



Obtención y purificación de la proteína Spike de SARS-CoV-2

Chamba Valladolid, Jefferson Alexander

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología

Torres Arias, Marbel PhD.

8 de marzo de 2023

Alexander Chamba_Obtención y purificación de Spike de SARS-CoV-2

< 1% **Similitudes**  0% **Texto entre comillas**
 0% similitudes entre comillas
 2% **Idioma no reconocido**

Nombre del documento: Alexander Chamba_Obtención y purificación de Spike de SARS-CoV-2.docx
 ID del documento: 93a7fc6594e7ce709c2e86623e59f05a4ac9e063
 Tamaño del documento original: 9,2 Mo

Depositante: MARBEL TORRES ARIAS
 Fecha de depósito: 6/3/2023
 Tipo de carga: interface
 fecha de fin de análisis: 6/3/2023

Número de palabras: 13.848
 Número de caracteres: 90.131

Ubicación de las similitudes en el documento:

Fuentes

Fuente principal detectada

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 Documento de otro usuario #6566b1 El documento proviene de otro grupo 2 fuentes similares	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (26 palabras)

Fuentes con similitudes fortuitas

Nº	Descripciones	Similitudes	Ubicaciones	Datos adicionales
1	 Documento de otro usuario #f0e644 El documento proviene de otro grupo	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (15 palabras)
2	 Documento de otro usuario #6bb60c El documento proviene de otro grupo	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (15 palabras)
3	 Documento de otro usuario #95d6a9 El documento proviene de otro grupo	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (13 palabras)
4	 www.semanticscholar.org METHODS: Optimization of culture medium for producti... https://www.semanticscholar.org/paper/METHODS:-Optimization-of-culture-medium-for-of-In-Tripathi-...	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (13 palabras)
5	 repositorio.espe.edu.ec Establecimiento de un proceso productivo a escala de labo... http://repositorio.espe.edu.ec:8080/bitstream/21000/23024/5/T-ESPE-044023.pdf.txt	< 1%		Palabras idénticas : < 1% (11 palabras)



Creado a partir de un documento por:
MARBEL TORRES ARIAS



Departamento de Ciencias de la vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular "Obtención y purificación de la proteína Spike de SARS-CoV-2" fue realizado por el señor Chamba Valladolid Jefferson Alexander; el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 06 de marzo de 2023



Firmado digitalmente por
MARBEL TORRES ARIAS

Firma:

.....
Torres Arias, Marbel PhD.

CC: 1802949154



Departamento de Ciencias de la vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de autoría

Yo **Chamba Valladolid Jefferson Alexander**, con cédula de ciudadanía n° 1725321028, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Obtención y purificación de la proteína Spike de SARS-CoV-2”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 06 de marzo de 2023

.....
Chamba Valladolid Jefferson Alexander

CC: 1725321028



Departamento de Ciencias de la vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de publicación

Yo **Chamba Valladolid Jefferson Alexander**, con cédula de ciudadanía n° 1725321028, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Obtención y purificación de la proteína Spike de SARS-CoV-2"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 06 de marzo de 2023

Chamba Valladolid Jefferson Alexander

CC: 1725321028

Dedicatoria

Este proyecto de investigación va dedicado en primera instancia a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por brindarme una vida llena de enseñanzas, experiencias y sobre todo felicidad.

A mis padres Sara Valladolid y Manuel Chamba por inculcarme el don de la perseverancia y dedicación, por cuidar de mí y hacer de mis días los más felices de mi vida, por sus consejos y esfuerzo de convertirme lo que hoy día soy.

A mi persona Carla Ordoñez por apoyarme en mi trayectoria estudiantil, incentivando mi desarrollo profesional, por ser parte de mi vida y formar el gran equipo que somos ahora

Jefferson Alexander Chamba Valladolid

Agradecimientos

Principalmente agradezco a mi familia ya que es mi pilar fundamental para seguir encaminándome al éxito, puesto que me han brindado su valioso e incondicional apoyo y siempre han creído en mí obsequiándome su ejemplo de superación, humildad y sacrificio para el logro de mis objetivos.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por abrirme las puertas y permitirme convertirme en un profesional en lo que tanto me apasiona, aquí aprendí muchas cosas y conocí a muchas personas dignas de admiración y ejemplo, que me enseñaron a no darme por vencido y que cada error siempre es una enseñanza aprendida para ser mejor.

A la Dra. Marbel Torres del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE por formar parte de mi formación dotándome con sus conocimientos para llegar a ser un gran profesional y además brindarme la oportunidad de ejecutar mi proyecto con su guía.

A la Ing. Andrea Aluisa y la Ing. Fernanda Toscana a del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE por su tiempo y ayuda brindada para el mejor resultado de mi investigación, agradezco su tolerancia y paciencia impartida al momento de consolidar mi conocimiento.

Jefferson Alexander Chamba Valladolid

Índice de contenidos

Resumen	14
Abstract	15
Capítulo I: Introducción	16
Antecedentes	16
Justificación e importancia	18
Alcance	19
Planteamiento del problema	19
Formulación del problema a resolver	20
Objetivos	20
Objetivo General	20
Objetivos específicos	20
Hipótesis.....	21
<i>Señalamiento de variables</i>	21
Capítulo II: Fundamentación teórica y referencial	22
Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2)	22
Tropismo tisular y patogénesis del SARS-CoV-2.....	25
Mecanismo del SARS-CoV-2 e importancia de la proteína Spike.....	26
Evolución de Spike	28
Tecnología de ADN recombinante.....	29
Expresión de proteínas recombinantes	30
Escherichia coli.....	32
<i>Promotor</i>	33
<i>Marcador de selección</i>	34
<i>Etiquetas de afinidad</i>	34

<i>Origen de replicación o replicones (ori):</i>	35
<i>Condiciones de cultivo</i>	35
BL21 (DE3) y sistema pET	37
Plásmido pGBW-m4046865	37
Etapas de bioproducción de E. coli BL21.....	38
Purificación cromatográfica.....	41
Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC)	43
Análisis de la estructura y función de las proteínas	44
Cuantificación e identificación de proteínas	45
Capítulo III: Materiales y Métodos	47
Localización geográfica	47
Verificación del plásmido pGBW-m4046865	47
<i>Purificación del plásmido pGBW-m4046865 a partir de células competentes E. coli JM109</i>	47
<i>Digestión de plásmido pGBW-m4046865 por EcoRV</i>	49
Transformación del plásmido pGBW-m4046865 en E. coli BL21 y ensayos de cloranfenicol.....	49
Condiciones de cultivo e inducción por IPTG para E. coli BL21 recombinante.....	51
Lisis celular para el producto de inducción E. coli BL21 recombinante	53
Díálisis del producto de lisis E. coli BL21 recombinante en PBS	55
Western Blot para producto de lisis E. coli BL21 recombinante.....	55
Purificación mediante columna DEAE-Sepharose Fast Flow	56
Purificación en columna de níquel (HisTrap HP 1mL, cytiva)	57
Acondicionamiento de la muestra.....	58
SDS-PAGE	59
Capítulo IV: Resultados	60

Verificación del vector pGBW-m4046865 en E. coli JM109	60
Transformación del plásmido pGBW-m4046865 en E. coli BL21 y ensayos de cloranfenicol.....	61
Ensayos de inducción en E. coli BL21 recombinante	62
Ensayos de lisis celular para biomasa de E. coli BL21 recombinante	64
Western Blot para producto de lisis E. coli BL21 recombinante.....	65
Purificación en columna de níquel (HisTrap HP 1mL, cytiva) a partir de producto de lisis E. coli BL21 recombinante.....	67
Capítulo VI: Conclusiones.....	74
Capitulo VII: Recomendaciones	74
<i>Bibliografía</i>	75

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Ejemplos de productos biofarmacéuticos de Escherichia coli con sus fabricantes</i>	18
Tabla 2 <i>Clasificación taxonómica de SARS-CoV-2</i>	24
Tabla 3 <i>Ventajas y desventajas de los sistemas de expresión</i>	31
Tabla 4 <i>Características de la línea celular B de E. coli</i>	33
Tabla 5 <i>Medios utilizados para el desarrollo de E. coli y concentración de biomasa producida</i>	36
Tabla 6 <i>Ruptura celular y extracción de proteínas intracelulares</i>	40
Tabla 7 <i>Tipos de cromatografía en columna</i>	42
Tabla 8 <i>Aspectos para el diseño de purificación cromatográfica IMAC</i>	43
Tabla 9 <i>Métodos para determinar la estructura tridimensional de proteínas</i>	44
Tabla 10 <i>Técnicas para cuantificar e identificar proteínas</i>	46
Tabla 11 <i>Ensamblaje de EcoRV para la digestión de pGBW-m4046865</i>	49
Tabla 12 <i>Parámetros del producto de transformación en sembrado por extensión</i>	51
Tabla 13 <i>Parámetros de concentración de cloranfenicol</i>	51
Tabla 14 <i>Ensayos y parámetros para la inducción con IPTG</i>	53
Tabla 15 <i>Ensayos y variables para lisis celular</i>	54
Tabla 16 <i>Tampones de equilibrio y elución para columna DEAE sepharose Fast Flow</i>	57
Tabla 17 <i>Preparación de tampones modificando concentración de imidazol y pH</i>	58
Tabla 18 <i>Cortes analizados en Benchling antes del corte con EcoRV</i>	61

Índice de figuras

Figura 1 <i>Cladograma de relaciones filogenéticas en la familia Coronavirinae</i>	23
Figura 2 <i>Genoma y estructura del SARS-CoV-2</i>	25
Figura 3 <i>Genoma y estructura de Spike del SARS-CoV-2</i>	27
Figura 4 <i>Mecanismo de replicación del SARS-CoV-2</i>	28
Figura 5 <i>Cladograma de la evolución de SARS-CoV-2</i>	29
Figura 6 <i>Mapa genómico del plásmido pGBW-m4046865</i>	38
Figura 7 <i>Principio de cromatografía en columna</i>	41
Figura 8 <i>Resumen de la metodología para la expresión y purificación de Spike mediante E. coli BL21</i>	47
Figura 9 <i>Procedimiento para obtener el plásmido pGBW-m4046865 a partir de E. coli JM109</i>	48
Figura 10 <i>Metodología para transformar el plásmido pGBW-m4046865 en E. coli BL21</i>	50
Figura 11 <i>Estandarización de inducción para E. coli BL21 recombinante</i>	52
Figura 12 <i>Metodología de estandarización de lisis para E. coli BL21 recombinante</i>	53
Figura 13 <i>Procedimiento para Western Blot de producto de lisis E. coli BL21 recombinante</i>	55
Figura 14 <i>Metodología de purificación mediante columna DEAE-Sepharose Fast Flow a partir de producto de lisis E. coli BL21 recombinante</i>	56
Figura 15 <i>Metodología de purificación en columna de níquel (HisTrap HP 1mL) para E. coli BL21 recombinante</i>	58
Figura 16 <i>Análisis confirmatorio de pGBW-m4046865 con EcoRV</i>	60
Figura 17 <i>Sembrado por extensión para el producto de transformación</i>	62
Figura 18 <i>Variación de parámetros de inducción para de E. coli BL21</i>	62
Figura 19 <i>Análisis SDS-PAGE para ensayos de inducción en E. coli BL21 recombinante</i>	63
Figura 21 <i>Análisis Western Blot para el producto de lisis E. coli BL21 recombinante</i>	65
Figura 22 <i>Purificación de Spike mediante columna de DEAE-Sepharose Fast Flow a partir del producto de lisis</i>	66
Figura 23 <i>Purificación de Spike mediante columna de Níquel HisTrap a partir del producto de diálisis</i>	67
Figura 24 <i>Análisis SDS-PAGE para purificación de Spike mediante columna DEAE-Sepharose Fast Flow</i> ..	68

Listado de abreviaturas

SARS-CoV-2: Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2

IFN: Interferón

S: Espiga o Spike

E: Envoltura

M: Membrana

N: Nucleocápside

ACE2: Receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2

CHO: Línea celular de ovario de hámster chino

HEK-293: Línea celular de riñón embrionario humano 293

NAb: Anticuerpos neutralizantes

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

iELISA: Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas indirecto

IPTG: Inductor isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido

COVID-19: Enfermedad por coronavirus 2019

SARS: síndrome respiratorio agudo severo

MERS: Síndrome respiratorio del Medio Oriente

NSP: Proteínas no estructurales

TMPRSS2: Proteasa transmembrana de superficie serina 2

sgARN: ARN subgenómicos anidados en 3'

RBD: Dominio de unión al receptor

Pp1a: Proteínas replicasas 1a

Pp1b: Proteínas replicasas 1b

Nsps: Proteínas no estructurales complejas de replicasa individuales

RE: Retículo endoplásmico

ERGIC: Compartimiento interno del aparato de Golgi.

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.

Capítulo I: Introducción

Antecedentes

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causante de la enfermedad COVID-19 ha provocado hasta diciembre del 2022 más de 651.9 millones de casos confirmados y 6.65 millones de fallecimientos alrededor del mundo, desde su aparición en el mercado de Wuhan provincia de Hubei-China en el 2019 (WHO, 2022). El coronavirus altamente transmisible y patógeno se caracteriza por ser un antagonista competitivo de interferón I (IFN-I), es decir, que la presencia de IFN reducida se relaciona directamente con una respuesta inmunitaria demasiado agresiva, agudizada por citocinas y quimiocinas aumentadas (Eskandarian Boroujeni et al., 2022) provocando cuadros clínicos graves como disnea, cuidados intensivos y en el peor de los casos la muerte (Harrison et al., 2020).

El genoma del coronavirus está constituido por 14 marcos de lectura abiertos (ORF), gran parte de los ORF codifican 16 proteínas no estructurales que forman el complejo replicasa, mientras que el restante codifica 9 proteínas accesorias y 4 proteínas estructurales: espiga o Spike (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) (Harrison et al., 2020). La proteína de relevancia médica es Spike o espiga (S) dado que interviene en la entrada a la célula huésped, al fusionarse con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) (ubicado en la superficie de las células huésped) (Schaub et al., 2021).

La tasa de mutación del SARS-CoV-2 incrementa a velocidades exponenciales concentrándose principalmente en Spike generando variantes de preocupación mundial informado por de la OMS, la preocupación es considerable dado que se inició con cuatro variantes (alpha, beta, delta y gamma) que evolucionaron rápidamente a ocho e innumerables subvariantes (ómicron, épsilon, zeta, kappa, etc.) que actualmente se encuentran bajo vigilancia por la OMS. Las mutaciones de Spike confieren al coronavirus resistencia a la inmunidad humoral, aumento a la efectividad de reproducción y mayor afinidad al receptor ACE2 (Saito et al., 2022). Además, la correlación de Spike con fusogenicidad vírica

(capacidad de la proteína para generar la fusión de las células) podría desempeñar una etapa primordial en la persistencia de la infección por el virus (Ehrlich, 2021).

La expresión de proteínas recombinantes o heterólogas se biosintetizan en un organismo distinto al original con el objetivo de aplicarse a fines investigativos, de diagnóstico y terapéuticos asimilando la actividad biocatalítica y aumentando la velocidad de bioproducción (Esqueda et al., 2021). La producción heteróloga de Spike se realiza ampliamente en sistemas de expresión de células eucariotas como la línea celular de ovario de hámster chino (CHO), línea celular de riñón embrionario humano 293 (HEK-293) y cultivos de células de insectos infectados con baculovirus (Tantiwivat et al., 2022). Los sistemas de expresión eucariontes sobresalen por generar casi todas las modificaciones postraduccionales necesarias para el correcto plegamiento y funcionalidad de la proteína recombinante, sin embargo, emplearlos conlleva inconvenientes como el elevado gasto energético y de inversión para el desarrollo de las líneas celulares, además el tiempo y mano de obra es extenso para lograr niveles de producción adecuados (Pampel, 2017).

La producción de proteínas heterólogas aplicando sistemas procariontes lideran la industria biofarmacéutica, debido a su crecimiento acelerado y fácil manipulación. Además, la producción bacteriana tiende a ser más económica con respecto a sistemas eucariontes dado su menor coste en medios de crecimiento, equipos de producción y purificación (Overton, 2014). La bacteria que encabeza la biofabricación es *Escherichia coli*, puesto que, fue la primera bacteria en ser caracterizada de forma genética, metabólica y fisiológica. *E. coli* fue adaptada a diversas mutaciones con el fin de mejorar la bioproducción, acelerando el tiempo de expresión y mejorando la actividad catalítica de la proteína, algunos ejemplos del desarrollo de fármacos en *E. coli* se encuentra en la tabla 1 (Rosano et al., 2019).

Tabla 1

Ejemplos de productos biofarmacéuticos de Escherichia coli con sus fabricantes

Producto	Tipo de producto	Compañía
Lantus	Análogo a la insulina	Sanofi
Neulasta	Recombinante del factor estimulador de granulocitos (G-CSF)	Amgen
Lucentis	Anti-factor de crecimiento endotelial vascular	Novartis
Oxervate	Recombinante del factor de crecimiento nervioso humano (NGF) que respalda la inervación y la integridad de la córnea	Dompé
Trumenba	Vacuna meningococo del grupo B	Pfizer
Myalepta	Recombinante de leptina	Aegerion
Palynziq	Antagonista de la fenilalanina	BioMarin

Nota. Adaptado de Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development, por Tripathi & Shrivastava, 2019, Synthetic Biology.

Justificación e importancia

Durante un largo tiempo, los avances científicos y tecnológicos en Ecuador se han visto condicionados debido a la legislación existente, cuyo interés se centra en las consecuencias que puede traer la biotecnología, sin embargo la producción de proteínas recombinantes forma parte de la biotecnología moderna debido a su gran impacto no solo económico, sino también en la salud humana, en lo que respecta a la tecnología de ADN recombinante utilizada para la creación de biofármacos o bioproductos, por lo tanto de haber una optimización en cuanto a las leyes del país y una inversión más alta en cuanto a este sector, sería posible el desarrollo tanto científico como tecnológico, convirtiéndose en una necesidad el desarrollo de proteínas recombinantes. (Guillén, 2005).

La evolución génica e inmunológica del SARS-CoV-2 está direccionada en su proteína estructural Spike tornándose un componente crítico de diagnóstico y terapéutico para tratar la COVID-19 (Saito

et al., 2022). Por ende, la producción heteróloga de Spike permite el desarrollo de investigación al comprender el mecanismo entre el SARS-CoV-2 y el receptor ACE2 determinado su grado de infección e interacción metabólica con el huésped.

La bioproducción está liderada por los organismos procariontes donde *Escherichia coli* destaca por su crecimiento acelerado, rentabilidad y fácil manipulación. El desarrollo biotecnológico de *E. coli* ha permitido generar una gran variedad de cepas que optimizan la producción de proteínas recombinantes, por ejemplo, un derivado de la línea celular B de *E. coli* denominada BL21 (DE3) predomina por tener un sistema de expresión proteico más selectivo y controlado al implementar el inductor isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG), permitiendo la inducción de la proteína recombinante en un crecimiento adecuado de *E. coli* (Rosano et al., 2019).

Alcance

La investigación se enfocará en conseguir una plataforma adecuada para la expresión heteróloga de Spike en el sistema de expresión *E. coli* BL21 que involucra la estandarización de parámetros de crecimiento, inducción y purificación de proteínas recombinantes similares a Spike.

