



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE DEPARTAMENTO CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

“Obtención de la proteína paraflagelar recombinante de *Trypanosoma vivax* mediante clonación y expresión en *Escherichia coli* BL21 (DE3)”

Autor: Bedoya Paez, Fausto Vinicio

Directora: Chávez Larrea, María Augusta M.Sc.

Sangolquí, agosto del 2022

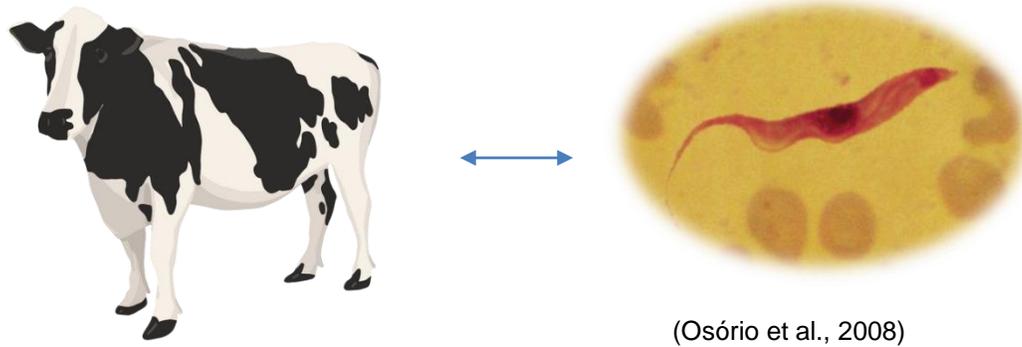


Contenidos

- Introducción
- Materiales y Métodos
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones



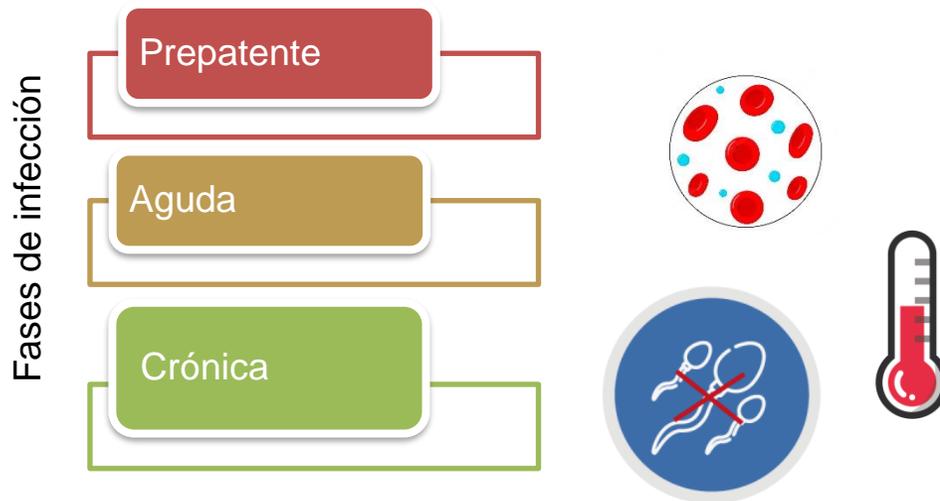
Tripanosomosis Bovina



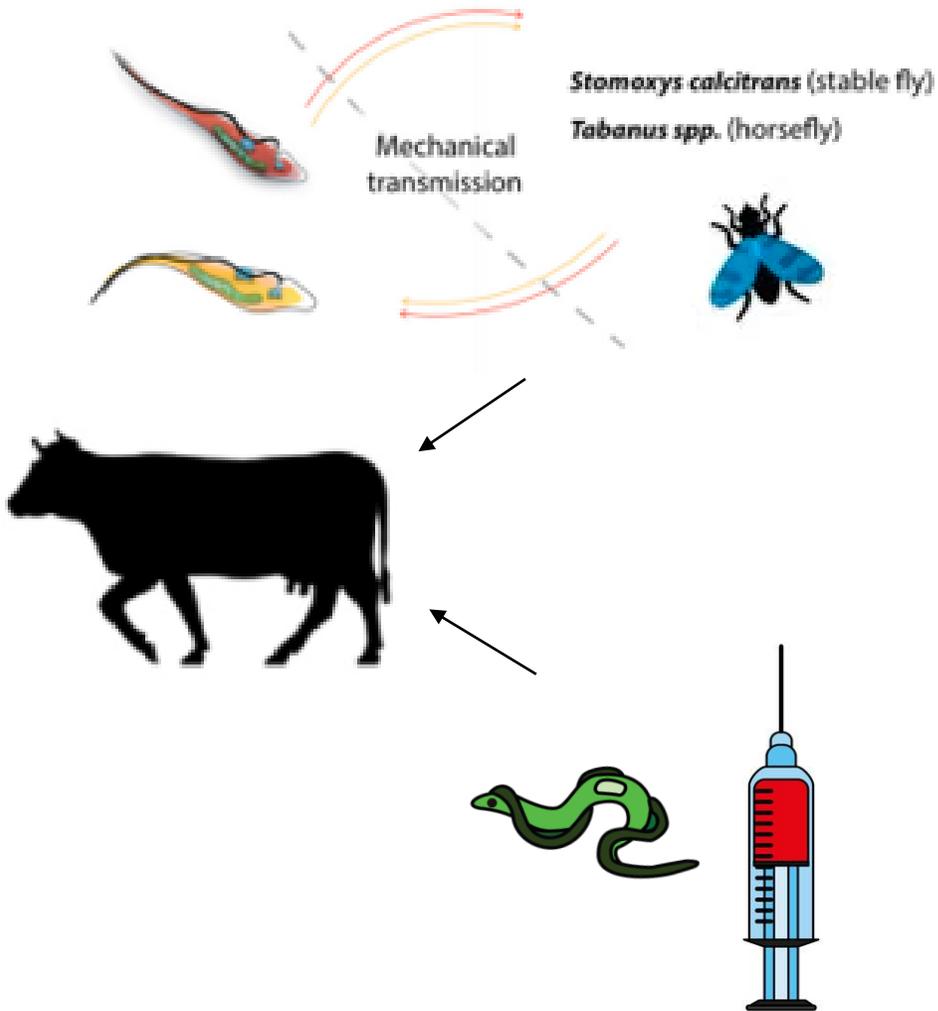
Distribución geográfica e impacto económico



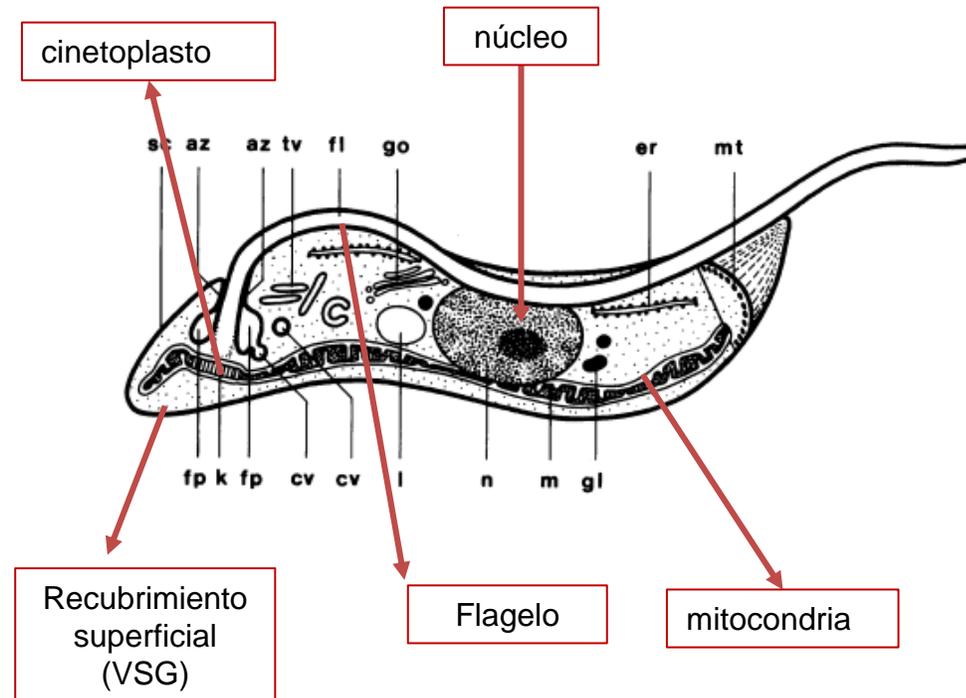
Sintomatología y fases de la infección



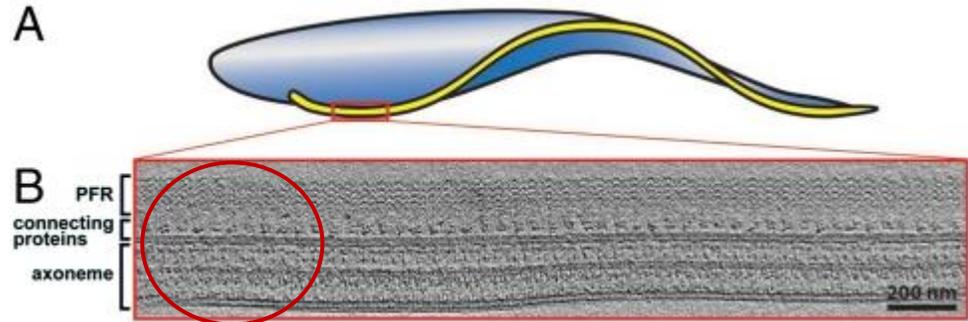
Transmisión



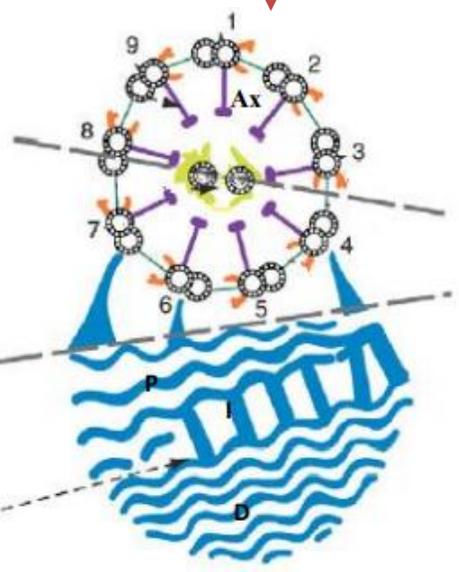
Estructura subcelular de *Trypanosoma vivax*



