individual, el sistema se conectó a una fuente de poder (Life Technologies TM) y se le aplicó una corriente de 80 V por 1h (hora). Las colonias cuya muestra amplificó una sola banda de aproximadamente 1000 pb, se consideraron positivas para presentar el inserto de la secuencia para la proteína NS1. En todas las reacciones de PCR, se incorporó un tubo de control negativo de contaminación (agua), al que no se añadía muestra con ADN.

7.3 Subclonación de la secuencia de NS1 en el plásmido de expresión

Para lograr la expresión de la proteína NS1 en bacterias *E. coli*, el gen clonado que codifica para la proteína se incorporó en el genoma del plásmido de expresión pPROEX HTb. Los plásmidos pPROEX HT (a, b, y c), son utilizados especialmente para la expresión de proteínas en bacterias ya que poseen promotores y secuencias reguladoras que son utilizadas por los sistemas procarióticos. En el plásmido de expresión pPROEX HTb se incorporó la secuencia nucleotídica de la proteína de interés, esto con el fin mantener el marco de lectura correcto.

Fue imprescindible tener disponible la mayor cantidad de ADNdc (ADN de doble cadena) de la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2 y del plásmido de expresión, para proseguir con el subclonaje, por lo que se propagó una colonia transformada con el plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®] - NS1 DENV-2 y otro con el plásmido de expresión pPROEX HTb.

Una de las colonias transformadas con el pCR[®] 2.1 TOPO[®]- NS1 DENV-2 que resultó positiva al presentar la secuencia de la proteína NS1, se propagó en 5 mL de medio LB- kanamicina (30 µg/mL), e incubó a 37°C a 200 rpm por 16 hrs en un Incubador Girotory[®] (New Brunswick Scientific). El cultivo de bacterias de esta colonia se concentró en un tubo de 1,5 mL, y subsecuentemente se procesó por la técnica de extracción y purificación de plásmido por lisis alcalina.

Al realizar una electroforesis con el ADN extraído de las colonias transformadas, se comprobó que el ADNdc correspondía con el pCR[®] 2.1 TOPO[®]- NS1 DENV-2 (4986 pb). El ADNdc del plásmido purificado se resuspendió en 50 µL de TE, y almacenó en un congelador (REVCO) a -20 °C, hasta su utilización en el proceso de subclonación de la secuencia de la proteína NS1 con el plásmido de expresión.

Con el plásmido de expresión comercial pPROEx HTb se procedió a realizar una transformación de bacterias *DH5α* (ANEXO B), las cuales se sembraron en cajas petri con medio sólido- antibiótico ampicilina (SIGMA[®]) (100 µg/mL) e incubaron por 16 hrs a 37°C. De las colonias desarrolladas, 10 colonias se propagaron en 5 mL de medio LB- antibiótico (Ampicilina 100 µg/mL) para extraer el plásmido por lisis alcalina.

La presencia del plásmido recuperado se analizó al realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et); 1 µL de ADNdc plasmídico se mezcló con 1 µL de solución amortiguadora de carga, se depositó en un pozo contiguo al marcador de 1 Kb, y se aplicó una corriente de 80 V por 1 ½ h ó hasta que se observó una banda a la altura de 4779 pb, que corresponde a la longitud del plásmido pPROEx HTb.

7.3.1 Liberación del gen de la proteína NS1 y linealización del plásmido de expresión

Para liberar la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2 del plásmido de clonación, la muestra de ADNdc del plásmido purificado pCR[®] 2.1 TOPO[®]- NS1 DENV-2 (4986 pb) se sometió a una reacción de corte restrictivo con las endonucleasas *BamHI* y *XhoI*, las cuales interaccionaron con los sitios anexados previamente durante la amplificación por PCR por los oligonucleótidos iniciadores. La reacción de restricción se estableció según la siguiente proporción de enzima y muestra de ADNdc:

Tabla 4. Reacción enzimática del plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®] - NS1 DENV-2

Reactivo	μL
pCR [®] 2.1 TOPO [®] - NS1 DENV-2 (135.86 μg/ μL)	10,0
Enzima de restricción <i>Bam</i> HI (20 U/ μL)	3,0
Enzima de restricción <i>Xho</i> I (20 U/ μL)	3,0
Buffer 3 10X (BioLabs [®] Inc.)	10,0
BSA 10X (BioLabs [®] Inc.)	10,0
H ₂ O destilada	64,0
Volumen final	100,0

(Los reactivos y la mezcla de reacción se mantienen en hielo para conservar la actividad)

Cada uno de los reactivos se depositó en un tubo de 0,6 mL, adicionando al final las enzimas de restricción, esta mezcla se resuspendió 3 veces y se incubó a 37° C por 16 hrs. Finalizada la incubación se colocó el tubo con reacción en hielo, se tomaron 5 μL del producto de corte se mezcló con 1 μL solución amortiguadora de carga y se corrió a 80 V en un gel de agarosa al 0,8% (Br-Et), y como referencia en un carril contiguo se depositó 1 μL de marcador de 1 Kb (10,000 pb).

La presencia de una banda de una longitud de 1068 pb, que correspondía al tamaño del amplificado de la secuencia de la proteína NS1, indicó la eficiencia del corte enzimático. El resto de la reacción (95 μL) se depositó en un gel de agarosa al 0.8% con 6 pozos, y se desarrolló la electroforesis a 80 V. La banda de gel de agarosa con el ADN ubicada a la altura de 1068 pb se cortó y purificó utilizando el QIAEX[®] II Gel Extraction kit (150) (QIAGEN[®]). La secuencia codificadora de la proteína se resuspendió en un volumen de 50 μL de TE (Tris-EDTA) y se mantuvo en congelación a -20°C hasta su utilización.

En paralelo pero en un tubo separado se preparó la reacción de corte enzimático del plásmido de expresión pPROEX HTb (4779 pb) utilizando las mismas enzimas de restricción requeridas para extraer del pCR[®] 2.1 TOPO[®] - NS1 DENV-2 la secuencia de la proteína NS1. Las condiciones y reactivos utilizados en la reacción restrictiva fueron las siguientes:

Tabla 5. Reacción enzimática del plásmido de expresión pPROEX HTb

Reactivo	μL
pPROEX HTb (187,16 μg/ μL)	10,0
Enzima de restricción <i>Bam</i> HI (20 U/ μL)	3,0
Enzima de restricción <i>Xho</i> I (20 U/ μL)	3,0
Buffer 3 10X (BioLabs [®] Inc.)	10,0
BSA 10X (BioLabs [®] Inc.)	10,0
H ₂ O destilada	64,0
Volumen final	100,0

(Los reactivos y la mezcla de reacción se mantienen en hielo para conservar la actividad)

Esta mezcla se resuspendió 3 veces y se incubó a 37° C por 16 hrs. Posteriormente una alícuota de 5 µL de la reacción de corte enzimático se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) aplicando una corriente de 80 V por 1 ½ h. La presencia de una banda a la altura de 4707 pb indicó que el corte por parte de las enzimas resultó, en tal situación el volumen restante de la reacción se depositó en un gel de agarosa al 0,8% (6 pozos), y se desarrolló una electroforesis en las mismas condiciones hasta que la banda de interés se visualizó. Posteriormente la banda de ADNdc correspondiente a la secuencia de la proteína NS1 con los extremos adhesivos (1068 pb) se purificó según las especificaciones del sistema de QIAEX[®] II Gel Extraction kit (150) (QIAGEN[®]). El fragmento de ADN se resuspendió en 50 µL de TE y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

7.3.2 Ligación de la secuencia de la proteína NS1 en el plásmido de expresión linearizado

La banda purificada de la secuencia de la proteína NS1 y el plásmido de expresión linearizado se descongelaron, y se adicionaron dentro de un tubo de 1,5 mL que contenía una reacción de ligación con la enzima T4 DNA Ligasa (BioLabs[®] Inc). Esta mezcla se constituyó con los reactivos que a continuación se describen:

Tabla 6. Mezcla de reacción de la ligación entre los sitios adhesivos de la secuencia de la proteína NS1 DENV-2 y del plásmido de expresión

Reactivo	µL	µL	µL	µL
pPROEx linearizado con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>XhoI</i>	7,0	7,0	7,0	4,0
Secuencia de la proteína NS1 extraída del plásmido de clonación	3,0	5,0	8,0	3,0
T4 DNA Ligasa (BioLabs [®] Inc)	1,0	1,0	1,0	1,0
Buffer T4 DNA Ligasa (BioLabs [®] Inc)	2,5	2,5	2,5	2,0
H ₂ O destilada	11,5	9,5	6,5	10,0
Volumen final	25,0	25,0	25,0	20,0

(Los reactivos y la mezcla de reacción se mantienen en hielo para conservar la actividad)

La mezcla se resuspendió suavemente y centrifugó 5 seg. a 13000 rpm e inmediatamente se incubó a temperatura ambiente (25 °C) por 12 hrs. Concluido el tiempo de incubación se tomó 5 µL del producto de la reacción de ligación, la alícuota se depositó en un gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) para realizar una electroforesis y visualizar la banda de ADNdc correspondiente a la ligación de la secuencia de la proteína NS1 dentro del plásmido de expresión linearizado (4703 pb). El resto de la reacción se utilizó para

realizar la transformación de bacterias competentes, siguiendo el protocolo general de transformación (ANEXO B) utilizando el antibiótico ampicilina (100 µg/mL).

Se preparó una mezcla para PCR colony de 200 µL que se repartió en 10 tubos de 0,6 mL para realizar una amplificación de la secuencia de la proteína NS1 a partir de 10 muestras de colonias transformadas con el plásmido pPROEx HTb-NS1 DENV-2. Con un asa bacteriológica por cada colonia se tomó una muestra, que se sembró en una nueva caja con medio sólido-antibiótico de restricción, e inmediatamente también se incorporó en el tubo con reacción de PCR. Los amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% y se expusieron a luz UV para visualizar la presencia de la banda de 1068 pb de la secuencia de la proteína NS1.

Las colonias que presentaron el inserto de ADN correspondiente a la secuencia de la proteína NS1, se propagaron en 5 mL de medio líquido- ampicilina 100 µg/mL (37°C, 12 hrs 200 rpm), y el plásmido se extrajo por el método de purificación por lisis alcalina. Con 5 µL de plásmido extraído de cada colonia, se realizó una reacción de corte con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* (volumen total 15 µL), y el producto de la reacción se corrió en un gel de agarosa al 0,8% (Br-Et). Las bandas resultado de la separación por electroforesis se analizaron en busca de la secuencia de interés 1068 pb, que confirmó la presencia del inserto en el plásmido de expresión.

El ADN de plásmidos de expresión recombinante pPROEx HTb- NS1 DENV-2 aislados de colonias que resultaron positivas para la secuencia de la proteína NS1, se cuantificaron y una alícuota debidamente etiquetada se envió para secuenciación. Los plásmidos reconstruidos previamente purificados y secuenciados, cuyo marco de lectura traducía correctamente para expresar la proteína NS1 recombinante con los residuos de histidina, se realizó la transformación de bacterias *Escherichia coli DH5α* con fines de inducción.

7.4 Expresión e inducción en condiciones nativas de la proteína recombinante NS1 de DENV-2 en bacterias *E. coli* DH5α

Las colonias transformadas con el plásmido recombinante pPROEx HTb- NS1 DENV-2 positivas para presentar la secuencia de la proteína NS1 de DENV-2 se propagaron en 5 mL de medio líquido-ampicilina (100 µg/mL) y se dejaron crecer en agitación 200 rpm a 37°C por 12 hrs. Finalizada la incubación, se tomó 2 mL de cultivo bacteriano el

cual se adicionó a 10 mL de medio líquido-ampicilina (100 µg/mL) y se permitió su crecimiento hasta una densidad óptica (D.O.) de 0,6 medida en espectrofotómetro (BioRad) a 600 nm de longitud. Alcanzada esta densidad se adicionó isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) (Fermentas) hasta una concentración 1 mM (milimolar) y cada colonia durante 3 horas se incubó a 37°C en agitación (200 rpm). Como control negativo de la inducción se siguió el mismo procedimiento con un cultivo de bacterias DH5α, que no fueron transformadas con algún plásmido.

Concluido el tiempo de inducción se alicuotó 1 mL de cada cultivo por colonia; 1 mL se almacenó (-20°C) como cultivo crudo. Del cultivo sin concentrar se tomó 80µL, que se mezclaron con solución amortiguadora de carga 5X, las proteínas se desnaturalizaron por calor durante 5 min. Por cada muestra se tomó 40 µL los cuales se resuspendieron en 8 µL de solución amortiguadora de carga para proteínas, posteriormente se desnaturalizaron también por calor. Después de colocar en hielo y centrifugar a 13000 rpm por 5 seg, por tubo con muestra se tomó 40 µL de proteínas desnaturalizadas que se cargaron en un gel de acrilamida al 10% (Sistema BioRad). Se aplicó una corriente de 80 V por 10 min y 100 V por 1½ h ó hasta que el frente de muestra se expulsó del gel.

Finalizada la electroforesis las proteínas del gel de acrilamida se tiñeron con azul de Coomassie por 1 h y se lavó el exceso con solución desteñidora, posteriormente se transfirieron a un recipiente con agua destilada para su visualización en un transiluminador de luz blanca (para su análisis se tomaron imágenes de cada gel con un fotodocumentador (BioRad)).

Una de las colonias con el plásmido recombinante que al ser inducida mostró un patrón de proteínas diferente al desarrollado por colonias no transformadas, se propagó en 5 mL de medio líquido-ampicilina (100 µg/mL), después de 12 hrs de incubación a 37°C se sembró 2 mL de cultivo en 10 mL de medio con antibiótico (proporción 1:5) y se siguió con el protocolo de inducción de los genes de interés a 37 °C. Finalizada la inducción a 37°C, los cultivos se concentraron por centrifugación a 6000 rpm por 20 min. Los botones con las células bacterianas de los cultivos se mezclaron con solución amortiguadora de lisis para sonicación con fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) en una concentración de 1mM y lisozima (SIGMA®) en una concentración de 1 mg/mL, y

se lisaron por choque de sonido (sonicador Ultrasonic Procesor Cole Parmer) según el siguiente programa:

Sonicación por 10 seg y 10 seg sin sonicación, de forma intercalada durante un minuto en intensidad 70%. Esta serie se repitió de 3 a 4 veces, hasta que la muestra adquirió una consistencia viscosa.

En una microcentrífuga refrigerada (Mikro 22K), los cultivos celulares concentrados y sonicados se centrifugaron a 12000 rpm por 20 min a 4°C, el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble se transfirió a un tubo nuevo limpio. El botón insoluble y el sobrenadante soluble se almacenaron a -20°C. Como control negativo de la inducción se creció una colonia con bacterias no transformadas la cual se sometió al mismo procedimiento.

Las proteínas de cada fracción se separaron por electroforesis en gel de acrilamida al 10% y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (BioRad) para realizar un ensayo de western blot con anticuerpos contra histidinas (Sta Cruz) y con anticuerpo monoclonal contra el antígeno de la proteína NS1 (Donado por la Dra. Cedillo CINVESTAV-ZACATENCO) y un anticuerpo secundario conjugado acoplado a peroxidasa (Pierce) (Anexo B).

Posteriormente la colonia que expresaba la proteína NS1 (40 kDa) inducida con 1mM en incubación a 37°C se propagó en 5 mL de medio líquido-ampicilina 100 µg/mL, por 12 hrs (2000 rpm a 37°C). Del cultivo crecido por 12 hrs se resembró 1mL en 5 mL de medio líquido-ampicilina (100 µg/mL) con glucosa (0,03 mM), el cultivo se mantuvo en agitación a 200 rpm a 37 °C hasta alcanzar una D.O. de 0,8 a 600 nm. Inmediatamente se transfirió el cultivo a un tubo estéril de 15 mL (Falcon) y se centrifugó a 6000 rpm por 20 min, se resuspendió en medio líquido-ampicilina 100 µg/mL, y adicionó IPTG, concentración final 0,5 mM, e incubó por 24 hrs a 16°C en agitación (200 rpm). El medio se descartó mientras que los botones celulares se resuspendieron en 2 mL de solución amortiguadora de lisis de sonicación (no desnaturalizante) con fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) en una concentración de 1mM y lisozima (SIGMA®) en una concentración de 1 mg/mL, para posteriormente ser sonicados según el siguiente programa:

Sonicación por 10 seg y 10 seg sin sonicación, de forma intercalada durante un minuto en intensidad 70%. Esta serie se repitió de 3 a 4 veces, hasta que la muestra adquirió una consistencia viscosa.

Los cultivos celulares concentrados y sonicados se centrifugaron a 12000 rpm por 20 min a 4°C, el sobrenadante correspondiente a la fracción soluble se transfirió a un tubo nuevo limpio. El botón insoluble y el sobrenadante soluble se almacenaron a -20°C. Adicional al cultivo de bacterias transformadas con el plásmido recombinante no inducidas, como control negativo de la inducción se creció una colonia de bacterias *DH5α* no transformadas las cuales se sometió al mismo procedimiento.

Para visualizar e identificar la proteína recombinante se prepararon dos geles de acrilamida al 10% uno para tinción con azul de Coomassie y otro para ensayo de western blot. Por cada cultivo de colonia (clona) inducida, no inducida y no transformada que fue sonicada se tomaron 7 µL de la fracción soluble que se resuspendieron en solución amortiguadora de carga 5X y en 57 µL de solución amortiguadora de corrida 1X. En un tubo aparte 0,5 µL del botón insoluble se resuspendió en solución amortiguadora de carga 5X con 64 µL de solución amortiguadora de corrida 1X.

7.4.1 Inducción en gran escala de la proteína recombinante en forma nativa

Para la realización de la inducción a gran escala (2000 mL) se realizó una transformación con el plásmido reconstruido número 2, y cuya secuencia nucleotídica coincidió con parte del gen de la proteína NS1 DENV-2. Nuevamente se realizó una PCR colony con muestras de 10 colonias que crecieron en el medio de restricción (ampicilina 100 µg/mL), una de las colonias que mostró el amplificado de 1055, fue propagada por estriado para su resguardo a 4°C, pues se utilizó para producir la proteína recombinante.

Se siguió el protocolo general de inducción en condiciones nativas a 16°C (ANEXO B). Se creció en 250 mL por 12 hrs una muestra de la colonia seleccionada. Después el cultivo se transfirió a 2000 mL de medio de cultivo–antibiótico-glucosa 0,03 M (medio inhibidor de la expresión) en una dilución 1:10. En el medio inhibidor (glucosa) se incubó el cultivo crecido por 12 hrs. hasta que alcanzó una D.O. de 0,8 (600 nm).

Alcanzada la densidad deseada se tomó 1 ml de cultivo para posteriormente correr en una electroforesis en gel de acrilamida (muestra no inducida) y se separó 200 mL como control negativo de la inducción. Se procedió a centrifugar el cultivo para control negativo y los 2000 mL del cultivo para inducción a 6000 rpm por 10 min, se descartó el medio con glucosa y se adiciono al botón celular medio nuevo, en el caso del cultivo destinado para inducción al medio se le adicionó inductor IPTG hasta alcanzar una concentración de 0,5 mM.

La inducción se llevo a cabo a 16°C en agitación (200 rpm) por 24 hrs. Como control negativo se creció a la par un cultivo (medio sin antibiótico) de 100 mL de bacterias DH5 α competentes no transformadas a las que se les aplicó el mismo protocolo de inducción con IPTG (0,5 mM). Finalizada la inducción se tomó 1ml de cada cultivo cultivo y se almacenó a -20° C para su posterior procesamiento para el corrimiento en una electroforesis en gel de acrilamida y para un ensayo de western blot contra histidinas.

Por centrifugación se concentró los 2000 mL de cultivo inducido (0,5 mM IPTG), a 6000 rpm por 30 min a 4°C y se envasó en un tubo Falcon de 50 mL. La pastilla celular se congeló a -70°C por 20 min y después se descongeló en hielo, y homogenizó por agitación en vortex por 2 min. Este proceso de descongelación se repitió por una ocasión más.

A continuación se resuspendió el botón celular en 4 mL de solución amortiguadora de lisis para sonicación (ANEXO A), con PMSF en una concentración de 1 mM y lizozima en una concentración de 1 mg/mL. Inmediatamente se agitó en vortex hasta que se observó una mezcla homogénea. La resuspensión se incubó en hielo por una hora antes de la sonicación.

El botón celular se sonicó en hielo, siguiendo la siguiente secuencia programada:

Durante un minuto se aplicó de forma intermitente una vibración sonica por 10 seg a una intensidad de 70 a 80% de amplitud, seguida de 10 seg de inactividad. Se incubó por 5 minutos, y nuevamente por un minuto se continuó con el programa. Este paso se repitió 5 veces.

Para separar la fracción soluble de la fracción insoluble (principalmente cuerpos de inclusión) se centrifugó el cultivo sonicado, a 13000 rpm por 30 min a 4°C. Cuidadosamente con una micropipeta de 1 mL se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo. Se alicuotó un volumen de 50 µL de sobrenadante de la fracción soluble para el análisis de la inducción y, el contenido restante se almacenó inmediatamente a -20°C.

En un tubo de 0,6 mL se depositó 5µL de sobrenadante correspondiente a la fracción con proteínas solubles y se resuspendió en 8 µL de solución amortiguadora de muestra 5X y 27 µL de solución amortiguadora de corrida 1X. Del botón se tomó 0,5 µL y se mezcló con 8 µL de solución amortiguadora y se resuspendió en 32 µL de solución amortiguadora de corrida 1X. Cada muestra se desnaturalizó por calor (10 min a 100 °C), 40 µL se corrió en un gel de de acrilamida al 10% para el análisis por tinción de bandas de proteínas con azul de Coomassie y, 40 µL en un gel duplicado para el ensayo de western blot contra histidinas.

7.4.2 Purificación de la proteína recombinante contenida en la fracción soluble por cromatografía de afinidad con la resina Ni-NTA

La purificación de la proteína de fusión se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad en suspensión, basada en la unión de proteínas con 6 residuos de histidina a una resina que presenta ácido nitrilotriacético (NTA) unido a iones metálicos de níquel, y posterior elución de las mismas con una solución amortiguadora e imidazol (SIGMA®) en diferentes concentraciones. Como resina de afinidad se empleó Ni-NTA acoplada a sefarosa®(QIAGEN®) capaz de unir más de 5 a 10 mg de proteína con residuos de histidina por mL de resina

Para la recuperación de la proteína por cromatografía de afinidad se utilizó de 1 mL de resina Ni-NTA (QIAGEN®) la cual se depositó en un tubo Falcon de 15 mL y se lavó con 10 mL de H₂O en agitación por 5 min, seguida de una centrifugación a 3500 rpm a 4°C por 5 min, con la finalidad de eliminar el etanol presente (esta forma de lavado se repitió por 5 veces). Enseguida se equilibró la resina con 5 mL de solución amortiguadora de lisis, incubando por 2 hrs a 4 °C en agitación suave.

La fracción soluble del cultivo inducido y sonificado se descongeló en hielo y, enseguida se le adicionó la resina Ni-NTA equilibrada. La interacción entre la resina y la fracción soluble se llevó a cabo por 12 hrs a 4 ° C en agitación suave. Finalizada esta etapa se tomó 10 µL de la interacción (guardado a 4°C) para la posterior electroforesis en gel de acrilamida.

A continuación la interacción Ni-NTA- fracción soluble se centrifugó a 4500 rpm por 10 min a 4°C, y se recuperó el sobrenadante que correspondía a las proteínas y partículas que no interaccionaron o no se fijaron a la Ni-NTA. Esta fracción que no interaccionó se guardó a -20°C.

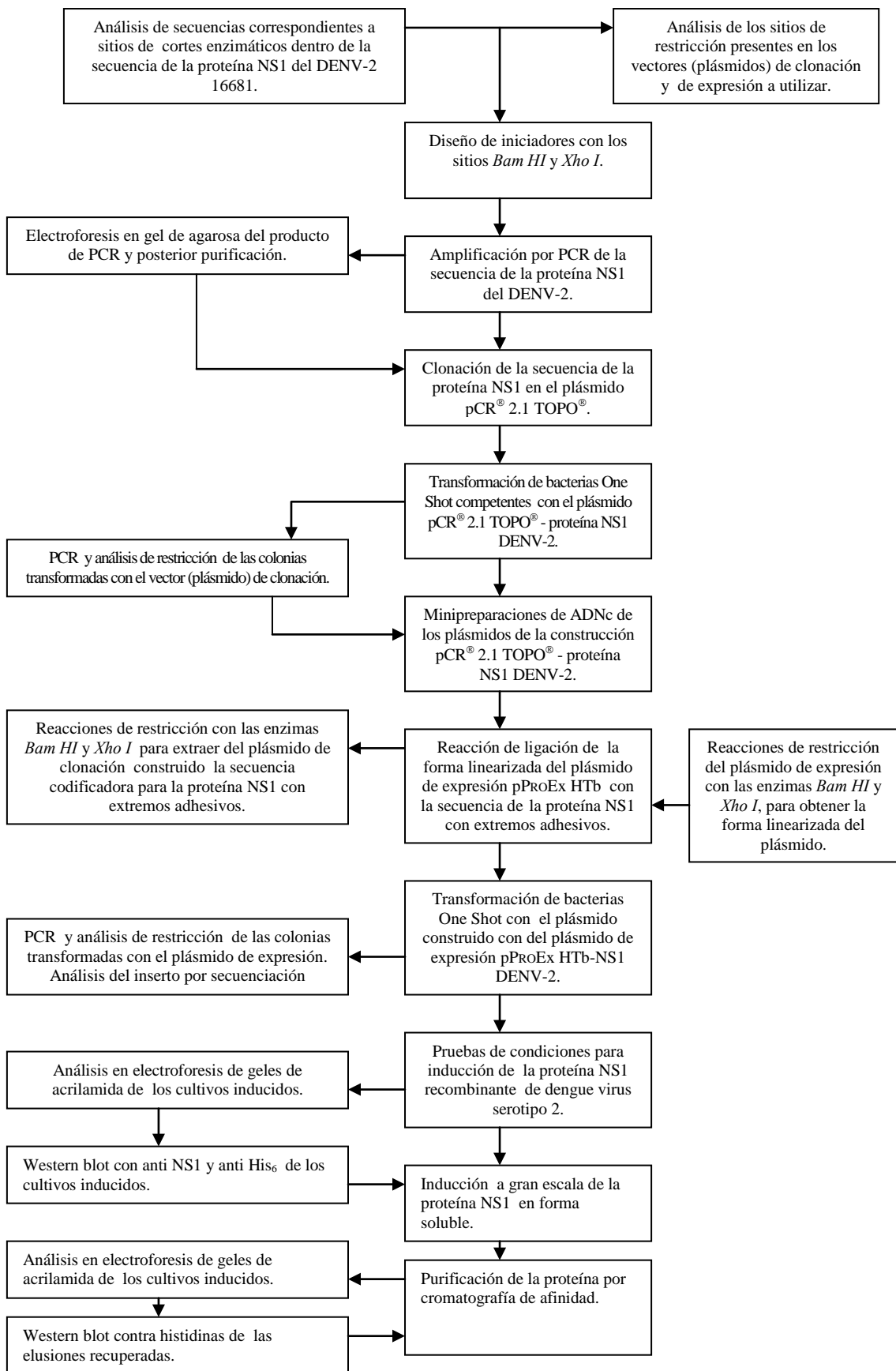
Después el botón-resina-proteína NS1 se resuspendió en 5 mL de solución amortiguadora “A” y se mantuvo en agitación por 5 min a temperatura ambiente, enseguida se centrifugó a 5000 rpm a 4°C por 5 min. El sobrenadante separado con las proteínas que no interaccionaron con la resina fue almacenado a -20°C. Y nuevamente el botón se lavó con 5 mL de de solución amortiguadora “A” y fue centrifugado para recuperar solo el complejo resina-proteína. Una alícuota de 60 µL de sobrenadante de cada lavado se preparó para su posterior análisis en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie y ensayo de western blot contra histidinas.

La proteína recombinante embebida en el complejo de la matriz Ni-NTA fue desprendida a través de una serie de lavados en agitación (5 min a T. amb.) con solución amortiguadora “A” e imidazol (SIGMA®) a diferentes concentraciones. El primer lavado se realizó con una concentración de 15 mM, después de la agitación (5 min a T. amb) la resina- proteína se centrifugó a 5000 rpm por 5 min a 4 °C y el sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y limpio. Los siguientes lavados fueron a 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM y 500 mM de imidazol. Por cada concentración de imidazol el lavado se repitió 3 veces.

Para cada sobrenadante obtenido del gradiente de lavado-elución se tomaron 60 µL para correr un gel de acrilamida para tinción con azul de Coomassie y otro gel para ensayo de western blot. Los sobrenadantes de los lavados de la resina Ni-NTA- fracción soluble y los eluidos con imidazol y la pastilla con los cuerpos de inclusión se almacenaron a -20°C.

Se repitió la inducción a gran escala (2000 mL) y se prosiguió con los mismos pasos hasta los lavados con imidazol. Se estableció una nueva serie de lavado-elución, primero se lavó el complejo resina-Ni-NTA 3 veces con la solución amortiguadora "A" con 25 mM de imidazol y enseguida se eluyó con 500 mM de imidazol. De los sobrenadantes recuperados se tomó una alícuota de 160 μ L para correr un gel de acrilamida para visualizar las proteínas teñidas con azul de Coomassie y otro gel para realizar un ensayo de western blot contra la bandera de histidinas, el resto se almacenó a -20°C.