Planteamiento del problema

La conexión entre la proteína Spike y los anticuerpos neutralizantes (NAb) colaboran con el entendimiento del mecanismo que utiliza SARS-CoV-2, a medida que muta drásticamente Spike del SARS-CoV-2 es necesario la producción heteróloga de Spike para uso investigativo, diagnóstico y terapéutico. Por ejemplo, la detección de NAb depende de forma exhaustiva del antígeno a utilizar es decir Spike (Tantiwawat et al., 2022). Por otro lado, las pruebas serológicas también dependen de la proteína Spike ya que pueden utilizarse con fines de diagnóstico como ensayos iELISA o determinar con precisión la respuesta inmunitaria inducida por las vacunas que circulan hoy en día para tratar la COVID-19 (Fitzgerald et al., 2021). Adicionalmente, Spike recombinante se puede utilizar directamente como vacuna, tal es el caso de la vacuna Novavax donde cultivaron la proteína Spike a través de la infección

por baculovirus a células de polillas, la vacuna contiene la proteína Spike purificada con un conjunto de adyuvantes que permiten una alta respuesta inmunitaria generando células de memoria (linfocitos B) que a su vez reconocerán y eliminarán la futura entrada del SARS-CoV-2 sin padecer los cuadros severos de la COVID-19 .

Formulación del problema a resolver

La cepa BL21 se complementa con el sistema pET es el sistema de expresión heteróloga más versátil en la actualidad, el objetivo es crear Spike de la forma más rápida posible creando una plataforma que sea replicable para futuras variantes de Spike. Por lo tanto, la investigación del presente trabajo de integración curricular consiste en la producción y purificación heteróloga de Spike del SARS-Cov-2 mediante el sistema de expresión procariota en *E. coli* BL21 donde el sistema pET incluye un marcador de selección al antibiótico cloranfenicol y una etiqueta de afinidad 6xHIS, la etiqueta facilita el proceso de purificación por afinidad de níquel. Por último, la identificación de la biosíntesis de Spike se determina con la técnica de electroforesis en gel SDS page.

Objetivos

Objetivo General

Obtener y purificar la proteína Spike de SARS-Cov-2.

Objetivos específicos

- Expresión heteróloga de la proteína Spike de SARS-Cov-2 en *Escherichia coli* BL21 aplicando el sistema pET que utiliza un promotor inducible por IPTG para controlar la biosíntesis de Spike.
- Purificación de la proteína Spike mediante cromatografía de afinidad de níquel con el fin de facilitar la eliminación de toxinas y residuos innecesarios.
- Aplicar la técnica de electroforesis SDS-PAGE a fin de verificar la presencia de Spike producida por *Escherichia coli* BL21.

Hipótesis

El sistema procariota *Escherichia coli* BL21 es capaz de producir la proteína recombinante Spike del SARS-CoV-2 y su purificación se puede realizar mediante cromatografía de afinidad de níquel.

Señalamiento de variables

Las variables dependientes son concentración de Spike en el lisado y purificado, concentración de fracciones, las variables independientes son concentración de inductor IPTG, glucosa y cloranfenicol tampones para la lisis. Finalmente, el diseño experimental es la estandarización de crecimiento, inducción y purificación de la proteína Spike en sistema de expresión E. coli BL21.

Capítulo II: Fundamentación teórica y referencial

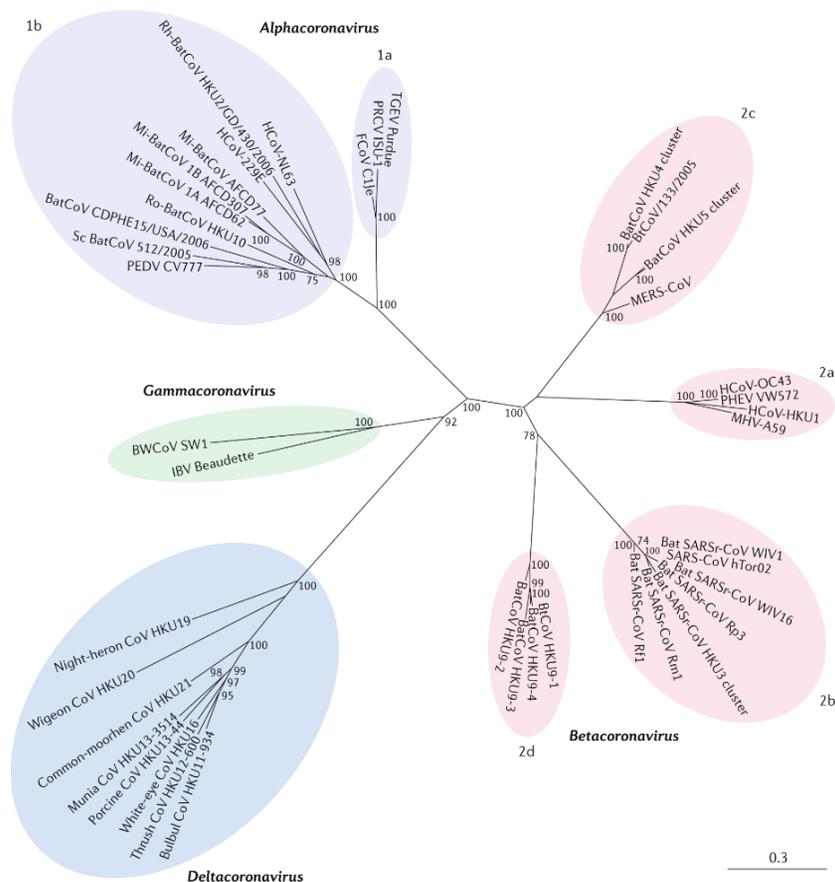
Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2)

El síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causa la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19) caracterizada por ser una afección respiratoria nociva para la salud y mortalidad humana en estos últimos años. SARS-CoV-2 pertenece a la familia *Coronaviridae* que a su vez incluye a las especies del síndrome respiratorio del Medio Oriente (MERS) y el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) compartiendo un 50 y 80% de identidad genómica respectivamente (Hu et al., 2021). La vinculación del SARS-CoV-2 con la cepa BatCov RaTG13 determina que el origen fue zoonótico a través del murciélago dado que se demostró un 96% de identidad entre las secuencias. Además, la diferencia esencial entre SARS-CoV-2 y las demás especies es la proteína estructural Spike, en vista de que varía drásticamente de forma genotípica otorgándole mayor patogenicidad y fusogenicidad al receptor ACE2 de las células huésped (Abulsoud et al., 2023).

La clasificación taxonómica del SARS-CoV-2 se encuentra en la tabla 2 donde se puede remarcar que las especies del orden Nidovirales se caracterizan por transcribir numerosos ARN subgenómicos anidados en 3' (sgARN) y con ello se define el nombre del orden, además la familia *Coronaviridae* son virus de ARN monocatenario de sentido positivo altamente patógenos, conjuntamente los géneros alfacoronavirus y betacoronavirus se distinguen por transmitirse por zoonosis a diferencia de los géneros Delta y Gammacoronavirus (Abulsoud et al., 2023). Con respecto al cladograma de la figura 1 se identifica que MERS-CoV, SARS-CoV, y SARS-CoV-2 son coronavirus beta (Cui et al., 2019).

Figura 1

Cladograma de relaciones filogenéticas en la familia Coronavirinae



Nota. El cladograma muestra los cuatro géneros más importantes de la familia *Coronaviridae*:

Alphacoronavirus (violeta), *Betacoronavirus* (rosado), *Gammacoronavirus* (verde) y *Deltacoronavirus*

(azul). Los subgrupos de cada genero también se encuentran distribuido en *Alphacoronavirus* el 1a y 1b

mientras que para *Betacoronavirus* del 2a al 2d. Tomado de Origin and evolution of pathogenic coronaviruses (p.184), por Culi et al., 2019, Nature Reviews Microbiology.g

Tabla 2*Clasificación taxonómica de SARS-CoV-2*

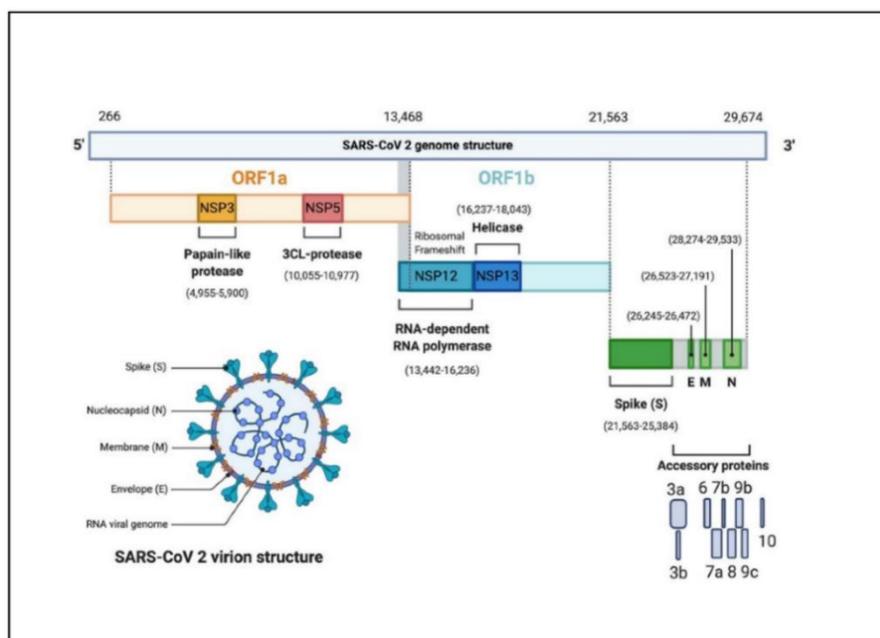
Coronavirus tipo 2 causante del síndrome agudo severo (SARS-CoV-2)	
Dominio	Riboviria
Grupo	IV (Virus de ARN monocatenario positivo)
Reino	Orthornavirae
Filo	Pisuviricota
Coronavirus tipo 2 causante del síndrome agudo severo (SARS-CoV-2)	
Clase	Pisoniviricetes
Orden	Nidovirales
Suborden	Cornidovirineae
Familia	Coronaviridae
Subfamilia	Orthocoronavirinae
Genero	Betacoronavirus
Subgénero	Sarbecovirus
Especie	Coronavirus relacionado con el síndrome respiratorio agudo severo (SARS)

Nota: Adaptado de Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, por Schoch C. et al., 2020, taxonomy ID: 2697049; Chitin and chitosan as tools to combat COVID-19: A triple approach,(p.183), por Mehrnough et al., 2021, International Journal of Biological Macromolecules.

SARS-CoV-2 tiene un tamaño aproximado de 30 kb, su genoma estructural codifica aproximadamente 9700 aminoácidos distribuidos en las proteínas S, E, M y N: además presenta dos ORF grandes (ORF1a y ORF1b) que codifican proteínas no estructurales (NSP) como se observa en la figura 2 (Harrison et al., 2020).

Figura 2

Genoma y estructura del SARS-CoV-2



Nota. En esta investigación secuenciaron el genoma del SARS-CoV2 mediante la tecnología PacBio con el fin de aumentar el desarrollo de kits para el diagnóstico de Covid-19. Tomado de The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms, (p.3), por Alanagreh et al., 2020, Pathogens.

Tropismo tisular y patogénesis del SARS-CoV-2

El tropismo tisular del SARS-CoV-2 depende de la susceptibilidad que le otorga Spike para anclarse al receptor ACE2 de las células huésped. Las vías respiratorias son la ruta principal de entrada del SARS-CoV-2, posteriormente el objetivo es infectar a las células epiteliales alveolares, endoteliales vasculares y macrófagos alveolares donde en gran medida interviene la regulación transcripcional y proteica de ACE2 (Hu et al., 2021). Otro factor importante es la dependencia a la expresión de la proteasa transmembrana de superficie serina 2 (TMPRSS2) de las células objetivo, aun cuando la detección de ACE2 sea muy baja mientras esté presente TMPRSS2 se dará la infección. Adicionalmente,

se podría decir que las células objetivo que resaltan son las células alveolares humanas tipo II puesto que presentan una mayor cantidad de receptores ACE2 (Hu et al., 2021).

SARS-CoV-2 tiene la capacidad de infectar eficazmente a las células del tracto respiratorio superior humano dado su mayor afinidad por ACE2, de tal modo que los tejidos más afectados son nasofaríngeos y orofaríngeos. En vista de que, la fuerte fusogenicidad de Spike depende de ACE2 junto con TMPRSS2 y a su vez estas se expresan en células del tracto intestinal se ha evidenciado enfermedades gastrointestinales relacionadas con la infección del SARS-CoV-2 (Liu et al., 2022).

La patogenicidad elevada del SARS-CoV-2 se comprueba con el rápido periodo de incubación que es de aproximadamente 6 días, causando síntomas iniciales similares a una gripe progresando rápidamente a patologías graves como dificultad respiratoria aguda, neumonía, disfunción multiorgánica e inclusive la muerte (CDC, 2020). La edad y estado de salud del paciente influyen drásticamente en la infección, dado que personas mayores (>55 años) o personas que presentan comorbilidades tienden a presentar mayor probabilidad de adquirir enfermedades graves como la muerte, mientras que la mayoría de las personas jóvenes o con buena salud tienen a presentar síntomas leves e incluso a ser asintomáticos frente al SARS-CoV-2 (Chen et al., 2022).

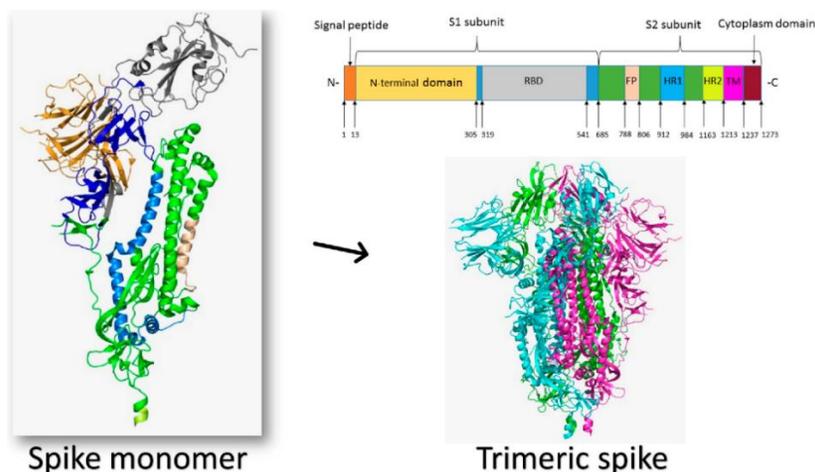
Mecanismo del SARS-CoV-2 e importancia de la proteína Spike

Spike es una glicoproteína de fusión transmembrana de clase I homotrimérica altamente glicosilada y con enlaces disulfuro que se encuentra en la cubierta del SARS-CoV-2 otorgándole la forma de corona donde aproximadamente 60 trímeros de Spike recubren un virión. El tamaño de Spike varía entre los 180-200 kDa, contiene un dominio de unión al receptor (RBD) ubicado en la subunidad S1, un sitio de escisión polibásica S1/S2 y una subunidad S2 que se encarga de mediar la fusión entre el virión y la membrana celular (Fig. 3) (Y. Huang et al., 2020). Los polisacáridos anclados a los N extremos de Spike permiten su bioactividad, dado que al interactuar con la célula huésped Spike experimenta un cambio conformacional asistido por glucanos. Además, los polisacáridos participan en el correcto plegamiento

de Spike, camuflan el virión para facilitar el acceso del SARS-CoV-2 y a su vez modulan el reconocimiento por los anticuerpos (Walls et al., 2020).

Figura 3

Genoma y estructura de Spike del SARS-CoV-2



Nota. Spike monomérico se fusiona para crear un trímero que se ancla a la superficie del SARS-CoV-2 y realizar sus funciones catalíticas. Los colores de Spike monomérico representan cada sección del genoma que codifica Spike. Tomado de A Review of Human Coronaviruses' Receptors: The Host-Cell Targets for the Crown Bearing Viruses, (p.3), por Nassar et al., 2021, Molecules.

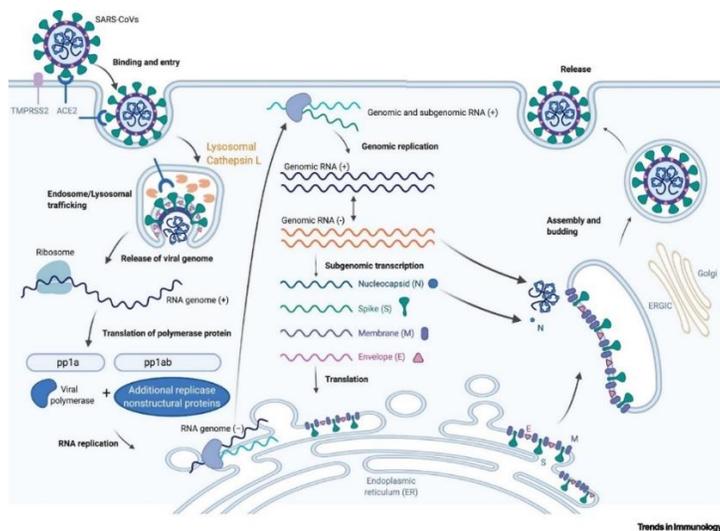
Spike crea trímeros para realizar sus funciones catalíticas, el Spike monomérico se encuentra con sus respectivos colores de cada dominio (Nassar et al., 2021)

La replicación del SARS-CoV-2 inicia con la traducción de los genes ORF1a y ORF1b a proteínas replicasas (pp1a y pp1b), posteriormente, pp1a y pp1b son escindidas por una proteasa (propia del virus, traducida por ORF1) en proteínas no estructurales complejas de replicasa individuales (nsps). Los nsps se reorganizan en el retículo endoplásmico (RE) en vesículas de doble membrana que agilizan la replicación del ARN genómico y subgenómico (sgARN). Por último, la traducción de sgARN da como resultado proteínas accesorias y estructurales que se ensamblarán en el compartimiento interno del

aparato de Golgi (ERGIC) generando viriones maduros que infectarán otras células (Harrison et al., 2020).

Figura 4

Mecanismo de replicación del SARS-CoV-2



Nota. Tomado de Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis and Pathogenesis, (p.1103), por Harrison et al., 2020, Cell Press.

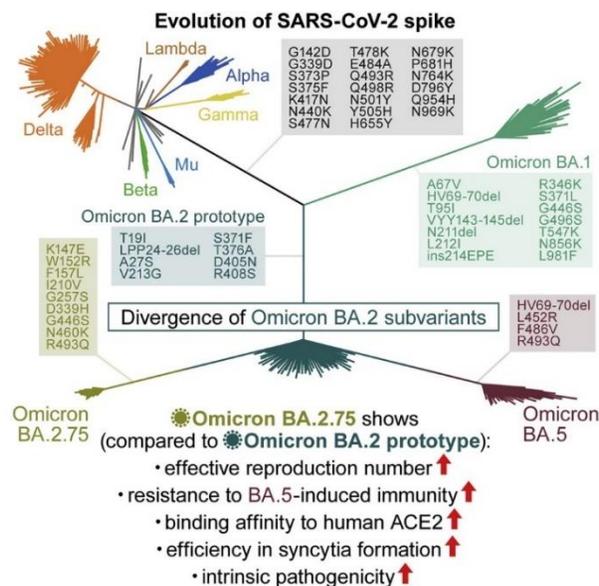
Evolución de Spike

La proteína Spike del SARS-CoV-2 comparte similitudes estructurales con las proteínas Spike de las otras especies de la familia *Coronaviridae*, sin embargo, diverge por sus mutaciones singulares en el RBD de S1. Además, una conformación adicional de Spike SARS-CoV-2 le permite un mejor método para evadir el sistema inmune del huésped. Entonces, la evolución del SARS-CoV-2 se congrega en Spike, en vista de que todas las variantes y subvariantes muestran un mayor porcentaje de mutaciones de la proteína. Las mutaciones de Spike le han permitido al virus desarrollarse de mejor forma al aumentar la afinidad por el receptor ACE2 e incrementar la resistencia al sistema inmune del huésped. Las variantes generadas por SARS-CoV-2 hasta diciembre de 2022 son Alpha, beta, delta, gamma, lambda y en

especial ómicron puesto que su mutación radica en Spike disminuyendo la efectividad del programa de vacunación que existe actualmente (Saito et al., 2022).