Proteínas paraflagelares



(Koyfman et al., 2011)

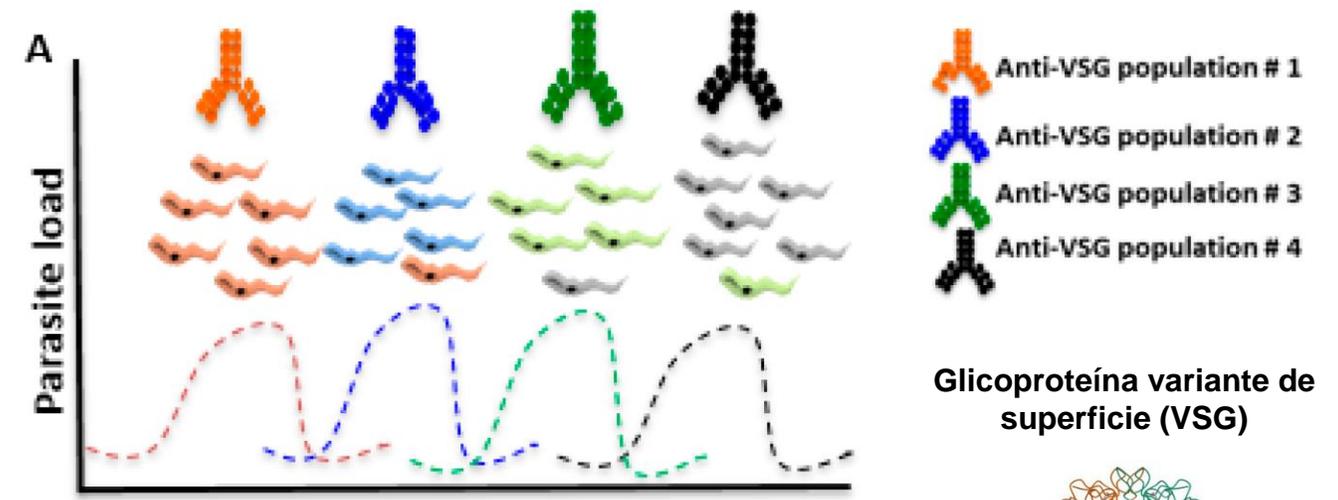


PFR1 y PFR2

Antigénicas e inmunogénicas



Evasión de la respuesta inmunitaria

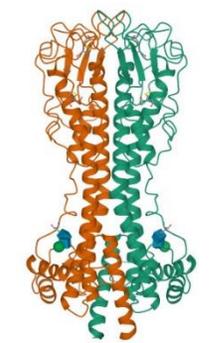


Course of infection

(Moreno et al., 2019)

- Anti-VSG population # 1
- Anti-VSG population # 2
- Anti-VSG population # 3
- Anti-VSG population # 4

Glicoproteína variante de superficie (VSG)



(Freymann et al., 1990)

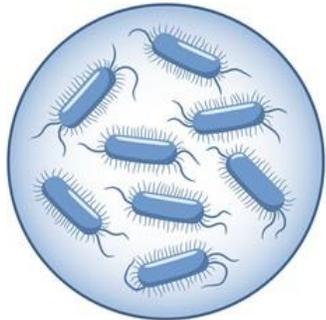
(Abdille et al., 2008) (Saravia et al., 2005) (Bertiaux et al., 2018)



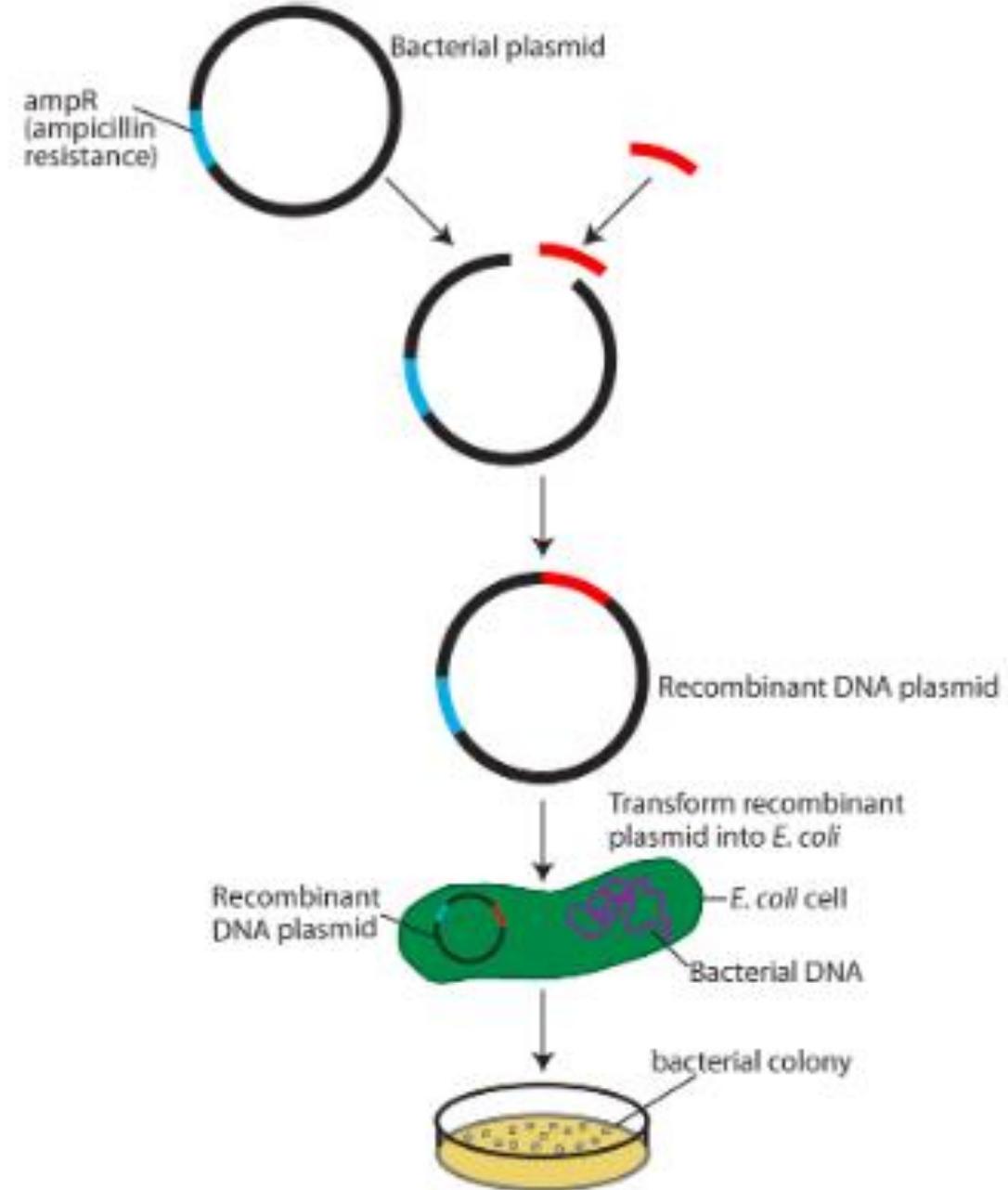
Vectores de clonación



Huéspedes de expresión



- ✓ Genética y bioquímica bien conocidas
- ✓ Rápido crecimiento
- ✓ Buena productividad
- ✓ Costos bajos



Objetivo general

Obtener la proteína paraflagelar recombinante de *Trypanosoma vivax* mediante clonación y expresión en *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Objetivos específicos

- Estandarizar un ensayo PCR para la amplificación del gen que codifica la proteína paraflagelar de *Trypanosoma vivax*.
- Expresar la proteína paraflagelar recombinante en bacterias *Escherichia coli* BL21 (DE3) transformadas con el gen que la codifica.
- Purificar la proteína paraflagelar recombinante mediante cromatografía de afinidad en columnas de níquel.

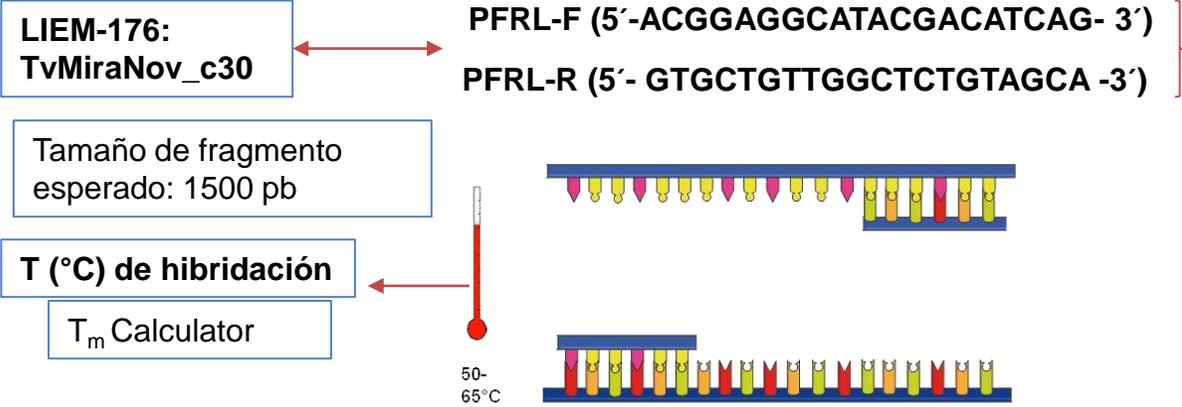


Hipótesis

La proteína paraflagelar recombinante de *Trypanosoma vivax* se expresa en bacterias transformadas de *Escherichia coli* BL21 (DE3).