8. DIAGRAMA DE FLUJO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL



9. RESULTADOS

9.1 Amplificación de la secuencia codificadora de la proteína NS1 del virus Dengue Serotipo 2 (DENV-2)

El primer paso para la clonación del gen que codifica para la proteína NS1 de DENV-2 en cuyos extremos se adicionaron los sitios de corte enzimático (*Bam*HI en dirección 5' y *Xho*I en 3'), fue la amplificación de este por PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores especialmente diseñados para anexar los sitios de restricción enzimática mencionados. La secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2 se obtuvo usando como templado el clon ADN de la cepa 16681 donado por el Dr. Kinney (CDC), que posee el genoma completo del virus dengue serotipo 2 cuyo tamaño es de 10,7 Kb.

Para analizar los productos amplificados obtenidos en la reacción de la PCR se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 0,8% con bromuro de etidio (Br-Et) (**Fig.16**), en el que observó la presencia de un amplicón bien definido con un longitud de 1068 pb (pares de bases), que corresponde con el tamaño esperado para el gen completo de la proteína NS1 con las bases adicionales de los sitios de corte *Bam*HI y *Xho*I.

Amplificación de la secuencia de la proteína NS1 de DENV-2

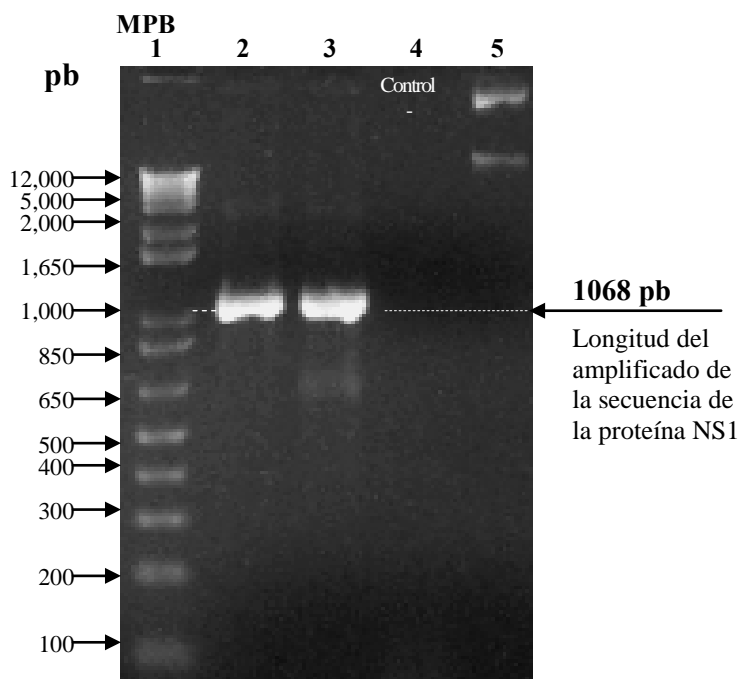


Fig. 16.- Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) de la **amplificación por PCR de la secuencia codificadora de la proteína NS1 del DENV-2**, en el primer carril se ubica el marcador de pares de bases (pb) de ADN de 1 Kb (MPB), cuyas bandas corresponden a fragmentos de ADN cuyos tamaños son una referencia. En los carriles 2 y 3 se observan dos bandas de la migración de los productos de amplificados de PCR (1 μ L) a una altura de 1068 pb el cual corresponde con el tamaño esperado para el amplicón de la secuencia de la proteína NS1 de DENV-2, lo que indica la correcta amplificación de la secuencia clonada. En el carril 4 se incluyó un control negativo, en el que se utilizó como templado agua destilada. Finalmente se corrió en el carril 5 el clon de ADNc del DENV-2 (10,7 Kb)

9.2 Ligación de la secuencia de la proteína NS1 con el plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®] y transformación de bacterias competentes

Con la finalidad de garantizar la inserción de la secuencia codificadora de la proteína NS1 dentro del plásmido de expresión, era indispensable disponer de una considerable cantidad de ADN de la mencionada secuencia, principalmente por los requerimientos en las reacciones de restricción enzimática, realizadas para obtener los extremos adhesivos, condición indispensables para el acoplamiento adecuado entre plásmido y secuencia de interés (vital para la correcta traducción de la proteína).

Por tal motivo se realizó una clonación del amplicón de 1068 pb obtenido por PCR, utilizando el plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®] (3,9 Kb). Este plásmido de clonación comercial se encuentra de forma linearizada, se caracteriza por tener incorporada la DNA topoisomerasa I, que habilitada dentro del plásmido funciona tanto como una enzima de restricción y como una ligasa, que posibilita la directa ligación de secuencias de ADN con bases nitrogenadas de adenina (A) en los extremos. La ligación del producto de PCR interrumpe la secuencia que codifica a la β -galactosidasa, de tal modo que si se desea obtener un mayor número de copias del gen de interés se puede utilizar el inductor IPTG, el cual promueve la transcripción de los genes asociados al operon *Lac*.

La construcción plasmídica (pCR[®] 2.1 TOPO[®]-NS1-DENV-2) obtenida de la reacción de ligación de la secuencia amplificada de la proteína NS1-DENV-2 dentro del plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®], se utilizó para realizar la transformación de bacterias competentes *Escherichia coli* cepa *DH5 α* One Shot (Invitrogen). Las bacterias transformadas que desarrollaron colonias en el medio selectivo con antibiótico kanamicina, anexaron el plásmido de clonación, ya que dentro del genoma del plásmido pCR[®] 2.1 TOPO[®] se encuentran incorporados los genes *nptII* y *bla* que codifican el promotor de resistencia selectiva ante los antibióticos kanamicina y ampicilina, respectivamente.

Sin embargo, debido a que una célula puede crecer en el medio de selección si es un mutante que es resistente al antibiótico, ó si ha incorporado un plásmido que carece del gen de interés (un plásmido que no incorporo el gen de interés durante el proceso de inserción), fue necesario demostrar la presencia del plásmido recombinante pCR[®] 2.1

TOPO[®] con la secuencia codificadora de la proteína NS1-DENV-2, en las colonias transformadas. Para tal efecto se preparó una serie de 10 reacciones para PCR utilizando como templado muestras tomadas directamente de las colonias bacterianas (clonas) crecidas en el medio sólido con antibiótico y para amplificar la secuencia de interés se usaron los oligonucleótidos iniciadores diseñados para la proteína NS1 DENV-2.

El subsecuente análisis por electroforesis en gel de agarosa de cada una de las reacciones de PCR de 8 colonias elegidas aleatoriamente, reveló 7 amplicones con 1068 pb de longitud, se asumió que las colonias incorporaron el plásmido recombinante con la secuencia de ADN de la proteína NS1 DENV-2, pues los oligonucleótidos iniciadores específicamente reconocen y amplifican la mencionada secuencia (**Fig.17**).

Amplicones de la secuencia de la proteína NS1 insertada en el plásmido de clonación (PCR Colony)

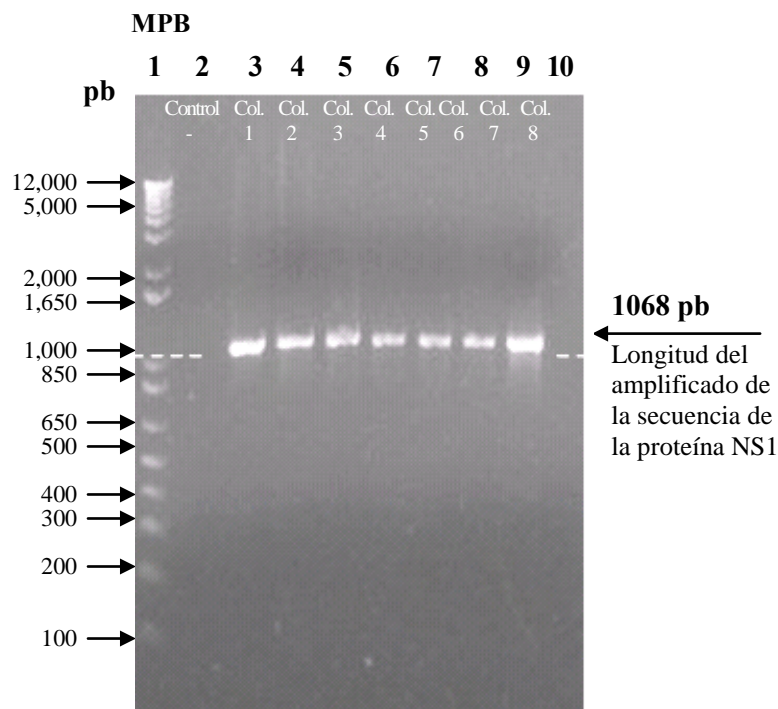


Fig. 17.- Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) de la amplificación por **PCR de las colonias transformadas con la reacción de ligación del plásmido plasmídica pCR[®] 2.1 TOPO[®] - NS1 DENV-2.** El marcador de ADN 1Kb (MPB) se ubica en el primer carril a la izquierda. En el carril 2 no se observan bandas del control negativo (sin muestra de ADN), descartando la posibilidad de falsos positivos por contaminación durante la manipulación al cargar las muestras. A partir del carril 3 y hasta el 9 se observó la banda de 1000 pb resultado de la amplificación de la secuencia de la proteína NS1 presente en las colonias 1 a 7. En el carril 10 se advirtió que la colonia 8 no amplificó la banda de 1068 pb, indicando que no presentó el inserto de la secuencia codificadora de la proteína viral.

Las bacterias transformadas que portaban el plásmido de clonación recombinante pCR[®] 2.1 TOPO[®]-NS1 DENV-2 se propagaron para extraer por la técnica de lisis alcalina el

plásmido recombinante con el ADN de la secuencia de la proteína NS1, requerida para seguir con paso de subclonación en el plásmido de expresión.

9.3 Subclonación de la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2 en el plásmido de expresión

Para expresar el gen de la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2, desde la transcripción a ARNm y hasta la traducción en aminoácidos, fue necesario subclonarla en un plásmido vector de expresión (sistema de expresión procariótico), el cual posee los promotores y elementos necesarios para regular la expresión de los genes hasta la traducción en proteínas.

La orientación correcta de la secuencia inserta en el plásmido de expresión en la traducción de la proteína se aseguró al emplear dos distintas enzimas de restricción, una enzima para cortar en el sitio *BamHI* en el extremo 5' y otra enzima para cortar en el sitio *XhoI* localizado en el extremo 3', elección predeterminada de acuerdo con la localización de ambos sitios dentro del espacio de clonación múltiple del plásmido de expresión.

Previo al corte enzimático se calcularon los tamaños teóricos de los productos resultantes tanto de la reacción de restricción como de la reacción de ligación (**Tabla. 7**), para identificar los fragmentos a purificar y ligar en la construcción del plásmido de expresión de la proteína recombinante.

Tabla 7. Tamaño teórico calculado de los fragmentos obtenidos de las reacciones de digestión de los plásmidos de clonación y expresión con las enzimas <i>BamHI</i> y <i>XhoI</i>	
Tamaño de los fragmentos esperados en pares de bases (pb)	
pCR [®] 2.1 TOPO [®] . Plásmido comercial sin modificar. Sin cortar	3931 pb
pCR [®] 2.1 TOPO [®] -NS1 DENV-2. Plásmido comercial con la secuencia de la proteína NS1. Sin cortar.	4986 pb
pCR [®] 2.1 TOPO [®] -NS1 DENV-2. Sin la secuencia entre los sitios <i>BamHI</i> y <i>XhoI</i> 3931 -41- 39 -1068 = 3864pb	3864 pb
Secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2	1055 pb
Plásmido de expresión pPROEx HTb . Sin modificar	4779 pb
Plásmido de expresión pPROEx HTb sin las bases entre el sitio <i>BamHI</i> y <i>XhoI</i> 4779pb -76= 4703pb	4703 pb

Se procedió a realizar una reacción de digestión enzimática del plásmido recombinante pCR[®] 2.1 TOPO[®] -NS1 DENV-2 y del plásmido de expresión pPROEx HTb con las

enzimas *BamHI* y *XhoI*, de tal manera que se obtuvieron los extremos cohesivos complementarios que permitieron la interacción de ligación, entre el sitio de clonación múltiple del plásmido y la secuencia de la proteína NS1 extraída del plásmido de clonación. Como control de la especificidad y eficiencia de la digestión por parte de las enzimas, por separado se efectuó el corte del plásmido de clonación pCR® 2.1 TOPO®-NS1 DENV-2 con cada una de las enzimas.

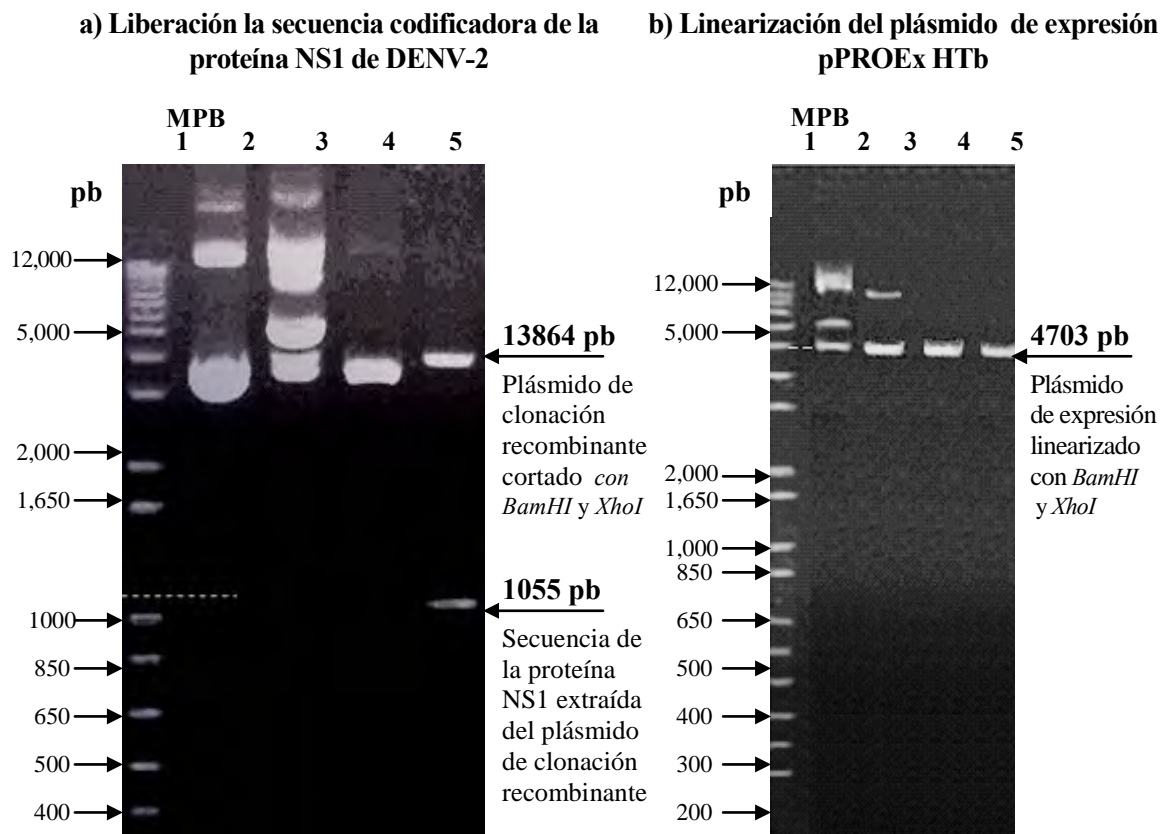


Fig.18- Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) de los productos de la digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI* del plasmido de clonación pCR® 2.1 TOPO®-NS1-DENV-2 y del plásmido de expresión pPROEx HTb. **a)** Liberación la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2. En el carril 1 se ubica como referencia el marcador de pares de bases (MPB). El carril 2 presenta el plásmido pCR® 2.1 TOPO® - NS1 DENV-2, sin cortes enzimáticos. En los carriles 3 y 4 se observa la serie de bandas que pertenecen al producto de la reacción de corte enzimático con la enzima *BamHI* y *XhoI*, respectivamente. La reacción de digestión doble del plásmido pCR® 2.1 TOPO®-NS1 DENV-2 con las enzimas *BamHI* y *XhoI* se corrió en el carril 5, donde se distingue tenuemente el fragmento de ADNdc de 1055 pb liberado, el cual corresponden a la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2. **b)** Linearización del plásmido de expresión pPROEx HTb. Carril 1 corresponde al MPB. En el carril 2 se observan las bandas de ADN del plásmido de expresión sin cortes enzimáticos. Al digerir sólo con la enzima *BamHI* (carril 3) y sólo con la enzima *XhoI* (carril 4) el plásmido es linearizado. En el carril 5 se aprecia el plásmido de expresión digerido con ambas enzimas de restricción, la diferencia de pares de bases con respecto al plásmido no digerido es sutil, debido a la reducida longitud de los fragmentos liberados (76 pb).

Los productos de las reacciones enzimáticas de la digestión del plásmido de clonación recombinante se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) para separar por electroforesis los fragmentos de ADNdc. Al analizar la serie de bandas formadas de los fragmentos de ADN liberados por la acción enzimática, se detectó que al cortar sólo con la enzima *BamHI* se obtuvieron varios fragmentos posiblemente a que las condiciones de la reacción no fueron las más adecuadas o también debido a un corte en el segundo

sitio *BamHI* del plásmido. Por su parte en la reacción de digestión del pCR[®] 2.1 TOPO[®]-NS1 DENV-2 sólo con la enzima *XhoI*, el plásmido se linearizó tal como se esperaba. En tanto que del corte con ambas enzimas de restricción se obtuvo un fragmento de 1055 pb (**Fig 18. a**), tamaño que coincide con la longitud de la secuencia NS1 de DENV-2. Este fragmento fue purificado y se ligó en el plásmido de expresión linearizado.

En el análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) de los productos de la reacción de digestión del plásmido de expresión con la enzima de restricción *BamHI*, se advirtió la presencia de una banda que migró ligeramente por debajo del tamaño de las bandas de ADN correspondientes al plásmido sin cortar (4779 pb), sugiriendo la linearización del plásmido circular, cuyo ADN al adoptar una conformación lineal migró más. De forma semejante al realizar la digestión del plásmido de expresión sólo con la enzima *XhoI* se observó también una banda por debajo de las 4779 pb. En tanto la acción de la digestión simultánea de ambas enzimas (**Fig 18. b**) dividió el plásmido en dos bandas; una banda de 4703 pb de longitud localizada ligeramente por debajo del tamaño del plásmido de expresión linearizado, y un fragmento imperceptible de 76 pb liberado de las bases entre los sitios *BamHI* y *XhoI*.

9.3.1 Ligación de la secuencia de la proteína NS1 en el plásmido de expresión pPROEx HTb

La ligación de secuencias de distintos genes dentro de diversos plásmidos permite la integración de secuencias de aminoácidos que confieren a la proteína de interés una característica particular. Para los propósitos del presente trabajo experimental, la secuencia de la proteína NS1 se ligó dentro del el plásmido pProEX HTb, vector de expresión, para posibilitar su sobreexpresión como una proteína fusionada en uno de sus extremos a una bandera de histidinas, como estrategia para su posterior identificación y purificación.

Se procedió a ligar la secuencia de 1068 pb de la proteína NS1, extraída del plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®]-NS1 DENV-2 por digestión con las enzimas *BamHI* y *XhoI*, dentro del plásmido de expresión linearizado (4703 pb) con las mismas enzimas, a través de una reacción de ligación catalizada por la enzima ligasa T4 que une los extremos cohesivos y complementarios del plásmido pProEx HTb y la secuencia de interés.

Al preparar las reacciones de ligación se probaron 3 concentraciones de inserto de la proteína NS1 (secuencia liberada del plásmido de clonación). Después de la incubación respectiva los productos se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% y se analizó el patrón de bandas de ADNdc separadas. En los productos de las tres reacciones de ligación se observa una banda tenue con un tamaño aproximado a las 6000 pb (Fig.19. carril 6, 7, 8), que es superior a la longitud del plásmido sin cortes (Fig.19. carril 2) y al del plásmido linearizado (Fig.19. carril 3).

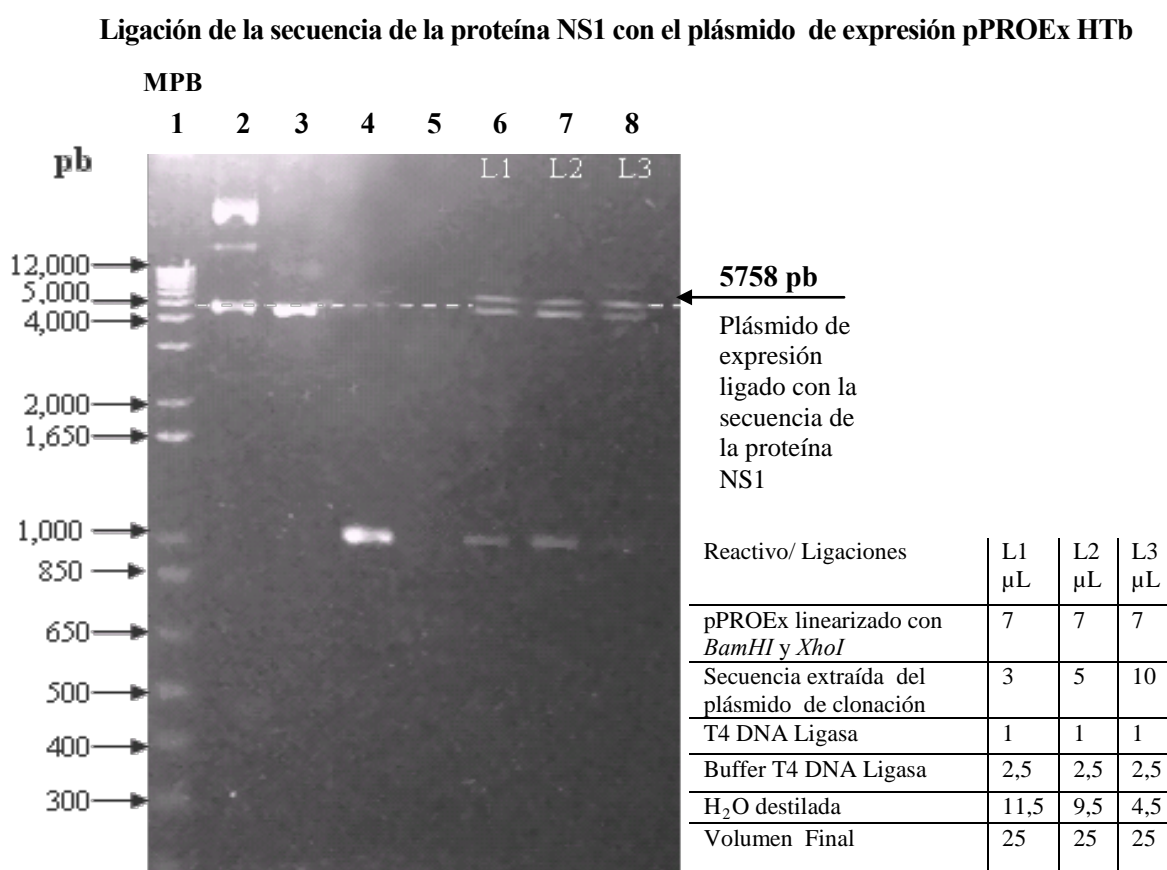


Fig.19.- Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) de los **productos de ligación de la secuencia codificadora de la proteína NS1 en el plásmido de expresión pPROEx HTb**. El marcador de pares de bases (MPB) se ubica en el primer carril. En el carril 2 se corrió el plásmido de expresión intacto. La digestión doble con las enzimas *Bam*HI y *xho*I linearizó el plásmido, carril 3. En el carril 4 se corrió el fragmento de ADNdc (1055 pb) extraído por digestión enzimática del plásmido de clonación. En los carriles 6,7 y 8 se corrieron las reacciones de ligación, en la reacción L1 y L2 se observan tres bandas, entre ellas una banda cercana a las 6000 pb, que coincide con la banda teórica de 5758 pb calculada; las otras dos bandas corresponden al plásmido linearizado (4703 pb) y a la secuencia de interés (1055 pb). En el carril 8 solo se observa la banda del plásmido linearizado y la banda de ADN del plásmido ligado a la secuencia de la proteína NS1 (5758 pb).

Teóricamente el valor calculado para el plásmido de expresión recombinante fue de 5758 pb, obtenido de la suma del tamaño del inserto linearizado 4779 pb con las 1055 pb de la secuencia de la proteína NS1, por tal motivo se dedujo que la banda ubicada entre las 5000 pb y 6000 pb correspondía a la ligación del inserto de interés en el plásmido de expresión. También se observó la banda ADNdc de 1068 pb de la secuencia de la proteína NS1 (con

los sitios de restricción) y una banda de 4703 pb lo cual sugirió una reducida actividad de la enzima ligasa (**Fig 19**. carril 6,7 y 8). El análisis de los productos de ligación por electroforesis mostró que efectivamente se obtuvieron productos de ligación en las tres reacciones preparadas, aunque con un bajo rendimiento.

9.3.2 Identificación y aislamiento de colonias transformadas con el plásmido de expresión ligado a la secuencia de la proteína NS1

La selección de clonas bacterianas convenientes para inducir la expresión de la proteína recombinante requirió primero, demostrar que las colonias desarrolladas de la transformación con las reacciones de ligación realmente presentaran el plásmido de expresión con la secuencia de la proteína NS1.

Con la mezcla de los productos de las reacciones de ligación preparadas con diferentes concentraciones del inserto de la secuencia de la proteína NS1, se efectuó la transformación de bacterias competentes *E. coli DH5α* que se sembraron en medio sólido con el antibiótico ampicilina (100 µg/mL). Solamente las bacterias que asimilaron el plásmido de expresión con el inserto o sin el inserto de la secuencia de la proteína se desarrollaron, debido a que el plásmido pPROEx HTb codifica el gen de resistencia al antibiótico.

En el medio de cultivo con antibiótico donde se sembraron las bacterias transformadas con la reacción de ligación número 3 (L3) (**Fig. 20**), en la que se utilizó una cantidad mayor de inserto de la secuencia de interés, se desarrollaron mas colonias en comparación con el número de colonias derivadas de la reacción de ligación 1 (L1) y de la reacción de ligación 2 (L2). Lo que significa que un mayor número de células desarrollo resistencia al antibiótico, debido a la incorporación del plásmido de expresión o por mutación.

Para comprobar si efectivamente las bacterias transformadas presentaban el plásmido de expresión ligado con la secuencia de la proteína NS1, se recurrió al análisis por restricción enzimática de ADN de plásmidos. Las colonias elegidas se propagaron para extraer por la técnica de lisis alcalina el ADN de los plásmidos que les conferían resistencia al antibiótico, los plásmidos se sometieron a un corte con la enzima de restricción *BamHI*. Los productos de digestión (5 µL) se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% para analizar los fragmentos de ADN resultantes

Colonias de bacterias transformadas con la reacción de ligación del plásmido de expresión con la secuencia de la proteína NS1

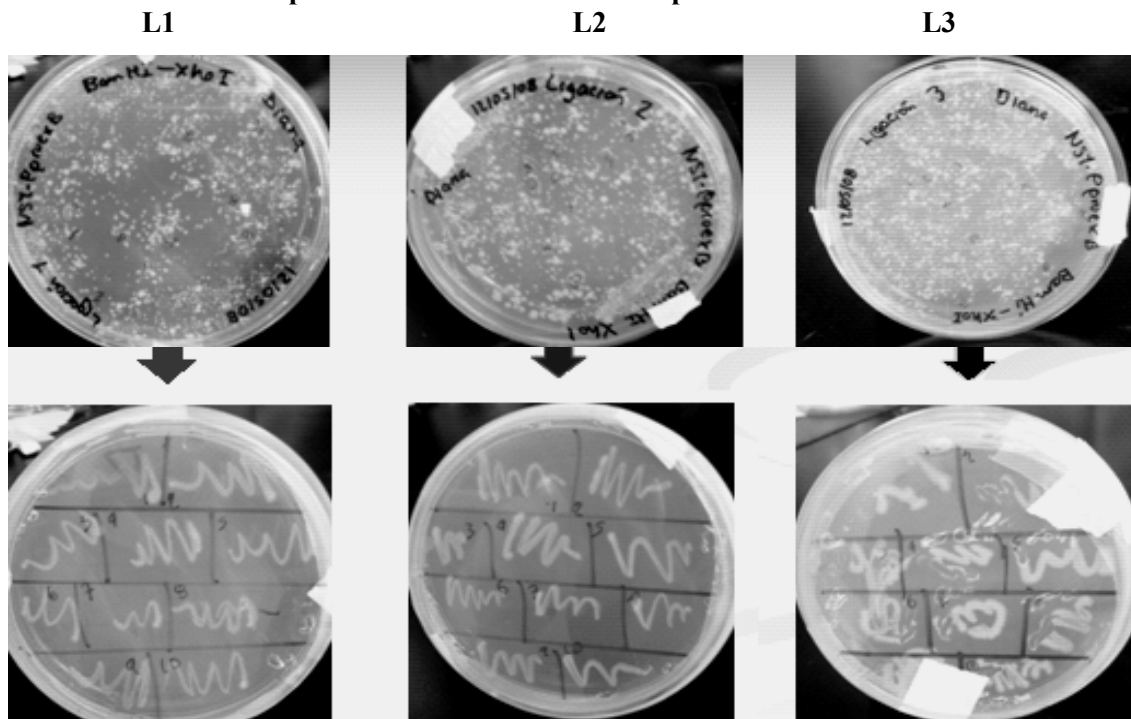


Fig.20 Colonias desarrolladas de las bacterias transformadas con las reacciones de ligación del inserto de la secuencia de la proteína NS1 en el plásmido de expresión pPROEx HTb. Se probaron 3 concentraciones de inserto de la proteína NS1, en la primera reacción de ligación se utilizó 3 μ L, en la segunda reacción 5 μ L y en la tercera reacción 8 μ L. De cada cultivo con colonias desarrolladas, se seleccionaron aleatoriamente 10 colonias que se sembraron por estriado, para su posterior análisis por PCR colony (muestra de colonia como templado), para comprobar la presencia de la secuencia de interés.