Figura 5

Cladograma de la evolución de SARS-CoV-2



Nota. La divergencia de Spike en la variante ómicron modifica drásticamente el mecanismo de SARS-CoV-2 (aumento de afinidad por ACE2, aumento de resistencia al sistema inmune, etc.), la tasa de mutación se concentra en Spike y en especial ómicron que se divide en dos grandes grupos BA.2.75 y BA.5. Tomado de Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75 variant, (p.1540), por Saito et al., 2022, Cell Press.

Tecnología de ADN recombinante

La ingeniería genética nace con la tecnología de ADN recombinante donde se manipula el genoma de una especie seleccionando un fragmento de interés para insertarlo en el ADN de otra especie. El mecanismo de las endonucleasas de restricción descubierta por Daniel Nathans en 1970, impulsa el desarrollo génico de nuevas especies con propiedades únicas o mejoradas para fines terapéuticos, industriales e investigativos. Las endonucleasas de restricción propias del sistema de defensa bacteriano contra fagos han fomentado el desarrollo de enzimas de restricción con una especificidad de secuencia

de ADN única permitiendo la inserción, modificación o corrección de genes proporcionando al organismo objetivo una nueva función (Nambisan, 2017).

Expresión de proteínas recombinantes

La producción recombinante o heteróloga de proteínas se logra mediante sistemas de expresión distintos al organismo original que la biosintetizan. La ingeniería genética facilita la clonación de genes que codifican proteínas en un sistema de expresión singular, generando un nivel mucho más elevado de producción a comparación de la forma natural (Watts et al., 2021). Uno de los objetivos de la expresión recombinante es eliminar el uso excesivo de biomasa tanto de animales como plantas, además soluciona la emisión de residuos o trazas contaminantes que utiliza la síntesis química, de igual forma la síntesis química dispone de procesos muy costosos que se van incrementando a medida que la proteína es más grande y compleja. Por ende, los campos de investigación, bioproducción y farmacéutica desarrollan la utilidad de la maquinaria celular de microorganismos para generar proteínas recombinantes (Park, 2022).

Los sistemas de expresión son células procariontas y eucariotas, que incluyen bacterias, levaduras, células de insectos, células de mamíferos y plantas (Mikami et al., 2008). La elección del sistema adecuado depende del objetivo de la investigación, tiempo dispuesto para la biosíntesis, cantidad de proteína producida, cualidades fisicoquímicas de la proteína como tamaño, modificaciones postraduccionales o solubilidad y finalmente el destino que tendrá la proteína ya sea para uso terapéutico o de diagnóstico (Tripathi & Shrivastava, 2019).

Aplicar cualquier sistema de expresión comprende una lista de ventajas y desafíos que el investigador debe tener en cuenta antes de realizar la producción. La siguiente tabla 3 comprende un resumen de las ventajas y desventajas que implica cada sistema de expresión.

Tabla 3*Ventajas y desventajas de los sistemas de expresión*

Sistema de expresión	Ventajas	Desventajas	Ejemplos
Procariota	- Alto nivel de expresión	- La mayoría de cepas solo	- <i>E. coli</i>
	- Concisiones de crecimiento sencillas y económicas	generan puentes disulfuro como modificación postraducciona.	- <i>Bacillus subtilis</i>
	- Crecimiento acelerado y escalable	- Generación de cuerpos de inclusión	
	- Condiciones de crecimiento simples y baratos	- Glicosilación no compatible, azucres inmunogénicos	- <i>Pichia pastoris</i> - <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	- Crecimiento rápido a alta densidad	- Generación de cuerpos de inclusión	
Levaduras	- Presentan algunas modificaciones postraduccionales		
Mamíferos	- Corrección de modificaciones postraduccionales	- Costo elevado para mantener las condiciones de crecimiento	HEK293 y CHO
	- Alto índice de capacidad biocatalítica.	- Bajo nivel de producción - Difícil escalamiento - Líneas celulares inestables	
	- Bajo costo de crecimiento	- Glicosilación toxica para la aplicación humana	- <i>Nicotiana tabacum</i>
Plantas	- Procedimientos de crecimiento optimizado		Familia poaceae

Nota Adaptado de The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins, por He et al., 2014, Protein& Cell.

Las bacterias son los microorganismos preferidos para la expresión recombinante para proteínas que no necesitan ser ampliamente modificadas de forma postraducciona, pueden sintetizarse de forma muy rápida aplicando condiciones de cultivo sencillos y baratos.

Escherichia coli

La especie que representa al sistema procariota es una bacteria gramnegativa *Escherichia coli* dada su caracterización preminente ha permitido que la ingeniería genética cree innumerables especies que se adapten a la necesidad del investigador para aumentar niveles de producción, crear uno o varios tipos de proteínas a la vez, controlar el nivel de expresión y facilitar los procesos de purificación (Overton, 2014). El tiempo de duplicación que puede alcanzar *E. coli* es de aproximadamente 20 min, sin embargo, cuando se realiza expresión de proteínas heterólogas se puede alterar el tiempo de crecimiento a causa de la carga metabólica impartida por la expresión recombinante (Rosano et al., 2019). La expresión de proteínas tanto homologas como heterólogas de *E. coli* superan la biosíntesis de otros sistemas de expresión, constatando que más del 80% de las proteínas ingresadas en Protein Data Bank (PDB) son producidas por *E. coli* (Thakur & Shankar, 2017).

La primera cepa descubierta en heces de pacientes con difteria fue *E. coli* K-12 en el año de 1922, K-12 fue modificada genéticamente hasta generar mutantes por ejemplo la cepa trxB que genera enlaces disulfuro en el citoplasma, la cepa JM83 que tiene la capacidad de producir proteínas periplasmáticas, la cepa rECA que tiene resistencia al antibiótico rifampicina, etc. Posteriormente, la investigación génica avanzó hasta conseguir un mutante que resolviera los problemas de niveles bajos de proteína por causa de poca biomasa, la línea mutante es B que presenta diversas modificaciones (tabla 4) que potencian la producción heteróloga (Thakur & Shankar, 2017).

Tabla 4*Características de la línea celular B de E. coli*

Característica	Descripción
Nivel de crecimiento	Crecimiento acelerado comparado con la cepa <i>E. coli</i> K-12
Inmovilidad	Presentan una delección del gen <i>fli</i> evitando la producción de flagelos y concentrando la maquinaria bacteriana para el crecimiento y biosíntesis de proteínas.
Disminución de la producción de acetato	El acetato implica una reducción agresiva del pH provocando un aumento de la muerte celular, al disminuir la producción de acetato con suministro continuo de glucosa se genera mejor cantidad de biomasa.
Deficiencia de proteasas	Una modificación génica de IS186 en el promotor de gen <i>lon</i> impide la producción de proteasas, de igual forma una delección del gen <i>OmpT</i> de la membrana externa evita la proteólisis en la etapa de purificación.
Biosíntesis aumentada	Añade un sistema de secreción adicional denominado T2S elevando la producción proteica.

Nota. Adaptado de New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*. A year update, por Rosano et al., 2019, The protein Society.

Escherichia coli B está equipada de un sistema de vectores plasmídicos y modificaciones génicas que permiten un alto rendimiento de expresión heteróloga, los componentes se describen a continuación:

Promotor

El promotor debe ser fuerte y a la vez regularse para que su expresión no sea inmunogénica para la célula. El sistema más conocido es del promotor del operón Lac que induce la expresión de un gen si solo existe la presencia de lactosa en el medio. Los vectores derivados de Lac para la expresión heteróloga son pUC (promotor lacUV5) y pMAL (promotor tac). A partir los promotores LacUV5 y tac se crearon mutantes que mejoraron el rendimiento por ejemplo L8U-V5 (mutante de LacUV5) aumenta la fuerza del promotor, mientras que Tac (mutante de tac) funciones perfectamente en condiciones con o

sin glucosa es decir mejora el rendimiento si solo se utiliza IPTG. Otros promotores que se pueden usar son promotor inducido por L-arabinosa (PBAD), sistema de tetraciclina inducible positiva On (Tet-On), promotores inducibles por luz pDaw, etc.

Marcador de selección

El sistema toxina y antitoxina se utiliza frecuentemente en la expresión heteróloga, básicamente su función es conceder una resistencia a la bacteria que contiene el vector de interés por ejemplo resistencia a un antibiótico y con ello identificarlo para expresarlo en grandes cantidades, además la resistencia a un antibiótico evita el crecimiento de otros microorganismos previniendo la contaminación del medio. El sistema puede presentar algunas falencias como la pérdida de plásmido dado que su replicación implica gasto energético las células pueden considerar innecesaria su replicación. El mecanismo funciona añadiendo un gen resistente como BLA que confiere resistencia a la ampicilina y con ello producir β -lactamasa degradando la ampicilina en el periplasma, si se desean utilizar las proteínas en ensayos clínicos debe ser eliminado todo el antibiótico

Etiquetas de afinidad

La caracterización de la proteína no solo es importante para determinar el sistema de expresión sino también para identificar el proceso de purificación más adecuado por ejemplo si en el conjunto de proteínas expresadas la proteína de interés resalta por tener un punto isoeléctrico en particular se puede purificar por cromatografía de intercambio iónico (), sin embargo, si se desconoce las funciones bioquímicas se puede incorporar una etiqueta de afinidad que facilite la purificación. Por lo general, las etiquetas son péptidos que presentan afinidad a ligandos biológicos o químicos. Las etiquetas que se pueden usar son His tag, HA-tag, FLAG, Strep tagII, c-myc, T7-tag, NusA, etc. Además, existen anticuerpos monoclonales que pueden detectar todas las etiquetas mencionadas. Por otro lado, las etiquetas también pueden interferir con la estabilidad de la estructura o función biológica por ende

deben ser eliminadas utilizando enzimas como enterocinasa o proteasa de virus grabado del tabaco (TEV) (Perkins, 2014).

Origen de replicación o replicones (ori):

Los vectores tienen un número determinado de replicación dirigido por el replicón (ori), utilizar un replicón con alto número de copias se interpreta como alto nivel de producción, sin embargo, la carga metabólica aumenta drásticamente disminuyendo la tasa de crecimiento así que se debe mantener el equilibrio entre el promotor y el replicón para evitar toxicidad dentro de la bacteria. Los replicones más comunes son ColE1 o pMB1 que dependerá si es estricto o relajado para generar un número alto o bajo de copias respectivamente, por ejemplo, pMB1 ori genera aproximadamente 20 copias/célula en cambio pUC crea alrededor de 700 copias/célula (Morgan, 2020).

Condiciones de cultivo

La tasa de crecimiento de E. coli se relaciona directamente con las variables y componentes de su cultivo, modificarlos involucra un cambio de concentración volumétrica en el crecimiento. Por lo general se utiliza el medio Luria Bertani (LB) para el cultivo, sin embargo, existen una variedad de suplementos como medios más enriquecidos por ejemplo Terrific Broth (TB) que aumenta la densidad celular en corto tiempo. Los medios de autoinducción contienen glucosa y lactosa, necesarios para la expresión de la proteína específica, sin embargo, existe un menor control sobre el momento de inducción menorando la producción de la proteína. Las bacterias que incluyan un marcador de selección a un antibiótico deben contener estrictamente en el medio de cultivo dicho antibiótico para mantener el plásmido.

El medio Luria Broth (LB) a pesar de que su creación fue con fines investigativos de bacteriófagos y crecimiento de Shigella se ha convertido hoy en día en el medio preferido para el crecimiento de microorganismos de la familia Enterobacteriaceae y exclusivamente Escherichia coli. El medio LB se puede acondicionar con aditivos para la expresión recombinante como el inductor IPTG o el

sustrato X-Gal donde se identifica la colonia recombinante al interrumpir la expresión de B-galactosidasa. *E. coli* es flexible con la demanda de nutrientes para su crecimiento, en primer lugar, la glucosa es un buen sustrato para el crecimiento, pero el exceso del mismo genera un nivel de pH bajo por la formación de ácido acético y con ello un ambiente tóxico para el desarrollo celular, *E. coli* puede metabolizar sus propios aminoácidos a partir de una fuente de nitrógeno y carbono, sin embargo, si se suministra aminoácidos directamente se puede acelerar el crecimiento, entonces LB proporciona la fuente adecuada de aminoácidos ya que contiene triptona y extracto de levadura ricos en aminoácidos. LB no es el único medio que sirve para la expresión, pero sí el más económico y sencillo, la optimización del medio para *E. coli* casi siempre parte con ensayos en LB, sin embargo, se puede experimentar con diversos medios según la disponibilidad del laboratorio (tabla 5).

Tabla 5

Medios utilizados para el desarrollo de E. coli y concentración de biomasa producida

Medio	Composición	Peso celular seco obtenido (g/L)
LB	Triptona, extracto de levadura, NaCl	0.8-1.1
TB	Triptona, extracto de levadura, NaCl, glicerol.	1.5-2
SB	Hidrolizado de soya, extracto de levadura, K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , glicerol	2-2.5
TY	Triptona, extracto de levadura, KH ₂ PO ₄ , (NH ₄) ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, EDTA.	2.5-3.5
TY biorreactor	Triptona, extracto de levadura, KH ₂ PO ₄ , (NH ₄) ₂ HPO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, EDTA.	≥16

Nota. Adaptado de Optimization of culture medium for production of recombinant dengue protein in *Escherichia coli* por Tripathi et al., 2009, Industrial Biotechnology.

BL21 (DE3) y sistema pET

La cepa *E. coli* BL21 (DE3) es un derivado de la línea celular D que dispone de todos sus atributos y se distingue por contar con una copia de polimerasa ARN del fago T7 (T7RNAP) altamente específica del promotor lacUV5, la incorporación génica de T7RNAP se da en el locus DE3 por ello su nombre. La expresión de T7RNAP se da en presencia del inductor IPTG, mientras el inductor no se encuentre, el promotor Lac (promotor de T7RNAP) estará unido al represor LacI inhibiendo la expresión, al añadir IPTG este disocia el represor permitiendo la traducción de T7RNAP. BL21 se complementa con el plásmido de expresión pET que integra en su secuencia el promotor T7 al cual T7RNAP es afín (Rosano et al., 2019).

El sistema pET contiene uno de los promotores más poderosos para la expresión heteróloga denominado promotor T7 (pT7) (procedente del bacteriófago T7), comprende un marcador de selección que le confiere resistencia a un antibiótico, un origen de replicación (ori) para el nivel de expresión. Además, contiene una etiqueta de afinidad para aplicar cromatografía. En algunos casos se puede aplicar una secuencia como el péptido PelB-leader que facilita la expresión periplasmática facilitando la purificación al obtener la proteína de interés en el sobrenadante, sin embargo, tiene un límite de peso puesto que no permite expulsar proteínas muy grandes. Por último, contiene una sección variada de sitios de enzimas de restricción para que se inserte el fragmento de interés y con ello la producción heteróloga (Mikami et al., 2008).

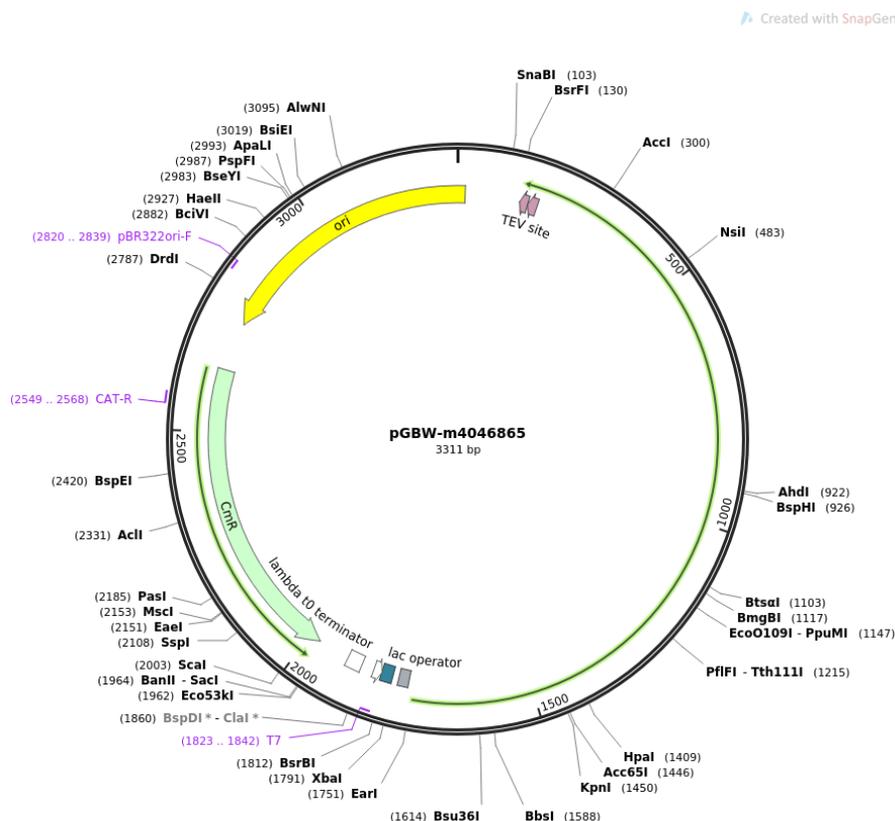
Plásmido pGBW-m4046865

La expresión heteróloga del presente trabajo investigativo utilizó el plásmido pGBW-m4046828 donde Spike ya se encuentra insertado, además contiene el promotor T7 (pT7), un sitio de unión al ribosoma T7(T7rbs) con el codón de inicio ATG. El plásmido genera una resistencia al antibiótico cloranfenicol produciendo la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) que realiza una acetilación del antibiótico inhibiendo la unión al ribosoma bacteriano. Por otro lado, como etiqueta de afinidad

contiene una cola de histidina (6His) con su respectivo sitio de reconocimiento de proteasa del virus grabado del tabaco (TEV) para eliminar la etiqueta en procesos de purificación (Fig. 6) (Bioworks & Chen, 2019).

Figura 6

Mapa genómico del plásmido pGBW-m4046865



Nota. El plásmido tiene un tamaño de 3311 bp con un Spike de 1620 bp generando una proteína Spike de aproximadamente 61.5 kDa. Tomado de Construcciones de expresión de *E. coli* de la proteína SARS-CoV-2, etiquetadas, para la expresión y/o purificación de proteínas, Bioworks & Chen, 2019, Addgene.

Etapas de bioproducción de *E. coli* BL21

El desarrollo de un bioproceso involucra tres etapas para la producción recombinante, cada una implica la experimentación variando parámetros físicos o químicos para su estandarización:

- Etapa upstream: comienza desde la caracterización de la proteína y selección del sistema de expresión en conjunto con el diseño génico hasta la transformación que implica la inclusión del plásmido en la bacteria competente por ejemplo *E. coli* BL21.
- Fermentación: comprende en determinar los parámetros óptimos de crecimiento y producción para la bacteria recombinante con el fin de escalar a nivel industrial.
- Etapa downstream: comienza a partir de la obtención del medio de cultivo que se sujeta a un conjunto de procesos que eliminan los restos y trazas innecesarias para el producto final aumentando la bioactividad y pureza de la proteína.