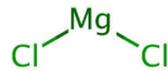
Estandarización de la PFRL-PCR



Variables analizadas



Temperatura de hibridación (58-68 °C)



Concentración de magnesio (1,5-2,5 mM)

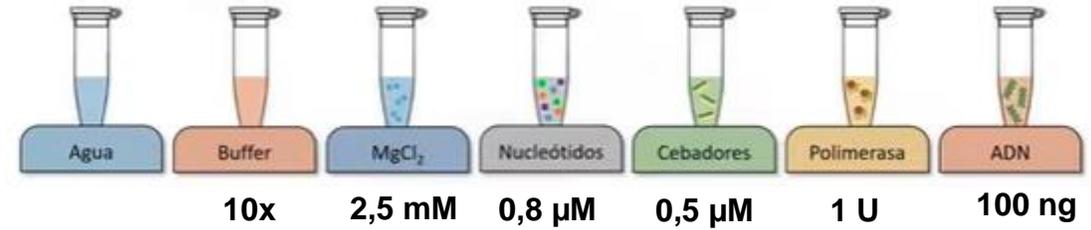


Concentración de enzima Taq polimerasa (0,5-1 U)



Concentración de cebadores (0,2-0,5 μM)

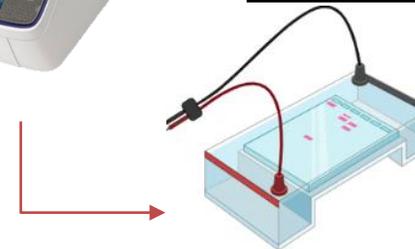
Concentraciones iniciales de reactivos



Condiciones de la reacción térmica

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Hibridación	58-68	1	35
Extensión	72	2	35
Extensión final	72	1	1
Mantenimiento	4	∞	-

ProFlex PCR System (Applied Biosystems, USA).



Gel de agarosa al 0,8 %, 1h, 120 V

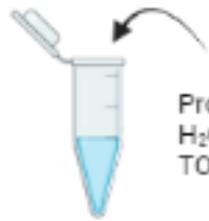
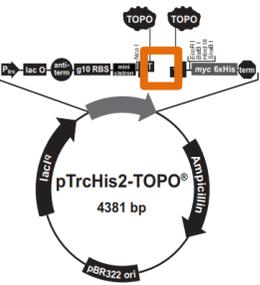


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Expresión de la proteína PFR Clonación del fragmento de interés

Materiales y métodos

Ligación



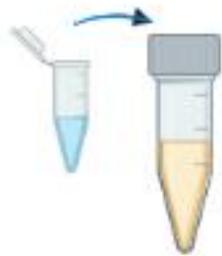
Producto PCR 2 μ l
H₂O estéril 2 μ l
TOPO® vector 1 μ l

Se mezcló cuidadosamente

Se incubó a 25 °C por 5 minutos



Transformación



Se agregó 2 μ l de ligación en un vial - *E. coli* JM109



30 min



Choque térmico 42 °C, 30s



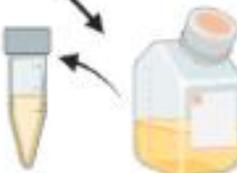
Se incubó a 37 °C toda la noche

Agar LB/
Ampicilina 50 μ g/
ml y 25 mM de glucosa



Se incubó a 37 °C, 1h, 250 rpm

250 μ l de medio SOC



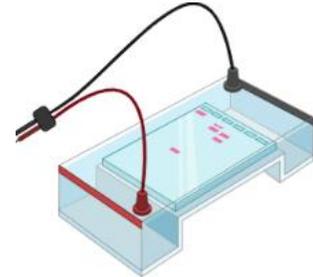
Extracción de plásmido -
Column-Pure Plasmid
Miniprep Kit



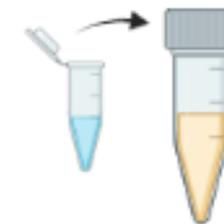
Análisis por enzimas de restricción (RFLP)

EcoRV

Dos fragmentos
de 4750 y 1120
pb



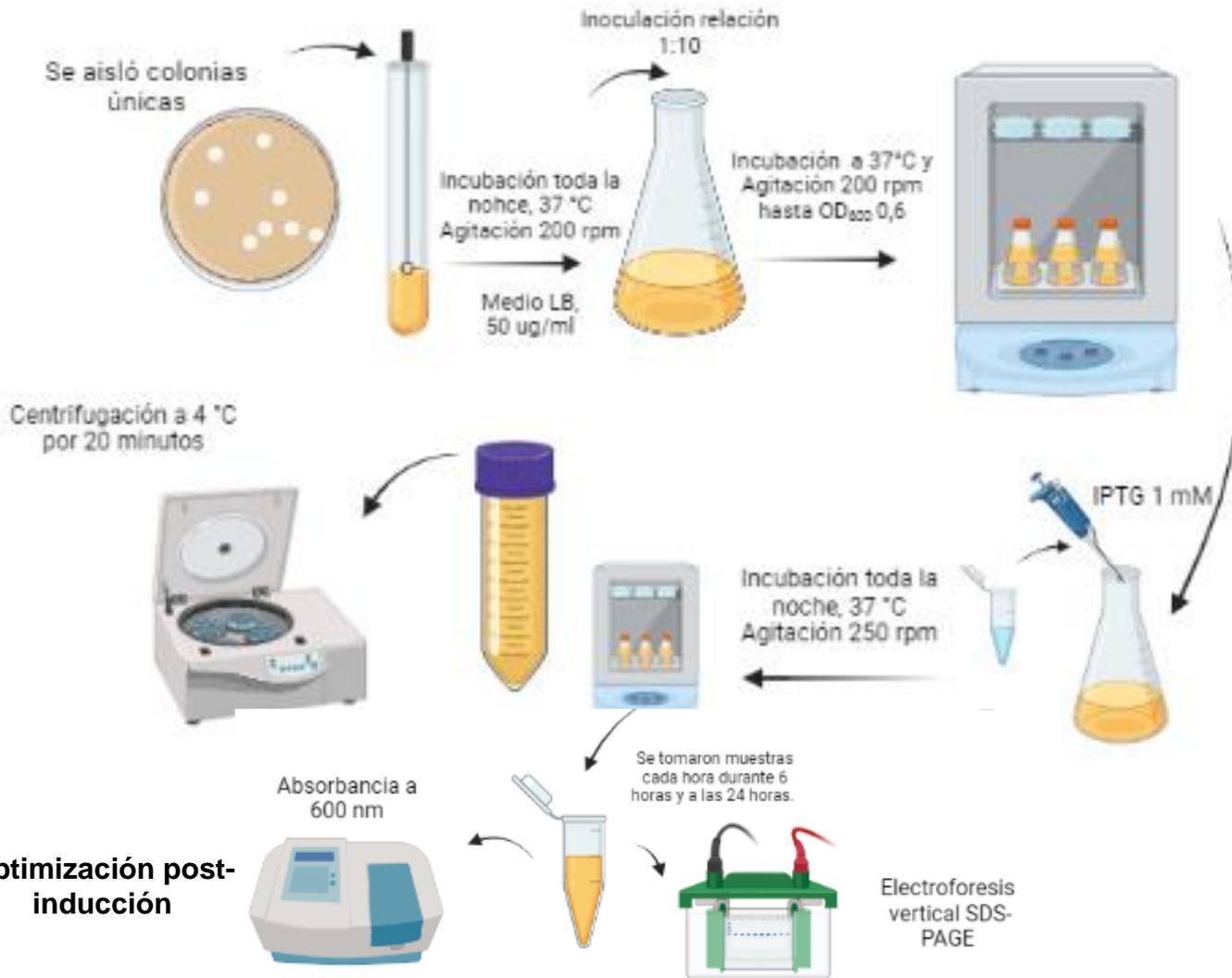
Transformación bacterias de expresión *E. coli* BL21



- 10 ng ADN (5 μ l)
- Incubación en hielo 10 min
- Choque térmico 50 s
- Agitación 225 rpm.