De entre los 30 plásmidos (extraídos de las colonias transformadas) sometidos a restricción enzimática, se advirtió que sólo un plásmido, correspondiente a una colonia transformada con la ligación 1, presentó el plásmido de expresión ligado con el inserto de la secuencia de interés (**Fig 21**). Concretamente los productos de digestión de este plásmido migraron una menor distancia debido a que midieron más (5758 pb), que las bandas derivadas de la digestión de un plásmido sin inserto, las que al ser mas pequeñas migran una distancia mayor (4703 pb).

El reducido número de bacterias transformadas con el plásmido de expresión ligado al inserto de la secuencia de interés motivó a preparar una reacción de ligación nueva. En la reacción para evitar la religación de los fragmentos extraídos del plásmido se disminuyó la cantidad de plásmido linearizado (4 μ L) y del inserto de la secuencia de la proteína NS1 (3 μ L), y se concentró la cantidad de enzima ligasa T4 al reducir el volumen final de reacción (20 μ L). Una alícuota de 5 μ L de esta reacción de ligación se corrió en un gel de agarosa al 0,8%, la ligación resultó mas eficiente pues se observó

una banda más acentuada localizada próxima a las 6000 pb (datos no mostrados), con el resto de la reacción se transformaron bacterias *E. coli* competentes.

Corte con la enzima de restricción *Bam*HI, para comprobar la presencia de la secuencia NS1 de DENV-2

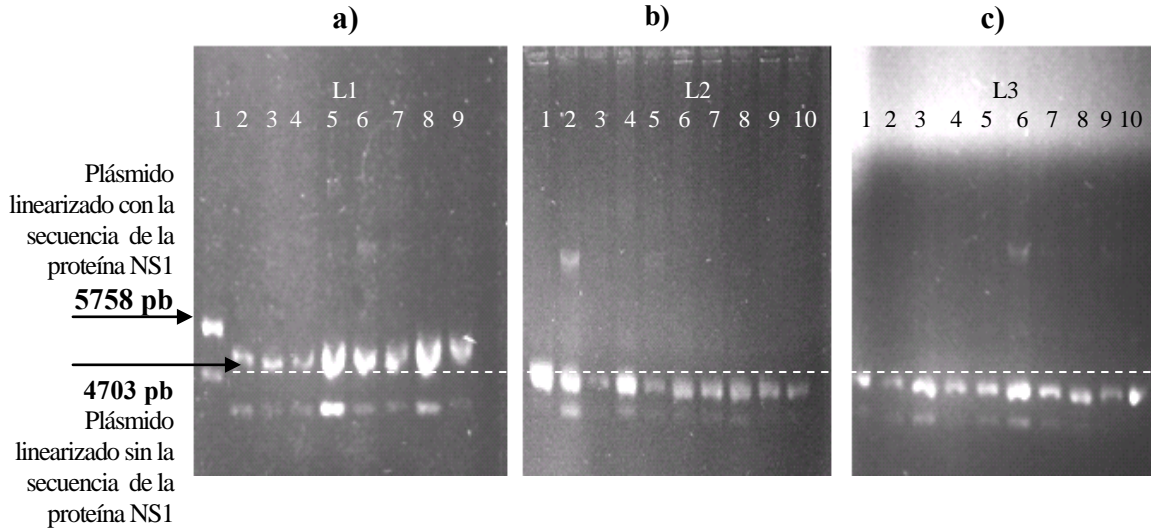


Fig.21. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) de los **productos de restricción con la enzima *Bam*HI, de los plásmidos extraídos de bacterias transformadas con la reacción de ligación** de la secuencia de la proteína NS1 de DENV-2 dentro del plásmido de expresión pPROEx HTb a) Gel de agarosa en el que se corrieron los productos de restricción enzimática de plásmidos obtenidos de colonias transformadas con una reacción de ligación preparada con 3 μ L de inserto de la proteína de interés. El carril 1 muestra la única colonia con el plásmido de expresión de 5758 pb de longitud, cuyas bandas correspondientes se ubican sobre las bandas de fragmentos digeridos de menor tamaño (carril 2 al 9). b) Los plásmidos de las colonias transformadas de la ligación 2 (5 μ L de inserto) al ser digeridos se linearizaron en fragmentos con un menor tamaño con respecto a la colonia 1 de la ligación 1 (carril 1 al 10) presentan menos pares de bases que la colonia 1 de la primera reacción de ligación. c) La migración de las bandas de los productos de digestión de los plásmidos de las colonias transformadas con la ligación 3 (carril 1 al 10), fue similar a la de los fragmentos digeridos de los plásmidos de la ligación 2. Las colonias transformadas con las reacciones de ligación 2 y 3 no anexaron el plásmido de expresión ligado a la secuencia de interés.

La presencia del plásmido ligado a la secuencia de interés (pPROEx HTb- NS1 DENV-2) en las colonias desarrolladas se corroboró al realizar PCR colony para amplificar la secuencia de la proteína NS1 y posteriormente una reacción de restricción enzimática. Los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% para visualizar los amplicones desarrollados. De 12 colonias seleccionadas al azar que se probaron por PCR, 10 mostraron amplificadas a una altura de 1068 pb, por lo que se consideraron positivas para presentar el plásmido con la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2. Para descartar falsos positivos por contaminación cruzada durante la ejecución de la prueba se incluyó un control positivo de la reacción de PCR utilizando como templado ADN de tejido de extracto de cerebro de ratón infectado con DENV-2, y en el control negativo agua destilada (**Fig.22**). Durante la preparación de las reacciones de PCR las colonias probadas se aislaron y propagaron por estriado en medio sólido, el número que se les asignó fue determinante para su posterior identificación.

**Amplicones de la secuencia codificadora de la proteína NS1 obtenido por PCR
colony de colonias con el plásmido de expresión recombinante**

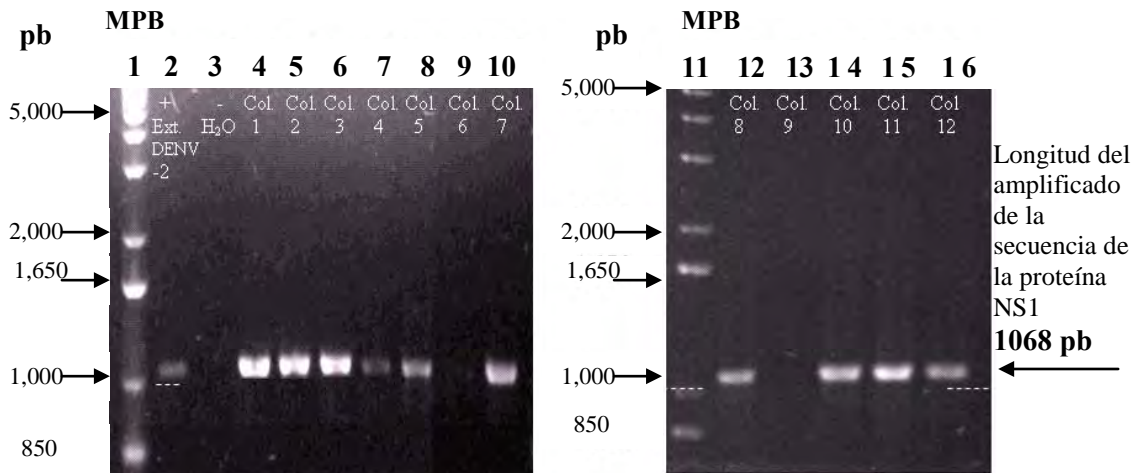


Fig. 22 Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) de la **amplificación por PCR de la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2 de colonias bacterianas transformadas con el plásmido de expresión recombinante pPROEX HTb- NS1 DENV-2**. Carril 1 MPB. El control positivo de la reacción de PCR fue el templado de extracto de cerebro de ratón infectado con el virus DENV-2, (carril 2) y el agua destilada como templado del control negativo (carril 3). Reacciones de amplificación de 12 colonias transformadas con la reacción de ligación del plásmido de expresión con la secuencia de interés (carriles 4 al 16). De 12 colonias 10 colonias amplificaron una banda de 1068 pb, lo que sugiere que las colonias poseen el inserto de la secuencia codificadora de la proteína NS1.

Secuencia de la proteína NS1 de DENV-2 extraída de plásmidos de expresión recombinantes por corte con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I

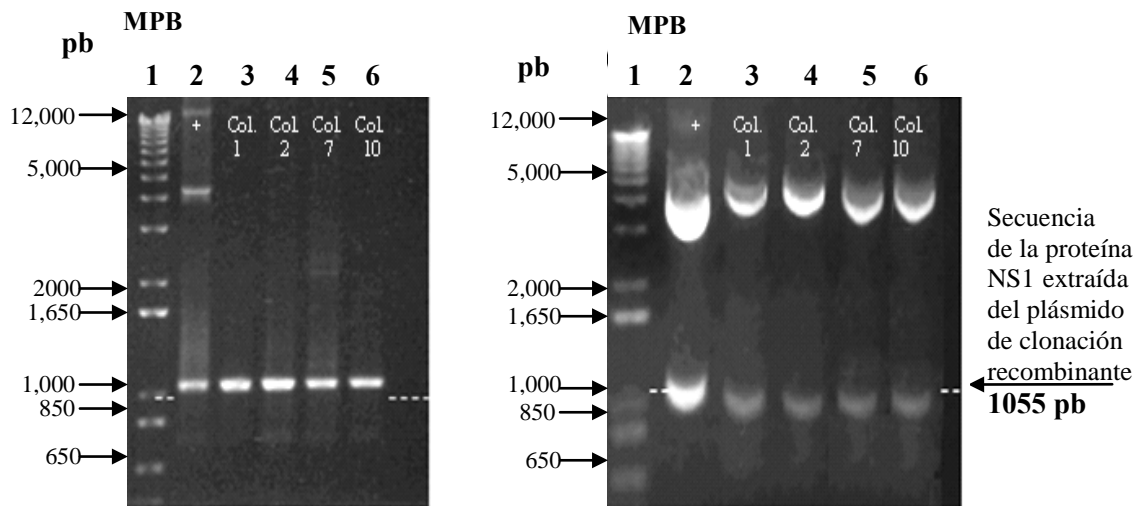


Fig.23. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) de la **amplificación por PCR de la secuencia codificadora de la proteína NS1 de DENV-2 y reacción de restricción enzimática doble (*Bam*HI y *Xho*I) de plásmidos extraídos de colonias bacterianas transformadas con el plásmido de expresión recombinante pPROEX HTb- NS1 DENV-2**. El marcado de pares de base se ubica en el carril 1 para ambos geles. **a)** En el carril 2 se corrió el control positivo de la amplificación de la secuencia de la proteína NS1 a partir del plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®] -NS1 DENV-2 (4986 pb). En los carriles 3 al 6 se cargaron las reacciones de PCR de 4 plásmidos de las colonias 1, 2, 7 y 10, transformadas con el plásmido de expresión recombinante. Las colonias presentan un amplicón de 1068 pb lo que indica que el plásmido de expresión que presentan está ligado al inserto de la proteína de interés. **b)** Restricción enzimática con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I de los plásmidos de las colonias 1, 2, 7 y 10. Como control positivo de la acción enzimática se digirió el plásmido de clonación, del que se extrajo una banda de 1055pb correspondiente a la secuencia de la proteína NS1 (carril 2). En los carriles 3 al 6 se corrieron los productos de la restricción enzimática de los plásmidos de las colonias 1, 2, 7 y 10, de las cuatro reacciones se desprendió un fragmento de 1055 pb, lo que confirma la ligación de la secuencia de la proteína NS1 de DENV-2 con el plásmido de expresión recombinante.

Adicionalmente se realizó un análisis por restricción enzimática del ADN de 4 extractos de plásmido recombinante pPROEX HTb- NS1 DENV-2 positivos por PCR para presentar el inserto de interés (**Fig 23 .a**). Los productos de la digestión de los plásmidos con las enzimas *BamHI* y *XhoI* se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et). Dos bandas se observan, una banda de aproximadamente 4703 pb y otra banda de 1055 pb, tamaños correspondientes al plásmido de expresión linearizado y a la secuencia de la proteína NS1 de DENV-2 flanqueada por los sitios *BamHI* y *XhoI*, respectivamente (**Fig.23. b**). La extracción de una banda de 1055 pb por acción de las enzimas demuestra que las colonias de las que se obtuvieron los plásmidos presentan el plásmido de expresión ligado a la secuencia de interés, y pueden expresar la proteína recombinante NS1 de DENV-2 fusionada a una bandera de histidinas.

9.3.3 Análisis de las secuencias de plásmidos recombinantes pPROEX HTb- NS1 DENV-2 extraídos de colonias transformadas

Para confirmar la identidad del inserto ligado en el plásmido de expresión que se extrajo de los plásmidos de las colonias transformadas nombradas 1, 2, 7 y 10, se enviaron muestras de ADN para su secuenciación, al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad. CINVESTAV-IRAPUATO.

El ADN de los plásmidos de la colonia 1 (50,11 µg/mL concentración de ADNdc) y de la colonia 10 (253,07 µg/mL concentración de ADNdc) no arrojó ningún resultado de secuenciación, posiblemente a una baja concentración de ADN ó a impurezas en la muestra. La secuencia del ADN de la colonia 2 (245,15 µg/mL) y de la colonia 7 (238,45 µg/mL) se muestra en la **Figura 24**. De la colonia 2 dirección 5' (sentido) se reconocieron 328 pb, y 471 pb en dirección 3' (antisentido), de un total de 1055 pb de la secuencia codificadora de la proteína NS1 DENV-2. Y de la colonia 7 se reconocieron 405 pb en sentido dirección 5' (sen) y 495 pb en antisentido dirección 3' (ase).

El análisis de alineamiento de pares de bases entre las secuencias en antisentido y antisentido (datos no mostrados) de los plásmidos de las colonias 2 y 7 se realizó con el software en línea Biology WorkBench 3.2 ⁽¹²⁷⁾. Ambas secuencias de ADN comparten 469 pares de bases en un mismo ordenamiento mostrando una identidad del 100%, indicando que ambas presentan el mismo inserto de interés (**Fig.25**).

```

a) >CLONA_2_D2nslsen_pPROEX_Hi
---GGCAGTGGGATTTTCATCACAGACAACGTGCACACATGGACAGAACAATACAAGTTCCAACCAGAAT
CCCCTTCAAACCTAGCTTCAGCTATCCAGAAAGCCCATGAAGAGGGCATTGTGGAATCCGCTCAGTAAC
AAGACTGGAGAATCTGATGTGGAACAAATAACACCAGAATTGAATCACATTCTATCAGAAAATGAGGTG
AAGTTAACTATTATGACAGGAGACATCAAAGGAATCATGCAGGCAGGAAAACGATCTCTGCGGCCTCAGC
CCACTGAGCTGAAGTATTTCATGGAAAACATGGGGCAAAGCAAATGCTCT-----

b) >CLONA_2_D2nslase_pPROEX_Hi
-----AACTCATGTCAGCGGCCATAAAAGACAACAGAGCCGTCATGCCGATATGGGT
TATTGGATAKAAAGTACACTCAATGACACATGGAAGATAGAKAAAGCCTCTTTCATTGAAGTTAAAAACT
GCCACTGGCCAAAATCACACACCCTCTGGAGCAATGGAGTGCTATAAAGTGAGATGATAATTCCAAAGAA
TCTCGCTGGACCAGTGTCTCAACACAATATAGACCAGGCTACCATACACAAAATAACAGGACCATGGCAT
CTAGGTAAGCTTGAGATGGACTTTGATTTCTGTGATGGAACAACAGTGGTAGTACTGAGGACTGCGGAA
ATAGAGGACCCTCTTTGAGAACAACCACTGCCTCTGGAACAACTATAACAGAATGGTGCTGCCGATCTTG
CACATTACCACCGCTAAGATACAGAGGTGAGGATGGGTGCTGGTACGGGATGGAATCAGACCATGAA--

c) >CLONA_7_D2nslsen_pPROEX_Hi
TGTGGCAGTGGGATTTTCATCACAGACAACGTGCACACATGGACAGAACAATACAAGTTCCAACCAGAAT
CCCCTTCAAACCTAGCTTCAGCTATCCAGAAAGCCCATGAAGAGGGCATTGTGGAATCCGCTCAGTAAC
AAGACTGGAGAATCTGATGTGGAACAAATAACACCAGAATTGAATCACATTCTATCAGAAAATGAGGTG
AAGTTAACTATTATGACAGGAGACATCAAAGGAATCATGCAGGCAGGAAAACGATCTCTGCGGCCTCAGC
CCACTGAGCTGAAGTATTTCATGGAAAACATGGGGCAAAGMAAAATGCTCTATAACAGAGTCTCATAACCT
GACCTTTCTCATTGAAGGCCCGAAACATCAGAATGCCCAACACAAATAGAGCT

d) >CLONA_7_D2nslase_pPROEX_Hi
TGTATTCTGTGACTCAAAACTCATGTCAGCGGCCATAAAAGACAACAGAGCCGTCATGCCGATATGGGT
TATTGGATASAAAGTGCACTCAATGACACATGGAAGATAGATAAAGCCTCTTTCATTGAAGTTAAAAACT
GCCACTGGCCAAAATCACACACCCTCTGGAGCAATGGAGTGCTATAAAGTGAGATGATAATTCCAAAGAA
TCTCGCTGGACCAGTGTCTCAACACAATATAGACCAGGCTACCATACACAAAATAACAGGACCATGGCAT
CTAGGTAAGCTTGAGATGGACTTTGATTTCTGTGATGGAACAACAGTGGTAGTACTGAGGACTGCGGAA
ATAGAGGACCCTCTTTGAGAACAACCACTGCCTCTGGAACAACTATAACAGAATGGTGCTGCCGATCTTG
CACATTACCACCGCTAAGATACAGAGGTGAGGATGGGTGCTGGTACGGGATGGAATCAGACCATGAAGG
AGAAA

```

Fig 24 Secuencia del plásmido extraído de la colonia 2 (CLONA_2) y 7 (CLONA_7) transformadas con el plásmido de expresión pP ROEX HTb- NS1 DE NV-2. a) Secuencia de ADN en dirección 5' del ADN del plásmido de la colonia 2 y b) Secuencia de ADN en dirección 3' (antisentido) del mismo plásmido 2. c) secuencia de ADN en dirección 5' del ADN del plásmido de la colonia 7 y d) Secuencia de ADN en dirección 3' (antisentido) del mismo plásmido 7. Los oligonucleótidos iniciadoras de la proteína NS1 de DENV-2 y los oligonucleótidos iniciadores Universales, en sentido y antisentido se requirieron para identificar las secuencias de ácidos nucleicos del ADN de los plásmidos problema.

La secuencia codificadora de la proteína NS1 se ubica entre las bases 2422 y 3477 dentro del genoma de DENV-2 16681, conociendo este dato, se confirmó la identidad del inserto cuando se analizó el alineamiento entre la secuencia en antisentido del plásmido de la colonia 2 contra la secuencia del genoma del virus dengue (**Fig.26**). El empalme entre ambas secuencias se da a partir de la base 2966 y hasta la base 3437, lo que indica que la secuencia ligada en el plásmido de expresión, extraído de las colonias 2 y 7, codifica para la proteína no estructural 1 (NS1) del virus dengue.

```

CLONA: 7_D2nslase, pPROEX Hib, CD,
CLONA: 2_D2nslase, pPROEX Hib, CD,
CLUSTALW - Nucleic Alignment, 495 bp
Ambiguous characters

STDIN  MSF: 495  Type: N                               Check: 0000 ..

Name: CLONA__7_D2nsl1a  Len:   495  Check: 0000  Weight: 1.00
Name: CLONA__2_D2nsl1a  Len:   471  Check: 0000  Weight: 1.00
//
CLONA__7_D2nsl1a  TGTATTCTGT  GACTCAAAAC  TCATGTCAGC  GGCCATAAAA  GACAACAGAG
CLONA__2_D2nsl1a  -----AAC  TCATGTCAGC  GGCCATAAAA  GACAACAGAG

CLONA__7_D2nsl1a  CCGTCCATGC  CGATATGGGT  TATTGGATAS  AAAGTGCAC  CAATGACACA
CLONA__2_D2nsl1a  CCGTCCATGC  CGATATGGGT  TATTGGATAK  AAAGTACAC  CAATGACACA

CLONA__7_D2nsl1a  TGGAAGATAG  ATAAAGCCTC  TTTTCATTGAA  GTTAAAAACT  GCCACTGGCC
CLONA__2_D2nsl1a  TGGAAGATAG  AKAAAGCCTC  TTTTCATTGAA  GTTAAAAACT  GCCACTGGCC

CLONA__7_D2nsl1a  AAAATCACAC  ACCCTCTGGA  GCAATGGAGT  GCTATAAAGT  GAGATGATAA
CLONA__2_D2nsl1a  AAAATCACAC  ACCCTCTGGA  GCAATGGAGT  GCTATAAAGT  GAGATGATAA

CLONA__7_D2nsl1a  TTCCAAAGAA  TCTCGCTGGA  CCAGTGTCTC  AACACAAC  TAGACCAGGC
CLONA__2_D2nsl1a  TTCCAAAGAA  TCTCGCTGGA  CCAGTGTCTC  AACACAAC  TAGACCAGGC

CLONA__7_D2nsl1a  TACCATACAC  AAATAACAGG  ACCATGGCAT  CTAGGTAAGC  TTGAGATGGA
CLONA__2_D2nsl1a  TACCATACAC  AAATAACAGG  ACCATGGCAT  CTAGGTAAGC  TTGAGATGGA

CLONA__7_D2nsl1a  CTTTGATTTC  TGTGATGGAA  CAACAGTGGT  AGTGACTGAG  GACTGCGGAA
CLONA__2_D2nsl1a  CTTTGATTTC  TGTGATGGAA  CAACAGTGGT  AGTGACTGAG  GACTGCGGAA

CLONA__7_D2nsl1a  ATAGAGGACC  CTCTTTGAGA  ACAACCACTG  CCTCTGGAAA  ACTCATAACA
CLONA__2_D2nsl1a  ATAGAGGACC  CTCTTTGAGA  ACAACCACTG  CCTCTGGAAA  ACTCATAACA

CLONA__7_D2nsl1a  GAATGGTGCT  GCCGATCTTG  CACATTACCA  CCGCTAAGAT  ACAGAGGTGA
CLONA__2_D2nsl1a  GAATGGTGCT  GCCGATCTTG  CACATTACCA  CCGCTAAGAT  ACAGAGGTGA

CLONA__7_D2nsl1a  GGATGGGTGC  TGGTACGGGA  TGGAAATCAG  ACCATGAAGG  AGAAA
CLONA__2_D2nsl1a  GGATGGGTGC  TGGTACGGGA  TGGAAATCAG  ACCATGAA--  -----

```

Fig.25. A análisis d el alineamiento con el software en línea Biology WorkBench 3.2 de l a s e cuencias en antisentido del ADN del plásmido recombinante de las colonias 2(CLONA_2) y de la colonia 7 (CLONA_7). Los plásmidos de ADN de ambas colonias comparten 469 pb de un alineamiento de 471 pb, tal acoplamiento refleja una cercana similitud entre secuencias.

Adicionalmente se analizó el alineamiento entre la secuencia teórica del plásmido de expresión recombinante pProEx HTb- NS1 DENV-2 (**Fig.27**) y la secuencia en sentido del plásmido de la colonia 7, corroborando una vez más la semejanza entre las bases nucleotídicas para ambas entidades.

```

CLONA: 2_D2nslase, pPROEX Hib, C,
      Dengue 2 16681 ALIGN - Nucleic Alignment, 10723 bp
ALIGN calculates a global alignment of two sequences
  version 2.0>Please cite: Myers and Miller, CABIOS (1989) 4:11-17
CLONA: 2_D2nslase, pPROEX_Hib, CD                      471 nt vs.
Dengue_2_16681                                         10723 nt
scoring matrix: DNA, gap penalties: -16/-4
4.4% identity;                                         Global alignment score: -38713

>CLONA_2_D2nslase_pPROEX_Hi
-----AACTCATGTCAGCGGCCATAAAAAGACAACAGAGCCGTCATGCCGATATGGGT
TATTGGATAKAAAGTACTCAATGACACATGGAAGATAGAKAAAGCCTCTTTCATTGAAGTTAAAAACT
GCCACTGGCCAAAATCACACACCCCTCTGGAGCAATGGAGTGCTATAAAGTGAGATGATAATCCAAAGAA
TCTCGCTGGACCAGTGTCTCAACACAACATATAGACCAGGCTACCATACACAAATAACAGGACCATGGCAT
CTAGTAAGCTTGAGATGGACTTTGATTTCTGTGATGGAACAACAGTGGTAGTACTGAGGACTGCGGAA
ATAGAGGACCCTCTTTGAGAACAACCACTGCCTCTGGAAAACCTATAACAGAATGGTGCTGCCGATCTTG
CACATTACCACCGCTAAGATACAGAGGTGAGGATGGGTGCTGTTACGGGATGGAATCAGACCATGAA--

CLONA: 2_D2n -----ACTCATGTCAGCGGCCATAAAAAGACAACAGAGCC
Dengue_2_166 AAACAGGATGTATTCTGCGACTCAAACACTCATGTCAGCGGCCATAAAAAGACAACAGAGCC
                2950      2960      2970      2980      2990      3000

CLONA: 2_D2n      40      50      60      70      80      90
Dengue_2_166 GTCCATGCCGATATGGGTTATTGGATAKAAAGTACTCAATGACACATGGAAGATAGAK
                3010      3020      3030      3040      3050      3060

CLONA: 2_D2n      100     110     120     130     140     150
Dengue_2_166 AAAGCCTCTTTCATTGAAGTTAAAAACTGCCACTGGCCAAAATCACACACCCCTCTGGAGC
                3070     3080     3090     3100     3110     3120

CLONA: 2_D2n      160     170     180     190     200     210
Dengue_2_166 AATGGAGTGCTATAAAGTGAGATGATAATCCAAAGAATCTCGCTGGACCAGTGTCTCAA
                3130     3140     3150     3160     3170     3180

CLONA: 2_D2n      220     230     240     250     260     270
Dengue_2_166 CACAACATAGACCAGGCTACCATACACAAATAACAGGACCATGGCATCTAGGTAAGCTT
                3190     3200     3210     3220     3230     3240

CLONA: 2_D2n      280     290     300     310     320     330
Dengue_2_166 GAGATGGACTTTGATTTCTGTGATGGAACAACAGTGGTAGTACTGAGGACTGCGGAAAT
                3250     3260     3270     3280     3290     3300

CLONA: 2_D2n      340     350     360     370     380     390
Dengue_2_166 AGAGGACCCTCTTTGAGAACAACCACTGCCTCTGGAAAACCTATAACAGAATGGTGCTGC
                3310     3320     3330     3340     3350     3360

CLONA: 2_D2n      400     410     420     430     440     450
Dengue_2_166 CGATCTTGACATTACCACCGCTAAGATACAGAGGTGAGGATGGGTGCTGGTACGGGATG
                3370     3380     3390     3400     3410     3420

CLONA: 2_D2n      460     470
Dengue_2_166 GAAATCAGACCAT-GAA-----
                3430     3440     3450     3460     3470     3480

```

Fig.26 Análisis del alineamiento con el software en línea Biology WorkBench 3.2 de la secuencia en antisentido del plásmido de la colonia 2 transformada con el plásmido de expresión pPROEX HTb- NS1 DENV-2 con el genoma de DENV-2 16681, que a partir de la base 2966 y hasta la base 3437 presenta un empalme, lo que indica la similitud y correspondencia del inserto con la secuencia de la proteína viral de interés.

```

CLONA: 7_D2ns1sen, pPROEX Hib, CD,
Proex B-NS1....Teorica
CLUSTALW - Nucleic Alignment, 1147 bp
>CLONA_7_D2ns1sen_pPROEX_Hi
TGTGGCAGTGGGATTTTCATCACAGACAACGTGCACACATGGACAGAACAATACAAGTTCCAACCAGAAT
CCCCTTCAAAACTAGCTTCAGCTATCCAGAAAAGCCCATGAAGAGGGGCATTTGTGGAATCCGCTCAGTAAC
AAGACTGGAGAATCTGATGTGGAACAAATAACACCAGAATTGAATCACATTCTATCAGAAAATGAGGTG
AAGTTAACTATTATGACAGGAGACATCAAAGGAATCATGCAGGCAGGAAAACGATCTCTGCGGCCCTCAGC
CCACTGAGCTGAAGTATTTCATGGAAAACATGGGGCAAAGMAAAATGCTCTATACAGAGTCTCATAACCT
GACCTTCTCATTGAAGGCCCCGAAAACATCAGAATGCCCAACACAAATAGAGCT

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  ATGTCGTACT ACCATCACCA TCACCATCAC GATTACGATA TCCAACGAC

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  CGAAAACCTG TATTTTCAGG GCGCCATGGG ATCCGATAGT GTTTGCCTTG

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  TGAGCTGGAA AAACAAAGAA CTGAAATGTG GCAGTGGGAT TTTCATCACA

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  GACAACGTGC ACACATGGAC AGAACAATAC AAGTTCCAAC CAGAATCCCC

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  TTCAAAACTA GCTTCAGCTA TCCAGAAAAGC CCATGAAGAG GGCATTTGTG

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  GAATCCGCTC AGTAAACAAGA CTGGAGAATC TGATGTGGAA ACAAATAACA

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  CCAGAATTGA ATCACATTCT ATCAGAAAAT GAGGTGAAGT TAACTATTAT

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  GACAGGAGAC ATCAAAGGAA TCATGCAGGC AGGAAAACGA TCTCTGCGGC

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  CTCAGCCAC TGAGCTGAAG TATTCATGGA AAACATGGGG CAAAGMAAAA

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  ATGCTCTATA CAGAGTCTCA TAACCTGACC TTTCTCATTG AAGGCCCGA

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  AACATCAGAA TGCCCAACA CAAATAGAGC T-----

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  AAGACTATGG CTTTGGAGTA TTCACCACCA ATATATGGCT AAAATTGAAA

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  GAAAAACAGG ATGTATTCTG CACTCATAAA CTCATGTGAG CGGCCATAAA

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  AGACAACAGA GCCGTCCATG CCGATATGGG TTATTGGATA GAAAGTGAC

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  TCAATGACAC ATGGAAGATA GAGAAAGCCT CTTCATTGA AGTTAAAAAC

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  TGCCACTGGC CAAAATCACA CACCCTCTGG AGCAATGGAG TGCTAGAAAG

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  TGAGATGATA ATTCCAAGA ATCTCGCTGG ACCAGTGCTT CAACACAAC

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  ATAGACCAGG CTACCATACA CAAATAACAG GACCATGGCA TCTAGGTAAG

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  CTTGAGATGG ACTTTGATTT CTGTGATGGA ACAACAGTGG TAGTGACTGA

CLONA__7_D2ns1s  -----
Proex_B-NS1....  GGACTGCGGA AATAGAGGAC CCTCTTTGAG AACAACCACT GCCTCTGGAA

```

Fig.27 Análisis del alineamiento con el software Biology WorkBench 3.2, de acceso público en línea, de la secuencia en sentido del plásmido de la colonia 7 transformada con el plásmido de expresión pPROEX HTb- NS1 DENV-2 contra la secuencia del genoma teórico de la construcción del plásmido de expresión ligado a la secuencia de la proteína NS1 de DENV-2. Resaltado en negro se encuentran en el sentido 5' las bases nucleotídicas que codifican para la bandera de histidinas. Los oligonucleótidos iniciadores para secuenciamiento sólo reconocieron parte de la secuencia de la proteína NS1 por lo que no se percibe la secuencia del plásmido que codifica para la bandera de histidinas.