Las proteínas recombinantes pueden expresarse de forma intracelular o extracelular, para determinar en qué parte se biosintetizan se realiza una centrifugación o microfiltración para recuperar la biomasa del sobrenadante, el objetivo es que se exprese en el sobrenadante para facilitar la purificación, sin embargo, la mayoría de las veces no es así, cuando se expresa intracelular se realiza lisis celular para ello se aplica protocolos físicos, químicos o enzimáticos. En vista de que *E. coli* es Gram negativa puede expresar proteínas en tres lugares citoplasma, periplasma y de forma extracelular, dado que lograr la expresión extracelular es muy difícil de diseñar genéticamente una alternativa es el diseño de proteínas periplasmáticas pequeñas por ejemplo PelB-leader, entonces los ensayos de lisis celular deben considerar en qué lugar se expresa para poder aplicar un método adecuado (Tabla 6).

Tabla 6*Ruptura celular y extracción de proteínas intracelulares*

Método	Aditivo o técnica	Características	Membrana de ruptura
Químico	Agentes quelantes: Tris, EDTA		Membrana externa
	Sacarosa	Aumenta la osmolaridad extracelular liberando agua y proteínas periplasmática.	Membrana externa
	Detergentes: Triton X-100, SDS, Tween 20		Membrana externa e interna
Enzimático	Lisozima	Tiene mayor especificidad donde no es necesario un cambio brusco de temperatura, pero puede añadir impurezas al producto final.	Pared celular de peptidoglicano
Físicos	Sonicación	Aplicación de ultrasonido (aprox. 20 kHz) para generar cavitación que perfora la membrana celular dañando inclusive el ADN.	
	Homogenización	Aplicando altas presiones (aprox. 20 000 psi) se realiza cizallamiento celular posteriormente se libera presión para la implosión de las células liberando el contenido citoplasmático.	Toda la membrana celular
	Molienda con perlas	La biomasa se aplica con perlas de vidrio, cerámica o acero aplicando agitación genera un contacto abrasivo lo que conlleva a la ruptura celular.	

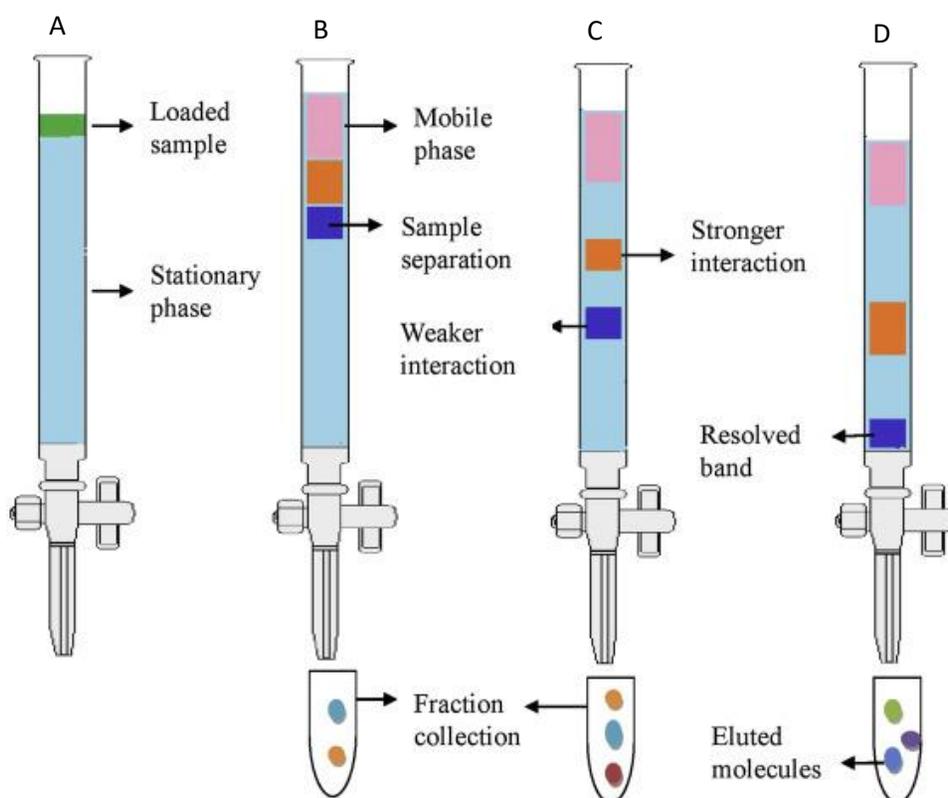
Nota. Adaptado de *Strategies for Protein Purification*, por GE Healthcare, 2010, Handbook.

Purificación cromatográfica

La purificación de proteínas se clasifica en procesos cromatográficos y no cromatográficos. En el caso de no cromatográficos se aplica ultrafiltración que por diferencia de tamaño se obtiene la proteína de interés, también se puede usar químicos como sulfato de amonio y separa la proteína por variación de solubilidad.

Figura 7

Principio de cromatografía en columna



Nota. La fase estacionaria es la columna mientras que la fase móvil es la muestra (A), la matriz se lava con tampón de lavado para eliminar las trazas o residuos innecesarios de la muestra en fracciones (B y C), la columna interacciona con la proteína de interés reteniéndola para ser eludida con un tampón específico de elución (D). Tomado de Chapter 21 - Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials, por Srivastava et al., 2021 Natural Bioactive Compounds.

La cromatográfica comprende la separación de sustancias de una fase líquida en una matriz sólida, en si utiliza las propiedades bioquímicas de la proteína para purificarla como su tamaño, forma, punto isoeléctrico (pI), hidrofobicidad, afinidad a ligandos. Por lo general, la purificación comienza con la extracción y clarificación del cultivo, posteriormente se realiza un proceso de captura para concentrar y estabilizar a la proteína, más adelante se lleva a cabo una purificación cromatográfica para remover impurezas y finalmente se efectúa un acabado adicional para lograr un nivel alto de pureza que se logra al aplicar varias técnicas cromatográficas (tabla 7)

Tabla 7

Tipos de cromatografía en columna

Tipo de cromatografía	Características
Cromatografía líquida de intercambio iónico	Utiliza el principio de atracción electrostática reversible entre la proteína y una matriz que posee grupos químicos con carga eléctrica opuesta. La proteína se elude alterando el pH de la matriz. La matriz puede ser de intercambio catiónico o aniónico.
Cromatografía por tamaño	La separación es por diferencia de tamaño donde se aplica una matriz inerte y porosa equilibrada con el tampón según el requerimiento de la proteína. Las proteínas pequeñas recorren un volumen más amplio que las proteínas grandes por ende pueden ser separadas por diferentes fracciones de tiempo.
Cromatografía líquida de hidrofobicidad	Ciertas proteínas se reordenan en su superficie al contacto con el agua generando interacciones hidrofóbicas que pueden unirse con ligandos en una matriz.
Cromatografía de afinidad	La purificación se basa en la unión específica de la proteína a un ligando de forma reversible, aquí se aplica todo lo relacionado con el sistema de etiquetas de afinidad donde cada matriz es acondicionada con el ligando específico y el buffer apropiado de la proteína. La pureza aumenta considerablemente eliminando los pasos de purificación disminuyendo costos y tiempo

Nota. Adaptado de Separation techniques: Chromatography, Yerleskesi et al., 2016, Biochemistry.

Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC)

Las proteínas tienen la capacidad de unirse a metales dada la afinidad entre los grupos de histidina o cisteína con los metales a un pH 7 ± 1 , el mecanismo puede aplicarse para proteínas con etiqueta de histidina (6XHis-Tag), los metales divalentes más usados son Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} y Fe^{2+} . La columna utiliza soluciones que involucran un aceptor de electrones similar a 6XHis-Tag, por ejemplo, el ácido etilendiaminotetracético (EDTA) o imidazol que funcionan como estabilizadores de columna para permitir la unión y elución de la proteína de interés (Healthcare, 2010).

Tabla 8

Aspectos para el diseño de purificación cromatográfica IMAC

Parámetro	Variables	Características
Selección del ion metal	Cobre (Cu^{2+})	Genera un porcentaje de recuperación del 60 %.
	Zinc (Zn^{2+})	Es el metal que genera la unión más débil.
	Níquel (Ni^{2+})	Es el metal que más se recomienda para la unión con la cola de histidina dada su mayor afinidad.
	Cobalto ($2+$) y calcio (Ca^{2+})	Pueden usarse como alternativas del zinc.
	pH	Para la unión debe ser neutro o ligeramente alcalino.
Tampón de unión	Reactivos	Se puede usar Tris-acetato, fosfato de sodio. El Tris-HCl no es recomendable usar porque reduce la unión.
	pH	Se puede aplicar una reducción gradual del pH para la elución no específica del material unido. El intervalo de variación de es pH 4-7 por lo general la mayoría de proteínas eluyen a pH 4.5-6.
Tampón de elución	Reactivos	Por lo general son quelantes que compiten por el ligando es decir la proteína anclada con cola de histidina, los reactivos son imidazol, cloruro de amonio, histamina, glicina, urea Clorhidrato de guanidina
Conservación de la columna	pH	Se utiliza pH neutro para evitar la interacción con las proteínas o residuos que se hayan mantenido en la columna.
	Reactivos	Por lo general se usa etanol (20%) a una temperatura entre 4-8°C

Nota. Adaptado de Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins, Rigüero et al., 2020, Journal of Chromatography A.

Análisis de la estructura y función de las proteínas

En la actualidad existen diversos métodos para determinar la estructura de una proteína donde el simple hecho de secuenciar un gen y posteriormente traducirlo para ser analizarlo con softwares bioinformáticos no prevé una estructura tridimensional adecuada. Una de las técnicas más conocidas para determina la estructura tridimensional de proteínas es la cristalografía de rayos X que utiliza la radiación electromagnética a una longitud muy corta de 0.1nm y por medio de la difracción determinar la estructura de la proteína a condición de que la muestra sea cristalina, otros ejemplos se encuentran detallados en la tabla 9 (Alberts et al., 2002).

Tabla 9

Métodos para determinar la estructura tridimensional de proteínas

Método	Características	Ref.
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)	Analiza pequeños volúmenes de proteína Utiliza la alteración magnética para la emisión de un patrón específico de radiofrecuencia e identificar la estructura de proteínas.	(Alberts et al., 2002)
Microscopia electrónica 3D	Utiliza un haz de electrones y un sistema de lentes de electrones para obtener imágenes de proyección 3D.	(Alberts et al., 2002)
Microscopia crioelectrónica (crio-EM)	Utiliza muestras congeladas aplicando un haz de electrones a baja potencia para evitar daños en la proteína y función biológica.	(Broadwith, 2017)
Laser de electrones libres de rayos X (XFEL)	Crea pulsos de radiación mediante un láser de electrones a velocidades de femtosegundos analizando estructura 3D y función biológica.	(N. Huang et al., 2021)

Cuantificación e identificación de proteínas

La concentración de proteína total en una muestra puede detectarse directamente por espectrofotometría a una observancia de 280nm, sin embargo, la sensibilidad aumenta si se aplica métodos colorimétricos o fluorométricos, en caso de detectar una proteína específica en pruebas serológicas o de expresión recombinante se puede aplicar ensayos ELISA. Una técnica muy conocida es la espectrometría de masas (MS), que implica la escisión de la proteína en péptidos para luego ser analizadas con un espectrómetro e identificar con un detector la composición de la proteína (espectro de masa específico) (Wang & Wilson, 2013). Para analizar el comportamiento celular o proteico se puede aplicar proteínas fluorescentes como GFP (proteína verde fluorescente), además, el aminoácido triptófano genera una fluorescencia en particular a condiciones específicas del medio proporcionando información sobre la conformación proteica (Healthcare, 2010).

El tamaño de la proteína es otro indicador para detectar una proteína dado que se puede aplicar electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), el detergente aniónico dodecilsulfato de sodio (SDS) linealiza las proteínas (desnaturaliza) e imparte una carga negativa proporcional a su masa molecular (MBL, 2023). Algunas técnicas adicionales se encuentran en la tabla 10.

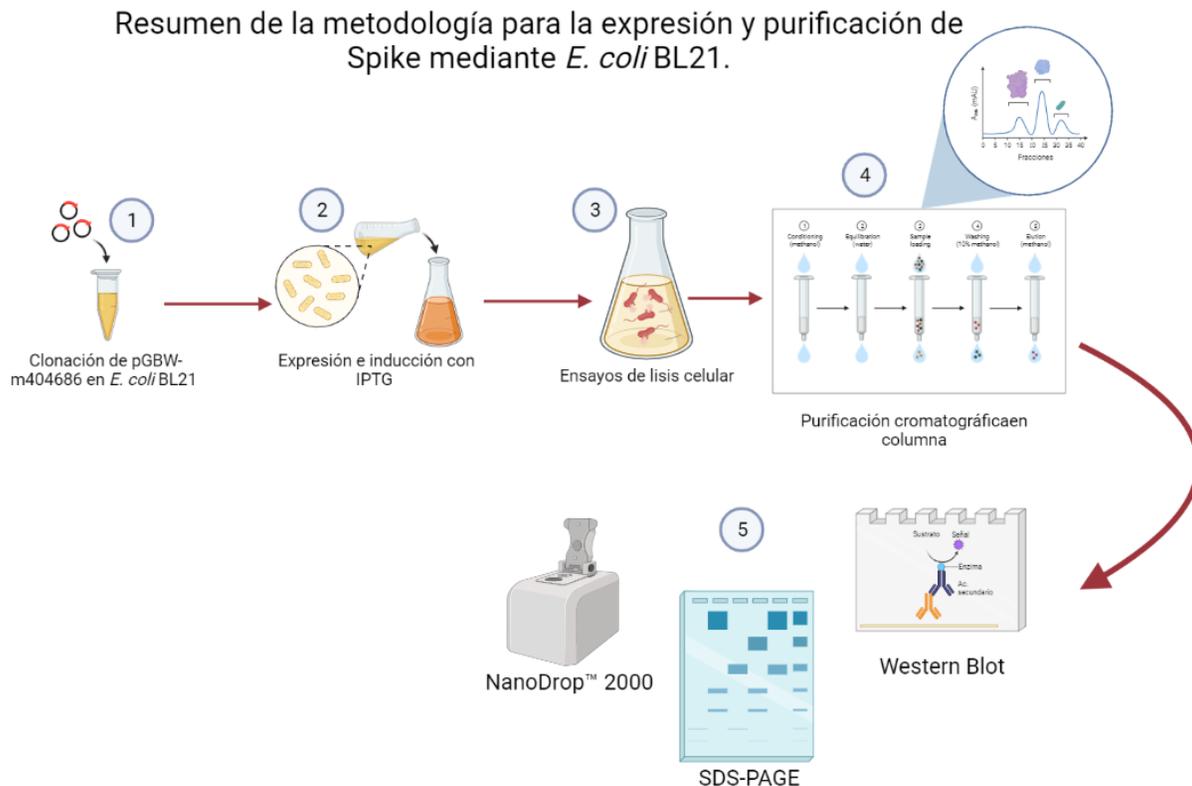
Tabla 10*Técnicas para cuantificar e identificar proteínas*

Técnica	Características	Ref.
Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	Utiliza la especificidad de anticuerpos para la identificación de proteínas	(De Martino et al., 2022)
Western Blot	Realiza una separación por tamaño donde marca la proteína objetivo utilizando un anticuerpo primario y secundario adecuado para visualizar.	(Anofel et al., 2022)
Isoelectric Focusing	Separación y modificación de la carga de la proteína mediante la variación del pH.	(Atascientific, 2019)
Calorimetría de titulación isotérmica	Analiza las interacciones entre péptidos mediante parámetros termodinámicos.	(Atascientific, 2019)
BCA	Ensayo colorimétrico que utiliza la reducción del cobre dada por la presencia de proteínas y posteriormente se aplica el ácido bicinconínico para observar el cambio de color.	(MERCK, 2023)
Bradford	Ensayo colorimétrico que utiliza el reactivo azul brillante de Coomassie que cambia de color al interactuar con la proteína.	(BIO-RAD, 2023)

Capítulo III: Materiales y Métodos

Figura 8

Resumen de la metodología para la expresión y purificación de Spike mediante E. coli BL21



Nota. Las pruebas de análisis de resultados (5) fueron lecturas de absorbancia y concentración en el NanoDrop™2000, SDS-PAGE y Western Blot.

Localización geográfica

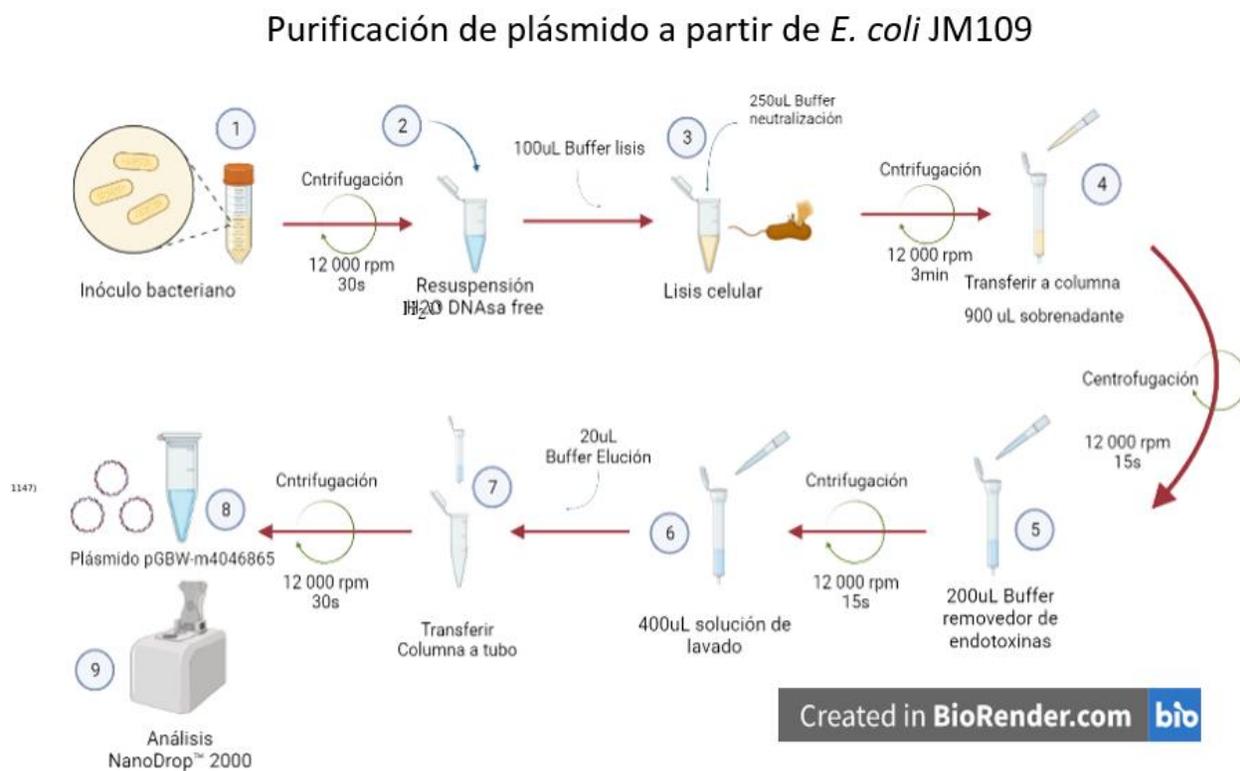
El trabajo de integración curricular se ejecutó en el Laboratorio de Inmunología y virología perteneciente al departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE ubicado en la Av. El Progreso s/n en Sangolquí, cantón Rumiñahui, Pichincha, Ecuador.