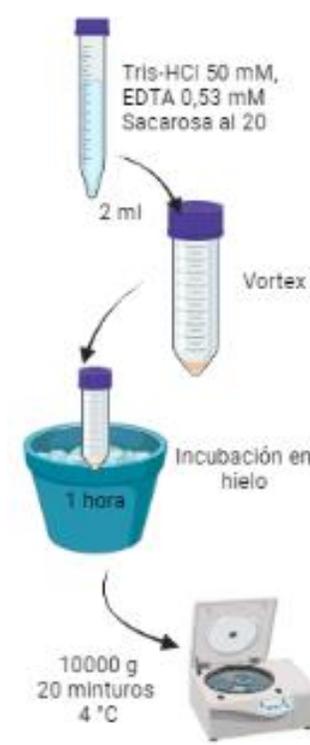


ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Prueba de lisis bacteriana

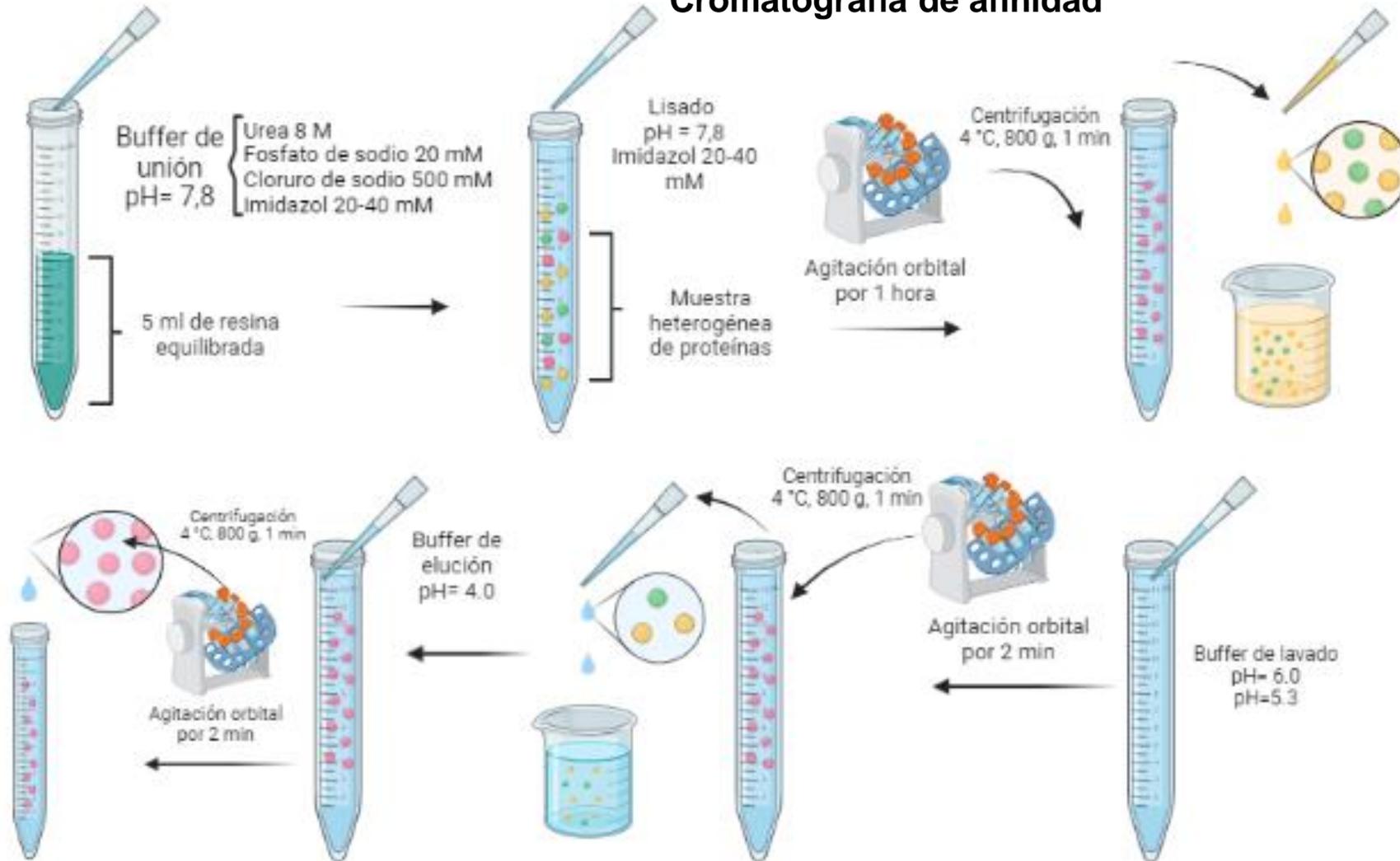
TES



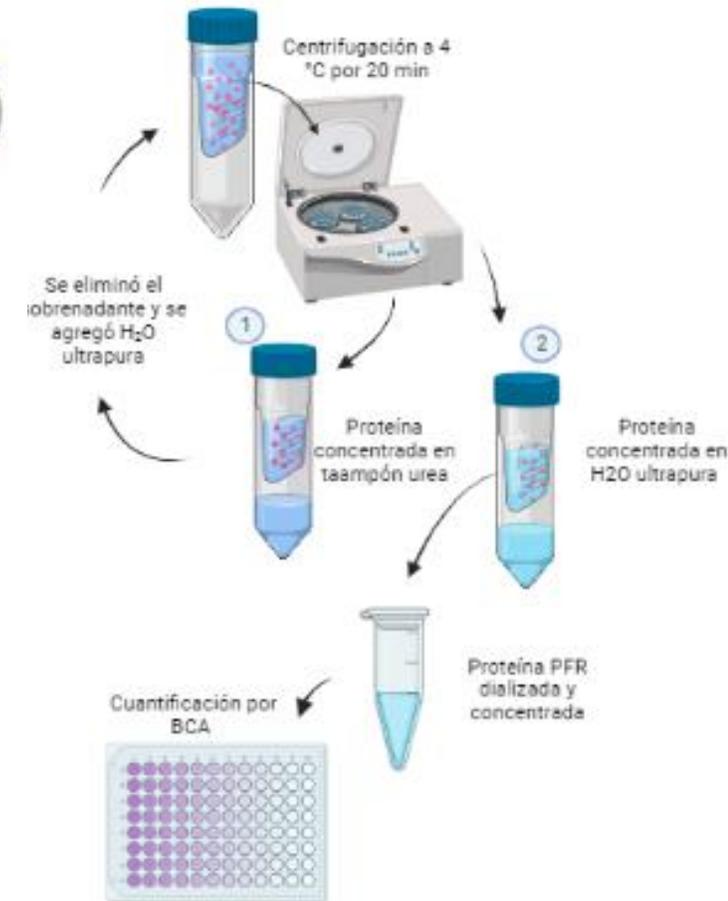
UREA

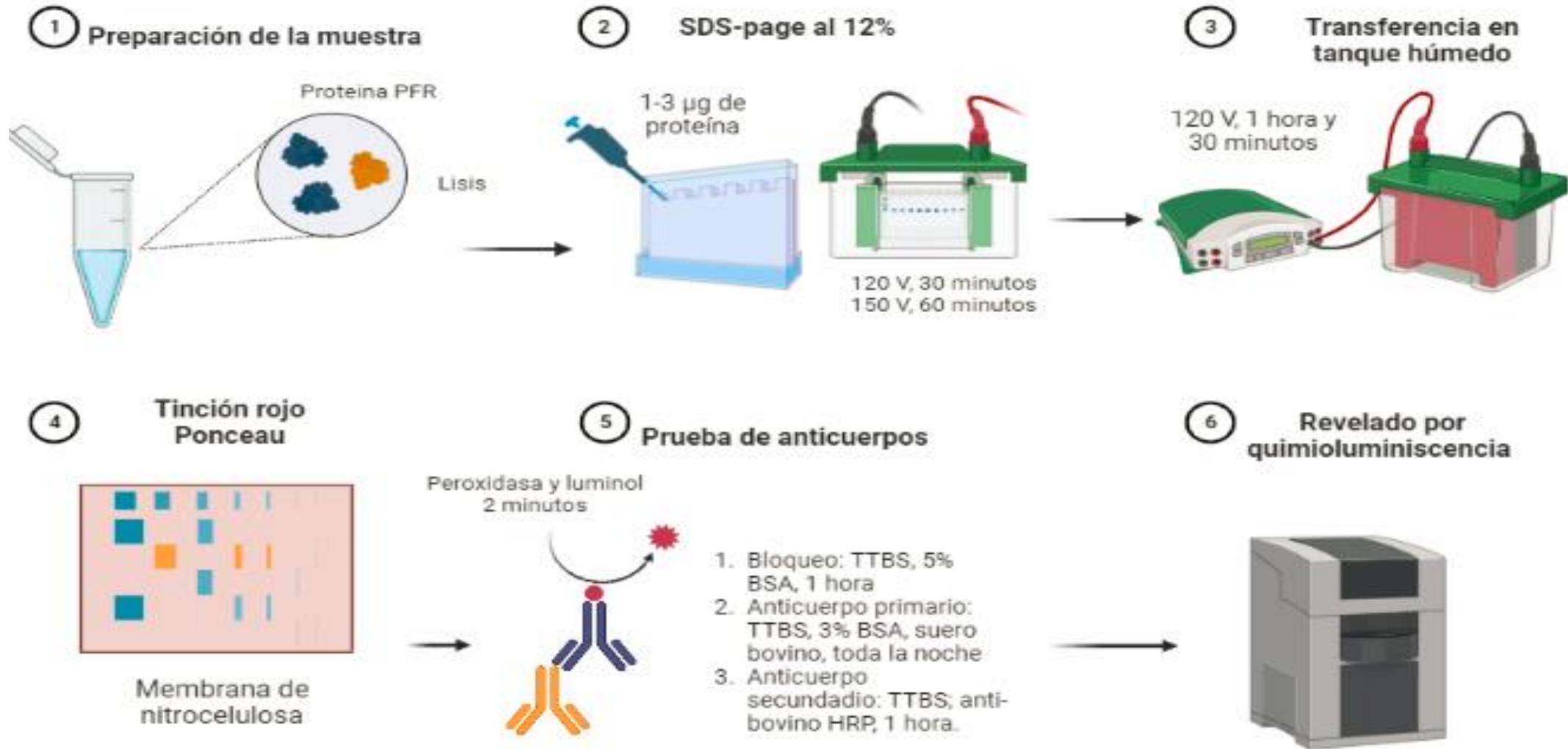


Cromatografía de afinidad



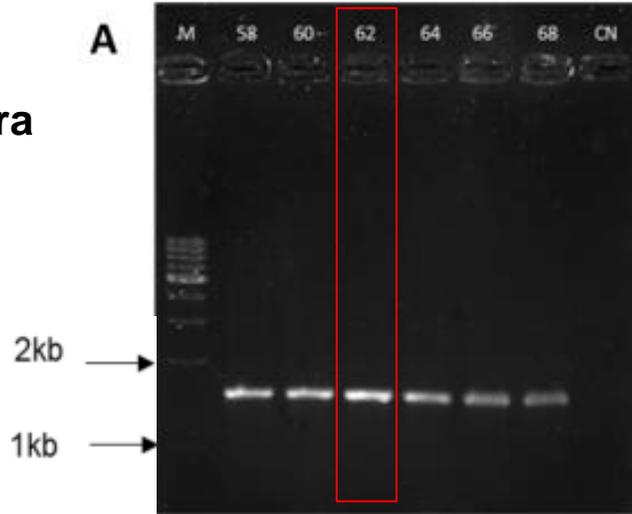
Diálisis y concentración





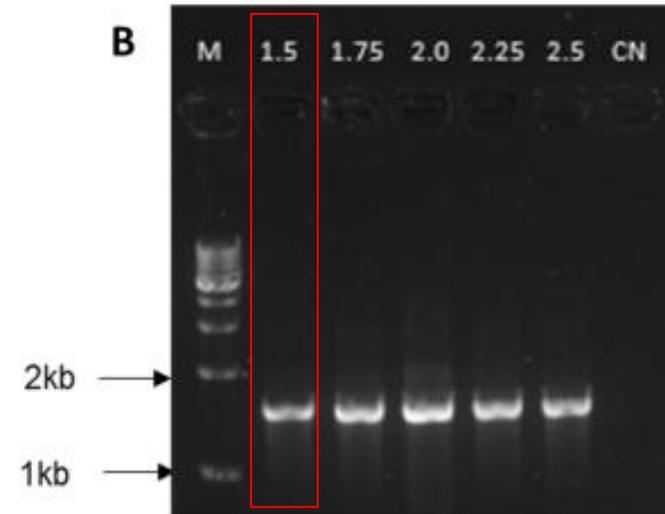