9.4. Inducción de la expresión de la proteína recombinante en bacterias *E. coli DH5α* transformadas con el plásmido de expresión recombinante

Dos diferentes condiciones de temperatura y diferentes concentraciones de inductor fueron probadas para determinar las condiciones que permiten producir la proteína recombinante soluble, ya que altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* pueden resultar en la formación de agregados insolubles llamados cuerpos de inclusión. Si la proteína de interés se acumula en citoplasma en estas estructuras sub-celulares es frecuente que biológicamente sea inactiva debido a un plegamiento incorrecto.

La visualización de las proteínas producidas durante las inducciones utilizando geles de poliacrilamida, en combinación con un ensayo de western blot, proporcionó una ventaja para analizar, en una pequeña escala, la eficiencia en la expresión además de proporcionar información sobre la degradación de la proteína de interés.

Para realizar la expresión de proteínas recombinantes se utilizaron bacterias que asimilaron la construcción del plásmido de expresión pPROEX HTb- NS1 DENV-2, y por tanto mostraron en el análisis de los productos de PCR amplicones de 1068 pb, correspondientes al inserto de la proteína NS1 de DENV-2. Se realizó una inducción a 37°C con 1 mM de IPTG incubados por 3 hrs, de cultivos de 6 diferentes colonias de bacterias transformadas y una colonia no transformada que no expresaba la proteína recombinante (control negativo), los extractos crudos (no lisados) con las proteínas totales se corrieron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 10% teñido con azul de Coomassie, para analizar el patrón de bandas de las proteínas separadas.

Se detectó la presencia de bandas de proteínas con un tamaño, intensidad y distribución diferente, en los extractos correspondientes a los cultivos de las colonias transformadas 2 y 10 (**Fig.28**, carril 4 y 8), en comparación con el patrón de bandas de proteínas presentes en el control negativo (bacterias *DH5α* competentes no transformadas), lo que indicó que se estaban sintetizando en las colonias transformadas con el plásmido pPROEX HTb- NS1 DENV-2 proteínas diferentes a las expresadas habitualmente por las bacterias *E. coli*. Sin embargo aunque el patrón de proteínas observado entre las fracciones, sobrenadante y pastilla fue diferente, en ningún caso se detectó la banda esperada correspondiente al peso de 45 KDa que sugiriera la presencia de la proteína recombinante.

**Selección de las colonias que sintetizan la proteína NS1 recombinante
(40 KDa) a 37 °C**

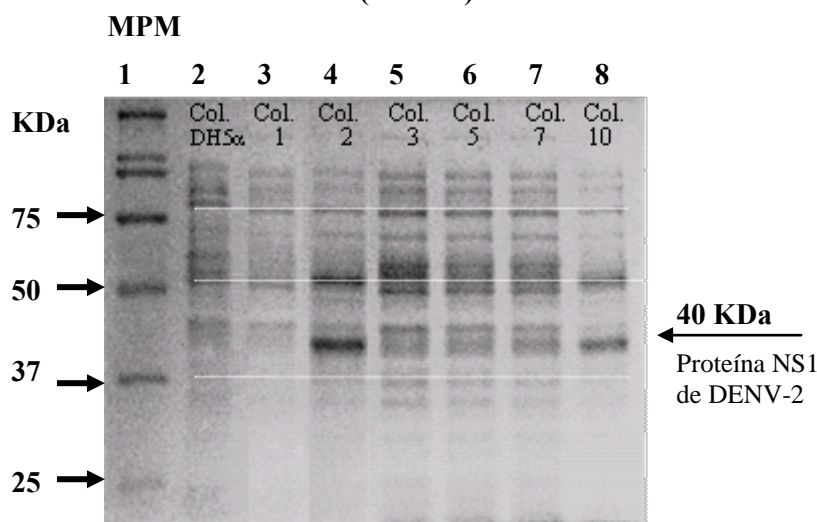


Fig. 28. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% de las **proteínas totales de cultivos de bacterias transformadas con el plásmido de expresión pPROEX HTb- NS1 DENV-2**. Carril 1 Marcador de peso molecular (MPM), el valor de referencia en KDa correspondiente a cada banda se aprecia a la izquierda. En el carril 2 se muestra el patrón de bandas de proteínas del extracto crudo con proteínas totales (no lisado) de bacterias no transformadas (control negativo). En los carriles 3, 4, 5, 6, 7 y 8 se corrió extracto crudo con las proteínas totales del cultivo de las colonias 1, 2, 3, 5, 7 y 10 según corresponde, las cuales fueron inducidas con 1 mM de IPTG por 3 hrs a una temperatura de 37°C.

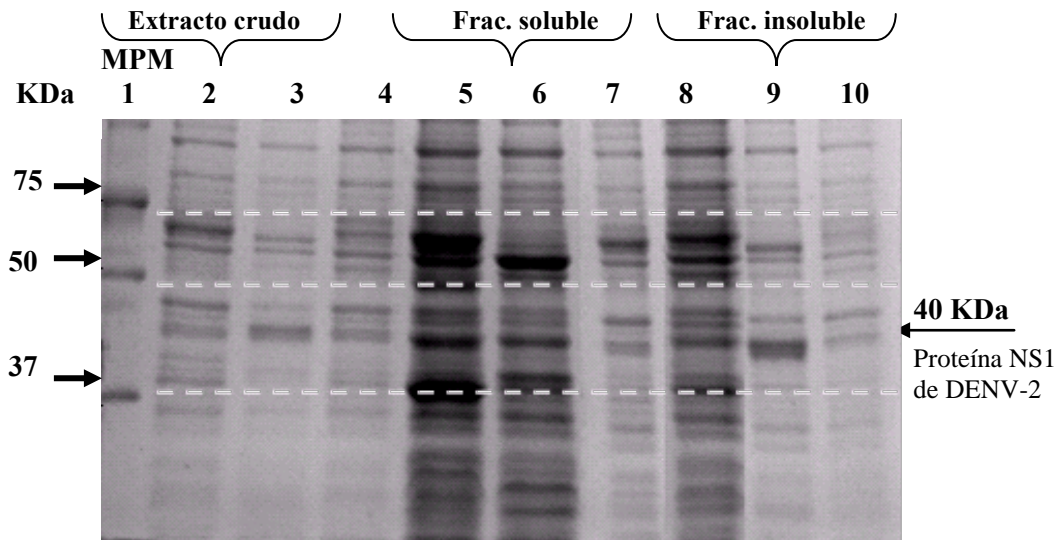
Resulta difícil visualizar las proteínas que son expresadas en cantidades mínimas por la técnica de tinción con azul de Coomassie (el cual se asocia con aminoácidos de arginina y aminoácidos con anillos aromáticos) por tal razón se realizó un ensayo de western blot (manchado en placa) el cual se fundamenta en el reconocimiento específico entre un antígeno de proteína y un anticuerpo acoplado a un reactivo como la enzima peroxidasa; la reacción entre la peroxidasa y un sustrato de peróxido libera energía en forma de luz que quema una placa fotográfica. Sólo si el antígeno de interés está presente se forma el complejo con la peroxidasa y se produce la reacción que libera la luz.

Para establecer si se encontraba en forma soluble o insoluble la proteína NS1, se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la proteína NS1 (Cortesía de la Dra. Leticia Cedillo, CINVESTAV) al realizar el ensayo de western blot. Las bacterias de la colonia 2 se propagaron en 100 mL de medio con antibiótico de restricción y se indujeron con 1 mM de IPTG para expresar los genes de interés. El extracto crudo del cultivo con las proteínas totales se sonicó con amortiguador de lisis de sonicación para romper la membrana de las células y liberar el contenido del citosol, posteriormente el cultivo lisado se centrifugó a 13000 rpm para separar la fracción soluble (sobrenadante con proteínas solubles) de la fracción insoluble (botón con proteínas asociadas o embebidas en estructuras celulares). Dos geles de

poliacrilamida al 10% se cargaron con las fracciones soluble e insoluble del cultivo inducido, cultivo de bacterias no inducidas y cultivo de bacterias *DH5α* competentes (control negativo).

Proteínas presentes en la fracción soluble e insoluble de lisados de bacterias *DH5α* (control negativo), bacterias inducidas y no inducidas

a) Electroforesis en gel de acrilamida al 10%. Inducción 37°C. 1 mM. Col. 2



Proteína NS1 recombinante detectada por western blot con anti-His₆ en la fracción insoluble de lisados de bacterias

b)

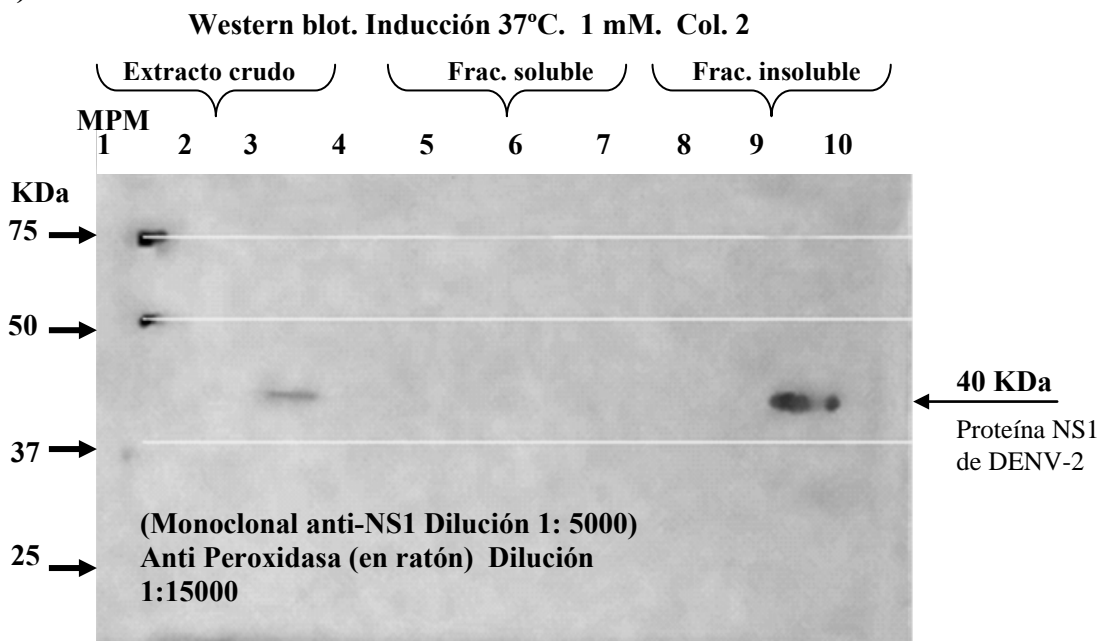


Fig.29. Análisis por electroforesis en gel de acrilamida al 10% y simultáneo ensayo de western blot (Monoclonal anti-NS1 dilución 1:5000) de la inducción de la colonia 2 con 1 mM de IPTG en incubación a 37 °C por 3 hrs. El marcador de peso molecular se ubica en el primer carril en ambas figuras. a) Análisis por electroforesis en gel de acrilamida al 10%. En el carril 2 se corrió el extracto del cultivo crudo sin procesar de una colonia de bacterias no transformadas. El extracto de cultivo con proteínas totales de la colonia inducida se localiza en el carril 3. Ubicado en el carril 4 se encuentra el extracto de cultivo con proteínas totales de la colonia no inducida. Los sobrenadantes con las proteínas solubles de los cultivos de las colonias de bacterias *DH5α*, del cultivo de la col. 2 inducida y del cultivo de la colonia 2 no inducida se corrieron en los carriles 5, 6 y 7 respectivamente. También se corrieron las proteínas totales contenidas en la pastilla de las muestras de cultivo; de la colonia de bacterias *DH5α* (carril 8), del cultivo de la col.2 inducida (carril 9) y del cultivo de la colonia 2 no inducida (carril 10). b) En la placa fotográfica del ensayo de western blot utilizando un monoclonal Anti-NS1 se observa que el anticuerpo interacciona con una proteína de 40 KDa de la muestra del extracto crudo del cultivo de la colonia 2 y con las proteínas insolubles totales del cultivo de la col.2 inducida.

En la **Figura 29.a** en el carril 6 y 9 se aprecia que efectivamente se efectúa la expresión de varias proteínas en el cultivo de bacterias transformadas, entre ellas la proteína de interés, que se acumulan principalmente en forma de insolubles agregados. En el análisis del revelado de la placa fotográfica del western blot utilizando el anticuerpo monoclonal contra la proteína NS1, se observó la formación de una mancha de la altura de 40 KDa sólo en las áreas correspondientes a las muestras del extracto crudo (**Fig.29. b carril.3**) y la fracción insoluble del cultivo de bacterias transformadas e inducidas (**Fig.29. b carril.9**), lo que sugiere que la proteína recombinante NS1 a 37 °C se acumula en cuerpos de inclusión.

Los resultados de la inducción a 37°C confirmaron que el gen insertado dentro del plásmido vector expresó la proteína NS1 aunque con un peso menor al esperado, por lo que el paso siguiente fue realizar una inducción a una temperatura menor a 20°C, en la cual se favorece la formación de enlaces que intervienen en el plegamiento de las proteínas, reduciendo su acumulación en forma de cuerpos de inclusión

Se probaron 3 concentraciones (0,1 mM; 0,5 mM y 0,8 mM) de IPTG para establecer la concentración mínima adecuada en la que se apreciara la expresión de proteínas al realizar la inducción a 16°C de un cultivo de la colonia 2. Las muestras de cada cultivo se procesaron para separar las proteínas totales por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10%. Al analizar el patrón de bandas formadas se notó una similitud entre la concentración de las proteínas producidas en el cultivo control, el cultivo no inducido y los cultivos inducidos con diferentes concentraciones de IPTG (datos no mostrados). Considerando tal efecto se eligió utilizar la concentración intermedia de 0,5 mM para efectuar la inducción a gran escala.

Para confirmar la expresión en forma soluble de la proteína de interés se procesó el extracto crudo del cultivo de una colonia transformada con el plásmido recombinante, que fue inducida con una temperatura de 16°C y 0,5 mM de inductor. El extracto de cultivo crudo con las proteínas totales se concentró por centrifugación (6000 rpm) en una pastilla celular la cual se sonicó con amortiguador de lisis.

La fracción soluble (sobrenadante) se separó de la fracción insoluble (pastilla) al centrifugar a 13000 rpm el lisado de las bacterias. Las proteínas totales correspondientes

a cada fracción fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%, y se tiñeron con azul de Coomassie para su análisis. El patrón de bandas observado en los extractos crudos del cultivo inducido y no inducido (Fig. 30 carriles 3 y 4) presentó las mismas proteínas expresadas en igual proporción, efecto que se repitió en la fracción soluble. En cambio en la fracción insoluble se expresaron en mayor cantidad 3 proteínas, una proteína con un peso de 60 KDa, una proteína de 40 KDa y una de 38 KDa (Fig.30. carril 9 y 10).

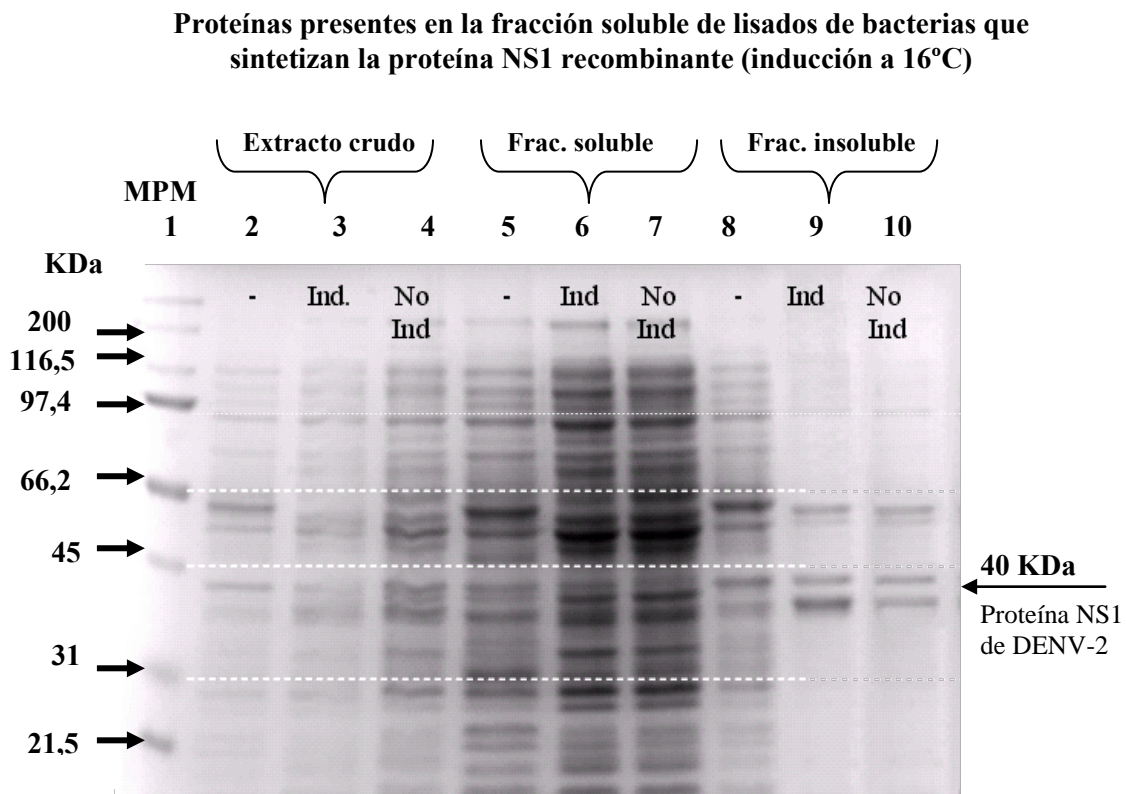


Fig.30.- Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie en donde se muestra las proteínas solubles e insolubles producidas en la inducción a 16°C con 0,5 mM de IPTG de una colonia transformada con el plásmido de expresión. El marcador de peso de proteínas se ubica en el carril 1(MPM); En los carriles 2, 3 y 4 se corrieron el extracto crudo de cultivo con las proteínas totales, de cultivo de bacterias *DH5α* (control negativo), de la colonia 2 inducida y de la colonia 2 no inducida, en el orden mencionado. Las fracciones con las proteínas solubles de los cultivos probados; cultivo control, cultivo inducido y cultivo no inducido se cargo en los carriles 5, 6 y 7, según corresponde. En los carriles 8, 9 y 10 se corrieron fracciones con las proteínas insolubles de los cultivos probados, cultivo control, cultivo inducido y cultivo no inducido.

Al disminuir la temperatura se reduce la velocidad y el tiempo en que se realiza la síntesis de las proteínas recombinantes pero también se incrementa el plegamiento, por tal motivo al no observar en la fracción soluble una banda con el peso de la proteína de interés, se procedió a realizar un ensayo de western blot utilizando un anticuerpo contra la bandera de histidinas (anti His₆) (Fig. 31). Para realizar el ensayo de western blot se utilizaron muestras de extracto crudo de una colonia inducida y la fracción soluble e insoluble del lisado correspondiente. En la muestra del extracto crudo de la colonia transformada que fue

inducida, el anticuerpo anti histidinas reconoció una proteína de aproximadamente 40 KDa, en la fracción soluble del mismo cultivo se reconocieron 2 bandas una de 40 KDa y otra de 35 KDa (**Fig.31.** carril 6), en tanto que en la fracción insoluble se observó solo una banda de 40 KDa. La proteína de 35 KDa podría ser una forma degradada de la proteína de interés, lo que indicaría que esta en su forma soluble tiende a degradarse rápidamente.

**Proteína NS1 recombinante detectada por western blot con anti-His6
en la fracción soluble de lisados de bacterias**

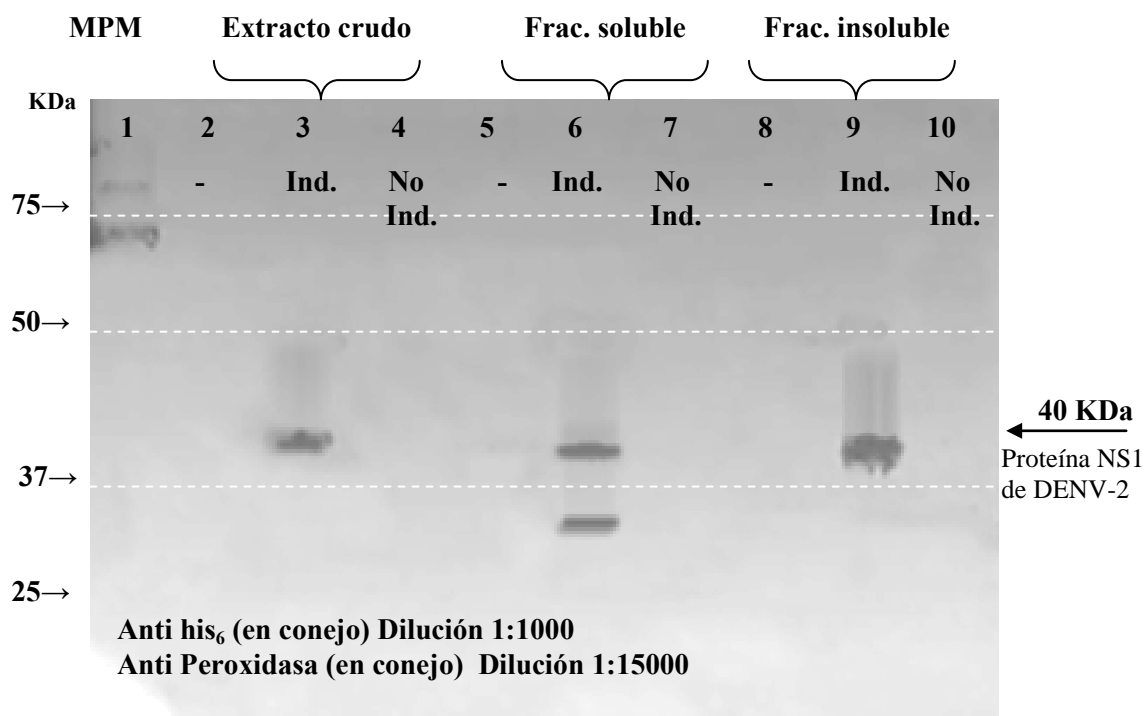


Fig 31. Análisis de la placa fotográfica con las impresiones de un **western blot** para reconocer la proteína recombinante, fusionada a la bandera de histidinas, en un lisado en el que se separaron las proteínas totales solubles e insolubles de una colonia de bacterias transformadas con el plásmido pPROEX HTb- NS1 DENV-2 inducidas con 0,5 mM de IPTG a 16°C por 24 hrs. Carril 1 MPM con los pesos de referencia. Carril 2. Extracto crudo con las proteínas totales de bacterias no transformadas. Carril 3. Extracto crudo de cultivo de bacterias transformadas inducidas, con las proteínas totales. Carril 4. Extracto crudo de cultivo de bacterias transformadas no inducidas, con las proteínas totales. Fracción con proteínas solubles totales de bacterias no transformadas (carril 5), de cultivo de bacterias transformadas inducidas. (carril 6) y de bacterias transformadas no inducidas (carril 7). Fracción con proteínas totales insolubles de bacterias no transformadas (carril 8), de cultivo de bacterias transformadas inducidas. (carril 9) y de bacterias transformadas no inducidas (carril 10).

Los resultados de los experimentos de western blot realizados con anticuerpo dirigido contra la bandera de histidinas, así como con los anticuerpos dirigidos contra la proteína NS1 analizados en conjunto indican que efectivamente las bacterias transformadas con el plásmido pPROEX HTb- NS1 DENV-2 están expresando la proteína NS1 fusionada a una bandera de 6 histidinas; y que además dicha proteína cuya producción es inducida a 16°C es expresada en forma soluble, no obstante esta principalmente es más estable en la fracción insoluble de los extractos de bacterias. Con estos resultados se procedió a intentar la purificación parcial de la proteína recombinante soluble por cromatografía de afinidad.

9.5 Purificación de la proteína recombinante NS1 de DENV-2 por cromatografía de afinidad.

Recuperar con la mayor pureza posible la proteína recombinante NS1 de DENV-2 para su posterior utilización en la producción de anticuerpos específicos en ratones o también después de una repurificación para ensayos en cultivos celulares e incluso en la elaboración de herramientas de diagnóstico.

Diferentes métodos son utilizados para enriquecer o purificar una proteína de interés de entre varias proteínas y componentes contenidos en el lisado de células u otro tipo de muestra. Uno de los métodos más efectivos es la purificación por afinidad también llamado cromatografía de afinidad, donde la proteína de interés es purificada tomando como ventaja sus propiedades de unión específica hacia un ligando inmovilizado. Se aprovechan las interacciones específicas entre dos moléculas para la purificación de una molécula específica.

Para facilitar la purificación de la proteína NS1 se recurrió a la clonación de su secuencia codificadora dentro del plásmido de expresión pPROEx HTb. Este plásmido se caracteriza por que en el extremo amino terminal de su sitio de clonación múltiple presenta una secuencia de 6 histidinas, de tal manera que se obtiene una proteína fusionada a la bandera adicionada. La presencia del anillo de imidazol que forma parte del aminoácido histidina presenta gran afinidad por la estructura de níquel de la resina de Ni-NTA, por lo que es factible separar la proteína de interés casi por completo del resto de las proteínas que la bacteria sintetiza continuamente. Sin embargo este sistema tiene una limitación en cuanto a que formas degradadas de la proteína recombinante y proteínas no deseadas pueden ser co-purificadas si exponen el anillo de imidazol.

Dado que la proteína recombinante en forma soluble es producida en menor proporción comparada con la cantidad de proteína acumulada en cuerpos de inclusión se efectuó una inducción a gran escala. Para evitar la posibilidad que durante el almacenamiento prolongado de las colonias se generara una mutación en el genoma de las bacterias o el rechazo del plásmido de expresión recombinante, se realizó una nueva transformación con el plásmido de expresión para la proteína NS1. Como control de la eficiencia en la asimilación del plásmido recombinante, se realizó a la par un cultivo con bacterias no transformadas.