Verificación del plásmido pGBW-m4046865

Purificación del plásmido pGBW-m4046865 a partir de células competentes E. coli JM109

Figura 9

Procedimiento para obtener el plásmido pGBW-m4046865 a partir de *E. coli* JM109



El plásmido pGBW-m4046865 se encontraba en la cepa *E. coli* JM109 con el fin de preservarlo y poder clonarlo en cualquier momento, por ello se inició con una extracción o purificación de plásmido mediante el kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) preparando el inóculo un día anterior de 2mL (medio LB + 50ug/mL [Clor]). Se centrifugó 1.5mL del inóculo 30s a 12 000 rpm para concentrar la masa celular, el pellet se resuspendió con 600uL agua libre de DNAsa, posteriormente se agregó 100uL de tampón lisis celular, después se agregó 350uL de solución de neutralización y se centrifugó a 12 000 rpm por 30s. A continuación, se transfirió 900uL del sobrenadante a la columna del kit y se centrifugó a 12 000 rpm por 15s. La etapa de lavado se ejecutó con 200 uL de tampón removedor de endotoxinas para centrifugarse a 12 000 rpm por 15s, seguidamente se aplicó 400 uL de la solución de lavado de columna y se centrifugó a 12 000 rpm por 30s. Finalmente, la elución se realizó con 30uL de tampón de elución. La concentración de ADN se analizó en el NanoDrop™ 2000 (Fig. 9).

Digestión de plásmido pGBW-m4046865 por EcoRV

En este estudio se escogió la enzima de restricción EcoRV (Promega). El análisis se realizó previamente in silico mediante la plataforma Benchling.

Tabla 11

Ensamblaje de EcoRV para la digestión de pGBW-m4046865

Componente	1X (uL)	4X (uL)
Agua DEPC	16.3	65.2
Tampón de EcoRV (10X)	2	8
BSA acetilado (10ug/uL)	0.2	0.8
Plásmido (1ug/mL)	1	-
Enzima EcoRV	0.5	2
Total	20	76

El ensamblaje se efectuó para 3 muestras de pGBW-m4046865 (P1, P2 y P3) y un blanco, la incubación fue a 37°C durante 1h. La inactivación de la enzima se realizó por calor a 65°C durante 15min. Por último, se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa 1% (120 v, 300 mA, t= 35 min). El marcador utilizado fue 1kb DNA Ladder (Labnet Cat. No. R1000-1kb).

Transformación del plásmido pGBW-m4046865 en *E. coli* BL21 y ensayos de cloranfenicol

Figura 10

Metodología para transformar el plásmido pGBW-m4046865 en *E. coli* BL21



Created in **BioRender.com** **bio**

Se colocó 5uL de pGBW-m4046865 en las células competentes *E. coli* BL21 pLysS (Promega), después se incubó 20 min en hielo, posteriormente se realizó un baño maría en el termobloque durante 1min a 42°C, luego se incubó 2 min en hielo. A continuación, se añadió 250uL de medio SOC (0.5% extracto de levadura, 2% triptona, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM MgSO₄, 20 mM glucosa) con una incubación a 37°C, rpm=225 durante 1h30min (Fig. 10). El producto de incubación se constituyó de 2 controles negativos (medios con ampicilina (A) y neomicina (B)) y los parámetros para el sembrado en placa por extensión (LB+25ug/mL Chlor) se distribuyó de la siguiente forma:

Tabla 12*Parámetros del producto de transformación en sembrado por extensión*

n	Volumen de sembrado (uL)	Temperatura (°C)
1.	25	35
2.	25	37
3.	50	35
4.	50	37

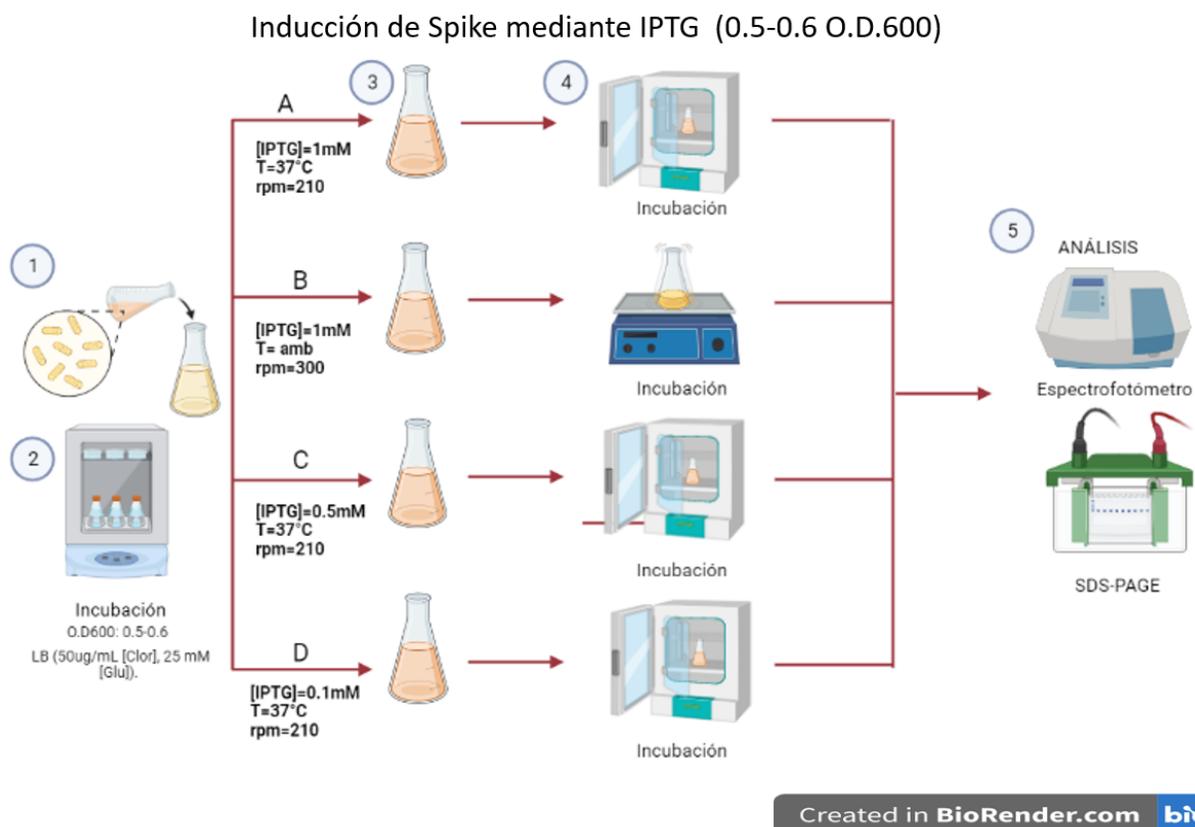
Para determinar la concentración adecuada de cloranfenicol se desempeñó una siembra por estriado a diferentes concentraciones de cloranfenicol manteniendo constante la temperatura (37°C).

Los ensayos fueron los siguientes.

Tabla 13*Parámetros de concentración de cloranfenicol*

N	[Clor]ug/mL
C	25
D	50
E	100
F	200

Condiciones de cultivo e inducción por IPTG para *E. coli* BL21 recombinante

Figura 11Estandarización de inducción para *E. coli* BL21 recombinante

Se inoculó previamente BL21 con el plásmido de interés en medio LB líquido con cloranfenicol (50 µg/mL) un día antes de los ensayos, después se recolectó 1 mL del medio en 4 matraces (250 mL) donde cada uno contenía 10 mL de LB (50ug/mL [Clor], 25 mM [Glu]) (Fig. 11). Se realizaron 4 ensayos detallados en la tabla 14, se elaboró las inducciones cuando el O.D 600 se encontraba entre 0.5-0.6 posteriormente se recolectó 1 mL del medio al tiempo 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 21h, 24h y 26h para analizar la absorbancia mediante el NanoDrop™ 2000.

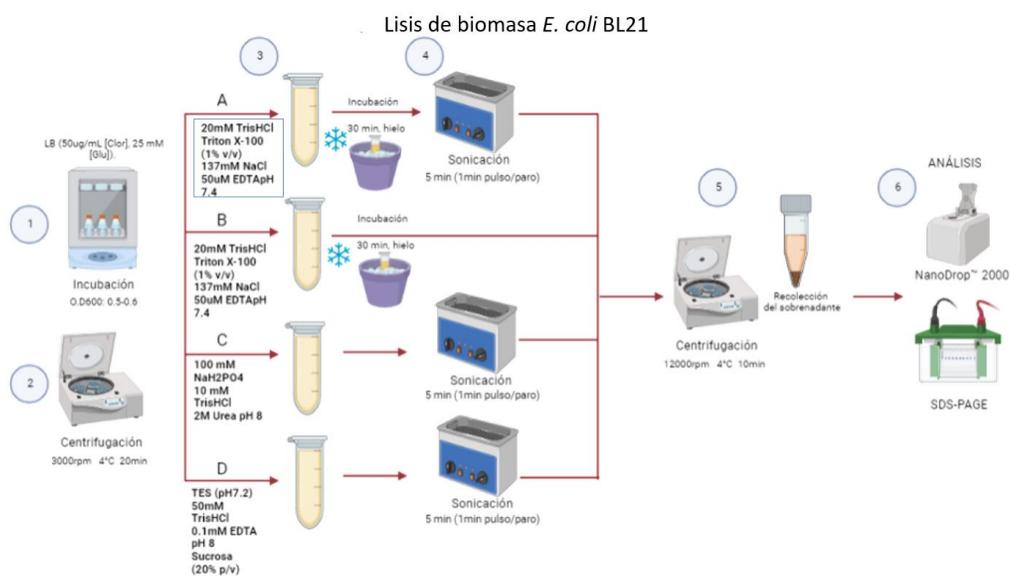
Tabla 14

Ensayos y parámetros para la inducción con IPTG

n	Parámetros
A	[IPTG]=1mM T=37°C rpm=210
B	[IPTG]=1mM T=ambiente (amb) rpm=300
C	[IPTG]=0.5mM T=37°C rpm=210
D	[IPTG]=0.1mM T=37°C rpm=210

Lisis celular para el producto de inducción *E. coli* BL21 recombinante

Figura 12

Metodología de estandarización de lisis para *E. coli* BL21 recombinante

Previamente, a los ensayos se inoculó 2 veces 50mL de medio LB (50ug/mL [Clor], 25mM [Clor]) en un matraz (250mL), el medio creció hasta un OD600 entre 0.5-0.6 para realizar la inducción con IPTG (0.5mM). Se recolectaron 25mL en 4 tubos (50mL), posteriormente se centrifugó a 3000rpm a 4°C durante 20min. Los ensayos de lisis celular se encuentran en la tabla 15 (Fig.12).

Tabla 15

Ensayos y variables para lisis celular

n	Tampón lisis	Incubación	Sonicación	Ref.
A	20mM TrisHCl Triton X-100 (1% v/v) 137mM NaCl 50uM EDTA pH 7.4	30 min en hielo	Sin sonicación	(Yaghoobizadeh et al., 2023)
B	20mM TrisHCl Triton X-100 (1% v/v) 137mM NaCl 50uM EDTA pH 7.4	30 min en hielo	5 min (1min pulso/paro)	(Yaghoobizadeh et al., 2023)
C	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM TrisHCl 2M Urea pH 8	Sin incubación	5 min (1min pulso/paro)	(Nazarian et al., 2022)
D	TES (pH7.2) 50mM TrisHCl 0.1mM EDTA pH 8 Sacarosa (20% p/v)	Sin incubación	5 min (1min pulso/paro)	(Ghamghami et al., 2020)

Finalmente, se centrifugó a 12 000 rpm a 4°C durante 10min, además se analizó la concentración de proteínas en el NanoDrop™ 2000.

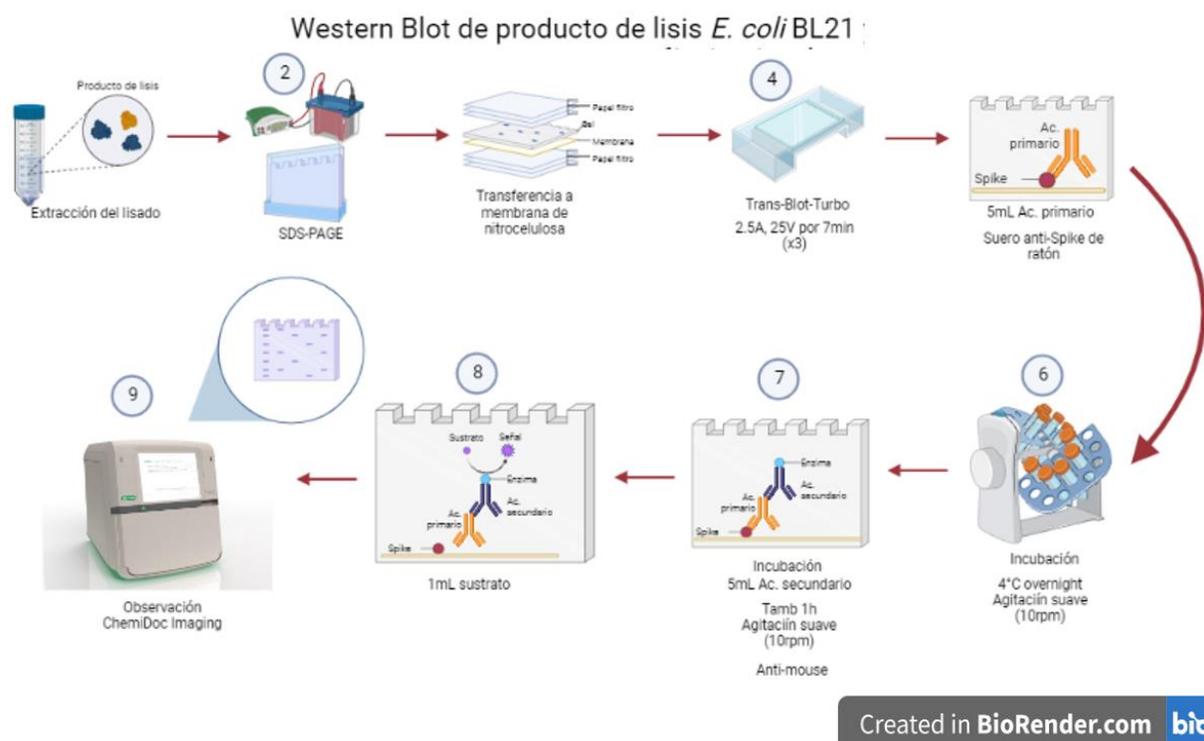
Diálisis del producto de lisis *E. coli* BL21 recombinante en PBS

El resultado del ensayo 1 (lisis celular) se dializó mediante bandas de (DIALYSIS TUBING, Fisherbrand, MWCO 12,000-14,000), se recortó 5cm de la banda y se colocó todo el producto de lisado, posteriormente se incubó en tampón PBS 1X overnight a 4°C. Por último, se realizó un análisis de electroforesis de proteínas (gel de concentración: 4%, gel de separación: 8%), también se analizó la concentración de proteínas en el NanoDrop™ 2000.

Western Blot para producto de lisis *E. coli* BL21 recombinante

Figura 13

Procedimiento para Western Blot de producto de lisis *E. coli* BL21 recombinante



El protocolo inicia de igual forma que SDS-PAGE, hasta la corrida en gel de poliacrilamida.

Obtenido el gel después de la corrida se incubó con tampón de transferencia (25mM Tris base, 192mM glicina, pH 8.3, metanol 20%) durante 10min, se transfirió el gel a la membrana de nitrocelulosa y papel Whatman. La transferencia se efectuó con el equipo Trans-Blot-Turbo (Bio-Rad) con 3 corridas de 2.5A,

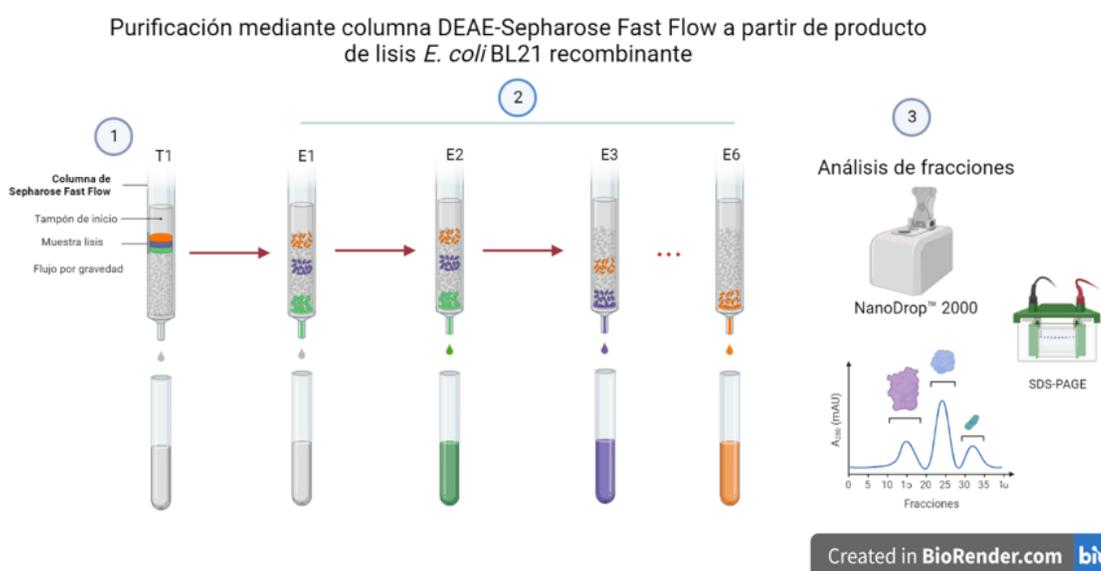
25V por 7min. Posteriormente, para confirmar la transferencia se ejerció una tinción con rojo de Ponceau durante 20min. Seguidamente, se llevó a cabo un lavado con TBS 1X (20mM Tris base, 150mM NaCl, pH 7.5) durante 10min. Después, se incubó con solución de bloqueo (TBS+BSA (5%)), a continuación, se realizó 6 lavados de 5min c/u con tampón TTBS (TBS + Tween 20 (0.1%)). Posteriormente, se incubó la membrana con 5mL de anticuerpo primario (1:1000 anticuerpo contra SARS-CoV-2 (IgG de ratón) + BSA 3% + TTBS) a 4°C overnight con agitación suave (10rpm).

Al día siguiente, se ejecutaron 6 lavados de 5min c/u con TTBS y se incubó con 5mL de anticuerpo secundario (1:20000 antimouse +TTBS), durante 1h con agitación suave (10rpm) en oscuridad. Posteriormente, se realizaron 6 lavados de 5min c/u con TTBS. Para la visualización se añadió 1mL de solución de sustrato 1:1 (tampón A y B del kit Bio-Rad Clarity Western ECL cat. no. 1705060) y se visualizó el resultado en el equipo ChemiDoc (Fig.13).

Purificación mediante columna DEAE-Sepharose Fast Flow

Figura 14

Metodología de purificación mediante columna DEAE-Sepharose Fast Flow a partir de producto de lisis E. coli BL21 recombinante



Primero se preparó las soluciones de trabajo descritas en la tabla 17, antes de utilizar la columna DEAE Sepharose Fast Flow se lavó con 12mL de agua destilada, posteriormente se equilibró con 12mL de tampón de inicio, la muestra se preparó 5mL de muestra a partir del lisado 1:5 (muestra: tampón de equilibrio) (Fig.14).

