

Resumen

El proyecto de integración curricular va dirigido a la expresión y purificación de Spike (glicoproteína de SARS-CoV-2) mediante el sistema procariota *Escherichia coli* BL21, dado su uso terapéutico y de diagnóstico para tratar la Covid19, la bioproducción de Spike es necesaria hoy en día para uso investigativo de la mutación descontrolada del SARS-CoV-2. La expresión heteróloga comenzó con la clonación del plásmido pGBW-m4046865 en *E. coli* BL21 identificando las condiciones de cultivo óptimas para el desarrollo de la bacteria, posteriormente se realizaron ensayos de lisis celular para la extracción proteica y más adelante ser purificados mediante cromatografía de afinidad de níquel HisTrap y cromatografía de intercambio aniónico Sepharose Fast Flow. El medio adecuado para el crecimiento de *E. coli* BL21 recombinante fue Luria Bertani (LB) suplementado con 50ug/mL [Clor], 25 mM [Glu] a una temperatura de 37°C y agitación 210rpm, la inducción óptima se inició con un O.D 600 entre 0.5-0.6 a una concentración de IPTG de 0.5mM. La lisis celular se logró mediante el tampón 5%v/v (20mM TrisHCl, Triton X100 (1%v/v), 137mM NaCl, 50uM EDTA, pH7.4). Posteriormente, se aplicó cromatografía de intercambio aniónico (Sepharose Fast Flow) para eliminar trazas, residuos de lisis y ADN, seguidamente se purificó el producto por cromatografía de afinidad de níquel. Finalmente se expresó y purificó Spike con un tamaño de 62kDa en *E. coli* BL21 confirmando su presencia mediante SDS-PAGE a una concentración final de 2.53mg/mL. El proyecto es el inicio de una prueba de diagnóstico para detectar SARS-CoV-2, donde aún se pretende estandarizar un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima indirecto (iELISA), por ende, se prevé analizar los resultados con otros métodos como pruebas de caracterización de cuantificación (Bradford o BSA), Western Blot, además se puede determinar la inmunogenicidad de Spike en modelos animales.

Palabras clave: Spike, *Escherichia coli* BL21, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico, SDS-PAGE.

Abstract

The integration project is focused at the expression and purification of Spike (SARS-CoV-2 glycoprotein) using the prokaryotic system *Escherichia coli* BL21, Spike is essential for therapeutic and diagnostic use to treat Covid19, nowadays the bioproduction of Spike is necessary for research use of the uncontrolled mutation of SARS-CoV-2. Heterologous expression began with the cloning of plasmid pGBW-m4046865 at *E. coli* BL21, identifying the optimal culture conditions for bacterial development, then cell lysis assays were performed for protein extraction and further purification by HisTrap nickel affinity chromatography and Sepharose Fast Flow anion exchange chromatography. The appropriate medium for the growth of *E. coli* BL21 recombinant was Luria Bertani (LB) supplemented with 50ug/mL [Chlor], 25 mM [Glu] at a temperature of 37°C and 210rpm agitation, the appropriate induction was initiated with an O.D 600 between 0.5-0.6 at with 0.5mM [IPTG]. Cell lysis was performed using 5%v/v buffer (20mM TrisHCl, Triton X100 (1%v/v), 137mM NaCl, 50uM EDTA, pH7.4). Afterward, anion exchange chromatography (Sepharose Fast Flow) was applied to remove traces, lysis residues and DNA, then the product was purified by nickel affinity chromatography. Finally, Spike was expressed and purified with a size of 62kDa in *E. coli* BL21 confirming its presence by SDS-PAGE at a final concentration of 2.53mg/mL. The project is the beginning of a diagnostic test to detect SARS-CoV-2, where it is still intended to standardize an indirect enzyme-linked immunoadsorption assay (iELISA), therefore, it is planned to analyze the results with other methods such as quantification characterization tests (Bradford or BSA), Western Blot, and also to determine the immunogenicity of Spike in animal models.

Keywords: Spike, *Escherichia coli* BL21, affinity chromatography, anion exchange chromatography, SDS-PAGE.