Gradiente de temperatura

La temperatura de 62 °C presentó mayor intensidad



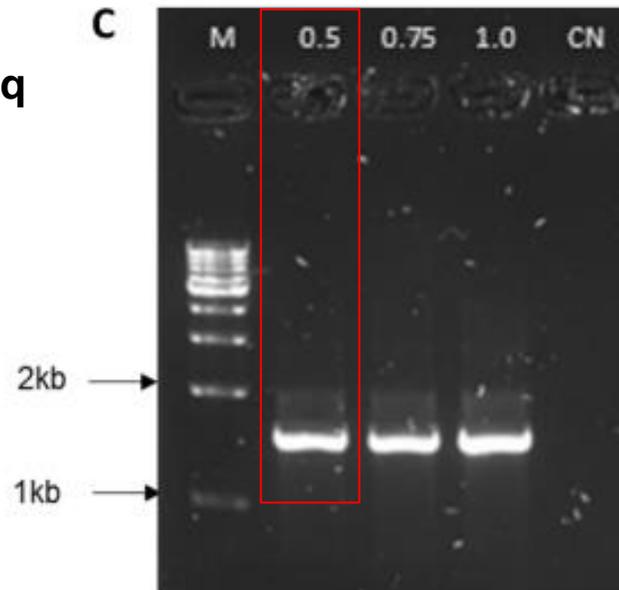
Gradiente de magnesio

Se seleccionó la concentración de 1,5 mM



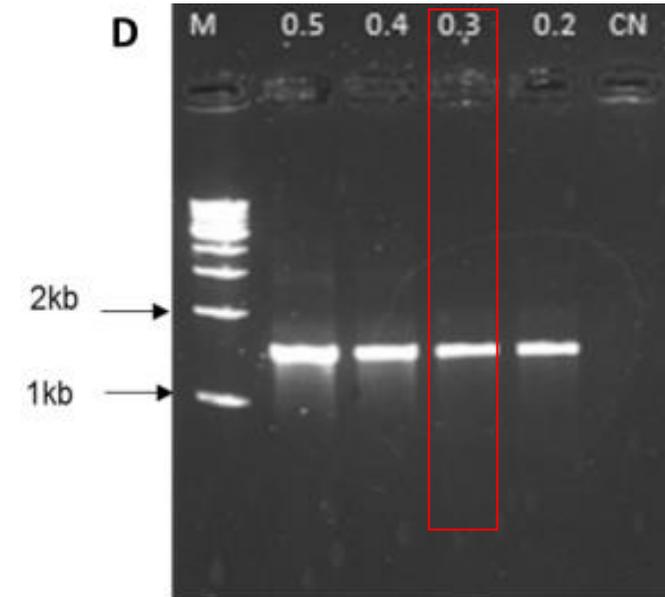
Gradiente de enzima Taq polimerasa

Se seleccionó la concentración de 0,5 U

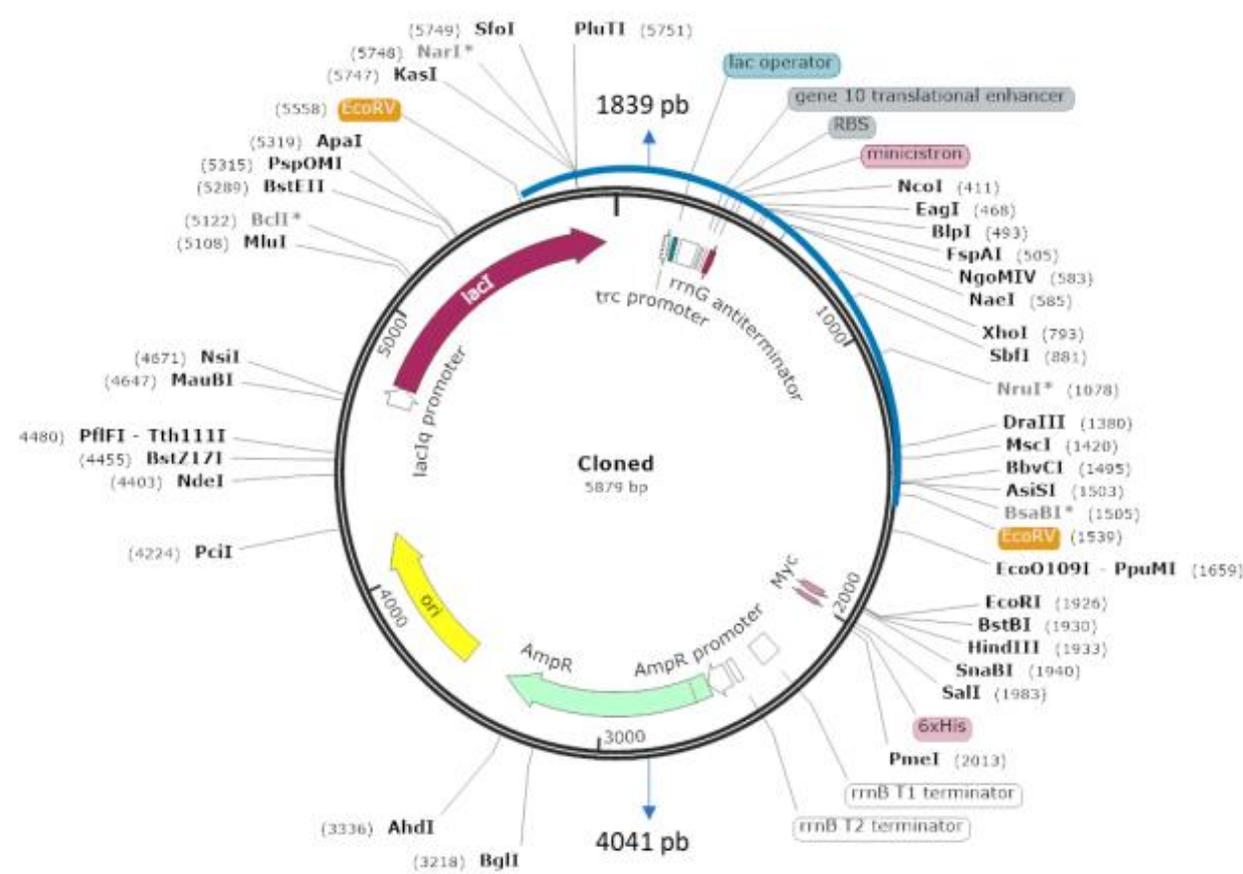
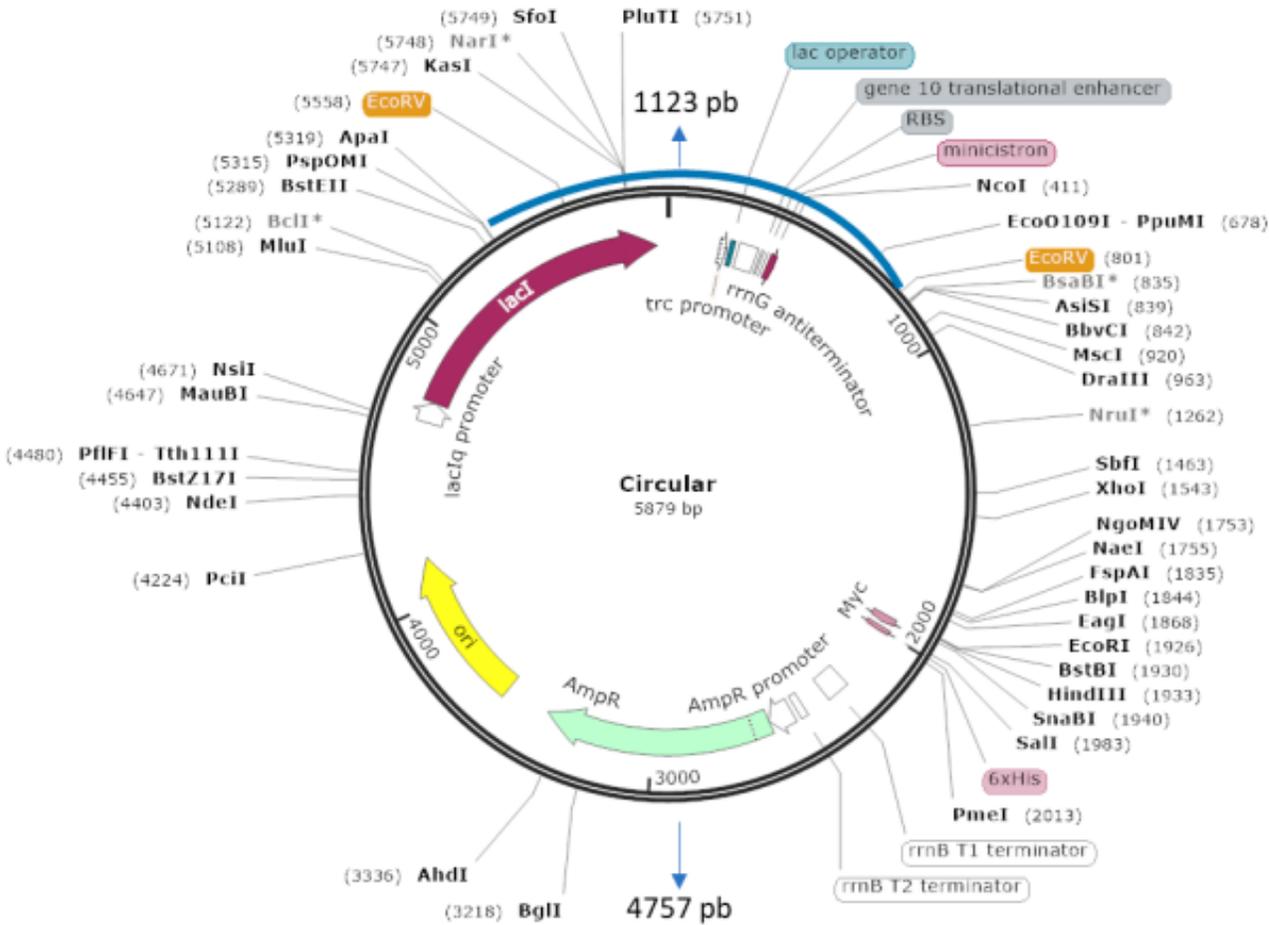