Tabla 16

Tampones de equilibrio y elución para columna DEAE sepharose Fast Flow

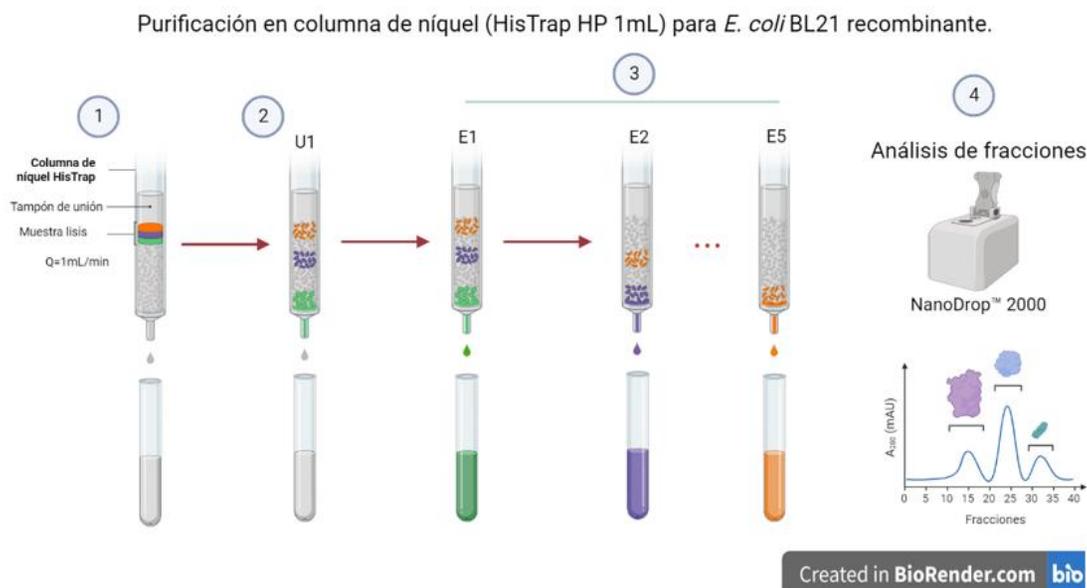
n	Soluciones	Composición
TI	Tampón de inicio	20mM Tris HCl pH 7.5
E1	Tampón de elución 1	20mM Tris HCl pH 7.5, 0.1M NaCl
E2	Tampón de elución 2	20mM Tris HCl pH 7.5, 0.2M NaCl
E3	Tampón de elución 3	20mM Tris HCl pH 7.5, 0.3M NaCl
E4	Tampón de elución 4	20mM Tris HCl pH 7.5, 0.4M NaCl
E5	Tampón de elución 5	20mM Tris HCl pH 7.5, 0.5M NaCl
E6	Tampón de elución 6	20mM Tris HCl pH 7.5, 1M NaCl
L	Solución de lavado	H2O _d NaCl 2M

Después de adicionar la muestra (5mL), se colocó el gradiente de elución 12mL de cada tampón, recolectando fracciones de 1.5mL para ser analizadas en el equipo NanoDrop™ 2000 con una longitud de onda de 280nm.

Purificación en columna de níquel (HisTrap HP 1mL, cytiva)

Figura 15

Metodología de purificación en columna de níquel (HisTrap HP 1mL) para *E. coli* BL21 recombinante



Acondicionamiento de la muestra

La muestra se ajustó a los componentes del tampón de unión (50mM Na₃PO₄, 300mM NaCl, 10mM Imidazol, pH 7.4) y se filtró con un filtro de 0.45µm. Se colocó el gradiente de elución descrito en la tabla 17.

Tabla 17

Preparación de tampones modificando concentración de imidazol y pH

n	Tampón	Componentes	pH
U1	Tampón de unión	50mM Na ₃ PO ₄ , 300mM NaCl, 10mM Imidazol	7.4
E1	Tampón de elución	50mM Na ₃ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM Imidazol	7.4
E2		50mM Na ₃ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM Imidazol	6.4
E3		50mM Na ₃ PO ₄ , 300mM NaCl, 250mM Imidazol	8
n	Tampón	Componentes	pH
E4		50mM Na ₃ PO ₄ , 300mM NaCl, 500mM Imidazol	8
E5		50mM Na ₃ PO ₄ , 300mM NaCl, 500mM Imidazol	7.4

La columna cromatográfica seleccionada para la purificación fue 1mL HisTrap HP (cytivia), dado el inserto de la columna se recomienda una etapa de blanco que consistió en lavar la columna con 5 volúmenes (VC) de agua destilada, seguidamente de 5 VC de tampón de elución y posteriormente 10 VC de tampón de unión (caudal de 1mL/min). Se aplicó 1mL de muestra acondicionada posteriormente se aplicó 8 VC de tampón de unión para equilibrar la columna. Finalmente, se aplicó el tampón de elución 5VC en total (Fig. 15).

Filtración mediante Amicon Ultra-4 del producto de purificación (cromatografía de intercambio aniónico DEAE Sepharose Fast Flow y cromatográfica de níquel)

Las fracciones recolectadas de cromatografía de DEAE Sepharose Fast Flow y níquel se recolectaron en dispositivos o tubos Amicon Ultra 50K (4mL 50 000MWCO) con un volumen máximo de 4mL para concentrar la proteína. Las condiciones fueron a 7 500xg. a 4°C durante 15 min. Se recolectaron los volúmenes tanto del centrifugado como del eludido para ser medidos en el equipo NanoDrop™ 2000 con una longitud de onda de 280nm.

SDS-PAGE

Todos los protocolos que incluyen la producción e identificación de proteínas (condiciones de cultivo, lisis celular, purificación en columnas) se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato sódico (SDS). El tampón de carga utilizado fue 2X (300mM 2-mercaptoetanol) cargando una concentración 1:1 para de las muestras. En todos los casos se corrieron 10uL en el gel de poliacrilamida (gel de separación: 8%, gel de concentración: 4%, el marcador fue Bench-Mark cat. No. 10748010) a 120v, 600 mA durante 1h. Posteriormente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie durante 10 min y se destiñeron con solución de distinción (Ác. acético glacial (10%v/v), etanol (10%v/v)) y agitación (170 rpm) hasta observar bandas definidas, finalmente se observó el gel mediante el equipo ChemiDoc.

Capítulo IV: Resultados

Verificación del vector pGBW-m4046865 en *E. coli* JM109

La concentración de ADN plasmídico purificado para P1, P2 y P3 fue de 150ug/mL, 71ug/mL y 183ug/mL respectivamente. La enzima de restricción EcoRV debía generar 3 cortes al plásmido pGBW-m4046865 según el análisis bioinformático en la plataforma Benchling (Fig.9-B) con un tamaño de 1176 bp, 2401 bp y 1972 bp para cada fragmento. Entonces únicamente la muestra P2 y P3 generó dichos fragmentos (P2E y P3E de Fig. 16) mediante la electroforesis en gel de agarosa (1%), confirmando la existencia y correcto plegamiento del vector pGBW-m4046865. La muestra P2 se utilizó para realizar la clonación.

Figura 16

Análisis confirmatorio de pGBW-m4046865 con EcoRV

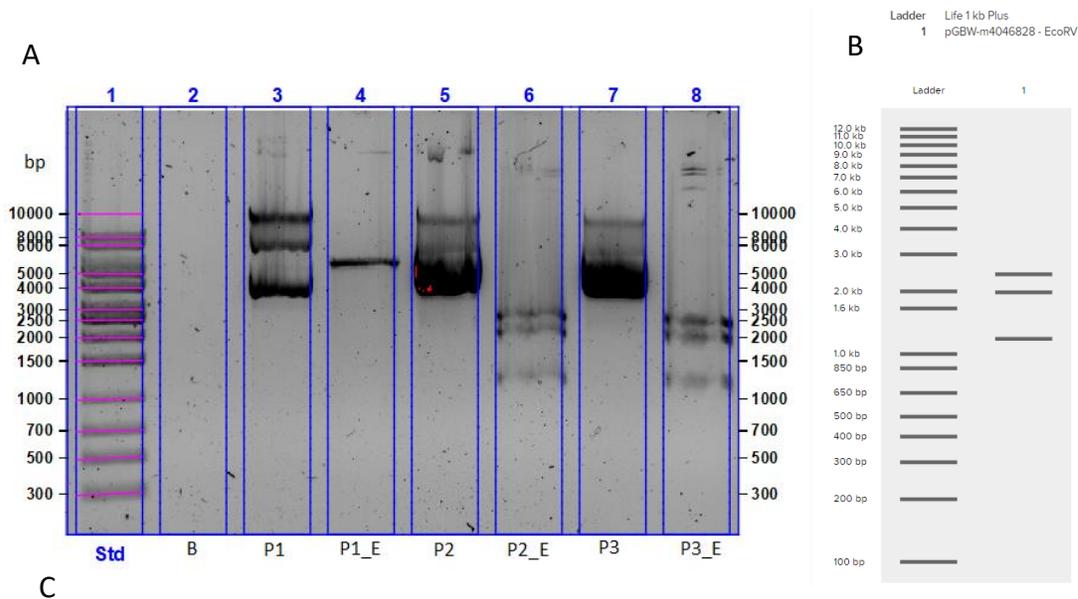


Tabla 18

Cortes analizados en Benchling antes del corte con EcoRV

Enzima	Cortes	Temperatura de incubación
EcoRV	3	37°C
Comienzo del corte	Final del corte	Tamaño (bp)
1866	3044	1176
3045	5445	2401
5446	1865	1972

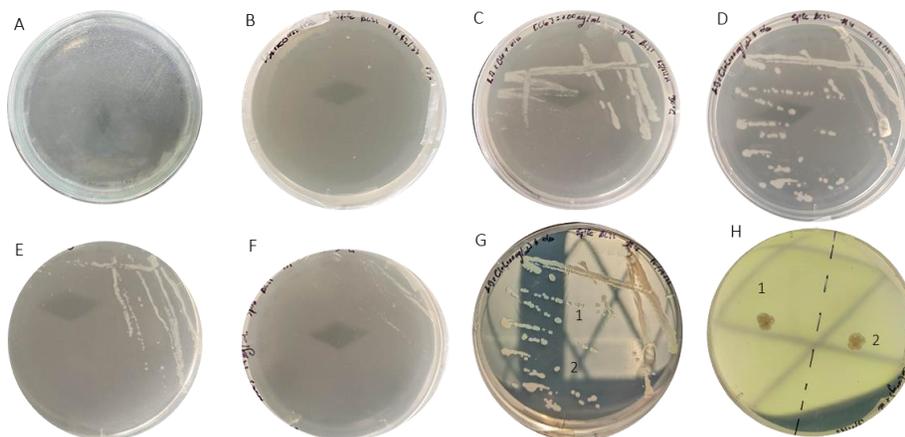
Nota. El producto de la enzima de restricción EcoRV se corrió en electroforesis en gel de agarosa (A), realizando un análisis previo en la plataforma Benchling (B) que a su vez menciona que a una incubación de 37°C se generan 3 cortes indicado el lugar de corte y su tamaño (C). El tamaño del plásmido es 3311 bp.

Transformación del plásmido pGBW-m4046865 en *E. coli* BL21 y ensayos de cloranfenicol

Se analizaron dos controles negativos, uno con ampicilina (50ug/mL, Fig. 10: A) y otro con neomicina (50 ug/mL, Fig. 17: B), como se puede observar no existió crecimiento. La figura 17 muestra los resultados de estriado en placa dado que los ensayos de transformación dieron crecimiento masivo, se determinó que la temperatura ideal de crecimiento era 37°C. Entonces, se utilizó un incremento de concentración de antibiótico de 25ug/mL a 200ug/mL (Fig. 17 C-F) donde se observa que el crecimiento bacteriano va disminuyendo a medida que se aumenta la concentración del antibiótico. Por último, se escogió dos colonias alzar del ensayo con 50ug/mL de cloranfenicol (Fig. 17: E) para aislarla, las colonias que se generaron presentaban una forma irregular y margen erosionado.

Figura 17

Sembrado por extensión para el producto de transformación



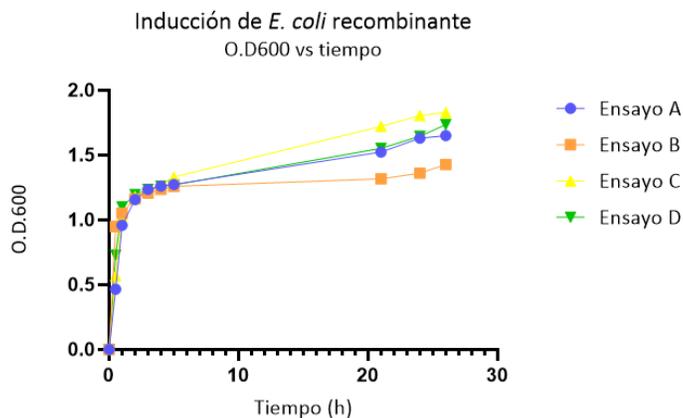
Nota. Controles negativos con ampilicina (A) y del medio LB (B), la incubación se realizó a 37°C donde se aplicó 25ug/mL (C), 50ug/mL (D), 100ug/mL (E) y 200ug/mL (F) de cloranfenicol. Se seleccionó dos colonias observadas en G para generar un aislamiento en H.

Ensayos de inducción en *E. coli* BL21 recombinante

El crecimiento de *E. coli* BL21 se observa en el gráfico de O.D600 vs tiempo, la concentración de IPTG varía entre 0.1-1mM, el ensayo C muestra mayor crecimiento con una concentración de 0.5mM de IPTG mientras que en los otros ensayos aparentemente el IPTG modifica la curva de crecimiento.

Figura 18

Variación de parámetros de inducción para de *E. coli* BL21

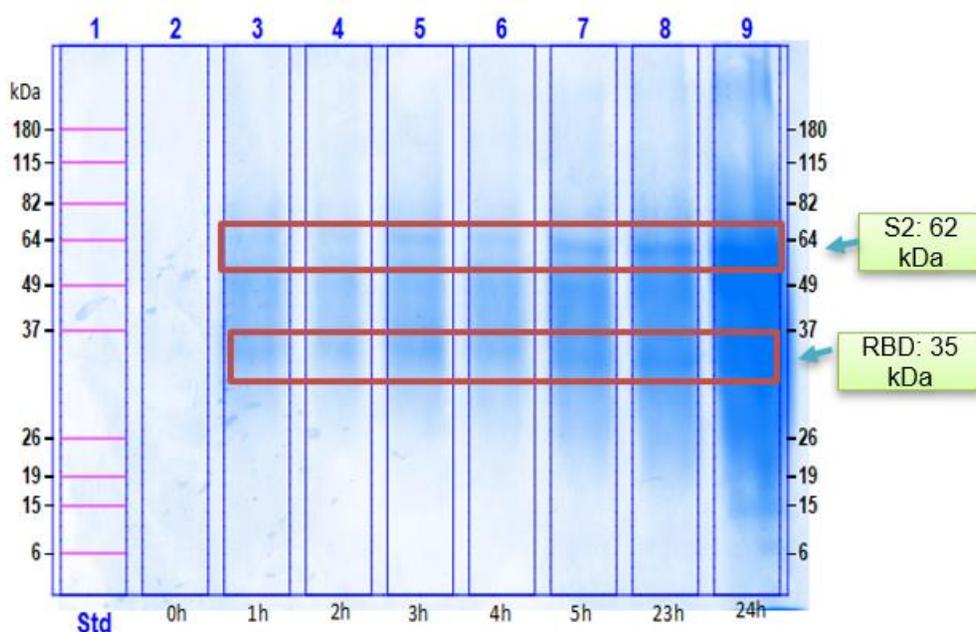


Nota. La cinética de crecimiento fue evaluada cada hora hasta 24h, las repeticiones tuvieron los siguientes tratamientos a 1mM [IPTG] y 37° C (A), 1mM [IPTG] y temperatura ambiente (B), 0.5mM [IPTG] y 37°C (C), 0.1 mM y [IPTG] 37°C (D). La grafica fue realizada con GraphPad Prism 8.

Los resultados de SDS-PAGE (Fig. 19) se obtuvieron con un muestreo realizado cada hora después de la inducción con IPTG durante 24h. El ensayo C fue el mejor resultado en caso de cinetica de crecimiento de acorde a variación de IPTG (fig. 18). Por último, Spike se encuentra entre la marcación de 35kDa RBD y 62kDa para la subunidad S2, para ello se demuestra con los resultados posteriores.

Figura 19

Análisis SDS-PAGE para ensayos de inducción en E. coli BL21 recombinante



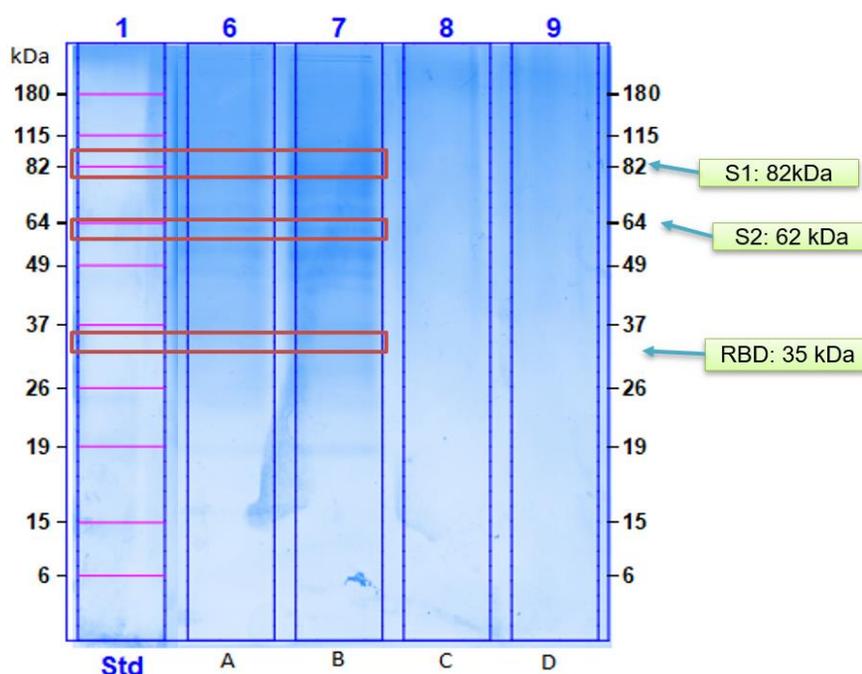
Nota. Expresión transitoria de RBD (35kDa) y S2 (62kDa) del tratamiento C con 0.5mM [IPTG], 37°C, 210rpm. Se cargo 10uL de muestra con tampón de carga 2X (4%SDS) (1:2), el marcador utilizado fue Bench Marck (180kDa), el gel de poliacrilamida (%concentración:4%, %concentración:8%).

Ensayos de lisis celular para biomasa de *E. coli* BL21 recombinante

Se realizaron 4 ensayos con diferentes soluciones lisis y condiciones (tabla 15), el análisis SDS-PAGE (Fig. 20) mostró que las muestras de los sobrenadantes (carril 1 y 6) presentaba proteína dado que se observó mejor nitidez en sus bandas donde aparentemente se encuentra Spike, mientras que el ensayo C y D (carril 8 y 9) no proporcionó ninguna extracción proteica en su sobrenadante. Los pellets o precipitados de cada ensayo (carril 2-5) presentaron degradación proteica o restos de lisis. Por lo tanto, el ensayo C muestra mejor lisis celular.