En el medio sólido donde se sembraron las bacterias no transformadas no se observó colonias en tanto que en la caja donde se sembraron las bacterias transformadas se desarrollaron más de 1000 colonias (datos no mostrados). Se seleccionaron 7 colonias al azar, para probar por PCR colony la presencia de la secuencia de la proteína NS1, De las cuales 5 colonias presentaron el inserto de interés. De las cuales solo una colonia fue seleccionada (**Fig.32**) para realizar la inducción a gran escala.

**Amplicones de la secuencia codificadora de la proteína NS1 obtenido por PCR
colony de colonias con el plásmido de expresión recombinante**

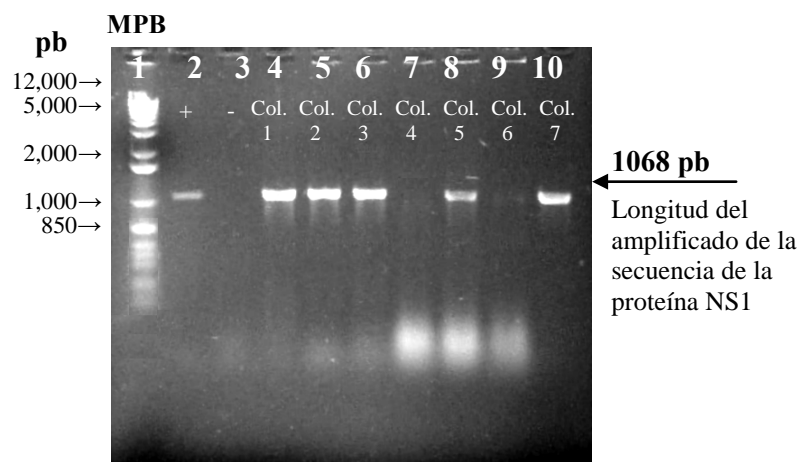


Fig .32.- Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Br-Et) de la **amplificación por PCR de las colonias transformadas con el plásmido de expresión pCR® 2.1 TOPO® - NS1 DENV-2** de una colonia que expresa la proteína recombinante NS1. El marcador de ADN 1Kb (MPB) se ubica en el primer carril. En el carril 2 no se observan bandas en el carril del control negativo (H₂O). A partir del carril 3 y hasta el 9 se corrieron las reacciones de PCR de las colonias 1 a 7. Las colonias cuyo plásmido de expresión está ligado a la secuencia de la proteína NS1 presentaron el amplificado de 1068 pb. Las colonias 4 y 6 no amplificaron alguna banda lo que indicando que no expresaran la secuencia de la proteína viral.

La colonia seleccionada se propagó en 250 mL de medio LB-antibiótico ampicilina (100 µg/mL) para que aumentara el número de bacterias durante toda la noche. Con este cultivo se siguió el protocolo de inducción a 16°C para obtener la fracción con las proteínas totales solubles (Anexo B).

El sobrenadante con la fracción que contenía las proteínas solubles se mezcló con 2 mL de la resina-Ni-NTA (previamente activada con solución amortiguadora de lisis 1 hr a 4°C) y se incubó por 24 hrs a 4°C en agitación. Finalizada la incubación se centrifugó a 4500 rpm el complejo resina-proteínas, sólo las proteínas que interaccionaron quedaron adheridas a la resina (**Fig 33 . carril 3**). Enseguida se realizaron lavados (5000 rpm) del complejo de la resina-proteínas con solución amortiguadora A sin imidazol, en el primer lavado disminuye la cantidad de proteínas

inespecíficas por lo que en el segundo lavado se observa una menor cantidad de proteínas eliminadas (Fig. 33 carril 4 y 5).

Purificación por cromatografía de afinidad con Ni-NTA de la proteína NS1 recombinante contenida en la fracción soluble de lisados de bacterias

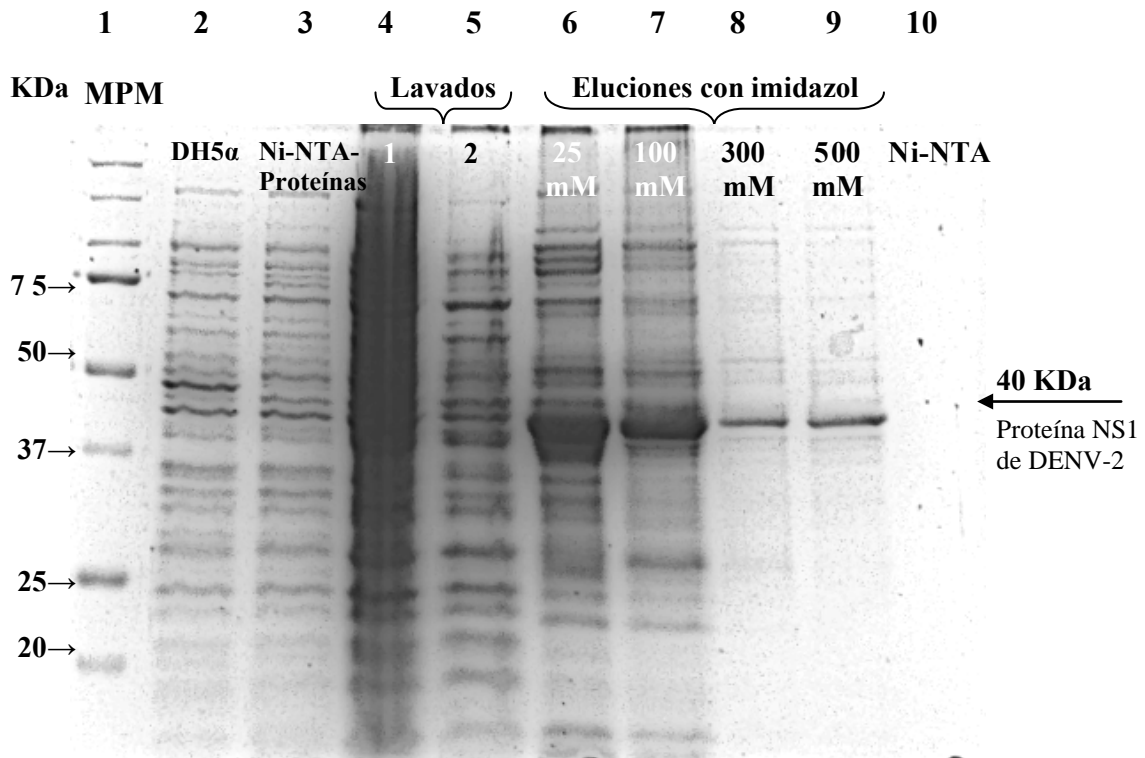


Fig. 33. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie en donde se muestra la purificación de la proteína recombinante NS1 producida por una colonia transformada con el plásmido de expresión al ser inducida con 0,5 mM de IPTG a 16°C. El marcador de peso molecular se corrió en el primer carril. En el carril 2 se ubicó el extracto de cultivo crudo donde se observan las proteínas producidas constitutivamente por la cepa de bacterias DH5α. En el carril 3 se encuentran las proteínas solubles totales del cultivo inducido que interaccionaron con la resina Ni-NTA. Carril 4, sobrenadante del primer lavado sin imidazol del complejo resina Ni-NTA- proteína NS1 (7 µl). Carril 5, sobrenadante del segundo lavado sin imidazol del complejo resina Ni-NTA- proteína. Carril 6 al 9 sobrenadante (30 µl) de la elución de la proteína NS1 con 25 mM, 100 mM, 300 mM y 500 mM de imidazol, según corresponde. Carril 10. Como control negativo de la presencia de proteínas contaminantes en la resina o en la solución amortiguadora de lisis se corrió 5 µl de resina Ni-NTA activada.

Después se realizaron lavados con imidazol debido a que compite con la histidina para unirse con el níquel, en este paso la mayoría de las proteínas no deseadas se separaron de la resina ya que su interacción no es tan fuerte como la generada por los 6 residuos continuos de histidina de la bandera fusionada a la proteína recombinante. Al lavar con la solución amortiguadora A con una concentración de imidazol 25 mM, se desprendieron más proteínas inespecíficas y se comenzó a concentrar una proteína con un peso de 40 KDa, lo que hizo suponer el enriquecimiento de la proteína de interés (Fig 33. carril 6). Sin embargo la purificación no es total y además al eluir utilizando concentraciones cada vez superiores de imidazol se aumenta la pureza de la proteína pero disminuye su cantidad (Fig. 33. carril 8 y 9). Debido a que el imidazol se une a cationes

divalentes compitiendo por el sitio de unión con el níquel las proteínas recombinantes con truncadas banderas de histidinas son eluidas junto con otras proteínas.

Elusión de la proteína NS1 recombinante con diferentes concentraciones de imidazol detectada por western blot con anti-His₆ en la fracción soluble de lisados de bacterias

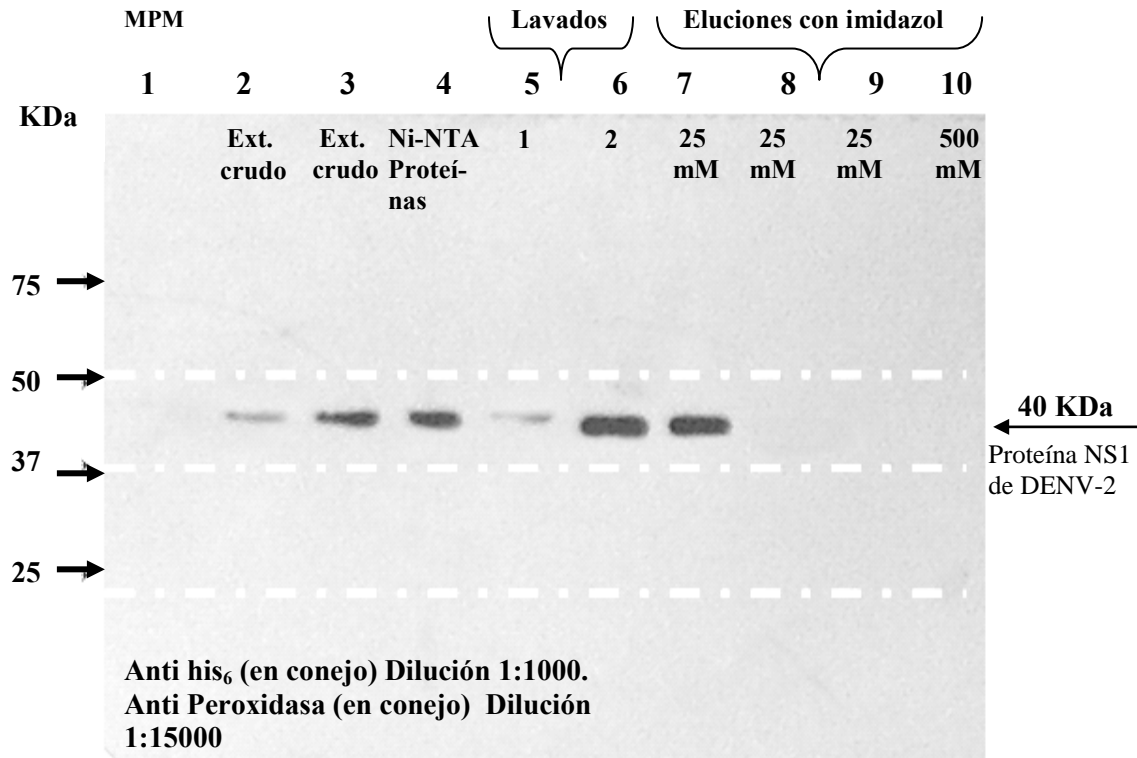


Fig 34.-Análisis de la placa fotográfica con las impresiones de un **western blot** para **reconocer la proteína recombinante NS1 fusionada a la bandera de histidinas, purificada de las proteínas totales solubles** de una colonia de bacterias transformadas con el plásmido pPROEX HTb- NS1 DENV-2 inducidas con 0,5 mM de IPTG a 16°C por 24 hrs (almacenada a 1 semana a -20°C). Carril 1 marcador de peso molecular (MPM). Controles positivos, cultivos de bacterias que expresan la proteína recombinante con la bandera de 6 histidinas (carril 2 y 3). En el carril 4 se corrieron las proteínas solubles totales del cultivo inducido que interaccionaron con la resina Ni-NTA. Carril 5 y 6, sobrenadante del primer y segundo lavado sin midazol del complejo resina Ni-NTA- proteína NS1 (15 µl). Carriles 7 al 9 sobrenadante (50 µl) de la elución de la proteína NS1 con 25 mM de imidazol. Carril 10, sobrenadante (50 µl) de la elución de la proteína NS1 con 500 mM de imidazol.

Posteriormente se realizó un ensayo de western blot utilizando un anticuerpo comercial que reconoce específicamente la bandera de 6 para probar la identidad de la proteína purificada por afinidad con Ni-NTA. En el ensayo se incluyó una serie de eluciones realizadas en un orden similar al de las muestras analizadas por electroforesis en gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie de la Fig 33. La proteína de los controles positivos, extractos crudos de cultivos de bacterias transformadas con el plásmido de expresión pPROEX HTb- NS1 DENV-2, e inducidos con 0,5 mM de IPTG a 16°C, fue reconocida por el anticuerpo anti His₆ confirmando su especificidad por la bandera de histidinas de la proteína de interés (Fig. 34. carril 2 y 3). La marca formada de la

interacción de las muestras de los cultivos positivos para expresar una proteína fusionada a histidinas, se repite en los carriles donde se corrieron sobrenadantes de los lavados y eluciones obtenidos de la purificación de la fracción soluble de los cultivos transformados inducidos. Sugiriendo que la proteína de 40 KDa cuya expresión es promovida por el plásmido de expresión pPROEX HTb- NS1 DENV-2, es la misma que interaccionó con la resina de Ni-NTA y que a su vez se localiza en los sobrenadantes de los eluidos de la purificación.

En el proceso de purificación la presencia de la proteína recombinante se detecta hasta la primera elución de 3 lavados con imidazol a una concentración de 25 mM (**Fig 34. carril 7**). La extinción en la marca indica que en los tres lavados con 25 mM de imidazol se despega totalmente la proteína de interés. Además la intensidad de las marcas presentes en los carriles correspondientes a los lavados previos sugiere que la solución amortiguadora A utilizada extrae prematuramente la proteína recombinante.

Las fracciones eluidas con 25 mM se almacenaron a -20°C para evitar la rápida degradación, ya que se observó que el almacenamiento de hasta 1 semana a 4°C favorece la aparición de la forma degradada de 32 KDa detectada por western blot (datos no mostrados), por lo que es conveniente utilizar lo antes posible la proteína recombinante o en su defecto realizar una nueva inducción y purificación antes de cada ensayo.

10. DISCUSIÓN

La incidencia de la infección por el virus de dengue se ha incrementado en áreas tropicales y subtropicales, principalmente a causa de la expansión geográfica del mosquito vector, *Aedes aegypti*, convirtiendo a la fiebre por dengue en una enfermedad urbana endémica y epidémica ⁽⁹⁵⁾. Los esfuerzos para contener el avance del agente transmisor han sido rebasados por lo que se han sumado nuevas estrategias, tales como el desarrollo e implemento de sistemas de diagnóstico temprano y elaboración de vacunas.

La proteína no estructural 1 (NS1) es uno de los primeros productos del procesamiento postraduccional de la poliproteína codificada por el virus, sobre sus funciones se conoce poco, no obstante resultados de varios ensayos experimentales sugieren que está involucrada en la replicación del ARN viral ⁽²⁵⁾. Además cabe destacar que se ha reportado que elevados niveles de la proteína NS1 correlacionan con riesgo aumentado para el desarrollo de fiebre hemorrágica por dengue y del Síndrome de Shock por Dengue ⁽⁵³⁾. Finalmente, como la proteína NS1 circula a altos niveles en el suero de pacientes durante la fase aguda de la infección, se ha convertido en un blanco de mucho interés principalmente para el diagnóstico del dengue.

Para obtener grandes cantidades de antígeno varias han sido las metodologías y sistemas utilizados. Huang y colaboradores clonaron la proteína NS1 de la cepa DEN2 PL046 en el plasmido pET21, y la expresaron en bacterias BL21 (DE3), la proteína completa (44 kDa) y por separado el extremo N-Terminal (24 KDa) y el extremo C-Terminal (28 KDa), con la finalidad de utilizarla en el diagnóstico para detectar anticuerpos IgG e IgM específicos ⁽⁹⁶⁾. Chang y colaboradores ⁽⁹⁷⁾, también expresaron la proteína en bacterias obteniéndola de forma insoluble en cuerpos de inclusión al incubar a 37°C por 3 hrs con 1 mM de IPTG. Con el antígeno obtenido al realizar subsecuentes ensayos con suero de pacientes infectados con dengue, demostraron la interacción entre la proteína NS1 de Dengue 2, recuperada de cuerpos de inclusión, y los amino ácidos arginina, glicina y ácido aspártico (RGD), un importante motivo para el reconocimiento de integrinas que media la adhesión celular, sugiriendo un mimetismo molecular entre ambas proteínas, destacando que se ha reportado que se ha altos niveles de anti-RDG en pacientes con dengue, podría perturbar los sistemas de coagulación.

En otro estudio, Dipankar y colaboradores⁽⁹⁸⁾, realizaron la expresión de la proteína NS1 de DENV-1, reportando una producción de 250 mg/L de la proteína extraída de cuerpos de inclusión. Por su parte Ananda-Rao y colaboradores produjeron una combinación de los epitopos altamente inmunogénicos de la proteína NS1 y la proteína E, y producir así una proteína con epitopos de ambos antígenos. Expresada en bacterias *DH5α* y fusionada a una cola de histidinas esta proteína recombinante (3,7 mg por 250 mL de cultivo) mostró ser reconocida específicamente por anticuerpos presentes en sueros de pacientes, y por lo tanto efectiva como antígeno para diagnóstico⁽⁹⁹⁾.

Mientras que Chang y colaboradores⁽¹⁰⁰⁾, a fin de obtener una proteína recombinante NS1 glicosilada (con residuos de azúcar manosa necesarios para su asociación con membranas y para su liberación fuera de la célula), tal como es secretada de células de mamífero infectadas con el virus dengue, para este fin utilizaron como vector de expresión un baculovirus para después infectar cultivos de células de insecto Sf9. A una alta densidad celular (23×10^6 células/mL.) adicionando la hormona 20-hidroxiecdisona, aumentando y renovando la cantidad de vitaminas, lípidos y otros elementos traza, obtuvieron un rendimiento de 20 µg/mL de proteína.

También en busca de un eficiente sistema que expresara la proteína en forma glicosilada, Zhou y colaboradores⁽¹⁰¹⁾ expresaron la proteína NS1 en células de la levadura *Pichia pastoris*. Después de una incubación con metanol por 72 hrs, lograron un rendimiento máximo de 70 mg/L. En tanto que Noisakran y colaboradores⁽¹⁰²⁾ expresaron la proteína NS1 en la línea celular de mamífero 293T (epiteliales de riñón de embrión humano), lo cual le permitió estudiar los mecanismos y requerimientos para la asociación de la proteína NS1 con la membrana plasmática de la célula. Concluyeron que la presencia de la región amino terminal de la proteína NS2A es necesaria para que NS1 se asocie a la membrana plasmática, posiblemente a través de un lípido tipo fosfatidil-inositol (GPI).

La detección de la proteína NS1 en sueros de pacientes proporciona varias ventajas pues al presentarse en el suero de pacientes a altas concentraciones durante todo el ciclo de infección del virus y principalmente en los primeros días, es factible su uso en el diagnóstico del dengue con un sistema de ensayos tipo ELISA, los cuales son relativamente sencillos. El diagnóstico temprano del dengue ofrece al médico tratante la

oportunidad de tomar prontas medidas hospitalarias requeridas para evitar las complicaciones del dengue y que pueden propician la muerte del paciente.

En contraste otras pruebas de diagnóstico basadas en la detección de anticuerpos, como el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI), fijación del complemento (CF) y la prueba de reducción de placas (PRNT) por dengue requieren entrenamiento especial y no están diseñados para un uso masivo. Además, la producción del antígeno es laboriosa ya que se obtiene de extractos de cerebro de ratón infectados o cultivos celulares y la calidad en los lotes varía ^(65, 103). Actualmente existen ensayos de ELISA comerciales para la detección de IgG e IgM específica para dengue. La detección de IgM se utiliza para el diagnóstico temprano de dengue, pero presenta el problema de que los niveles de IgM no se hacen detectables sino a partir del día 5-7 después de iniciados los síntomas. Por lo cual la prueba puede resultar en un falso negativo si el suero es tomado antes de los 5 días ^(54,55).

Resalta la importancia de la proteína NS1 en el ciclo de propagación de los virus del género flavivirus en el ensamblado del complejo de la replicasa viral ⁽⁴³⁾, en el diagnóstico y en la respuesta inmune como antígeno con reacción cruzada con el huésped, cuyas funciones e interacciones asociadas al desarrollo de las formas severas de la infección por dengue deben ser aclaradas. Ello con la finalidad de ofrecer una alternativa en el desarrollo de antivirales terapéuticos, vacunas y en nuevos sistemas de diagnóstico de la infección.

10.1 Construcción del plásmido de clonación y de expresión recombinantes

Para lograr una alta producción de la proteína recombinante utilizando un método sencillo y barato se requirió la utilización de bacterias. La regulación de la expresión en procariontes y eucariontes difiere en pocos aspectos, sin embargo para expresar proteínas recombinantes en bacterias es imprescindible la clonación de la secuencia de interés en un vector que posea las secuencias reguladoras y los promotores utilizados por las células procariontes ⁽¹⁰⁴⁾.

A diferencia de la incorporación del gen en el plásmido de clonación (vector de clonación), el proceso de ligación en el plásmido de expresión (vector de expresión)

requirió más pasos y un mayor número de ensayos, hasta conseguir una reacción donde estuviera insertado el gen de interés. En el análisis de la reacción de las primeras ligaciones se observó una serie de bandas de ADN de diferentes tamaños, una de las cuales presentaba aproximadamente el tamaño teórico calculado para el plásmido unido a la secuencia de interés, este efecto se debió posiblemente a causa de una disminuida actividad de la enzima encargada de la ligación.

Entre los factores que afectaron la actividad de la enzima T4 ligasa se consideró una inconsistencia de la temperatura de reacción, ya que se realizó una incubación a temperatura ambiente, siendo que la óptima actividad se alcanza a 37°C. Otra posible causa se relaciona con una alterada afinidad de unión entre la proteína y el sustrato (paso 1), en la adaptación de los pasos del mecanismo de ligación, incluyendo la transferencia del grupo adenilato de la proteína hacia el ácido nucleico (paso 2) ó en el momento de sellado en la cadena de ADN (paso 3), efecto asociado a una variación en la concentración de Mg^{2+} o ATP requeridos para la actividad de la enzima ⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁶⁾.

Pero también en la reacción de ligación se pudo dar una competencia entre los extremos adhesivos, si la reacción de restricción fue incompleta y se generaron productos del plásmido pPROEx HTb simplemente linearizados debido al corte con una sola enzima. En tal situación la enzima T4 ligasa unió los extremos adhesivos en dos combinaciones, acoplamiento entre los extremos adhesivos del gen de interés y los extremos del plásmido cortado con dos enzimas y, reunión de los extremos del plásmido cortado con una enzima. Esta última reacción resulta más eficiente que la primera.

Si el evento de recircularización del plásmido sin inserto fue favorecido sobre la ligación del inserto, se explica el bajo rendimiento en la reacción de ligación producto de una sobreestimación de la cantidad del plásmido de expresión digerido por las dos enzimas diferentes, que debió presentar ambos extremos disponibles para la unión con el gen a clonar.

Por lo que una solución fue aumentar la cantidad de inserto para propiciar el encuentro y unión entre el inserto de interés, el plásmido con los extremos adecuados y la enzima de ligación. De tal manera que la obtención de un mayor número de colonias de bacterias transformadas con el plásmido ligado al inserto esta directamente relacionado

con la cantidad de inserto y plásmido cortado presente en la reacción de ligación. No obstante si hay un exceso de cualquier reactivo o sustrato la reacción de ligación se inhibe o vuelve inespecífica. Por lo que al realizar procedimientos cuyos productos se requieren como sustrato o reactivos en subsecuentes reacciones es imprescindible conocer con certeza su concentración, pues subestimaciones o sobreestimaciones afectan la eficiencia esperada⁽¹⁰⁷⁾.

Antes de realizar una inducción de la expresión de la proteína a gran escala se realizó una serie de inducciones en pequeños volúmenes (5 y 10 mL) para identificar la colonia que expresara la proteína viral NS1. Los primeros análisis hechos por electroforesis en gel de acrilamida mostraron en los extractos crudos de cultivos de bacterias inducidas a varias proteínas localizadas a 50, 40 y 28 KDa (datos no mostrados) que sin embargo no correspondían con el tamaño de la proteína NS1 (45 KDa) por lo que se realizó una nueva ligación. Además, plásmidos de 4 colonias a los que se realizó PCR y restricción enzimática con *BamHI* y *XhoI*, que mostraron la banda de 1055 pb, fueron enviados a secuenciación a fin de corroborar la identidad del inserto.

Con asesoramiento se comprobó con el software en línea Biology WorkBench 3.2., que la homología entre las secuencias de los plásmidos era cercana, las secuencias empalmaban con las bases nucleotídicas de la proteína NS1 del DENV-2. Adicionalmente al realizar un western blot, donde un anticuerpo anti-NS1 reconoció una proteína de 40 KDa, se corroboró que el marco de lectura dentro del plásmido de expresión efectivamente codificaba para la proteína de interés. Todos estos resultados tomados en conjunto indican que efectivamente se tenía clonada y expresada la proteína NS1 de dengue, pero que tal vez sus niveles de expresión no fuesen lo suficientemente altos como para ser identificada en un gel de acrilamida

10.2 Expresión y purificación de la proteína recombinante NS1 de DENV-2

La literatura describe un número de métodos para la redirección de proteínas de cuerpos de inclusión hacia la fracción soluble citoplasmática. Estos métodos se dividen generalmente en procedimientos donde la proteína es replegada desde los cuerpos de inclusión y procedimientos donde la estrategia de expresión es modificada para la expresión de forma soluble⁽¹⁰⁸⁾.

Las condiciones de expresión utilizadas por varios investigadores para inducir la proteína NS1, en donde utilizan promotores fuertes, elevadas concentraciones de inductor a una temperatura de 37 °C, producen estrés en el sistema procarionte por lo que la proteína tiende a acumularse como cuerpos de inclusión. Entre los obstáculos que implica la agregación de las proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión, se encuentra el bajo rendimiento de recuperación de la producción después de los procesos tradicionales de resolubilización, los requerimientos para optimizar las condiciones de repliegamiento para cada proteína específica y la posibilidad de que en los procedimientos se vea afectada la integridad de las proteínas, debido a que es posible no se recupere la conformación tridimensional nativa. Todo ello hace que sea deseable expresar la proteína de interés en condiciones que eviten que la misma vaya a cuerpos de inclusión ⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾.

No obstante la proteína NS1 obtenida a partir de cuerpos de inclusión es capaz de producir anticuerpos en ratones que reconocen al proteína nativa ⁽⁹⁸⁾, lo que sugiere que los epitopos que reconocen quizá son de tipo lineal (secuencia). En cuanto a la producción de la proteína NS1 en la fracción soluble en *Escherichia coli*, esta no es frecuente, pero evitar la resolubilización haría más eficiente la obtención de grandes cantidades de antígeno.

Una estrategia para dirigir la expresión de los genes y producir una proteína recombinante en forma soluble, consiste en reducir la temperatura de inducción, ya que se conoce que la reacción de agregación es en general favorecida a altas temperaturas en consecuencia de la fuerte dependencia de las interacciones hidrofóbicas con la temperatura ⁽¹⁰⁹⁾. En la producción de proteínas tales como interferón α -2 humano, luciferasa bacteriana, fragmentos Fab y β -lactamasa, difíciles de obtener en forma soluble, ha resultado eficaz cultivar a bajas temperaturas ⁽¹¹⁰⁾.

El rango de temperatura sugerido para la inducción de proteínas en *E. coli* oscila entre los 20 y 37°C, ya que a temperaturas mayores se activan varios genes para contrarrestar el estrés celular y disminuir la síntesis de proteínas ^(111, 112). En los ensayos preliminares realizados se probaron varias temperaturas de inducción, 37, 30, 25 y 16 °C (datos no mostrados). Se seleccionó la última temperatura debido a que en el análisis por electroforesis en geles de las proteínas totales de los extractos crudos se observó una

disminución en la cantidad de bandas pertenecientes a proteínas co-inducidas, cuyos tamaños no correspondían al de la proteína viral (45 KDa).

Debido a la dificultad en la detección de las proteínas de interés, en los extractos crudos mediante análisis por electroforesis en geles de acrilamida teñidos con azul de Coomassie, se llevó a cabo la lisis celular y la separación de fracciones de los cultivos inducidos, para tratar por separado la fracción soluble, y constatar la presencia de la proteína recombinante por inmunoblot.