Gradiente de cebadores

Se seleccionó la concentración de 0,3 μM



Clonación *in silico*

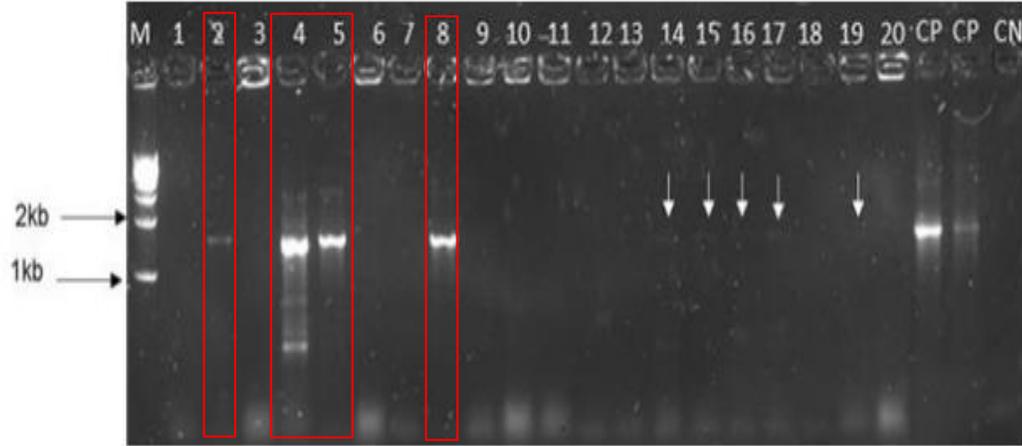


Expresión de la proteína PFR

Clonación en el vector de expresión

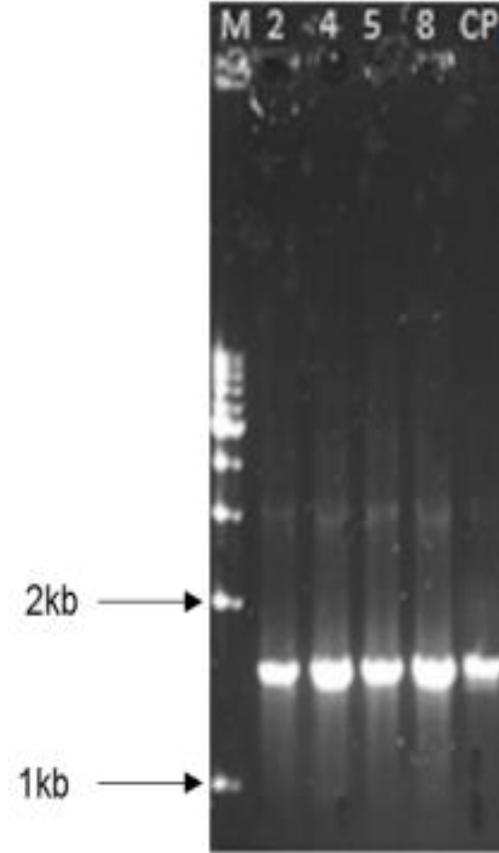
Resultados y discusión

PFRL-PCR colony



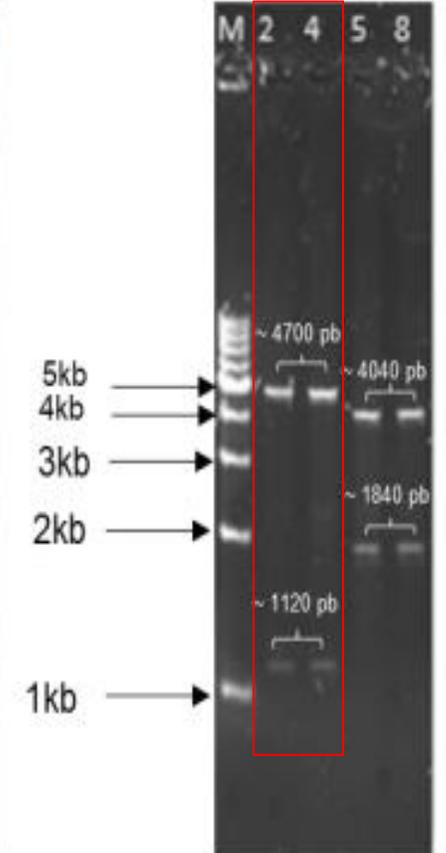
PFRL-PCR de plásmidos

A

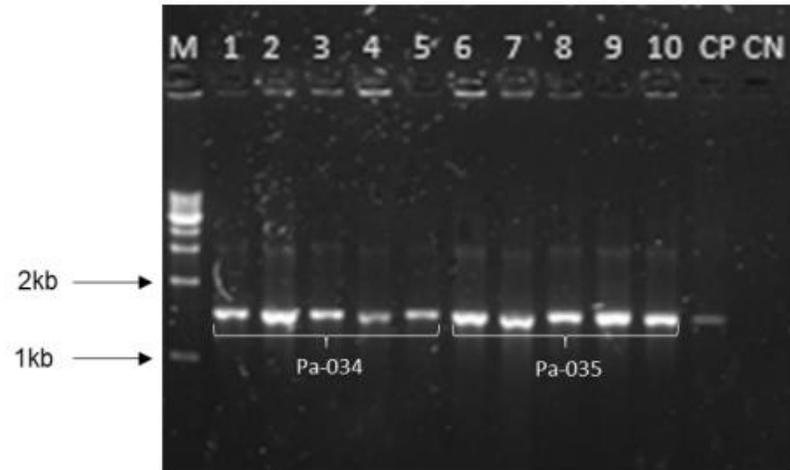


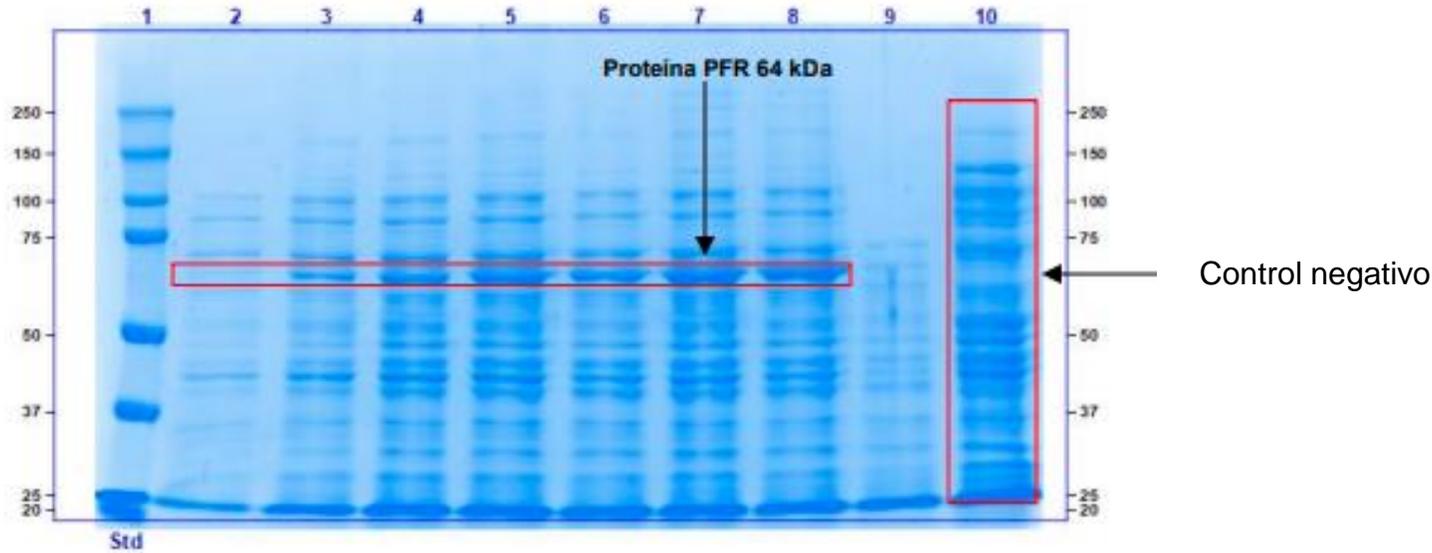
Análisis RFLP

B

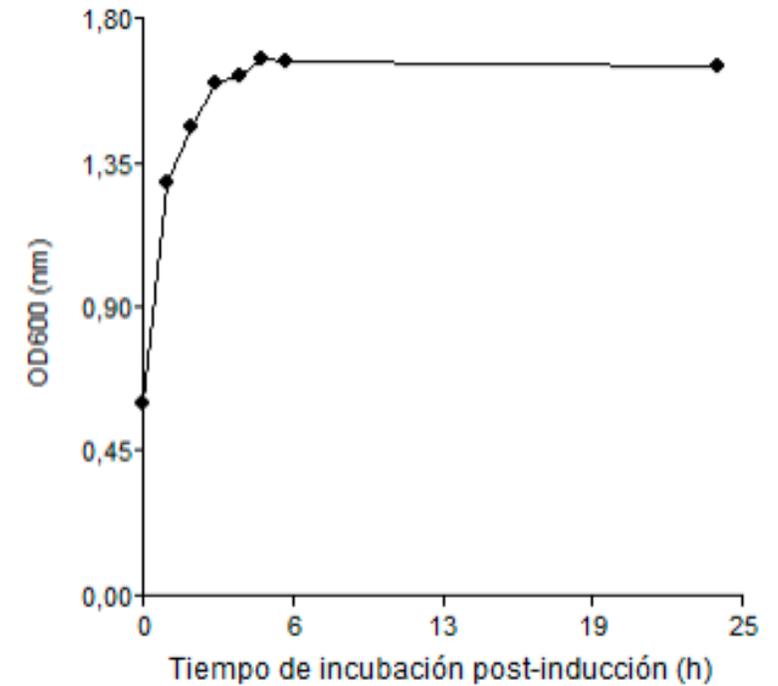