Figura 20

Análisis SDS-PAGE para ensayos de lisis celular en E. coli BL21 recombinante



Nota. Las repeticiones del tratamiento A y B se aplicó un tampón lisis 5%v/v (20mM TrisHCl, Tritón X-100 (1% v/v)), 137mM NaCl, 50uM EDTA pH 7.4). Se realizó una incubación de 30 min en hielo (A y C) y sonicación 5 min (1 min pulso/paro) solo para B. Se determinó S1 (82kDa), S2 (62kDa) y RBD (35kDa). Se cargó 10uL de muestra con tampón de carga 2X (4%SDS) (1:1).

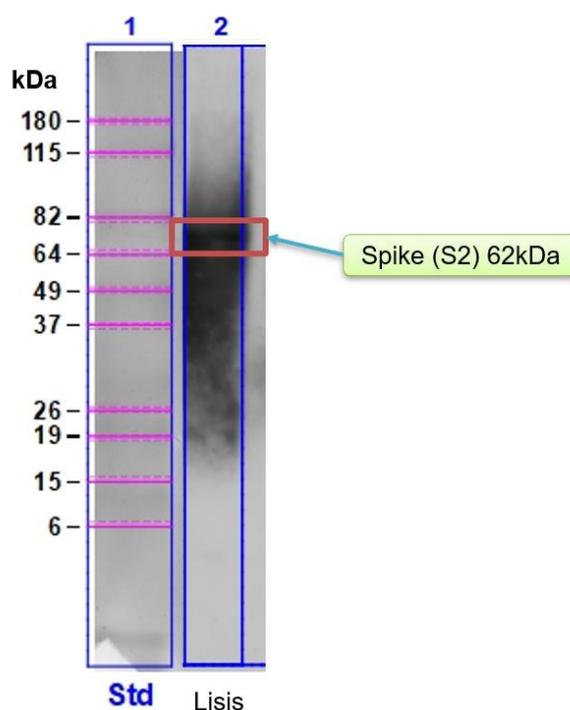
La concentración de proteína del ensayo C fue de 20.675mg/mL, posteriormente la lisis se trató con un proceso de diálisis que se sometió a los procesos cromatográficos generando una concentración de 16.327mg/mL (datos obtenidos de NanoDrop™ 2000).

Western Blot para producto de lisis *E. coli* BL21 recombinante

En todo el proceso es necesario confirmar la presencia de Spike para ello se utilizó la técnica de Western Blot para el producto de lisis. Efectivamente, se observó la presencia de Spike al tamaño previsto de aproximadamente 62kDa (Fig.21).

Figura 21

Análisis Western Blot para el producto de lisis *E. coli* BL21 recombinante



Nota. La expresión heteróloga de *E. coli* BL21 se verificó mediante Western Blot después de realizar la lisis, utilizando un suero de ratón (inmunizado con Spike) como anticuerpo primario mientras que se usó un antimouse IgG (Ref. ab197780) como anticuerpo secundario. Spike (S2) mostró un tamaño de 62kDa.

Purificación mediante columna de intercambio aniónico DEAE-Sepharose Fast Flow

Se aplicó cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-Sepharose Fast Flow) para eliminar trazas y compuestos innecesarios para la purificación de níquel. Las fracciones positivas se encuentran en la tabla 19.

Tabla 19

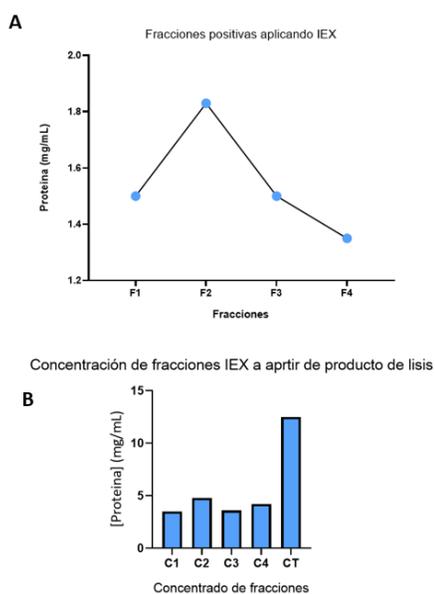
Concentraciones de fracciones obtenidas por DEAE-Sepharose Fast Flow

Tampón de Elución	Concentración de proteína (mg/mL)
F1	1.5
F2	1.85
F3	1.35
F4	1.25

Figura 22

Purificación de Spike mediante columna de DEAE-Sepharose Fast Flow a partir del producto de lisis

Cromatografía de intercambio aniónico (IEX) para producto de lisis.



Nota. Todas las fracciones de F1 (Fig. 22-A) se concentraron (Amicon Ultra-4) en una muestra generando C1 (Fig. 22-B) obteniendo una concentración final de 2.8 mg/mL, de igual forma fue para F2, F3 y F4. Finalmente, los concentrados se fusionaron en CT a una concentración de 12.5mg/mL. La grafica se realizó mediante GraphPad Prism 8.

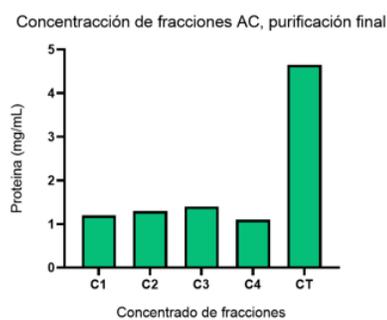
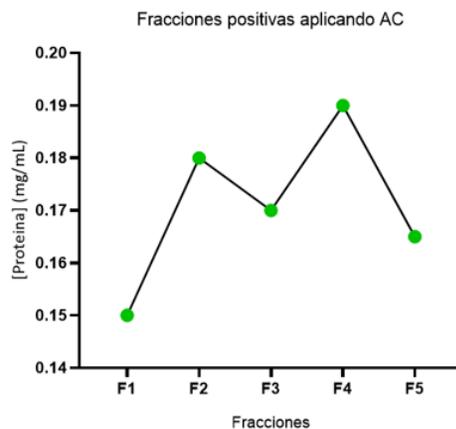
Purificación en columna de níquel (HisTrap HP 1mL, cytiva) a partir de producto de lisis *E. coli* BL21 recombinante

El producto de cromatografía de intercambio aniónico (Sepharose Fast Flow) se aplicó a la cromatografía de níquel, el producto CT de 12.5mg/mL se acondicionó, y mediante el gradiente de tampones se obtuvo las siguientes fracciones positivas (fig.23-A).

Figura 23

Purificación de Spike mediante columna de Níquel HisTrap a partir del producto de diálisis

Cromatografía de afinidad de níquel (AC) para el producto de IEX



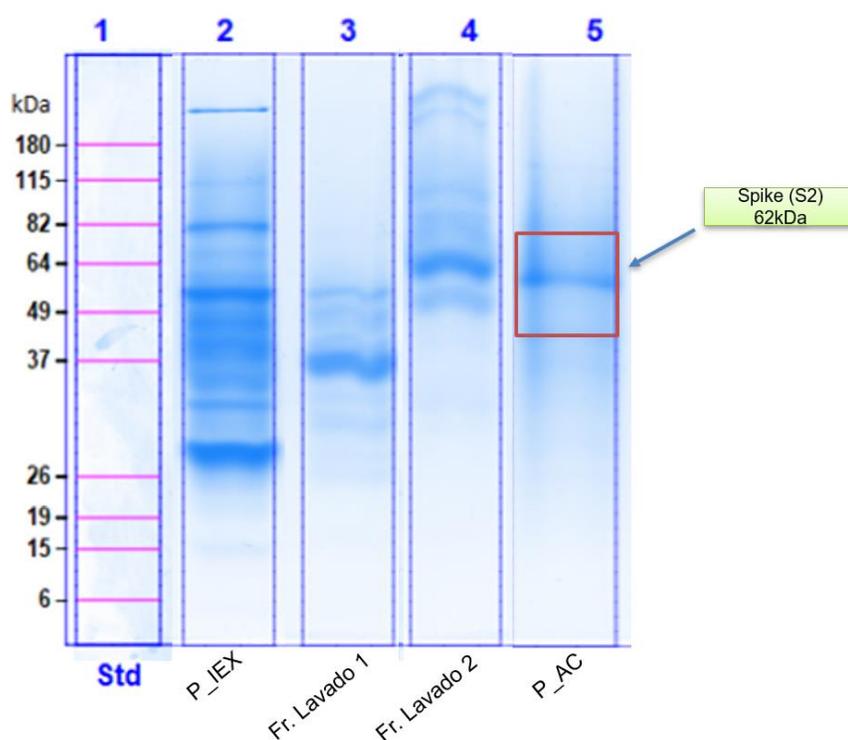
Nota. Se obtuvo una concentración de 2.53mg/mL de Spike (D-CT). La grafica se diseñó mediante GraphPad Prism 8.

Análisis SDS-PAGE

Por último, las fracciones y la purificación final aplicando cromatografía de afinidad de níquel se pueden observar en la figura 24.

Figura 24

Análisis SDS-PAGE para purificación de Spike mediante columna DEAE-Sepharose Fast Flow



Nota. El producto de cromatografía por intercambio aniónico (P_IEX) se pasó a través de la columna de níquel donde las fracciones de lavado eliminaron las proteínas que no tenían afinidad con níquel (Fr. Lavado 1 y Fr Lavado 2), por ende, la proteína Spike se obtiene de la purificación cromatográfica de níquel (P_AC) mostrando a Spike (S2) de un tamaño de 62kDa.

Capítulo V: Discusión

El desarrollo y optimización de tratamientos y mecanismos de diagnóstico para Covid19 se intensifica a medida que evoluciona o muta drásticamente el virus SARS-CoV-2, las investigaciones se congregan en la vacunación utilizando como objetivo terapéutico a la proteína Spike (He et al., 2021). En la actualidad, existen diversos métodos terapéuticos que inhiben el desarrollo de SARS-CoV-2 como la aplicación de fármacos Remdesivir o Favipivir como inhibidores de la polimerasa del virus (RdRp) o también inhibidores de proteasa por ejemplo Ritonavir u Oseltamivir (Oroojalian et al., 2020). El sistema de vacunación se ha intensificado dado el incremento severo de mortalidad, algunas vacunas están constituidas de mRNA envuelto por nanopartículas lipídicas (Pfizer-BioNTech) que se fusionaran con la célula huésped para expresar Spike e intensificar la respuesta inmune de memoria y con ello prevenir el ataque de SARS-CoV-2, en otros casos se inyecta directamente subunidades proteicas del virus como Spike (Novavax) con un coctel de adyuvantes para intensificar la respuesta inmune humoral (El-Shesheny et al., 2022). Por otro lado, el diagnostico presenta al ensayo RT-PCR como Gold standard para la identificación de SARS-CoV-2 sin embargo, la inversión de cebadores y más aún las sondas de hidrolisis como TaqMan que utiliza RT-PCR son costosas, por ello se puede utilizar pruebas más económicas como iELISA o inmunocromatografía de flujo lateral para detectar anticuerpos que solo sean específicos para SARS-CoV-2, esto tipo de pruebas dependen en gran medida de la calidad de antígeno que se utiliza y que tan específico es para detectar únicamente SARS-CoV-2, por ello se elabora antígenos de forma recombinante donde Spike se utiliza ampliamente, sin embargo la producción en líneas celulares como CHO o HEK-293 implican una alta inversión de producción (Tantiwawat et al., 2022). Por lo tanto, el proyecto actual utiliza a *E. coli* BL21 para facilitar la bioproducción y generar un antígeno adecuado que podría ser usado en el desarrollo de pruebas de diagnóstico.

La proteína Spike es muy difícil de producir de forma recombinante dado su tamaño y alto grado de glicosilación, sin embargo la producción heteróloga puede ayudar a la generación de kits de

diagnóstico ya que la glicosilación no es un factor primordial (Schaub et al., 2021). El proyecto consistió en la producción heteróloga de Spike mediante el sistema de expresión *E. coli* BL21, el plásmido pGBW-m4046865 (Bioworks & Chen, 2019) no fue diseñado en este estudio dado que es un vector comercial de Addgene, el sistema es similar al sistema pET-22b con diferencia de que no tiene el péptido PeIB-leader usado para la expresión periplasmática, además este plásmido le confiere resistencia al antibiótico cloranfenicol ya que expresa la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). El análisis en la plataforma Benchling contribuyó a especificar que Spike tenía un tamaño aproximado de 62kDa (Fig.6 1620bp) aplicado al análisis SDS-PAGE. El plásmido fue guardado en la cepa *E. coli* JM109 con anterioridad, entonces se extrajo el plásmido y se confirmó su presencia mediante la enzima EcoRV (Fig. 9), la mejor forma de conservar un plásmido es transformándolo a una bacteria dado que se protege de factores ambientales como cambios de temperatura y el plásmido tiende a degradarse más rápido (Alkan Uçkun et al., 2021). Utilizar enzimas de restricción es la forma más económica de confirmar la viabilidad de un plásmido ya que no es necesario diseñar cebadores como en la técnica de PCR ni implica el uso de equipos costosos como en secuenciación. En vista de que la cepa BL21 es un poco complicada de transformar dado que su crecimiento puede tardar más puesto que la carga metabólica es más elevada, se realizó un primer ensayo determinando temperatura y concentración adecuada de cloranfenicol, la temperatura adecuada fue de 37°C (Fig. 18), la concentración de cloranfenicol regula el crecimiento y a mayor concentración de cloranfenicol se reduce, se escogió la concentración de 50ug/mL, para que exista un ambiente estéril y libre de contaminación con otros patógenos y a su vez la bacteria recombinante *E. coli* BL21 no tenga que concentrarse únicamente en sobrevivir en el medio sino también generar altas concentraciones de Spike (Li et al., 2021), por último la elección de controles negativos debe ser cuidadosa ya que antibióticos del mismo grupo como amfenicoles que incluyen thiamfenicol y florenfinicol (de la misma familia que cloranfenicol) pueden dar falsos positivos dado su estructura similar y mecanismo CAT provisto por el plásmido (Carmignotto & Azzoni, 2019).

En la inducción de *E. coli* recombinante el factor principal a analizar es la concentración adecuada de IPTG, puede ser evidente que a altas concentraciones de IPTG se puede conseguir altas concentraciones de proteínas, sin embargo, la investigación de (Khani & Bagheri, 2020) argumenta que IPTG es tóxico, es por ello que en los resultados de inducción (Fig. 18), el crecimiento baja considerablemente a la concentración máxima utilizada de IPTG (1mM) y si más aún si se baja la temperatura de 37°C a Tamb (Ensayo A y B respectivamente) el crecimiento se disminuyó drásticamente. Por lo tanto, *E. coli* BL21 recombinante para producir Spike mostró estabilidad a una concentración de 0.5mM [IPTG] y una temperatura de 37°C y con ello los parámetros se establecieron para toda la investigación.

La producción heteróloga de *E. coli* BL21 recombinante para Spike fue en el periplasma, en vista de que en la recolección del pellet después de la inducción, además no existió ninguna proteína en el sobrenadante después de la inducción. La expresión extracelular se puede dar si existen secuencias o mecanismos de *E. coli* que faciliten dicha expresión, por ejemplo, el péptido PelB-leader o etiquetas de glutatión S-transferasa (GST) (Singha et al., 2017) pero conseguir la expresión extracelular es muy difícil dado que funciona únicamente con proteínas de menor tamaño (5-20kDa), así se aplique el péptido PelB-leader lo más probable es que Spike se produzca de forma intracelular por su tamaño de 62kDa. Entonces, se realizaron ensayos de lisis celular donde hay que considerar que el método de rotura influye en la solubilidad y estabilidad de Spike, por ende, se aplicó tampones que no reaccionen con las proteínas y potencien la ruptura celular, Tris y EDTA son agentes quelantes que se dirigen a la membrana celular externa facilitando la expulsión de proteínas periplasmáticas, de igual forma se puede usar sacarosa para facilitar la osmolaridad extracelular y liberar el contenido periplasmático, el caso de Tritón X-100 dado que es un detergente se dirige tanto a la membrana externa e interna de *E. coli* completando la lisis celular (Rusmini et al., 2007). Uno de los principales problemas en la lisis celular es la formación de cuerpos de inclusión, de cierto modo puede proteger a la proteína de interés (Spike) de

la proteólisis, pero a su vez hacen insoluble a la proteína dificultando la recuperación por centrifugado, un aditivo que puede usarse para solubilizar y desplegar los cuerpos de inclusión es la urea (4-8M), la concentración utilizada en el ensayo D fue de 2M, es por ello que no se obtuvieron buenos resultados (Fig.20-sobrenadante-C) (Nazarian et al., 2022). Los ensayos de lisis comprendieron el uso de algunos compuestos como TrisHCl, Tritón X100 y EDTA (Fig.20 y tabla 15) donde se confirma que por sí solos sin aplicar sonicación pueden realizar lisis (Fig.20-carril 6) (Yaghoobzadeh et al., 2023). Las proteasas son un factor importante al aplicar lisis, por lo general siempre se utiliza un conjunto de inhibidores como aprotinina o bestatina, EDTA también puede funcionar como inhibidor de proteasas exclusivamente de metaloproteasas (Wingfield, 2014). La lisis celular puede mejorar si se aplican métodos mecánicos como sonicación, homogenización o molienda de perlas, acelerando el proceso y eliminando compuestos innecesarios como ADN, sin embargo, si se crea mucha fuerza de cizallamiento se puede degradar la proteína de interés, en estos procesos el incremento de calor debe controlarse con frío para evitar desnaturalización (Wingfield, 2014). El proyecto utilizó pruebas de confirmación de expresión de Spike dado que si no se está expresando, se gastarían medios para la purificación y posteriores ensayos, entonces del producto de lisis se analizó mediante Western Blot el cual utilizó como anticuerpo primario a un suero inmunizado con Spike de la investigación (Orosco, 2019) mientras que para el anticuerpo secundario se utilizó un anti-mouse que identificó la presencia de Spike (Fig. 21) confirmando su expresión y por ende realizar su purificación.

Debido a que HisTrap solo permite la entrada de 1mL de muestra y está a su vez esta mezclada con residuos y proteínas inespecíficas obtenidas del producto de lisado, (Tang et al., 2023) recomienda un tratamiento previo para concretar la mayor cantidad de Spike posible, eliminando la mayor cantidad de residuos, entonces se puede aplicar una purificación inespecífica previa como un intercambiador de aniones (Sephacrose Fast Flow) que tiene como principio la separación de compuestos según la carga e interacciones electrostáticas que se le puede conferir a Spike ($pI= 5.9-7.1$) (Areo et al.,

2021)), por ello al implementar un pH superior al punto isoeléctrico se genera una interacción electrostática entre la matriz de intercambio aniónico y Spike, para la elución se utilizó una variación de concentraciones de sales (NaCl-tabla 17) donde al parecer Spike interactuó con la matriz Sepharose Fast Flow específicamente el tampón de elución 4 (20mM Tris HCl pH 7.5, 0.4M NaCl) dado que se encuentra una banda que determina la presencia de Spike (Abdulrahman & Ghanem, 2018). Aunque la concentración de proteína disminuyó de 16.327mg/mL a 12.5 mg/mL después de la cromatografía de intercambio aniónico, la muestra ya era adecuado para la columna de níquel HisTrap.