Al disminuir la temperatura se observó por análisis de western blot, que la proteína recombinante aun se acumulaba en cuerpos de inclusión, pero que a la vez también se presentaba en la fracción soluble de los lisados de cultivos inducidos. Utilizando un anticuerpo monoclonal anti NS1 y un anticuerpo anti histidinas (His₆) en un ensayo de western blot se evidenció la aparición, en la fracción soluble, de una proteína de aproximadamente 40 KDa correspondiente a NS1, y además una proteína de 32 KDa, que muy posiblemente y debido a su tamaño, corresponde a un fragmento proteolítico de NS1, similar al reportado por Huang⁽⁹⁶⁾.

Al utilizar sistemas procarióticos para la expresión de la proteína cabe esperar la producción de la proteína NS1 en forma monomérica, ya que las proteínas presentes en el citoplasma en *E. coli* están en forma reducida y no forman uniones disulfuro⁽¹¹³⁾. La formación de dímeros de NS1 requiere la estabilización de su estructura de monómero por uniones disulfuro. Esta habilidad para formar uniones disulfuro intramoleculares, particularmente en el extremo carboxi-terminal, parece ser crucial en la formación del dímero y en el subsecuente tráfico y secreción fuera de la célula⁽¹¹⁴⁾. La producción en la proteína NS1 en su forma dimérica (80 KDa) se ha logrado en sistemas de levaduras como *Pichia pastoris* en virtud de la capacidad que posee para realizar modificaciones postraduccionales tales como glicosilación, formación de uniones disulfuro y procesamiento proteolítico y por tanto puede expresar la glicoproteína de forma similar en la que el virus es liberado de las células de mamífero infectadas^(115, 116). Además, en células eucariontes la deglicosilación en el sitio ASN-207 es un factor que afecta la estabilidad y secreción de la forma dimérica⁽²⁷⁾, lo cual también hace esperar que general en células procariontes se obtenga la forma monomérica de 40 a 45 KDa.

La clonación en el plásmido de expresión pPROEx HTb, permitió disponer de la proteína fusionada a una bandera de 6 histidinas en su extremo amino terminal. Esta bandera facilitó la identificación al permitir el uso, en los ensayos de western blot, de anticuerpos comerciales anti 6X-His, para la localización de la proteína, y para adecuar las condiciones de inducción que posibilitaran la obtención de la proteína en forma soluble. Además la fusión con esta bandera fue determinante para poder purificar la proteína recombinante.

La interacción entre los iones de níquel (acoplados a una resina) y las histidinas presentes en la bandera, no depende de una estructura terciaria, sino de la interacción con el anillo de imidazol de las histidinas. Es por ello que la resina puede también interaccionar inespecíficamente con proteínas que presenten varios aminoácidos con estos anillos. En consecuencia, la purificación de proteínas utilizando el sistema de afinidad níquel e histidinas no es siempre tan eficiente, y generalmente resulta en la presencia de algunas otras proteínas contaminantes, aunque si en un gran enriquecimiento de la proteína de interés.

Al realizar los lavados de la resina Ni-NTA-proteína para la elusión de NS1 recombinante se observó en un análisis de gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie, que una gran cantidad de proteínas eran despegadas, sin embargo no se concentraba la banda de 40 KDa esperada. Subsecuentemente al eluir con imidazol (25 a 500 mM) se percibió una secuencial disminución en el número de bandas y a la vez la aparición de una banda ancha correspondiente a la proteína de interés. El mayor enriquecimiento de la banda correspondiente a la proteína de interés se observó con una elusión de 25 mM, por tal razón se repitió la purificación, en la que se realizaron solo 3 lavados con 25 mM de imidazol.

Las proteínas de los sobrenadantes obtenidos se analizaron por gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie y por ensayo de western blot con un anticuerpo anti histidinas. En el gel de acrilamida se apreció que la concentración de proteína no aumentó pero si disminuyó la cantidad de contaminantes, en tanto que en el western blot los anticuerpos detectaron hasta el segundo lavado con 25 mM la proteína con la bandera de histidinas, sugiriendo que la afinidad de las soluciones amortiguadoras de lavado y elusión por las proteínas contaminantes y la proteína de interés era similar, por lo que

esta última era fácilmente desprendida de la matriz de níquel, efecto acentuado si el método de lavado fue muy riguroso.

Como alternativas para disminuir la inespecificidad de la interacción entre las proteínas contaminantes y la matriz de Ni-NTA se recomienda la utilización de una solución amortiguadora de lisis que contenga 10 mM de imidazol además de reducir el pH de esta solución. Sin embargo no se descartan otros factores que pudieron afectar la interacción, tal como la concentración de Tris en la solución amortiguadora ya que la presencia de reactivos con estructura secundaria o terciaria pueden reducir la interacción con los iones níquel, o la baja concentración de NaCl (300 mM) el cual a mayor cantidad previene las interacciones iónicas. Dada la naturaleza de cada proteína, el pH óptimo, la concentración de imidazol y otros reactivos para los lavados debe ser determinado empíricamente ⁽⁵⁸⁾.

Finalmente la información sobre la degradación de la proteína es revelada cuando se desnaturalizan y analizan en ensayos de western blot. Estos ensayos revelaron con muestras almacenadas hasta por 2 semanas, una disminución en la intensidad de las bandas de proteínas correspondientes a la proteína íntegra y a su vez la aparición de bandas de proteínas con menor tamaño a 40 KDa, lo que indica la alta tendencia a la degradación del monómero recombinante, propiciado principalmente por el cambio de temperatura al descongelar y congelar, y al efecto de las proteasas durante la lisis celular ^(96, 100).

Por el método de cromatografía de afinidad aunque no se logró una purificación absoluta de la proteína de interés, se logró alcanzar un grado de pureza aceptable que permite el uso de la proteína como antígeno inductor de anticuerpos (inmunógeno) y que además facilitará la purificación por otros métodos que posteriormente pudieran aplicarse.

11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La incompleta información que se tiene sobre las funciones de las 3 formas de la proteína NS1 y la intrigante cuestión sobre su elevada concentración en suero de pacientes que desarrollan las forma severas de la fiebre por dengue, concentra el interés por producir la proteína en diversos sistemas celulares, con la finalidad de disponer de gran cantidad del antígeno para diversos estudios. Del presente trabajo experimental desarrollado para producir la proteína recombinante NS1 de forma soluble en bacterias *E. coli* (DH5 α), se concluyó lo siguiente:

1. La secuencia que codifican para la proteína NS1 de DENV-2 se clonó en el plásmido de clonación pCR[®] 2.1 TOPO[®] y posteriormente se subclonó en el plásmido de expresión pPROEX HTb, en este último el secuenciamiento del plásmido recombinante confirmó la naturaleza del gen de la proteína NS1.
2. En *Escherichia coli* la expresión de la proteína recombinante NS1 soluble se logró al realizar una inducción a temperaturas menores de 20°C y al reducir la concentración de inductor.
3. Por el método de cromatografía de afinidad con resinas de níquel se obtuvo una purificación parcial de la proteína de interés. Ello hace necesario recurrir a métodos complementarios de purificación en caso de requerirse la proteína con un mayor grado de pureza.
4. Es necesario para maximizar la producción y recuperación de la proteína recombinante NS1 soluble, expresada en bacterias, precisar en la metodología condiciones mas adecuadas para evitar la degradación de la proteína.

Existen estudios que sugieren una función para la proteína NS1 como parte del complejo de replicación viral. Por otra parte, los anticuerpos producidos en el paciente contra esta proteína generan reactividad cruzada con elementos del complemento y células del endotelio y se han señalado como causantes algunos de los daños que sufren los pacientes con fiebre hemorrágica por dengue. Sin embargo aún queda mucho por explorar de las múltiples funciones en que esta implicada esta proteína.

Considerando que se dispone de la proteína NS1 soluble de DENV-2, expresada en un sistema procarionte, se hace posible la realización de varios experimentos y ensayos, es así que las perspectivas contempladas son las siguientes:

1. Utilizar la proteína recombinante NS1 soluble de DENV-2 para la generación de sueros hiperinmunes específicos en ratón y conejo.
2. Evaluar la sensibilidad y especificidad de sueros hiperinmunes producidos contra la proteína NS1, y con los anticuerpos producidos elaborar un sistema de diagnóstico ELISA (inmunoensayo enzimático) para la detección de la proteína NS1 en sueros de pacientes.
3. Evaluar el efecto de la proteína sobre funciones celulares, replicación viral y factores de transcripción, modificación de estructuras, y activación o inhibición de vías de señalización.

12. ANEXO A: SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

12.1 Electroforesis en geles de agarosa

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TBE 10X (1000 mL)

Tris base (Invitrogen)	108,0 g
Ácido bórico.	55,0 g
EDTA	9,3 g
H ₂ O desionizada destilada	Aforar hasta 1000 mL

Almacenar a temperatura ambiente

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE MUESTRA DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA GELES DE AGAROSA 5X

Glicerol.(MERCK)	2,5 mL
TBE 10X	12,5 mL
SDS 10%	2,5 mL
Azul de Bromofenol	25,0 mg
Xilen xianol.	25,0 mg

Almacenar a temperatura ambiente.

12.2 Preparación de células competentes

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TFB1 (100 mL)

RbCl (SIGMA [®])	100 mM	1,2092 g
2H ₂ O• MnCl ₂	50 mM	0,8092 g
Acetato de potasio CH ₃ COOK (SIGMA [®])	30 mM	0,2944 g
CaCl ₂ (MERCK)	10 mM	0,1109 gr
Glicerol (MERCK)	15%	15,0 ml
H ₂ O desionizada destilada		Aforar hasta 100mL

Ajustar a pH 5,8 con ácido acético.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TFB2 (50mL)

MOPS	10 mM	0,1045 gr
RbCl (SIGMA [®])	10 mM	0,0605 gr
CaCl ₂ (MERCK)	75 mM	0,4162 gr
Glicerol (MERCK)	15%	7,5 ml
H ₂ O desionizada destilada		Aforar hasta de 50 mL

Ajustar a pH a 6,8 con KOH.

Esterilización de las soluciones por filtración y almacenado a 4°C.

12.3 Soluciones de trabajo concentradas de los antibióticos (stocks)

SOLUCIÓN CONCENTRADA DE ANTIBIÓTICO AMPICILINA 100 mg/mL

Ampicilina (SIGMA [®])	100 mg/mL	1,0 g
H ₂ O desionizada destilada		Aforar hasta de 10 mL

Adicionar por goteo NaOH 1N hasta solubilización. Esterilizada por filtración.

Almacenar alícuotas a -20°C, protegidas de la luz hasta su uso.

SOLUCIÓN CONCENTRADA DE ANTIBIÓTICO KANAMICINA 30 mg/mL

Kanamicina	30 mg/mL	0,3g
H ₂ O desionizada destilada		Aforar hasta de 10 mL

Esterilización por filtración. Almacenar alícuotas a -20°C, protegidas de la luz hasta su uso

12.4 Medios nutritivos: medio de cultivo sólido y líquido

MEDIO NUTRITIVO LB EN LÍQUIDO

Medio en polvo LB	25,0g
H ₂ O desionizada destilada	Aforar hasta de 1000 mL

Esterilizado por calor en autoclave 20 min. a 15 libras de presión. Almacenar a 4°C hasta su uso.

MEDIO NUTRITIVO LÍQUIDO LB- KANAMICINA 30 µg/mL

Medio líquido LB Estéril (37°C)	1000 mL
Solución concentrada de kanamicina 30 mg/mL	1,0 ml

MEDIO NUTRITIVO LÍQUIDO LB- AMPICILINA 100 µg/mL

Medio líquido LB Estéril (37°C)	1000 mL
Solución concentrada de ampicilina(SIGMA [®])100 mg/mL	1,0 ml

Nota: De preferencia la preparación del medio líquido –antibiótico se realiza momentos antes de su utilización. El antibiótico se adiciona hasta que el medio nutritivo esta a 37°C ó a temperatura ambiente.

MEDIO NUTRITIVO LB- AGAR- ANTIBIÓTICO EN PLACAS PARA CULTIVO SÓLIDO

MEDIO NUTRITIVO SÓLIDO LB- AGAR- KANAMICINA 30 µg/mL

Medio en polvo LB	25,0g
Agar en polvo	14,0g
H ₂ O desionizada destilada	Aforar hasta 1000 mL
Solución de trabajo de kanamicina 30 mg/mL	1,0 ml

MEDIO NUTRITIVO SÓLIDO LB- AGAR- AMPICILINA 100 µg/mL

Medio en polvo LB	25,0g
Agar en polvo	14,0g
H ₂ O desionizada destilada	Aforar hasta 1000 mL
Solución de trabajo de ampicilina (SIGMA [®])100 mg/mL	1,0 ml

Nota: La esterilización se llevo a cabo por calor en autoclave 20 min. a 15 libras de presión. La adición de la solución de trabajo del antibiótico se realizo hasta que el medio adquirió una temperatura de 37°C. Rápidamente en ambiente estéril se vertió 5 mL del medio nutritivo sólido LB- Agar-Antibiótico en cajas Petri, las cuales se cubrieron hasta que el medio se solidifico. El Almacenado de las cajas es a 4°C, protegidas de la luz hasta su uso.

12.5 Soluciones y medio de cultivo para el proceso de inducción de la proteína recombinante

SOLUCIÓN DE GLUCOSA 2 M (stock)

Glucosa en polvo	79,26 g
H ₂ O desionizada destilada	Aforar hasta 200 ml

Calentar a 30°C el agua para diluir fácilmente. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C.

SOLUCIÓN DE TRABAJO CONCENTRADA DE IPTG 0,5M (stock)

IPTG (Fermentas)	1,19 g
Agua desionizada destilada	Aforar a 10 mL

Separar en alícuotas y almacenar a -20°C. Proteger de la luz.

MEDIO LB EN LÍQUIDO AMPICILINA 100 µg/mL CON GLUCOSA 0,03 M

Medio LB líquido estéril (37°C)	983,0 mL
Solución de trabajo de ampicilina (SIGMA®) 100 mg/mL	1,0ml
Solución de glucosa 2 M	15,0 mL

Preparar en ambiente estéril. Usar en el momento.

MINIINDUCCIÓN

MEDIO DE EXPRESIÓN AMPICILINA 100 µg/mL – DIFERENTES CONCENTRACIONES DE INDUCTOR IPTG

Medio LB líquido Estéril(37°C)	Ampicilina(SIGMA®) 100 mg/mL	IPTG (Fermentas) 0,5M	Concentración Final IPTG
10,0 mL	10,0 µL	10,0	0,5 mM
10,0 mL	10,0 µL	20,0	1,0 mM
10,0 mL	10,0 µL	24,0	1,2mM

Preparar en ambiente estéril. Usar en el momento.

MEDIO DE EXPRESIÓN AMPICILINA 100 µg/mL – INDUCTOR IPTG

Reactivos		Concentración final
Medio LB líquido Estéril(37°C)	998,0 mL	
Ampicilina (SIGMA®)	1,0 mL	100 µg/mL
IPTG (Fermentas)	1,0 mL	0,5 mM

12.6 Extracción y purificación de ADNc plasmidico (minipreparación)

SOLUCIÓN ALCALINA DE LISIS I

Glucosa	50 mM
Tris-HCl (pH 8,0) (Invitrogen)	25 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM
H ₂ O destilada	Volumen 100 mL

Almacenar a 4°C hasta su uso

SOLUCIÓN II

NaOH 10 N	20,0 µL
SDS al 10 %	100,0 µL
H ₂ O destilada	880,0 µL

Preparar minutos antes de su adición

SOLUCIÓN III

Acetato de potasio CH ₃ COOK (SIGMA®)	5 M
Ácido acético glacial	11,5 mL
H ₂ O destilada	28,5 mL

Almacenar a 4°C hasta su uso.

SOLUCIÓN SEPARADORA DE FASES

Fenol/ Cloroformo/ Alcohol isoamilico proporción 25:24: 1

Fenol	250,0 µL
Cloroformo	240,0 µL
Alcohol isoamilico	10,0 µL

Almacenar a 4°C hasta su uso protegido de la luz

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA TE (DE SOLUBILIZACIÓN)

Tris-HCl (Invitrogen)	10 mM
EDTA	1 mM

Ajustar a pH 8,0. Almacenar a temperatura ambiente

12.7 Soluciones usadas en la técnica de electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE)

SOLUCIÓN A

Acrilamida	30,0 g
Bis-acrilamida	0,8 g
H ₂ O destilada	Aforado a 100 mL

Almacenar a 4°C hasta su uso.

SOLUCIÓN B

Tris base (Invitrogen)	12,11 g
H ₂ O destilada	Aforado a 100 mL

Ajustar a pH 8.8. Almacenar hasta su uso a 4°C.

SOLUCIÓN C (SDS 10 % p/v)

SDS 10 % p/v	10 g
H ₂ O destilada	Aforado a 100 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN D

Tris base (Invitrogen)	12,11 g
H ₂ O destilada	Aforado a 100 mL

Ajustar a pH 6.8. Almacenado hasta su uso a 4°C.

SOLUCIÓN DE PERSULFATO DE AMONIO 10%

Persulfato de amonio en polvo (Amersham Biosciences)	0,5 g
H ₂ O destilada	Aforado a 5 mL

Almacenar hasta su uso a 4°C

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PARA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS PARA SDS-PAGE 10X

Glicina (Invitrogen)	144,0 g
Tris base (Invitrogen)	30,0 g
SDS	10,0 g
H ₂ O destilada	Aforar hasta 1000 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CARGA 5X PARA MUESTRAS DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE)

Tris (Invitrogen) (pH 6,8) 500 mM	2,5mL
SDS 10%	4,0 mL
Glicerol (MERCK)	2,0mL
Azul de Bromofenol al 0.8%	0,5mL
β-mercaptoetanol (SIGMA®)	1.0mL
H ₂ O destilada	Aforar hasta un volumen de 10 mL

Almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz.

SOLUCIÓN COLORANTE DE AZUL DE COOMASSIE PARA TEÑIR PROTEÍNAS EN GELES DE ACRILAMIDA

Azul de Coomassie	0,2 g
Metanol absoluto (MERCK)	50,0 mL
Ácido acético glacial	7,0 mL
H ₂ O destilada	Aforar hasta 100 mL

Preparar en campana de extracción. Guardar a temperatura ambiente protegido de la luz.

SOLUCIÓN PARA DESTEÑIR GELES DE ACRILAMIDA TEÑIDOS CON AZUL DE COOMASSIE

Metanol absoluto (MERCK)	40,0mL	40%
Ácido acético glacial	10,0 mL	10%
H ₂ O destilada	Aforar hasta 100 mL	50%

Preparar en campana de extracción. Almacenar a temperatura ambiente.

12.8 Soluciones usadas en la técnica de Western Blot

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA PARA TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS EN SOPORTE SÓLIDO

Tris base (Invitrogen)	5,82 g	
Glicina (Invitrogen)	2,93 g	
Metanol absoluto (MERCK)	100,0 mL	10%
H ₂ O destilada	Aforar hasta 1000 mL	

Preparar en campana de extracción. Almacenar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN SALINA DE FOSTATOS (PBS) 10X

NaH ₂ PO ₄	2,4 g
NaHPO ₄	14,4 g
NaCl cristal (Reproquifin®)	80,0 g
KCl	2,0 g
H ₂ O destilada	Aforar hasta 100 mL

Ajustar el pH a $7,2 \pm 0,2$ con NaOH 1N ó HCl y aforar con H₂O destilada. Esterilizar por calor en autoclave 20 min. A 15 libras de presión. Almacenar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN SALINA DE FOSFATOS 1X CON DETERGENTE NO IÓNICO AL 0,5% (PBS- TRITÓN 0,5%)

PBS 10X	100 mL
Tritón-X100 (SIGMA®)	5 mL
H ₂ O destilada	Aforar hasta 1000 mL

Almacenar a temperatura ambiente.

SOLUCIÓN ROJO PONCEAU PARA TEÑIR PROTEÍNAS EN MEMBRANA DE NITROCELULOSA (BioRad)

Rojo Ponceau	0,1 g
Ácido acético	5,0 mL
H ₂ O destilada	Aforar hasta 100 mL

Almacenar a temperatura ambiente .Proteger de la luz.

SOLUCIÓN BLOQUEADORA DE MEMBRANA (PBS –Tritón- Leche Descremada al 5,0 %)

PBS –Tritón 0,05% (SIGMA [®])	10 ml
Leche descremada en polvo	0,5 g

Preparada en el momento.

SOLUCIÓN DE DILUCIÓN PARA ANTICUERPO PRIMARIO EN LA TÉCNICA DE WESTERN BLOT (PBS –Tritón- Leche Descremada al 1%)

PBS –Tritón 0,05% (SIGMA [®])	10 ml
Leche descremada en polvo (Svelty [®])	0,1 g

Preparada en el momento. Adicionado el anticuerpo se puede almacenar a 4°C máximo por una semana.

SOLUCIÓN DE REVELADO DE PLACA FOTOGRÁFICA (KODAK)

Kodak 6BX Revelador	54,47 mL
H ₂ O destilada	Aforar hasta 250 mL

Almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz.

SOLUCIÓN FIJADORA DE PLACA FOTOGRÁFICA (KODAK)

Kodak 6BX Fijador	54,43 mL
H ₂ O destilada	Aforar hasta de 250 mL

Almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz

12.9 Soluciones usadas en el proceso de purificación de la proteína recombinante en condiciones nativas

SOLUCIÓN DE TRABAJO CONCENTRADA DEL INHIBIDOR DE PROTEASAS PMSF 150 mM

PMSF	1,741 g
Etanol	25,0 mL
H ₂ O destilada	Aforar hasta 67,0 mL

Disolver el PMSF en etanol antes de aforar con agua. Prepara en campana de extracción. Separar en alícuotas y almacenar a -20°C.

SOLUCIÓN DE TRABAJO CONCENTRADA DE LISOZIMA 100 mg/mL

Lisozima en polvo (SIGMA [®])	1,0 g
H ₂ O destilada	Aforar hasta 10 mL

Esterilizar por filtración. Almacenar a 4°C.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LISIS PARA EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Hepes	50 mM
NaCl en cristales	300 mM
Glicerol (MERCK)	10%
Detergente no iónico Tritón X-100 (SIGMA [®])	1%
H ₂ O destilada	Volumen final 200 mL

Ajustar el pH a 7,0 y aforar hasta el volumen final a preparar. Almacenar a 4°C.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE LISIS PARA SONICACIÓN

Volumen de cultivo bacteriano a lisar	500 mL	2000 mL
Solución amortiguadora de lisis para extracción de proteínas	2,0 mL	4,0 mL
PMSF	1,0 mM	1,0 mM
Cóctel inhibidor de proteasas	200 µL	1,0 mL
Lisozima (SIGMA®)	1,0 mg/mL	1,0 mg/mL

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA “A” DE LAVADO PARA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Tris (Invitrogen) pH 7,0	50 mM
NaCl en cristales	300 mM
Glicerol (MERCK)	10 %
Detergente no iónico Tritón X-100 (SIGMA®)	0,1%
H ₂ O destilada	Volumen final 200mL

Esterilización por calor en autoclave 20 min. a 15 libras de presión. Almacenar a 4 °C.

SOLUCIÓN CONCENTRADA DE TRABAJO IMIDAZOL 1M

Imidazol	1,0212 g
Solución amortiguadora “A” de lavado	15 mL

Almacenar a 4°C. Proteger de la luz.

GRADIENTE DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE ELUCIÓN PARA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Solución Amortiguadora “A”	Solución Concentrada de Trabajo de Imidazol 1M	Concentración de Imidazol Final
9,85 mL	150 µL	15 mM
9,75 mL	250 µL	25 mM
9,50 mL	500 µL	50 mM
9,00 mL	1000 µL	100 mM
8,00 mL	2000 µL	200 mM
7,00 mL	3000 µL	300 mM
5,00 mL	5000 µL	500 mM

13. ANEXO B: PROCEDIMIENTOS BÁSICOS

13.1 Preparación de gel de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio

Nota: Disponer de un área especial aislada y limpia, manipular con guantes dado el potencial mutágeno del bromuro de etidio (Br-Et), y disponer por separado los desechos impregnados con este reactivo.

1. En un matraz Erlenmeyer limpio y seco se vierten 40 mL de solución amortiguadora TBE 1X y en el se adiciona 0,32 gr de agarosa (Invitrogen) punto de fusión medio la cual se disuelve al calentarla por 1 ½ min. en horno de microondas (agitar en 2 ocasiones) o hasta que ya no se observan partículas suspendidas. El porcentaje de la concentración de agarosa depende del tamaño molecular de los fragmentos de ácidos nucleicos a separar. Para secuencias mayores o iguales a 1 Kb se utiliza un porcentaje de 1,5 % de agarosa.
2. En un molde colocado sobre una superficie lisa se deposita lentamente y firmemente la solución líquida de agarosa, a continuación se adiciona y mezcla con Br-Et (1µl de Br-Et por cada 10 ml de TBE utilizado). El peine de plástico especial se coloca encima del molde mientras los dientes se mantendrán dentro del gel para obtener los espacios o pozos donde se depositaran las muestras a probar. Se deja reposar el gel a temperatura ambiente hasta que solidifique.
3. Para retirar el peine sin romper el gel éste se humedece con TBE 1X y la pieza plástica se desliza suavemente hacia arriba. El molde sin peine se coloca dentro de la cámara de electroforesis, la cual se cubre con TBE 1X.
4. Cada 5 µL de mezcla de ácido nucleico, se mezcla con 1 µL de solución amortiguadora de carga 5X y se resuspende con 10 µL de TBE 1X.
5. Se introduce completamente la punta que contiene la muestra preparada dentro del pozo previsto y se deposita resuspendiendo suavemente 3 veces. En el primer pozo del lado izquierdo se deposita 1 µL de marcador de tamaño molecular 1Kb, y de izquierda a derecha se depositan las muestras a correr por electroforesis.
6. La cámara se conecta a la fuente de voltaje (Life Technologies™), se ajustan el control de corriente a 80 V/cm² y por 1 h a 1 ½ h se lleva a cabo la electroforesis. La separación

de las bandas se verifica al exponer brevemente el gel a la luz ultravioleta (UV) de un trans-iluminador con protección especial (Kodak).

13.2 Extracción y purificación de fragmentos de productos de ADN obtenidos de una PCR con el kit comercial QIAEX II (QIAGEN[®])

1. Preparar un gel de agarosa al 0,8% con 6 pozos, colocar 20 μL de la muestra de ADN mezclado con 5 μL de solución amortiguadora de carga 5x en un pozo y μL de marcador para pb en un pozo diferente. Desarrollar la electroforesis a 80 V/cm^2 por 1 h ó hasta que la separación entre bandas permita ver definitivamente el fragmento de interés.
2. Pesar un tubo vacío de 1,5 mL estéril y anotar la cifra obtenida.
3. Sobre un trans-iluminador de luz UV se identificarla banda de interés, y se corta del gel de agarosa (lo mas exacto posible), y fracciona hasta partículas de 1 mm. Trabajar rápidamente para evitar daño al ADN por la luz UV.
4. Introducir los fragmentos en el tubo de 1,5 mL previamente pesado. El peso de la banda de ADN se obtiene de la diferencia del peso inicial del tubo y el peso del tubo con la banda, dependiendo de este valor se determina el volumen de reactivos a utilizar previamente establecido en el protocolo indicado por el fabricante.
5. Para un fragmento de 1000 bp – 100 mg de ADN se adicionan 300 μL de buffer QX1 (pH 7,5) (QIAGEN[®]). y 10 μL del reactivo QAEX II suspensión en perlas (QIAGEN[®]). Se resuspende e incorporan las perlas con la banda de agarosa que contiene el ADN, hasta formar una mezcla homogénea.
6. Incubar a 50°C la mezcla por 10 min., mezclar en vortex a intervalos de 2 minutos por 5 seg hasta que se solubilize la agarosa.
7. La muestra es centrifugada por 30 seg., el sobrenadante es removido y la fracción del botón que contiene las perlas unidas al ADN es conservada.
8. Para remover la agarosa se adicionar al botón 500 μL de buffer QX1 y se resuspende por vortex 5 seg. Se centrifuga por 30 seg. y se remueve el sobrenadante con una micropipeta.

9. Al botón se adiciona 500 μL de buffer PE (QIAGEN[®]) y se mezcla por vortex 5 seg. Se centrifuga por 30 seg. y desecha el sobrenadante con una micropipeta. Este lavado se repite dos veces.
10. El exceso de etanol del botón se elimina al secar a temperatura ambiente por 10 min. (evitar secado en exceso ya que se disminuye la eficiencia en la elución).
11. Para solubilizar el ADN se adicionan 20 μL de solución amortiguadora TE (pH 8,0) y se resuspende el botón manualmente. Se centrifuga por 30 seg. y se recupera el sobrenadante el cual contiene el ADN purificado. Almacenar a -20°C hasta su uso y descongelar manteniéndolo en hielo.