Transformación de bacterias de expresión *E. coli* BL21





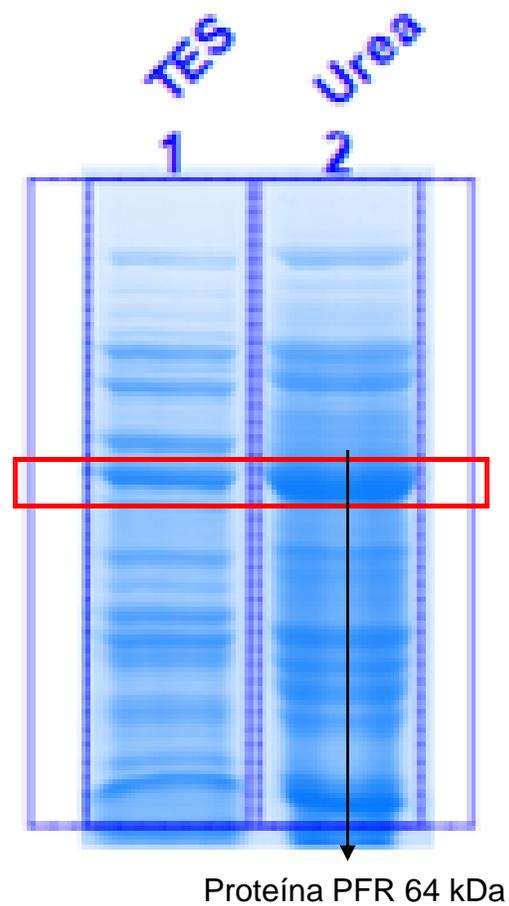
Densidad celular post-inducción de expresión vs Tiempo de incubación



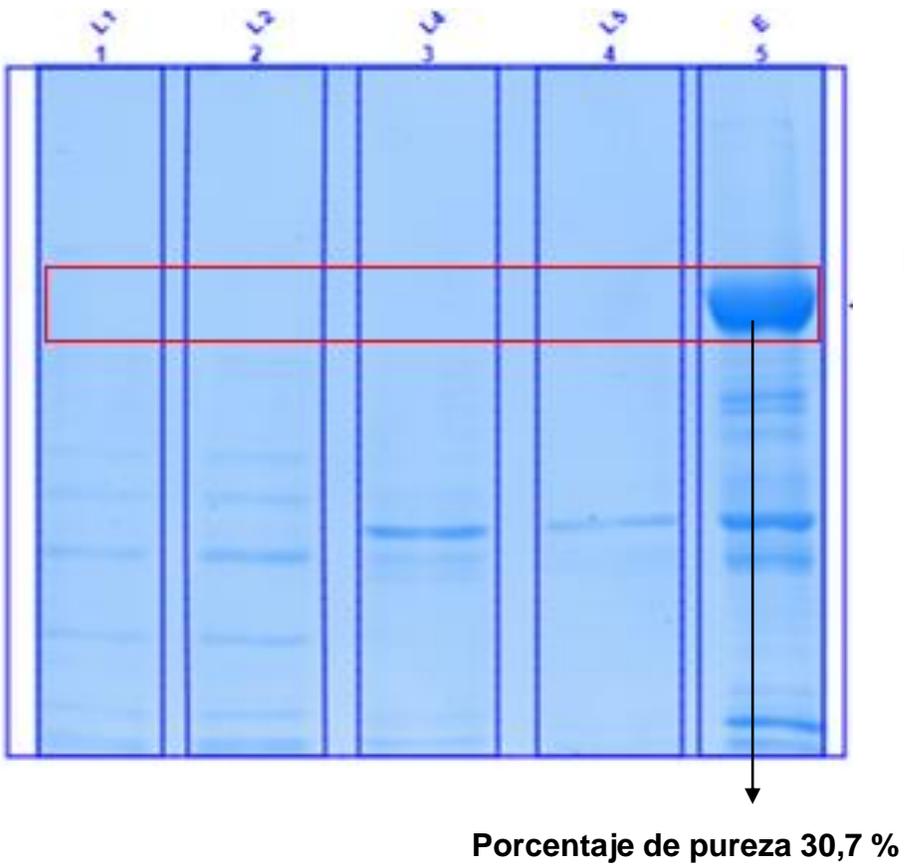
Efecto del crecimiento post-inducción sobre la densidad celular y la cantidad relativa de proteína PFR.

Tiempo transcurrido post-inducción (h)	Densidad celular post-inducción (OD ₆₀₀)	Cantidad relativa de la banda
0	0,6	-
1	1,285	0,580
2	1,461	1
3	1,598	1,366
4	1,621	1,051
5	1,672	1,553
6	1,661	1,3872
24	1,652	-