La purificación en columna de níquel HisTrap trabaja en función de un agente competitivo que es el imidazol, al inicio se acondicionó la columna con tampón de unión (de igual forma la muestra) para establecer un equilibrio entre Spike y la columna, además cantidad de imidazol inicial que entra impide la adherencia de sustancias inespecíficas o contaminantes, dado que existe una competencia entre el imidazol y Spike para que eluda Spike se debe aumentar la concentración de imidazol (Tee et al., 2020). La concentración inicial o cantidad de proteína debe bajar a medida que se administra los tampones de unión y elución, de forma teórica Spike debe eludirse en las 5 primeras fracciones de haber aplicado el tampón de elución, sin embargo, no fue así dado que no salía en ninguna fracción inicial por ello se realizó en ensayos con diferentes tampones de elución (Fig. 23), entonces aplicando primero el tampón de elución E1 (50mM Na₃PO₄, 300mM NaCl, 250mM Imidazol pH7.4) y seguidamente el tampón de elución E2 (50mM Na₃PO₄, 300mM NaCl, 250mM Imidazol) se observó una pequeña cantidad de elución en la fracción E2F+1(Fig. 23), en vista de que las concentraciones eran muy bajas (variaban entre 0.9-1.4mg/mL) se decidió concentrar mediante dispositivos Amicon (4mL 50kDa), el tamaño de poro se seleccionó dado el tamaño aproximado de Spike (62kDa). Además, el porcentaje de rendimiento de níquel HisTrap fue de aproximadamente del 30-40% (Schaub et al., 2021).

Finalmente, Spike se confirmó mediante SDS-PAGE el cual puede ser usado para futuros ensayos de diagnóstico utilizando a Spike como antígeno en ensayos ELISA o cromatografía de flujo lateral,

además Spike contienen importantes epítomos donde se aplica un análisis de anticuerpos neutralizantes (NAb) para comprender el mecanismo y evolución del SARS-CoV-2 generando una alta demanda en el mercado producirlo de forma heteróloga.

Capítulo VI: Conclusiones

Se expresó Spike con un tamaño de 62kDa en E. coli BL21 a una concentración final de 2.53mg/mL, donde se estandarizó en medio LB (50ug/mL [Clor], 25 mM [Glu]) a una temperatura de 37°C, con una agitación de 210rpm, la inducción adecuada se inició con un O.D 600 entre 0.5-0.6 (2-3h) donde la concentración optima de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) fue de 0.5mM (37°C, 210rpm), la extracción de biomasa se puede realizar entre 5-21h después de la inducción. El ensayo de lisis que recuperó más cantidad de proteína fue el tampón lisis (20mM TrisHCl, Triton X-100 (1% v/v), 137mM NaCl, 50uM EDTA, pH 7.4) aplicando sonicación (5 min pulso/paro).

La cromatografía de intercambio aniónico elimino la mayoría de compuestos tóxicos como EDTA que interrumpe la unión de Spike con la columna de afinidad de níquel, además elimino trazas y ADN. Posteriormente, al aplicar cromatografía de níquel se consiguió la purificación de Spike obteniendo la subunidad S2 de 62kDa (análisis SDS-PAGE).

Capitulo VII: Recomendaciones

Para estudios posteriores se recomienda una caracterización de la función de Spike donde se aplique cuantificación de BCA y Bradford, además realizar pruebas de función de Spike como Western Blot y ELISA. Por otro lado, se ah creado una plataforma que puede usarse como base para escalamiento a nivel industrial, donde se puede utilizar equipos automatizados como el biorreactor BIO-TEC-PRO Tecnal. Por último, se puede utilizar estudios cristalográficos como microscopia crioelectrónica, espectroscopia de resonancia magnética nuclear y microscopia electrónica 3D antes de aplicarlos a ensayos preclínicos en modelos animales.

Bibliografía

- Abdulrahman, A., & Ghanem, A. (2018). Recent advances in chromatographic purification of plasmid DNA for gene therapy and DaNA vaccines: A review. *Analytica Chimica Acta*, *1025*, 41-57. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.001>
- Abulsoud, A. I., El-Husseiny, H. M., El-Husseiny, A. A., El-Mahdy, H. A., Ismail, A., Elkhawaga, S. Y., Khidr, E. G., Fathi, D., Mady, E. A., Najda, A., Algahtani, M., Theyab, A., Alsharif, K. F., Albrakati, A., Bayram, R., Abdel-Daim, M. M., & Doghish, A. S. (2023). Mutations in SARS-CoV-2: Insights on structure, variants, vaccines, and biomedical interventions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *157*, 113977. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113977>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Analyzing Protein Structure and Function. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26820/>
- Alkan Uçkun, A., Uçkun, M., & Akkurt, Ş. (2021). Efficiency of Escherichia coli Jm109 and genetical engineering strains (E. coli MT2, E. coli MT3) in cadmium removal from aqueous solutions. *Environmental Technology & Innovation*, *24*, 102024. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102024>
- Alanagreh, L., Alzoughool, F., & Atoum, M. (2020). The Human Coronavirus Disease COVID-19: Its Origin, Characteristics, and Insights into Potential Drugs and Its Mechanisms. *Pathogens*, 1-11.
- Anofel, Houzé, S., & Delhaes, L. (2022). Chapitre 11—Techniques de Western Blot. En Anofel, S. Houzé, & L. Delhaes (Eds.), *Parasitologie et Mycologie Médicales (Deuxième Édition)* (pp. 185-190). Elsevier Masson. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-77766-0.00011-X>
- Areo, O., Joshi, P. U., Obrenovich, M., Tayahi, M., & Heldt, C. L. (2021). Single-Particle Characterization of SARS-CoV-2 Isoelectric Point and Comparison to Variants of Interest. *Microorganisms*, *9*(8), Art. 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081606>

Atascientific. (2019, agosto 2). *Protein Analysis Techniques Explained*. ATA Scientific.

<https://www.atascientific.com.au/3-protein-analysis-techniques/>

BIO-RAD. (2023, marzo 1). *Bradford Protein Assay*. Bio-Rad Laboratories. [https://www.bio-rad.com/es-](https://www.bio-rad.com/es-ec/feature/bradford-protein-assay.html)

[ec/feature/bradford-protein-assay.html](https://www.bio-rad.com/es-ec/feature/bradford-protein-assay.html)

Bioworks, G., & Chen, B. (2019, enero 23). *Addgene: PGBW-m4046865*.

<https://www.addgene.org/153930/>

Broadwith, P. (2017, octubre 4). *Explainer: What is cryo-electron microscopy*. Chemistry World.

<https://www.chemistryworld.com/news/explainer-what-is-cryo-electron-microscopy/3008091.article>

Carmignotto, G. P., & Azzoni, A. R. (2019). On the expression of recombinant Cas9 protein in *E. coli* BL21(DE3) and BL21(DE3) Rosetta strains. *Journal of Biotechnology*, 306, 62-70.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.09.012>

CDC. (2020, febrero 11). *COVID-19 and Your Health*. Centers for Disease Control and Prevention.

<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/symptoms-testing/symptoms.html>

Chen, Y., Li, C., Liu, F., Ye, Z., Song, W., Lee, A. C. Y., Shuai, H., Lu, L., To, K. K.-W., Chan, J. F.-W., Zhang, A. J., Chu, H., & Yuen, K.-Y. (2022). Age-associated SARS-CoV-2 breakthrough infection and changes in immune response in a mouse model. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 368-383.

<https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2026741>

Cui, J., Li, F., & Shi, Z.-L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), Art. 3. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>

De Martino, M., Daviaud, C., & Vanpouille-Box, C. (2022). Chapter 11—ELISA-based quantification of type I IFN secretion by irradiated cancer cells. En A. Sato, J. Kraynak, A. E. Marciscano, & L. Galluzzi (Eds.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 172, pp. 163-178). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2022.01.004>

- Ehrlich, P. (2021, febrero 19). *Daño tisular a través de la fusión celular en COVID-19 y el papel de la proteína espiga*. <https://www.bionity.com/es/noticias/1169949/dao-tisular-a-travs-de-la-fusion-celular-en-covid-19-y-el-papel-de-la-protena-espiga.html>
- El-Shesheny, R., El Taweel, A., Gomaa, M. R., Roshdy, W. H., Kandeil, A., Webby, R. J., Kayali, G., & Ali, M. A. (2022). Induced humoral immunity of different types of vaccines against most common variants of SARS-CoV-2 in Egypt prior to Omicron outbreak. *Vaccine*, *40*(32), 4303-4306. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2022.05.086>
- Eskandarian Boroujeni, M., Sekrecka, A., Antonczyk, A., Hassani, S., Sekrecki, M., Nowicka, H., Lopacinska, N., Olya, A., Kluzek, K., Wesoly, J., & Bluysen, H. A. R. (2022). Dysregulated Interferon Response and Immune Hyperactivation in Severe COVID-19: Targeting STATs as a Novel Therapeutic Strategy. *Frontiers in Immunology*, *13*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.888897>
- Esqueda, A., Jugler, C., & Chen, Q. (2021). Chapter Eleven—Design and expression of a bispecific antibody against dengue and chikungunya virus in plants. En W. B. O'Dell & Z. Kelman (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 660, pp. 223-238). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2021.05.003>
- Fitzgerald, G. A., Komarov, A., Kaznadzey, A., Mazo, I., & Kireeva, M. L. (2021). Expression of SARS-CoV-2 surface glycoprotein fragment 319–640 in *E. coli*, and its refolding and purification. *Protein Expression and Purification*, *183*, 105861. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105861>
- GE Healthcare. (2010). Strategies for Protein Purification. In G. Healthcare, *Strategies for Protein Purification* (p. 167). Europa: Handbook.
- Ghamghami, E., Abri Aghdam, M., Tohidkia, M. R., Ahmadikhah, A., Khanmohammadi, M., Mehdipour, T., Mokhtarzadeh, A., & Baradaran, B. (2020). Optimization of Tris/EDTA/Sucrose (TES)

- periplasmic extraction for the recovery of functional scFv antibodies. *AMB Express*, *10*(1), 129.
<https://doi.org/10.1186/s13568-020-01063-x>
- Guillén, C. P. (2005). Legislación ecuatoriana y biotecnología. *Foro: Revista de Derecho*, *4*, Art. 4.
- Harrison, A. G., Lin, T., & Wang, P. (2020). Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends in Immunology*, *41*(12), 1100-1115. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.10.004>
- He, Y., Qi, J., Xiao, L., Shen, L., Yu, W., & Hu, T. (2021). Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from Escherichia coli. *Engineering in Life Sciences*, *21*(6), 453-460. <https://doi.org/10.1002/elsc.202000106>
- He, Y., Wang, K., & Yan, N. (2014). The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins. *Protein & Cell*, 658 - 672.
- Healthcare. (2010). *Strategies for Protein Purification*. General Electric Company—.
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(3), Art. 3. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, N., Deng, H., Liu, B., Wang, D., & Zhao, Z. (2021). Features and futures of X-ray free-electron lasers. *The Innovation*, *2*(2), 100097. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100097>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X., Xu, W., & Liu, S. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: Potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, *41*(9), Art. 9. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Khani, M.-H., & Bagheri, M. (2020). Skimmed milk as an alternative for IPTG in induction of recombinant protein expression. *Protein Expression and Purification*, *170*, 105593.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105593>
- Li, L., Yang, M., Zhu, W., Liu, X., Peng, X., & Li, H. (2021). Functionally ampicillin-stressed proteomics reveals that AdhE regulates alcohol metabolism for antibiotic resistance in Escherichia coli. *Process Biochemistry*, *104*, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.03.017>

- Liu, S., Zhao, Y., Feng, X., & Xu, H. (2022). SARS-CoV-2 infection threatening intestinal health: A review of potential mechanisms and treatment strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1-19. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2103090>
- MBL. (2023, marzo 1). *The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) | MBL Life Science -JAPAN-* [SDS-PAGE is an analytical technique to separate proteins based on their molecular weight.]. The principle and method of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). <https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/sds-page.html>
- Mehnoush, S., Sahar, S., Mahdieh, A., Mohsen, R., Ramin, P., Mostafa , H., & Molla, H. (2021). Chitin and chitosan as tools to combat COVID-19: A triple approach. *International Journal of Biological Macromolecules*, 235-244.
- MERCK. (2023, marzo 1). *Kit de ensayo de proteínas BCA | 71285*. https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/BCA-Protein-Assay-Kit,EMD_BIO-71285?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F71285?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F71285?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com%2F71285
- Mikami, S., Kobayashi, T., Masutani, M., Yokoyama, S., & Imataka, H. (2008). A human cell-derived in vitro coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 62(2), 190-198. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.09.002>
- Morgan, K. (2020, noviembre 11). *Plasmids 101: Origin of Replication*. <https://blog.addgene.org/plasmid-101-origin-of-replication>
- Nambisan, P. (2017). Chapter 4—Recombinant DNA Technology and Genetically Modified Organisms. En P. Nambisan (Ed.), *An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology* (pp. 83-126). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809231-6.00004-1>

- Nassar, A., Ibrahim, I. M., Amin, F. G., Magdy, M., Elgharib, A. M., Azzam, E. B., Nasser, F., Yousry, K., Shamkh, I. M., Mahdy, S. M., & Elfiky, A. A. (2021). A Review of Human Coronaviruses' Receptors: The Host-Cell Targets for the Crown Bearing Viruses. *Molecules*, *26*(21), Art. 21. <https://doi.org/10.3390/molecules26216455>
- Nazarian, S., Olad, G., Abdolhamidi, R., Motamedi, M. J., Kazemi, R., Kordbacheh, E., Felagari, A., Olad, H., Ahmadi, A., Bahirae, A., Farahani, P., Haghighi, L., Hassani, F., Hajhassan, V., Nadi, M., Sheikhi, A., Salimian, J., & Amani, J. (2022). Preclinical study of formulated recombinant nucleocapsid protein, the receptor binding domain of the spike protein, and truncated spike (S1) protein as vaccine candidates against COVID-19 in animal models. *Molecular Immunology*, *149*, 107-118. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2022.06.007>
- Oroojalian, F., Haghbin, A., Baradaran, B., Hemmat, N., Shahbazi, M.-A., Baghi, H. B., Mokhtarzadeh, A., & Hamblin, M. R. (2020). Novel insights into the treatment of SARS-CoV-2 infection: An overview of current clinical trials. *International Journal of Biological Macromolecules*, *165*, 18-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.204>
- Overton, T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug Discovery Today*, *19*(5), 590-601. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.11.008>
- Pampel, J. (2017, diciembre 29). *Protein Expression Systems*. Protein Expression Systems. <https://www.antibodies-online.com/resources/17/5177/protein-expression-systems/>
- Park, R. (2022, noviembre 26). *Recombinant protein—Definition & Expression Process—Evitria*. <https://www.evitria.com/journal/recombinant-antibodies/recombinant-protein/>
- Perkins, E. J. (2014, diciembre 14). *Plasmids 101: Protein tags*. <https://blog.addgene.org/plasmids-101-protein-tags>

- Riguero, V., Clifford, R., Dawley, M., Dickson, M., Gastfriend, B., Thompson, C., . . . Connor, E. (2020). Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. *Journal of Chromatography A*, 1-19.
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412-1422.
<https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Rusmini, F., Zhong, Z., & Feijen, J. (2007). Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules*, 8(6), 1775-1789. <https://doi.org/10.1021/bm061197b>
- Saito, A., Tamura, T., Zahradnik, J., Deguchi, S., Tabata, K., Anraku, Y., Kimura, I., Ito, J., Yamasoba, D., Nasser, H., Toyoda, M., Nagata, K., Uriu, K., Kosugi, Y., Fujita, S., Shofa, M., Begum, M. M., Shimizu, R., Oda, Y., ... Sato, K. (2022). Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75 variant. *Cell Host & Microbe*, 30(11), 1540-1555.e15.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.10.003>
- Schaub, J. M., Chou, C.-W., Kuo, H.-C., Javanmardi, K., Hsieh, C.-L., Goldsmith, J., DiVenere, A. M., Le, K. C., Wrapp, D., Byrne, P. O., Hjorth, C. K., Johnson, N. V., Ludes-Meyers, J., Nguyen, A. W., Wang, N., Lavinder, J. J., Ippolito, G. C., Maynard, J. A., McLellan, J. S., & Finkelstein, I. J. (2021). Expression and characterization of SARS-CoV-2 spike proteins. *Nature Protocols*, 16(11), Art. 11.
<https://doi.org/10.1038/s41596-021-00623-0>
- Singha, T. K., Gulati, P., Mohanty, A., Khasa, Y. P., Kapoor, R. K., & Kumar, S. (2017). Efficient genetic approaches for improvement of plasmid based expression of recombinant protein in *Escherichia coli*: A review. *Process Biochemistry*, 55, 17-31. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.01.026>
- Srivastava, N., Singh, A., Kumari, P., Hind, J., Gautam, V., Yadav, M., . . . Kharwar, R. (2021). Chapter 21 - Advances in extraction technologies: isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. *Natural Bioactive Compounds*, 409-433.

- Suresh, N. (2020). *Pinterest*. Retrieved from in.pinterest.com: <https://in.pinterest.com/pin/diagram-of-column-chromatography--692076667747615595/>
- Tang, R., Bai, Q., Ma, S., & Ou, J. (2023). Materials, workflows and applications of IMAC for phosphoproteome profiling in the recent decade: A review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 158, 116862. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116862>
- Tantiwiwat, T., Thaiprayoon, A., Siriatcharanon, A., Tachaapaikoon, C., Plongthongkum, N., & Warahozhmayev, D. (2022). Utilization of Receptor-Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein Expressed in *Escherichia coli* for the Development of Neutralizing Antibody Assay. *Molecular Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00563-4>
- Tee, K. L., Jackson, P. J., Scarrott, J. M., Jaffe, S. R. P., Johnson, A. O., Johari, Y., Pohle, T. H., Mozzanino, T., Price, J., Grinham, J., Brown, A., Nicklin, M. J., James, D. C., Dickman, M. J., & Wong, T. S. (2020). *Purification of recombinant SARS-CoV-2 spike, its receptor binding domain, and CR3022 mAb for serological assay* (p. 2020.07.31.231282). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.07.31.231282>
- Thakur, R., & Shankar, J. (2017). Strategies for Gene Expression in Prokaryotic and Eukaryotic System. En V. C. Kalia & A. K. Saini (Eds.), *Metabolic Engineering for Bioactive Compounds: Strategies and Processes* (pp. 223-247). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5511-9_11
- Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2019.00420>
- Tripathi, N., Shrivastava, A., Biswal, K., & Rao, L. (2009). Optimization of culture medium for production of recombinant dengue protein in *Escherichia coli*. *Industrial Biotechnology*, 179-183.
- Vanni, I., Iacobone, F., D'Agostino, C., Giovannelli, M., Pirisinu, L., Altmeppen, H. C., Castilla, J., Torres, J. M., Agrimi, U., & Nonno, R. (2023). An optimized Western blot assay provides a comprehensive

- assessment of the physiological endoproteolytic processing of the prion protein. *Journal of Biological Chemistry*, 299(2), 102823. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102823>
- Walls, A. C., Park, Y.-J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Wang, P., & Wilson, S. R. (2013). Mass spectrometry-based protein identification by integrating de novo sequencing with database searching. *BMC Bioinformatics*, 14(Suppl 2), S24. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S2-S24>
- Watts, A., Sankaranarayanan, S., Watts, A., & Raipuria, R. K. (2021). Optimizing protein expression in heterologous system: Strategies and tools. *Meta Gene*, 29, 100899. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2021.100899>
- WHO. (2022, diciembre 23). *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int>
- Wingfield, P. T. (2014). Preparation of Soluble Proteins from Escherichia coli. *Current Protocols in Protein Science*, 78(1), 6.2.1-6.2.22. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0602s78>
- Yaghoobizadeh, F., Ardakani, M. R., Ranjbar, M. M., Galehdari, H., & Khosravi, M. (2023). Expression, purification, and study on the efficiency of a new potent recombinant scFv antibody against the SARS-CoV-2 spike RBD in E. coli BL21. *Protein Expression and Purification*, 203, 106210. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2022.106210>
- Yerleskesi, T., Binasi, D., & Anabilim, B. (2016). Separation techniques: Chromatography. *Biochemistry*, 60-156.