13.3 Corte de ADNdc con enzimas de restricción.

1. Verificar la compatibilidad de soluciones con los requerimientos de la enzima de restricción a utilizar, especificado en la hoja técnica de la enzima, especialmente al realizar digestiones con varias enzimas.
2. Cuantificar el ADNdc de la muestra problema en un espectrofotómetro (BioRad).
 - a) En una celda de cuarzo depositar 99 μL de agua destilada y adicionar 1 μL de muestra problema, resuspender.
 - b) La primera lectura se realiza con un blanco, celda de cuarzo donde se deposita 100 μL de agua destilada. Realizar los cálculos correspondientes a la conversión de unidades.
3. Calcular las unidades de enzima requerida para digerir la cantidad de ADN deseada (especificado en la hoja técnica del producto).
4. Descongelar en hielo los reactivos y solución amortiguadora especificada por el fabricante para la enzima de restricción a utilizar.
5. Preparar la reacción de restricción según las especificaciones sugeridas por el fabricante. Adicionar la enzima de restricción al último (mantener siempre en hielo).

La cantidad de enzima en μL dependerá de las unidades requeridas para digerir los μg de ADN de la muestra problema. Ajustar las concentraciones según el volumen final de la reacción de restricción, por lo general se utilizan un volumen de 50 μL .

6. Incubar las reacciones a 37°C por 12 hrs.
7. Concluida la incubación, depositar en hielo la reacción de restricción y analizar por electroforesis en gel de agarosa (0,8 % con Br-Et) una alícuota de 1 μL de los productos digeridos.
8. Si se observan las bandas correspondientes a los cortes esperados, el ADNdc restante se almacena en congelación a -20°C hasta su uso. Sin embargo antes de realizar cualquier ensayo se sugiere purificar los fragmentos obtenidos.

Nota: La muestra problema, los reactivos y la enzima de restricción deben mantenerse en hielo durante su utilización.

13.4 Método de cloruro de rubidio para preparación de bacterias competentes

1. Limpiar con agua y posteriormente con alcohol al 70% el área de trabajo y los materiales a utilizar. Encender un mechero para mantener un flujo de aire estéril.
2. Descongelar en hielo una alícuota de bacterias DH5 α One Shot (Invitrogen) no competentes (50 μL). Inocular 10 mL de medio de cultivo nutritivo LB (Medio Luria Broth) con las bacterias, dejar crecer toda la noche a 37°C en agitación (200 rpm).
3. Adicionar 10 mL del cultivo anterior a 100 mL de LB precalentado a 37°C en un matraz de 250 mL e incubar a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,5 a 90- 120 nm.
4. Enfriar el cultivo en hielo por 5 minutos y transferir el contenido a un tubo estéril para centrifuga. Colectar las células por centrifugación a baja velocidad (5 min, 4000 gravedades, 4°C).
5. Descartar el sobrenadante cuidadosamente y mantener el botón celular siempre en hielo.

6. Resuspender las células gentilmente en hielo con la solución amortiguadora TFB1 frío según la siguiente proporción: 30 mL para 100 mL de cultivo. Incubar la suspensión en hielo 90 min.
7. Colectar las células por centrifugación (5 min., 4000g, 4°C). Descartar el sobrenadante cuidadosamente y mantener el botón celular en hielo.
8. Resuspender las células cuidadosamente en 4 mL de TFB2 frío. Preparar alícuotas de 75 µL con glicerol al 15% en tubos estériles de 1,5 mL e introducir las en nitrógeno líquido por 10 seg. para su congelación. Almacenar a -70°C hasta su uso.

13.5 Transformación química de bacterias competentes *E. coli* DH5a

1. Limpieza con agua y posteriormente con alcohol al 70% del área de trabajo y los materiales a utilizar. Encender un mechero para mantener un flujo de aire estéril.
2. Introducir cajas petri con medio solidó-agar –antibiótico (con la tapa hacia abajo y el medio hacia arriba). en un mini-incubador (sin luz) a 37 °C.
3. Descongelar en hielo 50 µL de bacterias competentes. Inmediatamente adicionar 0,7 µL de β-Mercaptoetanol (1:10), y mezclar manualmente e incubar 10 min. en hielo.
4. A la par se descongelan 50 µL de bacterias competentes a las cuales se les aplica el mismo protocolo pero sin adicionar el plásmido. Estas serán el control negativo, para verificar de efectividad del antibiótico de resistencia
5. Adicionar 3 µL del plásmido, mezclar manualmente y colocar en hielo exactamente 10 min.
6. Colocar el tubo con las bacterias en un termoblock calibrado a una temperatura de 42 °C e incubar exactamente 45 seg. . Sin mezclar, inmediatamente transferir a un recipiente con hielo e incubar por 2 min.
7. Al tubo con las bacterias se adiciona 360 µL de medio líquido LB-antibiótico (indicado por el fabricante del plásmido) e se incuba a 37 °C en agitación por 30 min.

8. Centrifugar 30 seg a alta velocidad y desechar el sobrenadante. El botón celular se resuspende en 100 μ L de medio líquido LB- antibiótico.
9. Los 100 μ L de bacterias transformadas son sembrados por espatulación en cajas petri con medio sólido LB- antibiótico (previamente atemperadas a 37 °C). Se calienta la porción final de una espátula de cristal, se coloca en el medio sólido donde se mueve hasta que se enfría, inmediatamente se coloca la alícuota con bacterias y se extienden por toda la superficie de la caja petri. Etiquetar apropiadamente cada caja según el plásmido, la fecha de cultivo, antibiótico y elaborador.
10. Incubar por 12 a 16 horas a 37° C en un mini-incubador sin luz.
11. Sí se observa la formación de gran cantidad de colonias de bacterias no transformadas en la caja petri del control, la transformación se debe repetir ya que posiblemente el lote de cajas con medio sólido- antibiótico este defectuoso o en la manipulación se produjo contaminación(antibiótico inactivado), lo que permite el crecimiento de bacterias que no poseen secuencia de antibiótico de resistencia y en consecuencia la mayoría de las colonias no presentaran el plásmido recombinante con la secuencia de interés.
12. Seleccionar 10 colonias aleatoriamente, resembrarlas por estriado en una caja petri con medio LB- antibiótico (37 °C) y realizar una PCR para comprobar la presencia de la secuencia con el gen de interés. Indicar apropiadamente la localización de las colonias seleccionadas en la caja petri donde se realizó la transformación y en la caja petri donde se resembró para propagación.
13. Se recomienda la utilización de colonias recién transformadas para obtener una mayor cantidad de proteína recombinante durante la inducción de colonias bacterianas.

Nota: La mayoría de las bacterias que crecen en un medio de cultivo con antibiótico de resistencia (indicado por el fabricante) poseen el plásmido que codifica los genes para expresar resistencia, sin embargo es conveniente la selección aleatoria de 10 ó mas colonias a las que se les realiza una PCR y/o una reacción con enzimas de restricción para comprobar la presencia de la secuencia del gen a clonar (secuencia de interés).

13.6 Purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina (Mini preparación)

1. Inocular 5 ml de medio líquido LB-antibiótico (atemperado a 37 °C) introduciendo una asada de colonias transformadas con el plásmido que presenta la secuencia de interés. Incubar a 37 °C en agitación a 200 rpm por 12 horas.
2. En un tubo de 1,5mL adicionar parte del cultivo crecido por 12 hrs, centrifugar a 13000 rpm durante 30 seg. a 4°C, y desechar el sobrenadante. Repetir este procedimiento hasta concentrar las bacterias contenidas en los 5 mL del cultivo.
3. Adicionar al botón celular 100 µL de solución I y mezclar por agitación en vórtex. Colocar en hielo.
4. Inmediatamente preparar la solución II y adicionar 200 µL al tubo con bacterias. Agitar manualmente invirtiendo el tubo 5 veces y colocar en hielo.
5. Se agrega 150 µL de la solución III y se agita manualmente invirtiendo el tubo varias veces. Incubar por 5 min en hielo y después centrifugar el contenido por 6 min a 13000 rpm a una temperatura de 4 °C.
6. Recuperar el sobrenadante transparente y envasarlo en un tubo nuevo (evitar extraer la capa superior de consistencia viscosa y color blanco). Colocar en hielo.
7. Al sobrenadante depositado en el tubo nuevo se adiciona 500 µL de fenol/ cloroformo/ alcohol isoamilico (25:24:1), se mezcla manualmente invirtiendo varias veces el tubo.
8. Posteriormente se centrifuga a 13000 rpm por 6 min a 4°C. El sobrenadante se transfiere a un tubo de 1.5 mL limpio y el botón se desecha. Mantener en hielo.
9. Se adiciona al sobrenadante 1mL de etanol al 100 %. (lo equivalente a dos volúmenes). Mezclar por agitación manual e incubar 2 min. a temperatura ambiente (en este paso se precipita el ADN).
10. Nuevamente centrifugar a 13000 rpm por 6 min a 4°C, retirar el sobrenadante y semi-secar la pastilla a temperatura ambiente por 10 a 15 min (en el momento en que las orillas del precipitado comienzan a tornarse de color blanco intenso inmediatamente se continua con el siguiente paso).

11. Adicionar al botón celular 1mL de etanol al 70%, mezclar invirtiendo el tubo varias veces hasta que el contenido se solubilice.
12. Centrifugar a 13000 rpm por 6 min a 4°C, retirar el sobrenadante y secar la pastilla a temperatura ambiente por 10 a 15 min.
13. Para solubilizar el ADNc se resuspende el botón celular en 25 a 50 µL de solución amortiguadora TE. Colocar en hielo.
14. Mezclar 1µL del ADNc del plasmido recién purificado con solución amortiguadora de carga 5X y correr una electroforesis para comprobar la extracción de ADNc.
15. Se adiciona 1µL de RNAsa al purificado de ADNc. Incubar a 37 °C por 15 min. y guardar a -20°C. Alicuotar y descongelar hasta su uso.

13.7 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para análisis de proteínas

1. Montar el sistema para electrofóresis (Bio-Rad) en un área nivelada, utilizar moldes de cristal para geles de 1,5 mm de espesor. Antes de preparar las soluciones verificar que no existan fugas de líquido entre los cristales.
2. Preparar la solución separadora al 10% de acrilamida. Para un gel chico de 7,8 cm x 8 cm en un tubo cónico de 20 mL se mezclan: 3,3 mL de solución A, 3,7 mL de solución B, 0,1 mL de solución C, 2,7 mL de H₂O, 40 µL de persulfato de amonio (10 % p/v) y finalmente 16,6 mL de TEMED. Inmediatamente resuspender y depositar entre los cristales de 1,5 mm la mezcla hasta una altura de 6 cm. (Preparar en una campana extractora debido al efecto neurotóxico de uno de los reactivos).
3. Uniformemente adicionar 1 ml de isopropanol grado reactivo para eliminar burbujas y permitir la polimerización adecuada. El gel solidifica en aproximadamente 20 min, Retirar el alcohol por decantación y secar a temperatura ambiente 5 min.
4. En un tubo cónico de 20 mL limpio preparar la solución concentradora según lo siguiente: 665 µL de solución A, 625 µL de solución D, 50µL de solución C, 3,6 mL de H₂O, 100 µL de persulfato de amonio y finalmente 5 µL de TEMED. Inmediatamente resuspender y depositar entre los cristales sobre el gel solidificado

hasta llenar el espacio restante. Colocar el peine plástico de 10 pozos y esperar a que solidifique, para poder utilizarlo (entre 20 y 30 minutos).

5. Se retira el peine y los cristales se colocan en la cámara de electroforesis según las indicaciones del fabricante. El sistema es llenado con solución amortiguadora para electroforesis de proteínas 1X de tal manera que se cubran perfectamente los conductores eléctricos y además se deben limpiar cuidadosamente los pozos para eliminar prolongaciones de gel inespecíficos.
6. Las muestras a separar por electroforesis son depositadas en tubos limpios de 0,6 mL y se mezclan con solución amortiguadora de carga 5X, se desnaturalizan por calor en baño María a 100 °C por 5 a 10 min. Se retiran del calor y colocan en hielo 2min y posteriormente se centrifugan a 13000 rpm por 5 seg. (trabajar en campana de extracción para evitar los efectos tóxicos de uno de los reactivos de la solución amortiguadora de carga 5X)
7. El marcador de peso molecular (kDa) es adicionado en el primer pozo del lado izquierdo en un volumen de 8 µL, y subsecuentemente cada muestra es colocada en pozos individuales.
8. La cámara es cerrada y conectada a la fuente de poder, en los primeros 10 min de la electroforesis se aplica una corriente eléctrica de 80 Volts y después 1 h a 100 Volts. La duración de la electroforesis finaliza en el momento en que el frente de carga llega a la base del gel, aunque si es necesario se deja pasar la corriente por más tiempo.
9. Después de desconectar el sistema el gel es desmontado de los cristales y es lavado con agua destilada.

Tinción de proteínas con azul de Coomassie

10. El gel de acrilamida después de la electroforesis se deposita en un recipiente con solución Coomassie teñidora de proteínas, por 2 hrs en agitación. La solución teñidora se puede reutilizar por lo que es recuperada en un recipiente.
11. Posteriormente para desteñir las áreas que no tienen proteínas el gel es colocado en solución desteñidora por 24 hrs, en agitación. Esta solución es retirada y el gel es lavado con H₂O destilada.

12. Las bandas se visualizan al exponer el gel a un transiluminador de luz blanca.

Nota: El porcentaje de acrilamida en el gel separador depende de la migración de la proteína a observar. Así mismo la cantidad de muestra a introducir en cada pozo debe ser proporcional para que sea representativa la comparación. Si la concentración de proteínas en la muestra es demasiada esta se puede diluir. Se debe respetar las cargas correspondientes al ánodo y cátodo para evitar que las proteínas migren fuera del gel en dirección contraria a la esperada.

13.8 Técnica de Western Blot (WB) para identificar proteínas

1. Preparar 1 gel de poliacrilamida al 10% y montar el sistema para electroforesis. Procesar las muestras y cargarlas en los pozos correspondientes.
2. Desarrollar la electroforesis a 80 Volts por 10 min y después a 100 volts por 1½ hr.
3. En un recipiente humedecer 3 hojas de papel filtro con solución amortiguadora para transferencia semi-seca de proteínas (del tamaño del gel de acrilamida). Sobre la base de la cámara de transferencia (BioRad) cada papel es acomodado uno sobre otro, y sobre estos se coloca la membrana de nitrocelulosa previamente humedecida con la solución amortiguadora de transferencia.
4. Se separa el gel de acrilamida de los cristales que lo contienen y se lava con agua destilada, se coloca sobre la membrana de nitrocelulosa humedecida. Se eliminan las bolsas de aire que se hayan formado. Finalmente sobre el gel de acrilamida se depositan 3 hojas de papel filtro previamente humedecido con amortiguador de transferencia.
5. La cámara de transferencia se cierra y conecta a la fuente de poder. La transferencia se lleva a cabo al aplicar una corriente de 16 Volts por 60 min. finalizada la transferencia la membrana es colocada en un recipiente y lavada con agua destilada.
6. Las bandas de proteínas transferidas del gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa se visualizan al teñir con una solución de Rojo ponceau (2 min en agitación). El exceso de colorante se elimina al lavar con agua destilada. Las bandas del marcador de peso molecular son remarcadas con un lápiz y con líneas punteadas se prolongan horizontalmente de extremo a extremo de la membrana.

7. Se destiñen las proteínas de la membrana al lavar con agua destilada (2 min en agitación), y con PBS 1X -Tritón al 0,5% (2 min en agitación).
 8. Se bloquea la membrana de nitrocelulosa-proteínas con una solución de PBS 1X con leche descremada al 5% en agitación durante 24 hrs a 4°C o en su defecto por 1 hr a 37°C. después de esta incubación se lava la membrana con PBS 1X- Tritón al 0,5% (2 min en agitación)
 9. En un hielo se prepara una dilución del primer anticuerpo en PBS 1X- Tritón 0,5% al 1% de leche descremada :
 - Para detectar la proteína NS1 se realiza una dilución 1:1000 del anticuerpo primario anti-NS1 hecha en hibridoma.
 - Y para detectar los residuos de histidina se realiza una dilución 1:1000 del anticuerpo primario comercial anti-His 6 hecho en conejo o en ratón.
- Nota:** La dilución del anticuerpo primario o secundario puede variar dependiendo de la intensidad de la marca observada durante el revelado del western blot.
10. La solución del anticuerpo primario diluido se vierte sobre la membrana y se deja interaccionar por 12 hrs a 4°C o en su defecto por 3 hrs a temperatura ambiente, en agitación. Concluido el tiempo de interacción se retira y almacena a 4°C la dilución del anticuerpo.
 11. Sin dejar secar la membrana, se procede a realizar 5 lavados de 5 minutos en agitación con PBS 1X-Tritón 0,5%.
 12. Inmediatamente se agrega una solución dilución 1:10,000 del anticuerpo secundario comercial anti-ratón acoplado a peroxidasa en PBS 1X- Tritón 0.5%. La membrana con el anticuerpo secundario se incuban por 1hr a 37°C en agitación suave, preferentemente protegida de la luz.
 13. Se retira la solución con anticuerpo secundario de la membrana y esta se lava, con PBS 1X-Tritón 0,5%, 3 veces por 5 min. en agitación.

14. En cuarto oscuro se desarrolla la exposición de placas fotográficas a la reacción entre la peroxidasa y el sustrato sobre la membrana con proteínas, y de la misma manera el revelado y fijado fotográfico.
15. En un recipiente seco y limpio se mezcla 300 μ l de solución Sustrato de peróxidasa Super Signal West Femto Stable (Pierce) con 300 μ l Solución aumentadora Super Signal West Femto Luminol (Pierce).
16. El exceso de la solución de los lavados (PBS 1X-Tritón) se elimina al colocar suavemente papel absorbente sobre la membrana. Inmediatamente se adiciona la mezcla de sustrato -solución aumentadora (Pierce), que se vierte consecutivamente sobre la membrana por aproximadamente 30 seg. La membrana es introducida entre dos placas plásticas, colocadas dentro de una caja con fondo negro.
17. El revelado se desarrolla a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad, hasta que las bandas son claramente visibles (evitar un exceso de fondo).
18. Una placa fotográfica es colocada sobre la membrana por 15 seg., una segunda placa por 30 seg y una tercera por 5 min. Si al exponer la placa por 5 min se observan marcas poco definidas, una placa nueva se debe exponer por 12 hrs.
19. Las placas son lavadas con agua corriente, y se sumergen en solución reveladora Kodak hasta la aparición de las manchas oscuras producidas por la luz de la reacción entre la peroxidasa del anticuerpo y la solución Femton. La placa es lavada con agua corriente antes de pasar a la siguiente solución.
20. Para el fijado de las manchas, la placa fotográfica es sumergida en solución fijadora por 5 min. y posteriormente es lavada con agua corriente. Y después las placas son colocadas en una superficie de tal manera que se mantengan en posición vertical hasta su secado.

Nota. La membrana en la que se transfirieron las proteínas debe mantenerse hidratada en todo momento, en especial después de la interacción con los anticuerpos. La reactividad de las soluciones de revelado y fijado Kodak se debe verificar. Se sigue el

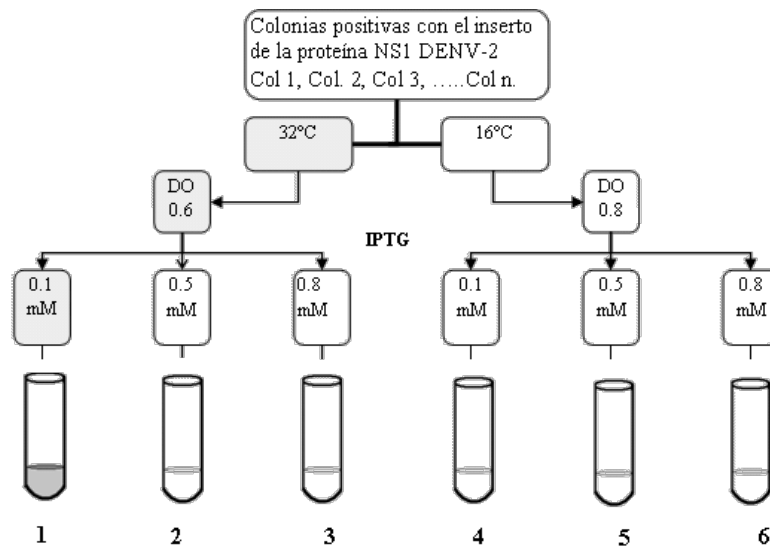
procedimiento de revelado y fijado con dos tiras de placa fotográfica (0,5cm x 0,2cm) una expuesta a la luz y otra no expuesta. Si después de revelar no se observan manchas en la tira expuesta a la luz, se considera que debe cambiarse de solución.

El tamaño de las placas fotográficas debe ser el mismo que el de la membrana y un leve corte diagonal o marca se realiza en la parte superior izquierda tanto en la membrana como en la placa para mantener la orientación correcta. Las placas fotográficas y las soluciones Femton son almacenadas a 4 °C hasta su uso.

Expresión e inducción de p proteínas recombinantes en bacterias DH5 dProtocolo para el establecimiento de las condiciones de expresión e inducción

1. Por n-duplicados, se propagan individualmente en 5 mL de medio líquido LB – antibiótico 100 µg/mL, de 5 a 10 colonias transformadas positivas para el plásmido de expresión pProexHTB-NS1, en tubos individuales, y se incuban en agitación a 200 rpm durante 12 hrs a 37° C. El número de n-duplicados por colonia dependerá de las diferentes condiciones de incubación e inducción a probar. Ejemplo de inducción con solo dos colonias:

Concentración de IPTG y temperatura de inducción



2. De cada cultivo de bacterias crecidas durante 12 hrs. se toman 500 µL que se adicionan a 5 mL de medio líquido LB -antibiótico100µg/mL (previamente calentado a 37°C) e incuban a 37°C (200 rpm) hasta la Densidad Óptica deseada medida a 600 nm de longitud. (Ejem. D.O. 0,6). Como blanco se utiliza medio-antibiótico.

3. De cada colonia se toma 200 μ L de cultivo no inducido que se resuspende en 40 μ L de solución amortiguadora de carga 5x para correr en un gel de acrilamida al 10%. Almacenar a -20°C hasta su utilización.
4. Se adiciona a cada colonia la cantidad de IPTG previamente calculada, y se procede a incubar en agitación 200 rpm por 3 a 6 horas. Se recomienda probar a dos o más temperaturas, dependiendo de los resultados a buscar. Incubar a temperaturas cercanas a 37 °C producen proteínas que se localizaran en cuerpos de inclusión mientras que temperaturas menores a 20° C permiten que la proteína se mantenga en la fracción soluble que es más fácil de obtener.
5. Finalizada la inducción se toman 40 μ L de cultivo de cada colonia, y se procesan para la realización de una electroforesis en gel de acrilamida al 10%.

Nota: La manipulación de los plásmidos, medio de cultivo sólido o líquido y de las bacterias en los procesos de transformación, propagación, inducción, así como en la medición de la densidad óptica se realiza en condiciones de esterilidad.

Protocolo general para la expresión e inducción de la proteína recombinante NS1 a 16°C para obtenerla en forma nativa

1. Propagación en 100 a 200 mL de medio líquido LB –antibiótico ampicilina (Sigma) 100 μ g/mL una colonia transformada positiva para el plásmido de expresión pPROEX HTb-NS1, e incubar en agitación (200 rpm.) durante 12 hrs a 37° C.
2. Envasar en un matraz Erlenmeyer (capacidad 4,0 L) 2000mL de medio LB-ampicilina 100 μ g/ml -Glucosa 0,03 mM (medio de inhibición del promotor). Incubarlo a 37° C hasta su utilización.
3. El cultivo bacteriano crecido durante 12 hrs se adiciona a los 2000 mL de medio represor LB/ antibiótico/glucosa en una dilución proporción 1:10, y se incuba en agitación a 37°C hasta que alcance una D.O. de 0,8 a 600 nm de longitud (tiempo aproximado 2 ½ hrs.). La adición de glucosa proporciona las condiciones que inhibirán la prematura expresión de la proteína recombinante durante el tiempo en que se lleva a cabo el crecimiento bacteriano.

4. Tomar una alícuota de 1mL del cultivo D.O. 0,8 (600 nm), centrifugarlo y resuspenderlo en 200 µl de solución amortiguadora de carga 5x para gel SDS-PAGE. (dilución final hasta 1X). Almacenar en congelación a -20°C hasta su utilización.
5. En un matraz Erlenmeyer de 4L se prepara 2000 mL de medio LB- ampicilina 100 µg/mL. Este medio es mantenido a temperatura ambiente hasta su uso.
6. Al alcanzar la densidad óptica adecuada se centrifuga el cultivo a 6000 rpm por 10 min. Se descarta el sobrenadante y el botón bacteriano es resuspendido en 2000 mL de medio LB-ampicilina -IPTG 0,5 mM a 37°C.
7. Incubar a 16° C por 24 hrs en agitación (200 rpm).
8. Después de la incubación se toma 1ml de cultivo el cual es centrifugado (5000 rpm por 10 min), el botón se resuspende en 200 µL de solución amortiguadora de carga 5X, y con 35 µL se realiza una electroforesis en gel de acrilamida el cual se tiñe con solución de azul de Coomassie. Se comprueba que hubo inducción si se observan bandas anchas, con el peso en KDa esperado para la proteína expresada.
9. Los 2000 ml de cultivo son concentradas en un tubo cónico estéril de 50ml por centrifugación a 6000 rpm por 20 a 30 min. El sobrenadante es descartado y el botón recuperado (el botón puede congelarse a -20 hasta su disposición no mayor a 24hrs).
10. El concentrado celular es congelado por 10 a 15 min a -70 °C y después descongelado en hielo y resuspende en vórtex por 2 min. Este paso se debe repetir dos veces.
11. Posteriormente se resuspende el concentrado bacteriano en 4mL de solución amortiguadora de lisis con PMSF 1 mM, cóctel inhibidor de proteasas y lisozima 1 mg/mL. La solución amortiguadora de lisis debe ser compatible con la resina de Ni-NTA a utilizar, según las indicaciones del fabricante.
12. Por agitación en vortex el concentrado de cultivo celular es completamente disuelto e incubado en hielo por 1 hora.
13. El botón con las proteínas totales solubilizado es sonicado en hielo según el siguiente programa: Sonicación (10 seg, intensidad 70% a 80%) y no sonicación (10

seg) de forma intercalada durante un minuto. Repetir la serie 3 a 4 veces, hasta que la muestra adquiriera una consistencia viscosa.

14. La suspensión celular sonicada es centrifugado a 13000 rpm. por 20 a 30 min. a 4° C. El sobrenadante recuperado contiene la fracción soluble y es colocado en hielo, para después ser almacenado a -20°C. Y la pastilla que contiene proteínas no solubles contenidas en cuerpos de inclusión también es recuperada para su posterior análisis.
15. En un tubo de 0,6 mL se depositan 7 µL de sobrenadante a los que se adicionan 10 µL de solución amortiguadora de carga SDS-PAGE, y en otro tubo se depositan 10 µL de solución amortiguadora de carga SDS-PAGE en el que se resuspenden 0,5 µL de la pastilla bacteriana. Y de los extractos de cultivos crudos bacterianos de la colonia inducida y los controles se procesan 30 a 40 µL. Con estas muestras se realiza una electroforesis. En gel de acrilamida al 10%.

Nota: La manipulación de los plásmidos, medio de cultivo sólido o líquido y de las bacterias en los procesos de transformación, propagación así como en la medición de la densidad óptica se realiza en condiciones de esterilidad.

Purificación por cromatografía de afinidad con matriz de Ni-NTA de la proteína NS1 de DENV-2 (condiciones nativas no desnaturalizantes)

1. Seleccionar la clona que expresa mejor la proteína recombinante y propagarla en 1L de cultivo y seguir el protocolo de inducción a 16°C por 16 a 24 hrs.
2. Concentrar el cultivo inducido en un tubo Falcon de 50mL y solubilizarlo en solución amortiguadora de lisis con PMSF, cóctel inhibidor de proteasas y lisozima 1mg/mL, según el protocolo de inducción a 16°C.
3. Sonicar el cultivo celular y separar la fracción soluble, la cual se debe almacenar a -20°C, en caso de no usar inmediatamente.
4. Previamente a la concentración del cultivo inducido se prepara la resina Ni-NTA (QIAGEN®) para la interacción con la fracción soluble. El volumen de resina depende de la cantidad de proteína visualizada según el protocolo establecido por el fabricante.

5. La resina Ni-NTA es lavada con 10 mL de H₂O destilada por 3 a 5 veces hasta que se elimina el etanol usado en el almacenamiento
6. La resina es equilibrada por 5min en agitación suave a T. amb. con 5 mL de la misma solución amortiguadora con que se liso el cultivo celular, después se centrifuga a 500 rpm por 2 min. Al botón de la resina nuevamente se le adiciona 5 mL de la solución amortiguadora y se incuba por 12 hrs a 4 °C en agitación suave o en su defecto mínimo por 1 ½. h Verificar que la concentración de sales y otros reactivos de la solución sean compatibles con las condiciones de interacción descritas en el instructivo de la Resina Ni-NTA.
7. A la fracción soluble se le adiciona la resina equilibrada y se deja interaccionar por 12 hrs a 4°C. en agitación suave. Finalizada la incubación tomar 10 µL de la interacción y prepararla para una posterior electroforesis en gel de acrilamida, guardar a 4°C.
8. Después de la incubación se centrifuga el complejo Resina-Fracción soluble entre 4500 rpm y 6000rpm por 10 min a 4°C, El sobrenadante no es utilizado inmediatamente pero puede volver a interaccionarse con resina equilibrada para recuperar una mayor cantidad de proteína recombinante.
9. Al botón de Ni-NTA-Fracción soluble se le adiciona 5 mL de solución amortiguadora “A” y se agita suavemente por 5 min., después se centrifuga a 4500 o 6000 rpm a 4°C por 5 min. El sobrenadante se recupera y el lavado se repite de una a cinco veces más. Una alícuota de 30 µL de estos lavados se prepara para una electroforesis en gel de acrilamida.
10. Se lava durante 5 min a T. amb.(25 °C) la resina- proteína recombinante con 1 mL de solución amortiguadora “A”-Imidazol, después se centrifuga a 5000 o hasta 8000 rpm a 4°C por 5 min, y el sobrenadante es colectado. Los lavados se repiten 3 veces y se continúa lavando con otra concentración de imidazol. El gradiente de lavado a seguir es de 15mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM y 500 mM de imidazol. De los sobrenadantes de los lavados- eluidos con imidazol se toman 30 a 60 µl para un análisis por tinción de bandas con Coomassie y ensayo de western blot, el resto se almacena a -20°C.

Nota: La resina Ni-NTA (QIAGEN®) nunca debe ser congelada ya que se pierde su capacidad de interacción, su almacenamiento es a 4°C según indicaciones del fabricante. Durante las interacciones evitar el secado de la matriz de níquel.

14. REFERENCIAS

1. **Guzman M**, Kouri G, Bravo J, Triana C. **1992**. Estimación de las afectaciones económicas causadas como consecuencia de la epidemia de dengue hemorrágica ocurrida en Cuba en 1981. *Rev Cub Med Trop* 44: 13-17
2. **Marty A**, Jahrling P, Geisbert T. **2006**. Viral Hemorrhagic Fevers. *Clin Lab Med* 26: 345-386
3. **Riegan J**, Clark D, Gubler P, Reiter E, Sanders & Vorndam A. **1998**. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lan* 352: 971-977
4. **Soldan S**, & González F. 2005. Emerging infectious diseases: The Bunyaviridae. *J Neur* 11:1538-2443.
5. **Ascenzi P**, Bocedi A, Heptonstall J, Capobianchi M, Di Caro A, Mastrangelo E, Bolognesi M & Giuseppe I. 2008. Ebolavirus and Marburgvirus: Insight the Filoviridae family. *Mol Asp Med* 29: 151-185
6. **Kanerva M**, Mustonen J, & Vaheeri A. **1998**. Pathogenesis of Puumala and other hantavirus infections. *Rev Med Virol* 8: 67-86
7. **Gubler D**. **2002**. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social, and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol* 10: 100–103
8. **Hales, S**, DeWet N, Maindonald J, & Woodward A. **2002**. Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model. *Lan* 360: 830–834
9. **Whitehead S**, Blaney J, Durbin A & Murphy B. **2007**. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microb* 5: 518-528
10. **Clyde K**, Kyle J, & Harris E. **2006**. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Patogenesis. *J Virol* 80: 11418-11431
11. **Kuhn R**, Zhang W, Rossmann M, Pletnev S, Corver J, Lenches E, Jones C. Mukhopadhyay S, Chipman P, Strauss E, Baker T & Strauss J. **2002**. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell* 108: 717-725
12. **Zhang Y**, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss J, Baker T, Kuhn R, & Rossmann M. **2004**. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Struct Camb* 12: 1607-1618
13. **Stiasny K**, & Heinz F. **2006**. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol* 87: 2755-2766
14. **Chambers T**, Hahn C, Galler R, & Rice C. **1990**. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649-688
15. **Lindenbach B**, Thiel H, & Rice C. **2007**. Flaviviridae: The Viruses and their Replication. In: *Fields Virology*, Kripe DM, Howley PM. 5th Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. pág. 1106-1112
16. **You S**, Falgout B, Markoff L, & Padmanabhan R. **2001**. In vitro RNA Synthesis from Exogenous Dengue Viral RNA Templates requires Long Range Interactions Between 5'- and 3'-Terminal Regions that Influence RNA Structure. *J Biol Chem* 276: 15581-15591
17. **Yábar C**. **2003**. Rol de las Proteínas no Estructurales en los eventos de Replicación del ARN del Virus Dengue propuesta de un modelo de replicación del ARN. *Rev Peru Med Exp Sal Pub* 20: 51-57
18. **Wang S**, He R, & Anderson R. **1999**. PrM and cell-binding domains of the dengue virus E protein. *J Virol* 73: 2547-2551
19. **Lorenz I**, Allison S, Heinz F, & Helenius A. **2002**. Folding and dimerization of tick-borne encephalitis virus envelope proteins prM and E in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 76: 5480-5491

20. **Lee E, Weir R, & Dalgarno L. 1997.** Changes in the dengue virus major envelope protein on passaging and their localization on the three dimensional structure of the protein. *Virology* 232: 281-290
21. **Sangiambut S, Keelapang P, Aaskov J, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, & Sittisombut N. 2008.** Multiple regions in dengue virus capsid protein contribute to nuclear localization during virus infection. *J Gen Virol* 89: 1254-1264
22. **Wang S, Syu W, Huang K, Lei H, Yao C, King C. & Hu S. 2002.** Intracellular localization and determination of a nuclear localization signal of the core protein of dengue virus. *J Gen Virol* 83:3093-3102
23. **Schlesinger J. 2006.** Flavivirus nonstructural protein NS1: Complementary surprises. *PNAS* 103:18879-18880
24. **Winkler G, Maxwell S, Ruemmler C, & Stollar V. 1989.** Newly synthesized dengue-2 virus nonstructural protein NS1 is a soluble protein but becomes partially hydrophobic and membrane-associated after dimerization. *Virology* 171: 302-305
25. **Mackenzie J, Jones M, Young P. 1996.** Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* 220: 232-240
26. **Crabtree M, Kinney R, & Miller B. 2005.** Deglycosylation of the NS1 protein of dengue 2 virus, strain 16681: construction and characterization of mutant viruses. *Arch Virol* 150:771-786
27. **Pryor M, & Wright P. 1994.** Glycosylation mutants of dengue virus NS1 protein. *J Gen Virol* 75:1183-1187
28. **Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey F, Deubel V. 1999.** Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol* 73: 6104-6110
29. **Jacobs M, Robinson P, Bletchly C, Mackenzie J, Young P. 2000.** Dengue virus nonstructural protein 1 is expressed in a glycosyl-phosphatidylinositol-linked form that is capable of signal transduction. *FASEB J* 14: 1603-1610
30. **Heinz F, Stiasny K, & Allison S. 2004.** The entry machinery of flaviviruses. *Arch Virol Suppl* 18: 133-137
31. **Pillay C, Elliott E, & Dennison C. 2002.** Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 363: 417-429
32. **Alcon S, Drouet M, Roux P, Frenkiel M, Arborio M, Durand A, Maurice M, Le Blanc I, Gruenberg J, & Flamand M. 2005.** The Secreted Form of Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is Endocytosed by Hepatocytes and Accumulates in Late Endosomes: Implications for Viral Infectivity. *J Virol* 79 :11403-11411
33. **Kummerer B & Rice C. 2002.** Mutations in the Yellow Fever virus Non-structural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol* 76: 4773-4784
34. **Munoz J, Sanchez G, Laurent M, & Garcia A. 2003.** Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 :14333-14338
35. **Murray C, Jones C, & Rice C. 2008.** Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol* 6: 699-708
36. **Falgout B, Miller R, & Lai C. 1993.** Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: Identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *J Virol* 67: 2034-2042
37. **Niyomrattanakit P, Winoyanuwattikun P, Chanprapaph S, Angsuthanasombat C, Panyim S, & Katzenmeier G. 2004.** Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation. *J Virol* 78 :13708-16

38. **Falgout B**, Pethel M, Zhang Y, & Lai C. **1991**. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol* 65: 2467–2475
39. **Chua J**, Ng M, & Chow V. **2004**. The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Vir Res* 102: 151-163
40. **Kurane I**, Brinton M, Samson A, & Ennis F. **1991**. Dengue virus-specific, human CD4+ CD8- cytotoxic T-cell clones: multiple patterns of virus cross-reactivity recognized by NS3-specific T-cell clones. *J Virol* 65: 1823-1828
41. **Kurane I**, Dai L, Livingston P, Reed E, & Ennis F. **1993**. Definition of an HLA-DPw2- restricted epitope on NS3, recognized by a dengue virus serotype-cross-reactive human CD41 CD8_ cytotoxic T-cell clone. *J Virol* 67: 6285–6288
42. **Miller S**, Sparacio S, & Bartenschlager R. **2006**. Subcellular Localization and Membrane Topology of the Dengue Virus Type 2 Non-structural Protein 4B. *J Bio Chem* 281: 8854-8863
43. **Lindenbach B**, & Rice C. **1999**. Genetic Interaction of Flavivirus Nonstructural Proteins NS1 and NS4A as a Determinant of Replicase Function. *J Virol* 73: 4611-4621
44. **Lindenbach B**, & Rice C. **2003**. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res* 59: 23-61
45. **Munoz J**, Laurent M, Ashour J, Martinez L, Ashok M, Lipkin W, & Garcia A. **2005**. Inhibition of α/β interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. *J Virol* 79:8004-8013
46. **Kapoor M**, Zhang L, Ramachandra M, Kusakawa J, Ebner K, & Padmanabhan R. **1995**. Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J Biol Chem* 270: 19100-19106
47. **Medin C**, Fitzgerald K, & Rothman A. **2005**. Dengue virus nonstructural protein NS5 induces interleukin-8 transcription and secretion. *J Virol* 79:11053-11061
48. **Vaughn D**, Green S, Kalayanarooj S, Innis B, Nimmannitya S, Suntayakorns S, Endy T, Raengsakulrach B, Rothman A, Ennis F, & Nisalak A. **2000**. Dengue viremia titer, antibody, response pattern and virus serotype correlate with disease severity. *J Infect Dis* 181: 2-9
49. **Thein S**, Aung M, Shwe T, Aye M, Zaw A, Aye K, Aye K.M, & Aaskov J. **1997**. Risk factors in dengue shock syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 56: 566–572
50. **Kurane I**, Innis B, Nimmannitya S, Nisalak A, Meager A, Janus J, & Ennis F. **1991**. Activation of T lymphocytes in dengue virus infections. High levels of soluble interleukin 2 receptor, soluble CD4, soluble CD8, interleukin 2, and interferon-gamma in sera of children with dengue. *J Clin Investig* 88: 1473–1480
51. **Mongkolsapaya J**, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, Khemnu N, Tangthawornchaikul N, Chotiyarnwong P, Sae-Jang K, Koch M, Jones Y, McMichael A, Xu X, Malasit P, & Screaton G. **2006**. T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? *J Immunol* 176 :3821–3829
52. **Green S**, Vaughn D, Kalayanarooj S, Nimmannitya S, Suntayakorn S, Nisalak A, Rothman A, & Ennis F. **1999**. Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. *J Med Virol* 59: 329–334
53. **Libraty D**, Young P, Pickering D, Endy T, Kalayanarooj S, Green S, Vaughn D, Nisalak A, Ennis F, & Rothman A. **2002**. High Circulating Levels of the Dengue

- Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *JID* 186: 1165-1168
54. **Alcon S**, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, & Flamand M. **2002**. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein reveals circulation of the antigen in blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol* 40: 376-381
 55. **Avirutnan P**, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, Jairungsri A, Kanlaya R, Tangthawornchaikul N, Puttikhunt C, Pattanakitsakul S, Yenchitsomanus P, Mongkolsapaya J, Kasinrerkerk W, Sittisombut N, Husmann M, Blettner M, & Vasanawathana S. Sucharit Bhakdi,8 and Prida Malasit. **2006**. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis* 193: 1078-1088
 56. **Liu C**, Chiu S, Hsiao Y, Wan S, Lei H, Shiao A, Liu H, Yeh T, Chen S, Liu C, & Lin Y. **2005**. Expression of cytokine, chemokine, and adhesion molecules during endothelial cell activation induced by antibodies against dengue virus nonstructural protein 1. *J Immunol* 174: 395-403
 57. **Lin C**, Lei H, Shiao A, Liu H, Yeh T, Chen S, Liu C, Chiu S, & Lin Y. **2002**. Endothelial Cell Apoptosis Induced by Antibodies Against Dengue Virus Nonstructural Protein 1 Via Production of Nitric Oxide. *J Immunol* 169: 657-664.
 58. **Falconar K**. **1997**. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. *Arch Virol* 142: 897-916
 59. **Chua J**, Bhuvanakantham R, Chow V, Ng M. **2005**. Recombinant non-structural 1 (NS1) protein of dengue-2 virus interacts with human STAT3 β protein. *Vir Res* 112: 85-94
 60. **Schlesinger J**, Brandriss M, & Walsh E. **1987**. Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *J Gen Virol* 68: 853-857
 61. **Lin C**, Lei H, Shiao A, Liu C, Liu H, Yeh T, Chen S, & Lin Y. **2003**. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. *J Med Virol* 69: 82-90
 62. **Lolekha R**, Chokephaibulkit K, Yoksan S, Vanprapar N, Phongsamart W, & Chearskul S. **2004**. Diagnosis of dengue infection using various diagnostic tests in the early stage of illness. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub Health* 35: 391-395
 63. **Lanciotti R**, Calisher C, Gubler D, Chang G, & Vorndam A, **1992**. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 545-551
 64. **Innis, B.L**, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayaborn S, Puttisri P, & Hoke C.H, **1989**. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 40 :418-427
 65. **Kuno G**, Gomez I, & Gubler D. **1991**. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods* 33:101-113
 66. **Vorndam V**, & Kuno G. **1997**. Laboratory diagnosis of dengue virus infections, p. 313-333. In D. J. Gubler and G. Kuno (ed.), *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. CAB International, New York, N.Y.
 67. **Lapphraa K**, Sangcharaswichaia A, Chokephaibulkita K, Tiengrima S, Piriyaakarnsakula W, Chakorna T, Yoksanb S, Wattanamongkolsila L & Thamlikitkula V. **2008**. Evaluation of an NS1 antigen detection for diagnosis of

- acute dengue infection in patients with acute febrile. *Int J Diagn Microbiol Infect Dis* 60:387-391
68. **QIAGEN. 2003.** The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5th ed. Pág. 11-13, 18-19, 58
 69. **Franken K, Hiemstra H, Meijgaarden K, Subronto Y, Hartigh J, Ottenhoff T, & Drijfhout J. 2000.** Purification of His-Tagged Proteins by Immobilized Chelate Affinity Chromatography: The Benefits from the Use of Organic Solvent. *Prot Exp Purif* 18: 95-99
 70. **Stevens R. 2000.** Designing of High-throughput Methods of Protein Production for structural Biology. *Struct* 8 : R117-R185
 71. **Yokahama S. 2003.** Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr Opin Chem Biol* 7: 39-43
 72. **Singleton P. 1999.** Bacterias en biología, Biotecnología y Medicina. Ed. Acribia S.A. España. Pág. 145-146,188-191, 240-243
 73. **Watson J & Gilman M, Witkowski J, Zoller M. 1992.** W.H. Freeman and Company. New York. pág 27- 28
 74. **Lodish H, Berck A, Matsudaria P, Kaiser C, Krieger M, Scout M, Zipursky S, & Darnell J. 2004.** Molecular cell biology. 5^a ed. W.H. Freeman and company. New York U.S.A. pág. 361-364
 75. **Snyder L, & Champness W. 1997.** Molecular Genetics of bacteria. American Society for Microbiology Press. Washington, U.S.A. pág 108-109
 76. **Watson J. 2005.** Biología Molecular del Gen. 5^a ed. Ed. Panamericana. España. pág.732-733
 77. **Day M. 1982.** Plasmids. The Institute of Biology's Studies in Biology. Publishers Edward Arnold. London, England. pág 1-2
 78. **Berg J, Tymoczko J & Clarke N. 2003.** Bioquímica. 5^a ed. Ed. Reverte S.A. España. pág. 152
 79. **Boezi J, & Dean B. 1961.** Kinetic Studies OF/3-Galactosidase Induction. *Biophys J* 8: 639-647
 80. **Baneyx F, & Mujacic M. 2004.** Review. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22 :1399-1408
 81. **Schweder T, Lin H, Jurgen B, Breitenstein A, Riemschneider S, Khalameyzer V, Gupta A, Buttner K, & Neubauer P. 2002.** Role of General Stress Response During Strong Overexpression of a Heterologous Gene in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 151-159
 82. **Carrió M, Corchero J, & Villaverde A. 1998.** Dynamics of *in vivo* protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 169: 9–15
 83. **Strandberg L, & Enfors S. 1991.** Factors Influencing Inclusion Body Formation in the Production of a Fused Protein in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 57: 1669-1674
 84. **Carrió M, & Villaverde A. 2003.** A Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Lett* 537: 215–221
 85. **Schein C, & Noteborn M. 1988.** Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperatures. *Bio/Technol* 6: 291–294
 86. **Singh S, & Panda A. 2005.** Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *J Biosci Bioeng* 99: 303- 310
 87. **Vallejo L, & Rinas U. 2004.** Review. Strategies for the Recovery of Active Proteins Through Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *Microl Cell Fact* 3:11 doi: 10.1186/1475-2859-3-11

88. **Invitrogen. 2006.** TOPO TA Cloning® Five-minute cloning of *Taq* polymerase-amplified PCR products. User manual. Invitrogen Corporation. Toll Free: 800 955 6288. pág. 1-2, 4
89. **Lin J, Smith M, Jesse J, & Bloom F. 1992.** DH11S: An *Escherichia coli* strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vectors. *BioTech* 12:718–721
90. **Life Technologies.** pPROEx.HT Prokaryotic Expression System. Hoja técnica. Catálogo 10711-018
91. **Eastman E, & Durland R. 1998.** Manufacturing and quality control of plasmid-based gene expression systems. *Adv Drug Deliv Rev* 30: 33-48
92. **Ow D, Yap M, & Oh S. 2009.** Enhancement of plasmid DNA yields during fed-batch culture with a fruR knockout *Escherichia coli* strain. *Biotechnol Appl Biochem* 52: 53-59
93. **Taylor R, Walker D, & McInnes R. 1993.** E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nuc Acids Res* 21: 1677-1678
94. **Secretaría de Salud.** Subsecretaria de Prevención y Control de Enfermedades Coordinación de Vigilancia Epidemiológica. **2003.** Dengue y Dengue Hemorrágico (Guía práctica para su diagnóstico, tratamiento y manejo). México. pág 1, 5
95. **Gubler D, & Clark G. 1995.** Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Inf Dis* 1: 55-57
96. **Huang J, Huang J, Shyu R, Teng C, Lin Y, Kuo M, Yao C, & Shaio M. 2001.** High-Level Expression of Recombinant Dengue Viral NS-1 Protein and Its Potencial Use as a Diagnostic Antigen. *J Med Virol* 65: 553-560
97. **Chang H, Shyu H, Wang Y, Sun D, Shyu R, Tang S, & Huang Y. 2002.** Facilitation of cell adhesion by immobilized dengue viral nonstructural protein 1 (NS1): arginine-glycine-aspartic acid structural mimicry within the dengue viral NS1 antigen. *JID* 186:743-751
98. **Dipankar D, Sunundha M, & Mavanur R. 2009.** Super induction of dengue virus NS1 protein in E. coli. *Prot exp purific* 66: 66-72
99. **AnandaRao R, Swaminathan S, Fernando S, Jana A, & Khanna N. 2006.** Recombinant Multiepitope Protein for Early Detection of Dengue Infections. *Clin Vac Immunol* 13: 59-67
100. **Chan L, Young P, Bletchly C, Reid S. 2002.** Production of the baculovirus-expressed dengue virus glycoprotein NS1 can be improved dramatically with optimised regimes for fed-batch cultures and the addition of the insect moulting hormone, 20-Hydroxyecdysone. *J Virol Meth* 105: 87-98
101. **Zhou J, Tang Y, Fang D, Zhou J, Liang Y, Guo H, & Jiang L. 2006.** Secreted expression and purification of dengue 2 virus full-length nonstructural glycoprotein NS1 in *Pichia pastoris*. *Vir Gen* 33:27–32
102. **Noisakran S, Dechtawewat T, Rinkaewkanb P, Puttikhunt C, Kanjanahaluethai A, Kasinrerak W, Sittisombut N, Malasit P. 2007.** Characterization of dengue virus NS1 stably expressed in 293T cell lines. *J Virol Meth* 142:67-80
103. **Gubler D. 1998.** Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin Microbiol Rev* 11: 480-496
104. **Life technologies.** pPROEx.HT Prokaryotic Expression System. Hoja técnica. Catálogo 10711-018
105. **Rossi R, Montecucco A, Ciarrocchi G, & Biamonti G. 1997.** Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action. *Nuc Acid Res* 25: 2106–2113
106. **Cherepanov A, & De Vries S. 2002.** Dynamic mechanism of nick recognition by DNA ligase. *Eur J Biochem* 269: 5993–5999

107. **Chávez Y. 2008.** Expresión y purificación de los Dominios I, II, III y III de la proteína E de Dengue 2 en bacterias. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios superiores Zaragoza. pág. 52
108. **Middelberg A. 2002.** Preparative protein refolding. *T Biotech* 20: 437
109. **Kiefhaber T, Rudolph R, Kohler H, & Buchner J. 1991** Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnol* 9: 825-829
110. **Vasina J, & Baneyx F. 1997.** Expression of aggregation prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the *Escherichia coli* cspA and tac promoter systems. *Prot Expr Purif* 9: 211-218
111. **Chesshyre J, & Hipkiss A. 1989.** Low temperatures stabilize interferon α -2 against proteolysis in *Methylophilus methylotrophus* and *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotech* 31: 158-162
112. **Shaw M, & Ingraham J. 1967.** Synthesis of macromolecules by *Escherichia coli* near the minimal temperature for growth. *J Bacteriol* 94: 157-164
113. **Hiniker A, & Bardwell J. 2003.** Disulfide bond isomerization in prokaryotes. *Bioch* 42: 1179-1185
114. **Pryor M, & Wright P. 1993.** The effects of site-directed mutagenesis on the dimerization and secretion of the NS1 protein specified by dengue virus. *Virology* 194: 769-780
115. **Cregg J, & Higgins D. 1995.** Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Can J Bot* 73:91-97.
116. **Trimble R, Atkinson P, Tschopp J, Townsend R, & Maley F. 1991.** *J Biol Chem* 266: 22807-22817
117. **Goding J. 1996.** Monoclonal antibodies: Principles and Practice. Production and application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry and Immunology. Academic Press. 3th. Gran Bretaña. pág. 480-482
118. **Biolabs. 2007.** Catalog & Technical Reference 2007-08. New England Biolabs, Inc. U.S.A. pág. 24, 74
119. **Noisakran S & Perng G. 2008.** Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/ Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection. *Exp Biol Med* 233: 401-408

14.1 BASES DE DATOS Y ENLACES ELECTRONICOS

120. PAHO. <http://www.paho.org/english/ad/dpc/cd/dengue.htm>.; **Julio 2008.**
121. WHO DengueNet. <http://www.who.int/csr/disease/dengue/denguenet> ; **Julio 2008.**
122. Bio-Rad. http://www3.bio-rad.com/cmc_upload/Literature/inserts/72830_881040_GB.pdf ; **Agosto 2008**
123. Panbio diagnostics. <http://www.panbio.com/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=33> ; **Agosto 2008**
124. Invitrogen Corporation. 2009. tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pproexhtb.pdf ; **Marzo 2008.**
125. Base de datos del NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ; **Febrero 2008.**
126. Servidor ExPASy Proteomics Server <http://www.expasy.ch/tools/> ; **Marzo 2008.**
127. Servidor en línea: Biology WorkBench 3.2 **Julio 2008**

15. GLOSARIO

Anticuerpo: molécula sintetizada en respuesta a la estimulación con un antígeno específico; consiste de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas ⁽¹¹⁷⁾.

Antígeno: alguna sustancia la cual produce una respuesta inmune específica ⁽¹¹⁷⁾ que induce la formación de anticuerpos.

Clonación: método para obtener varias copias de un determinado gen (u otro fragmento de ADN), por ejemplo, para análisis de secuencias o para obtener grandes cantidades de un producto génico (producto codificado por el gen) ⁽⁷⁷⁾.

Competente: célula que posee la habilidad para captar ADN extracelular y que puede llegar a ser transformada dependiendo del estado fisiológico ⁽⁷⁵⁾.

Complemento: grupo de proteínas del plasma las cuales interactúan con los anticuerpos resultando en rompimiento de la célula, eliminación de antígenos y estimulación de la inflamación ⁽¹¹⁷⁾.

Cuerpos de inclusión: agregados insolubles de proteínas no plegadas o plegadas incorrectamente que a menudo se forman en el citoplasma durante la superproducción, estas se encuentran embebidas en una mezcla de varios tipos de proteínas de membrana, componentes de ribosomas y pequeñas cantidades de fosfolípidos y ácidos nucleicos ⁽⁷⁷⁾.

Desnaturalización: cambio en la conformación de una proteína hacia una forma que es diferente de la conformación nativa; puede ser parcial o completamente reversible; las proteínas pueden ser desnaturalizadas por muchas condiciones incluyendo calor, extremos de pH, modificación química, solventes orgánicos, urea y ciertos iones y detergentes ⁽¹¹⁷⁾.

Electroforesis: técnica de separación de moléculas que se basa en su movilidad en un campo eléctrico ⁽¹¹⁷⁾.

ELISA: Sistema de inmunoensayo enzimático donde un antígeno o anticuerpo se adsorben a una fase sólida (microplacas de poliestireno, o bien membrana de nitrocelulosa) sobre la cual se llevan a cabo las reacciones para la detección de alguno de los dos, utilizando anticuerpos conjugados a enzimas. Los anticuerpos conservan su capacidad de unión específica al antígeno, mientras la enzima es capaz de catalizar una reacción en la cual el sustrato se transforma generalmente en un producto de color evidenciando la presencia de la partícula que reconoce ⁽¹¹⁷⁾.

Enzima *BamHI*: enzima endonucleasa, obtenida del organismo *Bacillus aeurinolyticus* (IAM 1077), que reconoce y corta en la secuencia nucleotídica ⁽¹¹⁶⁾:



Enzima *XhoI*: enzima endonucleasa, obtenida del organismo *Xanthomonas holcicola* (ATCC 13461), que reconoce y corta en la secuencia nucleotídica ⁽¹¹⁸⁾:



Epitopo: regiones discretas de un antígeno o químicamente definido como determinante antigénico, ⁽¹¹⁷⁾.

Expresión: síntesis y transcripción en ARN de la información genética contenida en los genes, que en la mayoría de los genes se traduce en proteínas ⁽⁷⁸⁾.

Gen regulador: gen que codifica para una proteína que se pega al operador, obstruyendo al promotor (y por lo tanto a la transcripción), del gen estructural. Cuando se remueve la proteína represora, puede producirse la transcripción ⁽⁷⁸⁾.

Inmunoglobulinas (Ig): moléculas solubles con actividad de anticuerpo, es decir se combinan específicamente con un determinado epítipo del antígeno que indujo su producción ⁽¹¹⁷⁾.

Inmunogénico: se refiere a la capacidad de una sustancia o molécula para inducir una respuesta inmune adaptativa ⁽¹¹⁷⁾.

Nativa: conformación en la cual la proteína es sintetizada en su forma mas estable, ó como existe naturalmente ó es biológicamente activa ⁽¹¹⁷⁾.

Operador *lac*: región del DNA localizada entre el promotor y el comienzo de los genes estructurales, que es reconocida por la proteína represora *Lac I*. Gen represor (*lac I*): codifica la proteína represora *Lac I*, que reconoce la región operadora, donde se une e impide la unión de la ARN polimerasa y así la transcripción de los genes estructurales ⁽⁷⁸⁾.

Operón: grupos de genes que codifican para proteínas relacionadas agrupados en una unidad. Consiste en: un operador, un promotor, un regulador y un gen estructural ⁽⁷⁸⁾.

Plásmido: Molécula de ADN circular relativamente pequeña capaz de auto replicarse así misma al incorporarse dentro de una célula ⁽¹¹⁷⁾.

Promotor: región del DNA que antecede a los genes estructurales y que reconoce la ARN polimerasa para llevar a cabo la transcripción ⁽⁷⁸⁾.

Replicones: elementos extracromosómicos replicables como unidades genéticas discretas; Ejem. plásmidos y bacteriófagos. En general son de menor tamaño que el cromosoma bacteriano entre 5 a varias decenas de kb ⁽⁷³⁻⁷⁵⁾.

Vector (1): organismo que sirve como un hospedero biológico que actúa como un vehículo transmisor, en donde los agentes patógenos pueden ser transmitidos a un nuevo hospedero. En algunos casos se requiere que el microorganismo patógeno se multiplique en gran cantidad dentro del vector y en ocasiones no es necesario (ejem. vectores son algunos artrópodos como los mosquitos y las garrapatas) ⁽¹¹⁹⁾.

Vector (2): moléculas que pueden portar genes y tienen la capacidad de replicarse dentro de una célula ⁽⁷⁷⁾.

Western Blot (Inmunoblot): Técnica electroforética en la cual las proteínas son separadas en un gel de poliacrilamida, y entonces se transfieren a una membrana (usualmente nitrocelulosa) y es entonces probada con anticuerpos dirigidos contra un antígeno particular ⁽¹¹⁷⁾.