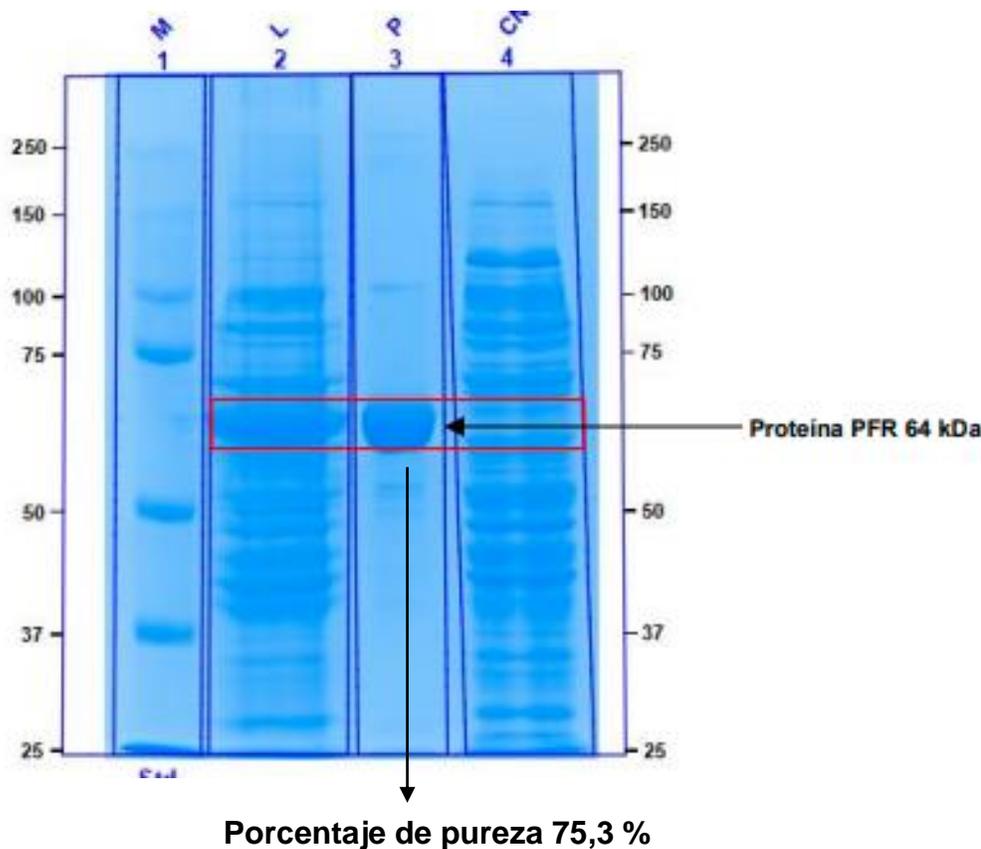
Prueba de lisis bacteriana



Proteína PFR purificada y concentrada

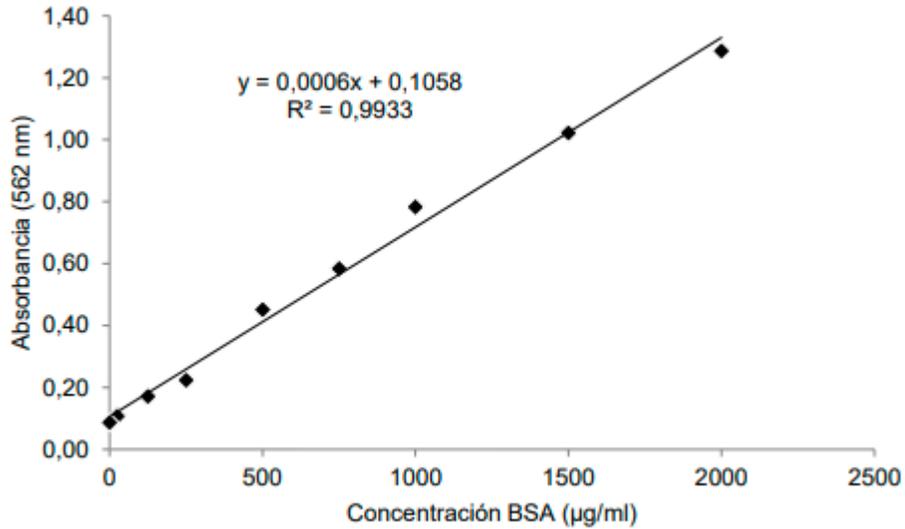


Proteína PFR purificada con 30 mM de imidazol y concentrada



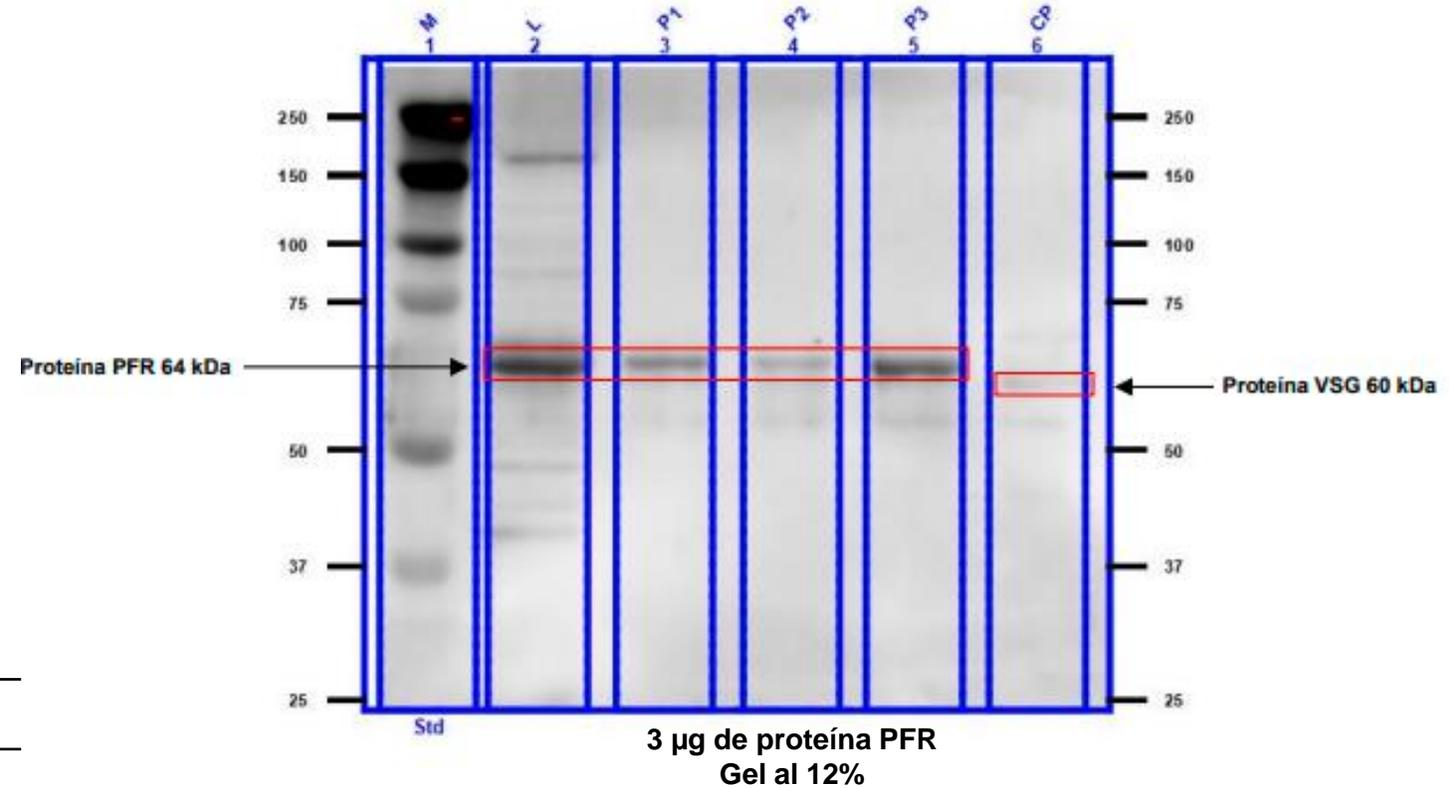
Resultados y discusión

Cuantificación de la proteína PFR



Etapa de purificación	Concentración proteína PFR (mg/ml)	Rendimiento (mg/ L de cultivo)
Cromatografía de afinidad	0,14 ± 0,01	28
Filtración por centrifugación	0,25 ± 0,01	1,5

Westernblot

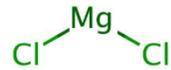


1. Estandarización de la PCR

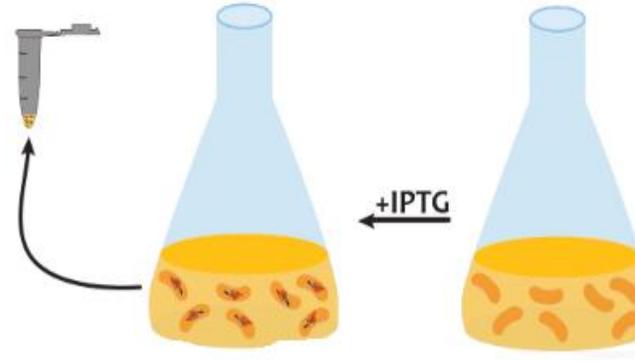
Temperatura de hibridación



Concentración de magnesio



2. Expresión de la proteína PFR

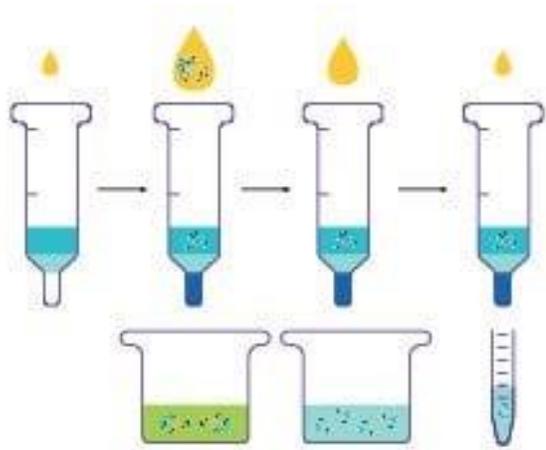


Proteína de 64 kDa

Cuerpos de inclusión

Tiempo óptimo post-inducción: 5 horas

3. Purificación de la proteína PFR



Porcentaje de purificación

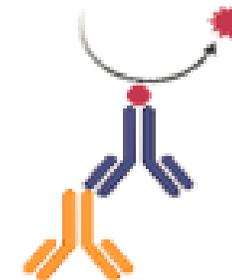
- 30,7% sin imidazol
- 75,3 % con 30 mM de imidazol

Rendimiento

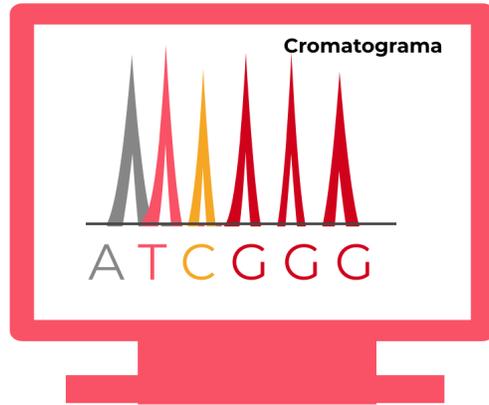
- 28 mg/L de cultivo
- 1,5 mg/L de cultivo

4. Ensayo inmunológico Westernblot

Peroxidasa y luminol
2 minutos

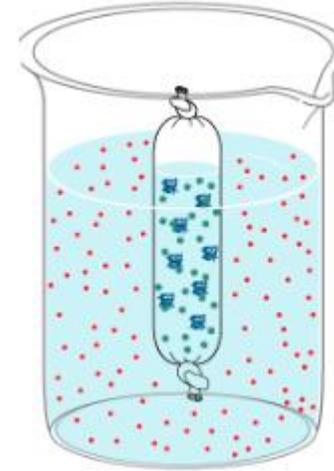
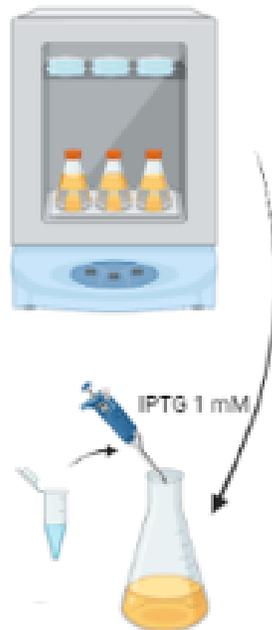


Se presume que la proteína PFR es antigénica



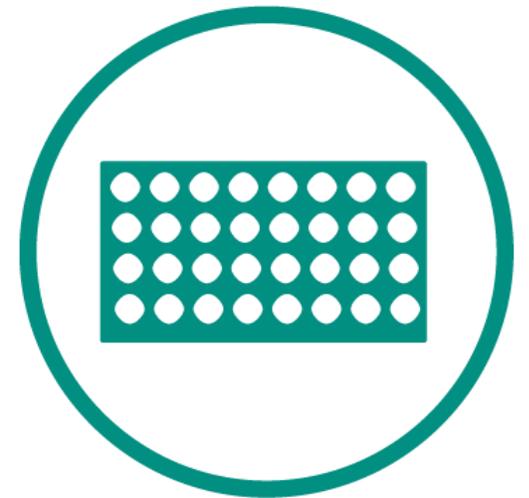
Secuenciación del plásmido

Estrategias de expresión



Diálisis

Estandarización de un ensayo ELISA cuantitativo



Agradecimientos



ACADÉMIE
DE RECHERCHE ET
D'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR



LIÈGE
université



Ing. Cristina Cholota
Ing. Michelle Yugcha
Dra. María Augusta Chávez Ph. D. (c)
Dr. Jorge Ron Ph. D.
Dr. Armando Reyna Ph. D.
Dra. Sarah Martin Solano Ph. D.
Dra. Marbel Torres Ph. D.
Laboratorio de Biotecnología Animal
Laboratorio de Inmunología y Virología

Familia y amigos

El trabajo de titulación fue realizado dentro del marco de actividades del proyecto “Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y sensibilización, diagnóstico y desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y tripanosomosis en Ecuador (BruTryp)”, financiado por la Academia de Investigación y Enseñanza Superior - ARES de Bélgica.



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA