



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

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

Autor: Jefferson Alexander Chamba Valladolid

Directora: Torres Arias, Marbel Ph.D

Sangolquí, 08 Marzo 2023



Índice de Contenidos

1

Introducción

2

Justificación del problema

3

Objetivos e Hipótesis

4

Materiales y Métodos

5

Resultados y Discusión

6

Conclusiones

7

Recomendaciones

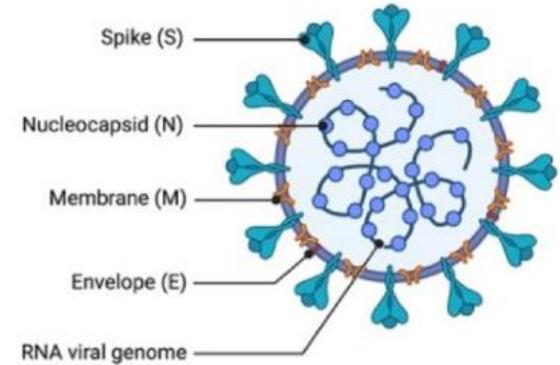


SARS-CoV-2 y proteína Spike

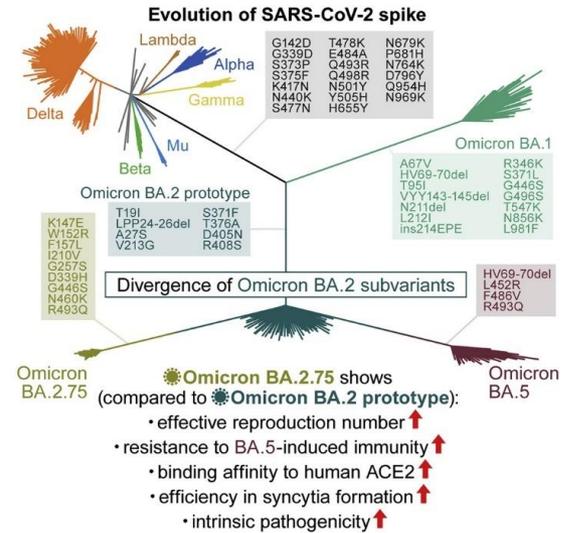


Análisis de casos y muertes del Covid19

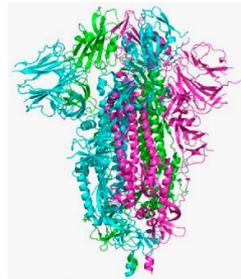
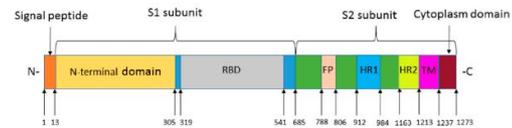
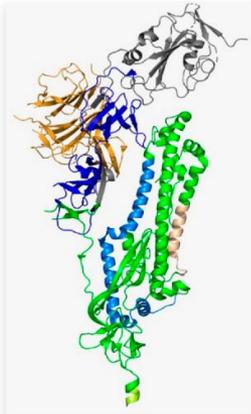
Introducción



Estructura del SARS-CoV-2



Mutación del SARS-CoV-2



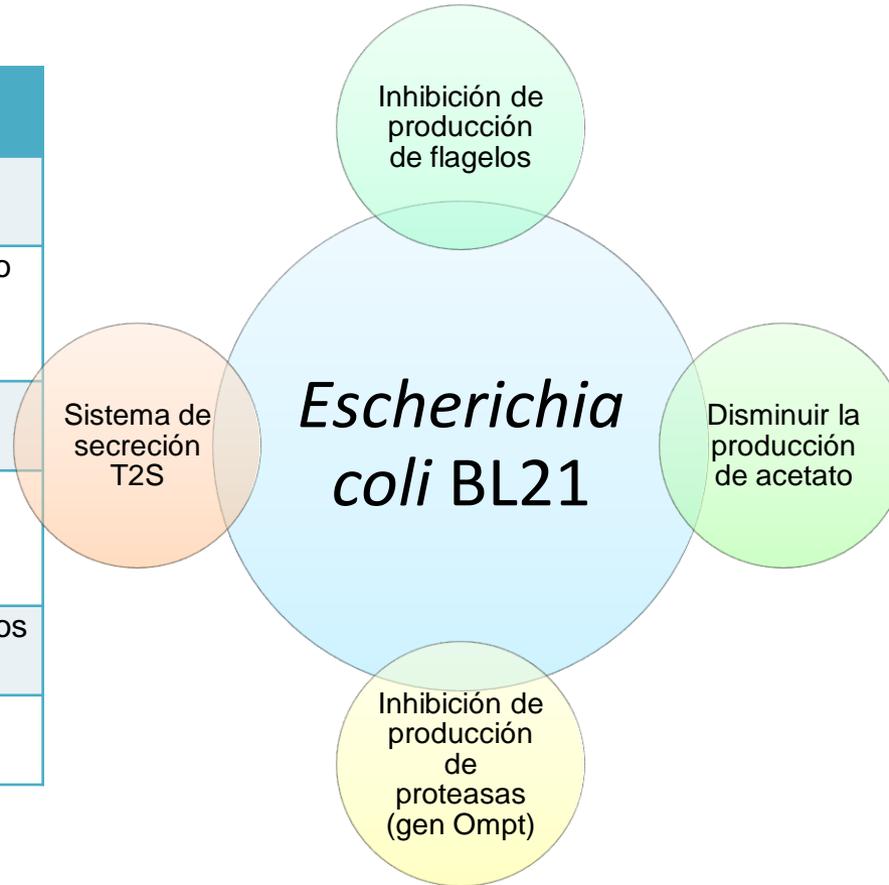
| Partes de Spike | Tamaño |
|-----------------|-------------|
| Spike completo | 180-200 kDa |
| Subunidad S1 | 80-90 kDa |
| Subunidad S2 | 50-65 kDa |
| RBD | 30-40 kDa |

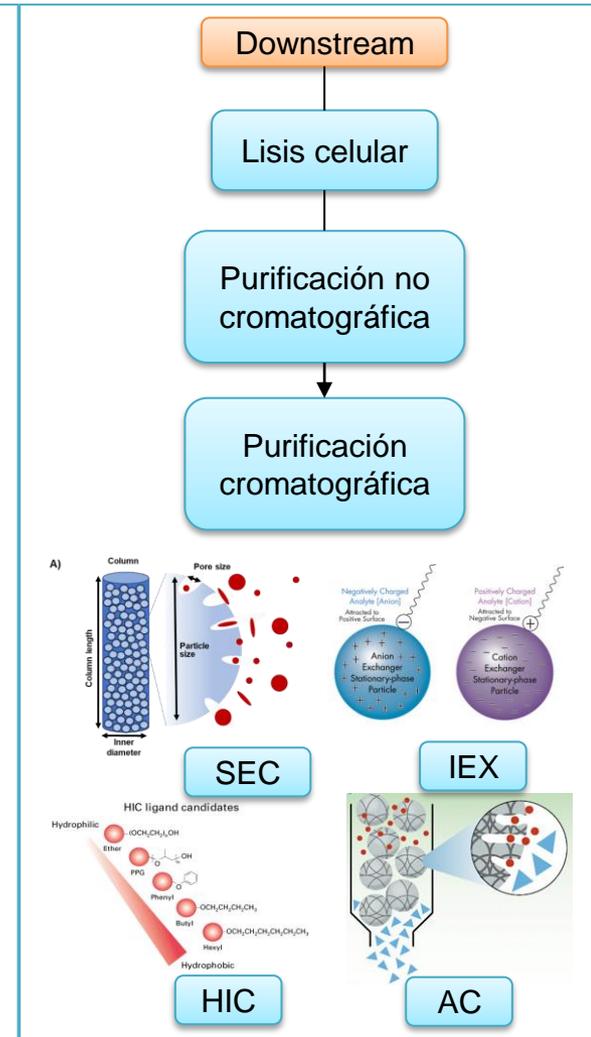
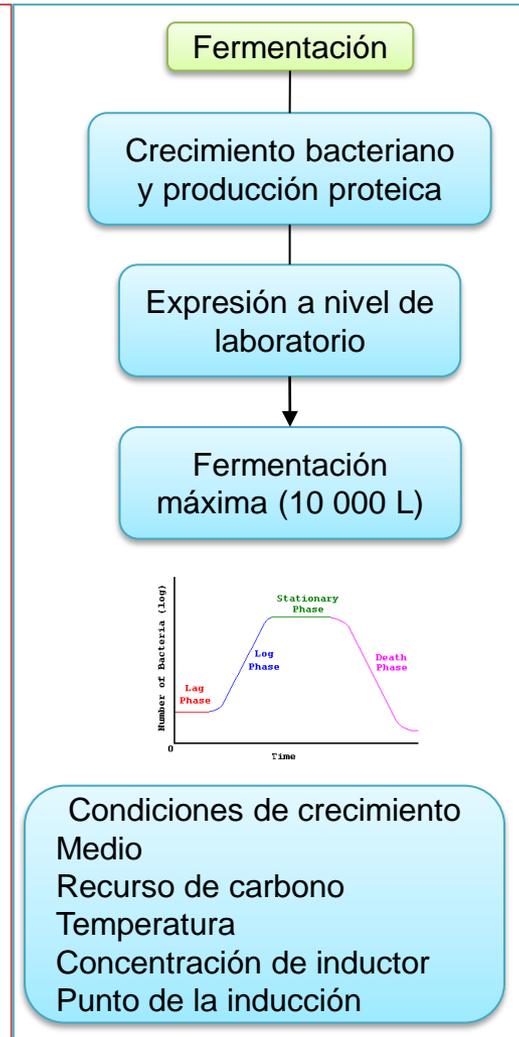
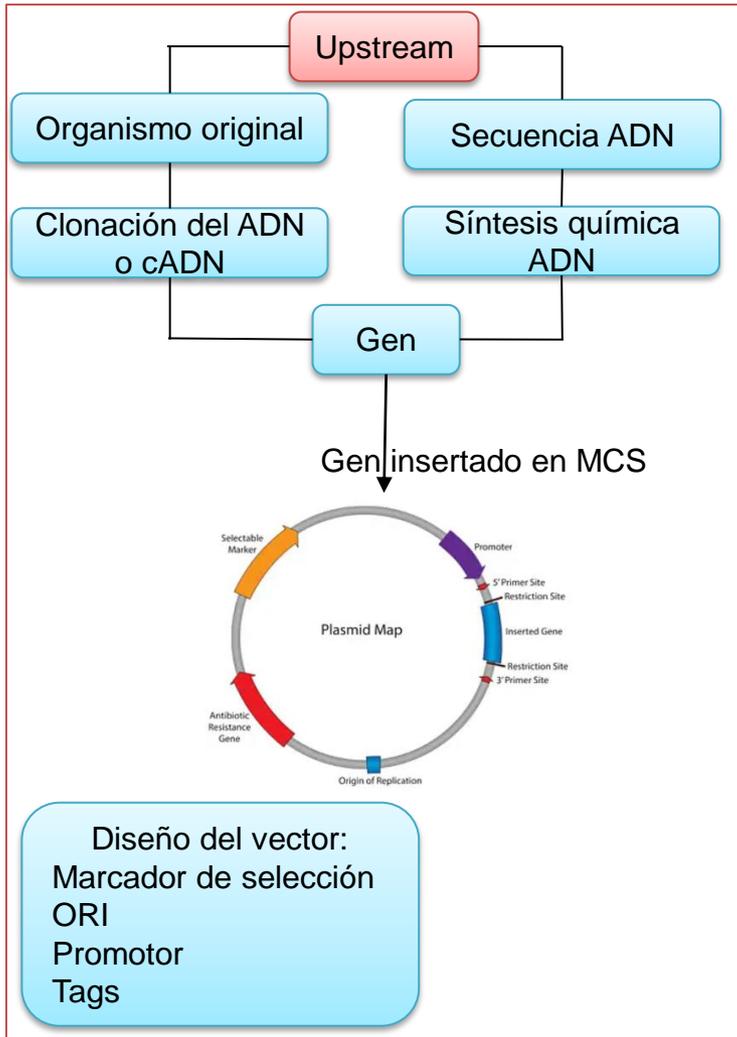
Estructura de Spike



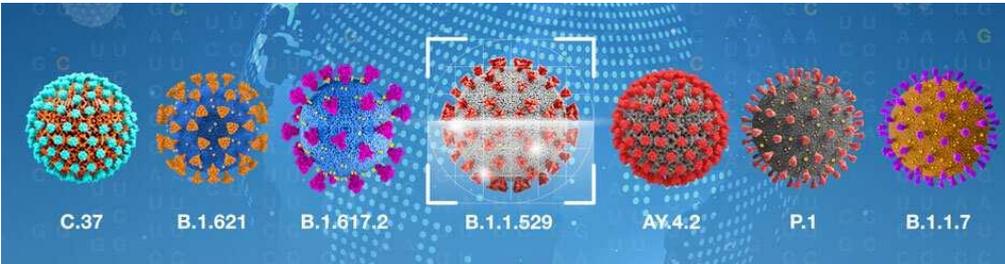
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

| Sistemas de expresión | Características |
|----------------------------|---|
| Bacterias | Escalable, bajo costo, condiciones simples de medio de cultivo. |
| Levaduras | Tiempo de crecimiento mas extenso en comparación con bacterias. |
| Algas | El desarrollo se centra en la producción de biocombustibles |
| Insectos | Difíciles de escalar, medios de crecimiento extremadamente complejos. |
| Mamíferos | Factores de crecimiento más costosos |
| Sistemas libres de células | Difícil de escalar |

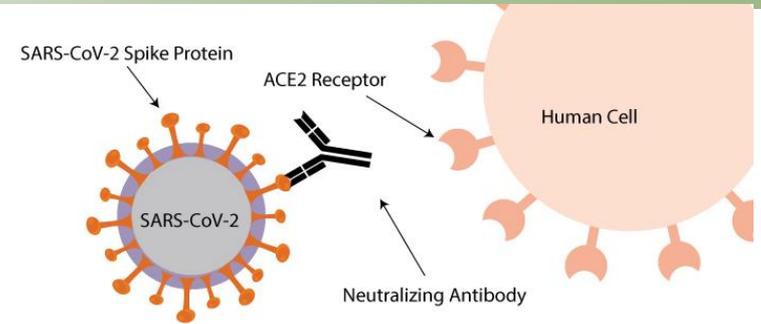




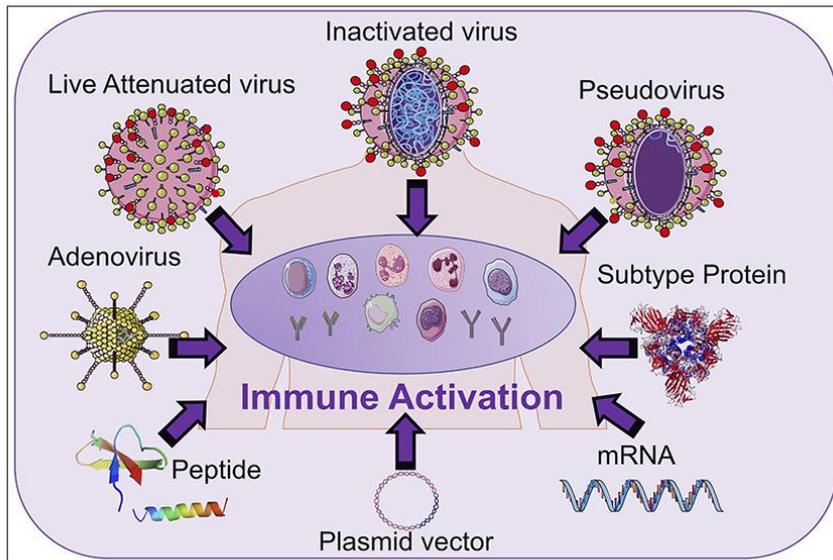
Justificación



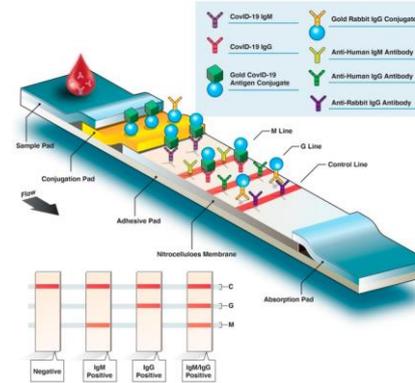
Mutación del SARS-CoV



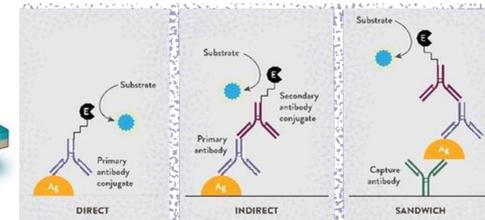
Anticuerpos neutralizantes



Vacunas



Cromatografía de flujo lateral



Ensayos de ELISA



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Objetivos e Hipótesis

Objetivo general

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

Objetivos específicos

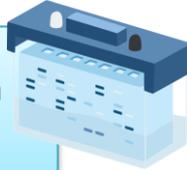
Expresión heteróloga de la proteína Spike de SARS-Cov-2 en *Escherichia coli* BL21 aplicando el sistema pET que utiliza un promotor inducible por IPTG para controlar la biosíntesis de Spike.



Purificación de la proteína Spike mediante cromatografía de afinidad de níquel con el fin de facilitar la eliminación de toxinas y residuos innecesarios.

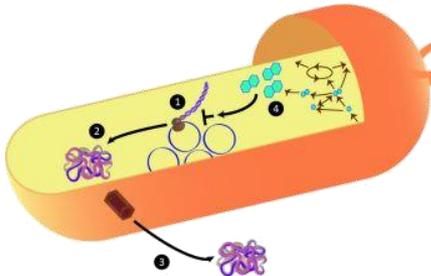


Aplicar la técnica de electroforesis SDS-PAGE a fin de verificar la presencia de Spike producida por *Escherichia coli* BL21.



Hipótesis

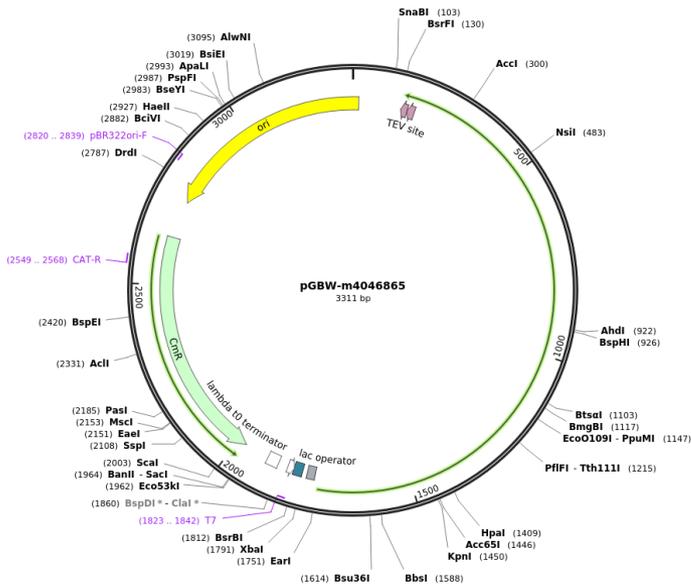
El sistema procariota *Escherichia coli* BL21 es capaz de producir la proteína recombinante Spike del SARS-CoV-2 y su purificación se puede realizar mediante cromatografía de afinidad de níquel.



- 1 Reduce stress-related phenomena
- 2 Enhance post-translational modifications
- 3 Enhance secretion
- 4 Reduce acetate production

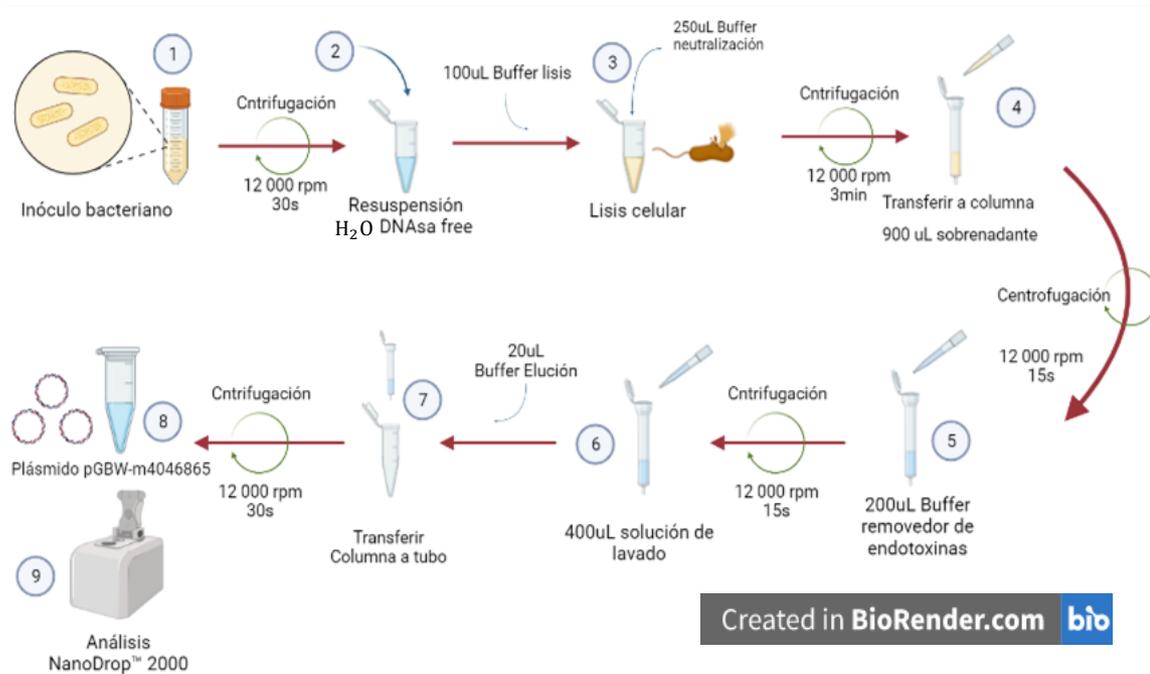


Created with SnapGene®



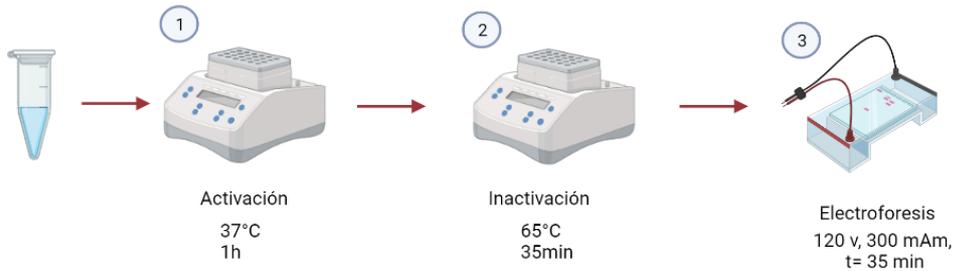
Mapa genómico pGBW-m4046865

Purificación de plásmido a partir de *E. coli* JM109



Created in BioRender.com

Digestión por EcoRV

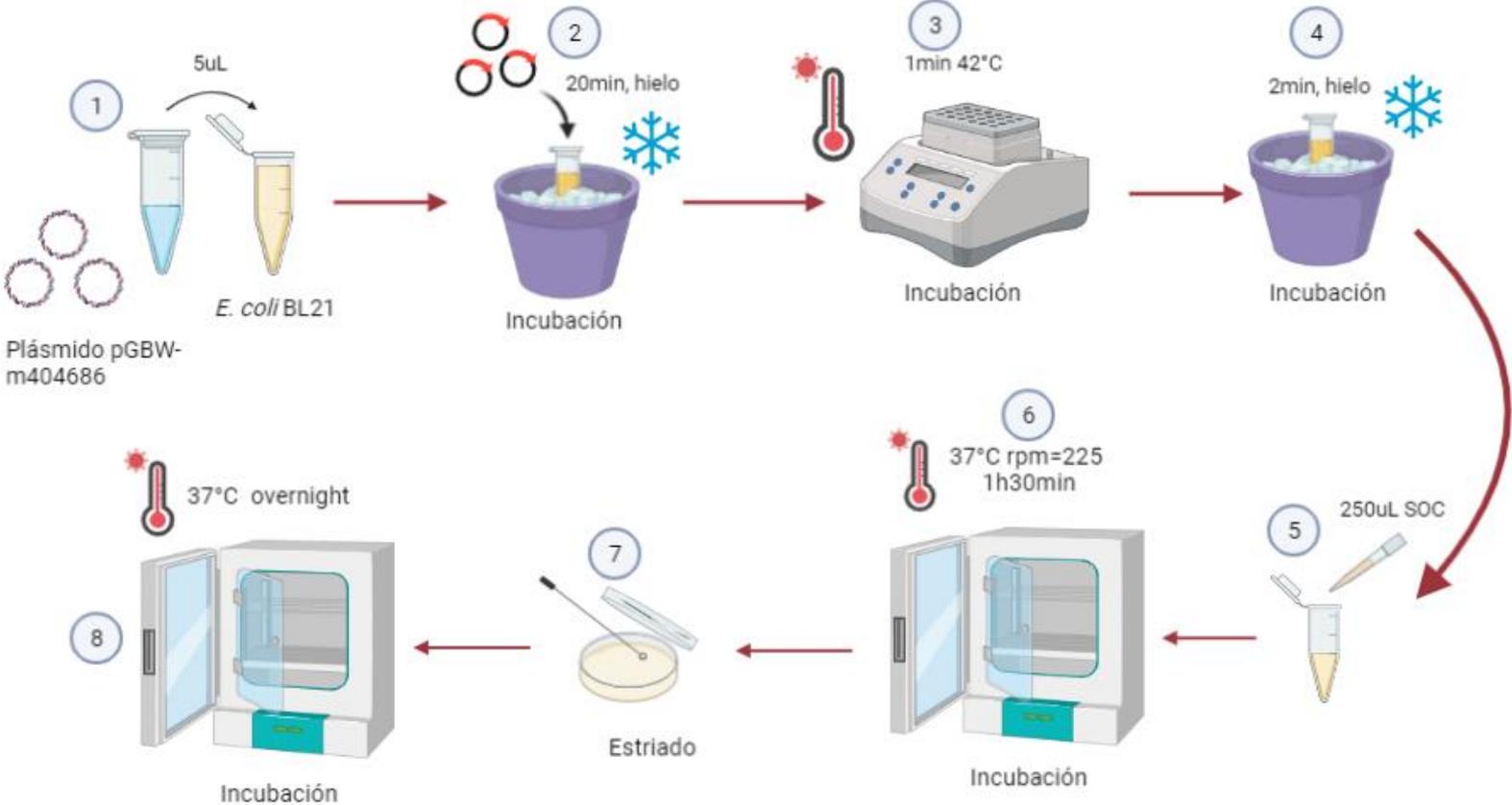


| Componente | 1X (uL) | 4X (uL) |
|-------------------------|-----------|-----------|
| Agua DEPC | 16.3 | 65.2 |
| Tampón de EcoRV (10X) | 2 | 8 |
| BSA acetilado (10ug/uL) | 0.2 | 0.8 |
| Plásmido (1ug/mL) | 1 | - |
| Enzima EcoRV | 0.5 | 2 |
| Total | 20 | 76 |

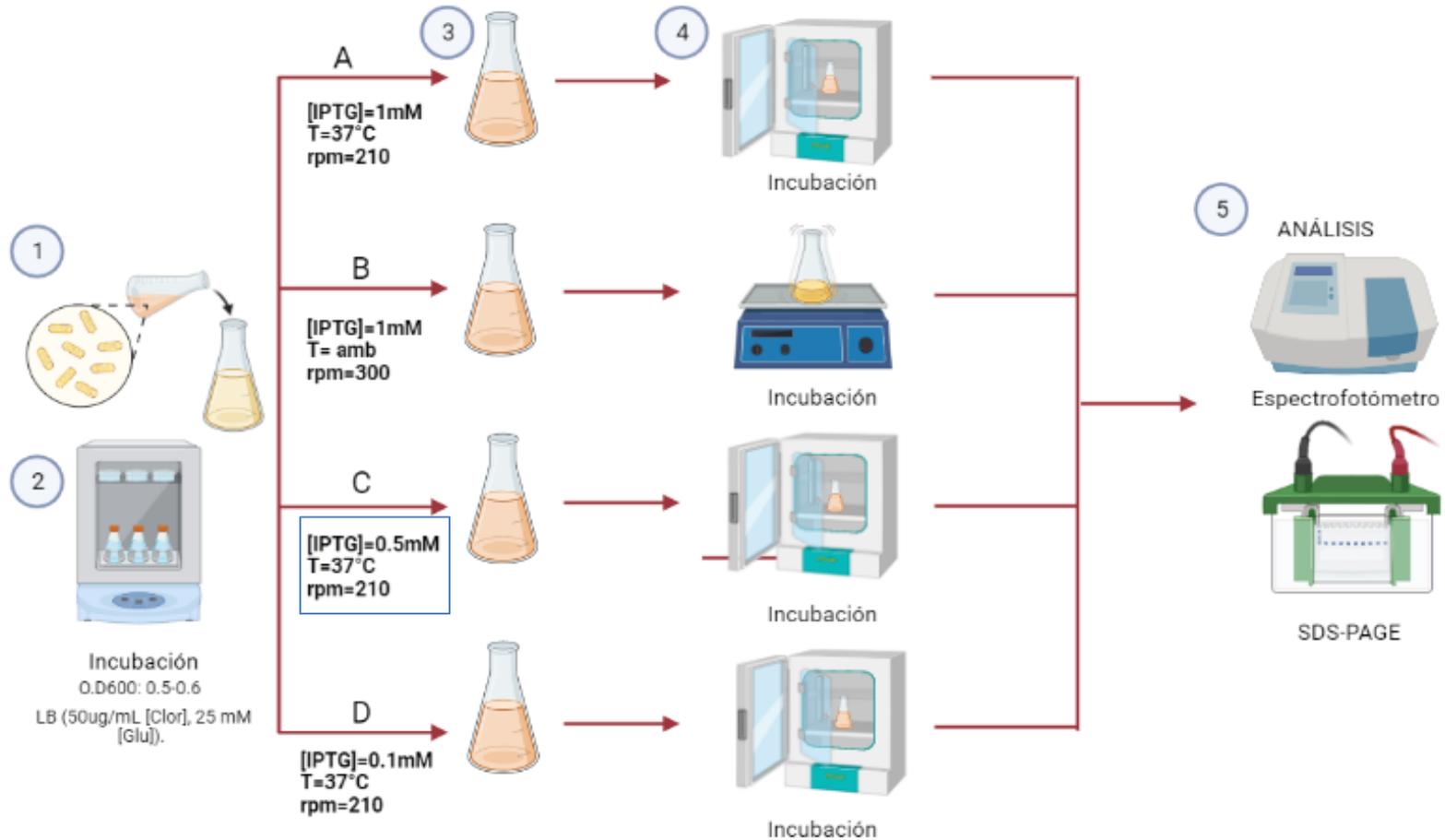
Created in BioRender.com



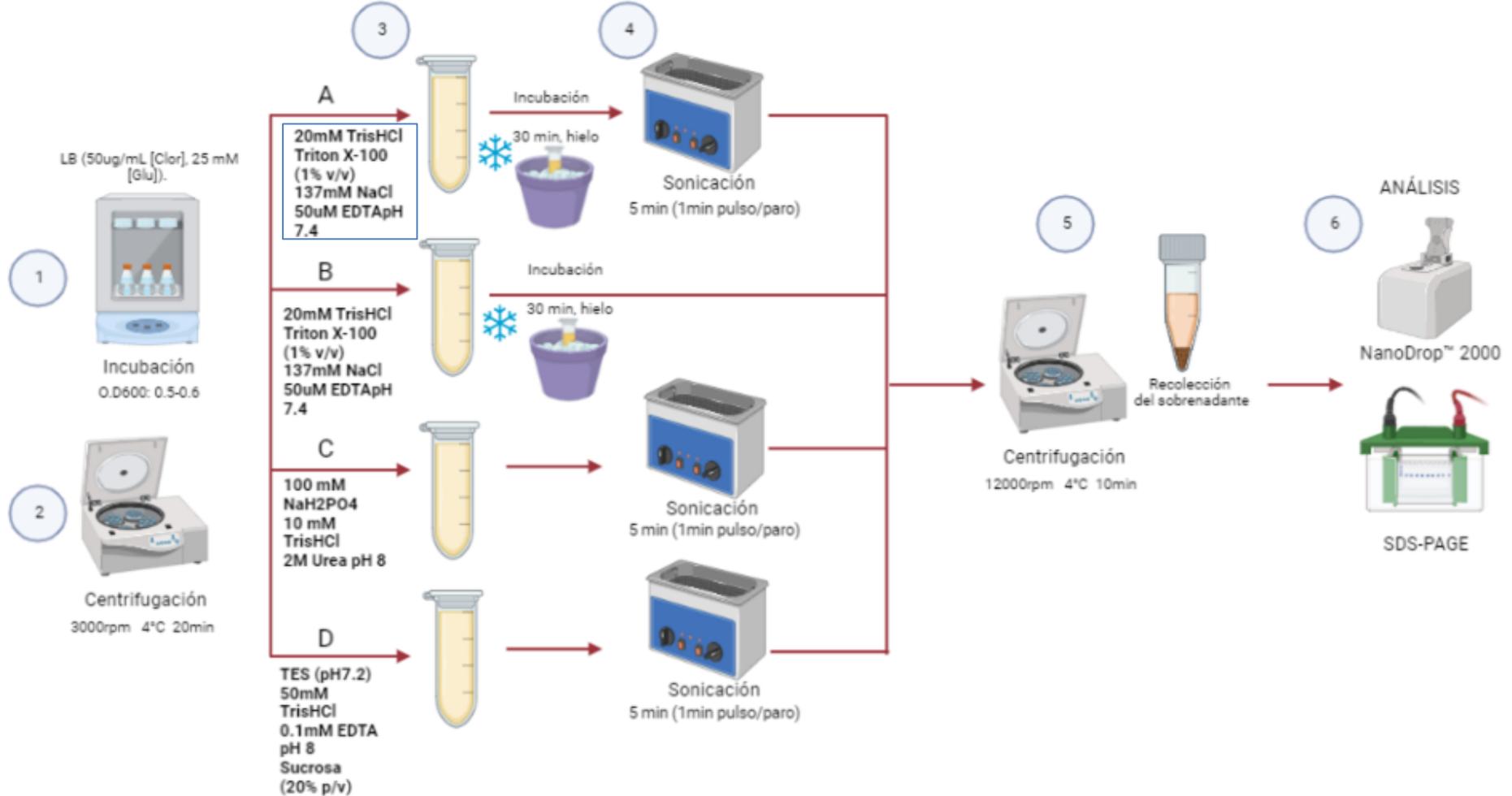
Transformación de pGBW-m4046865 por ShockTermico

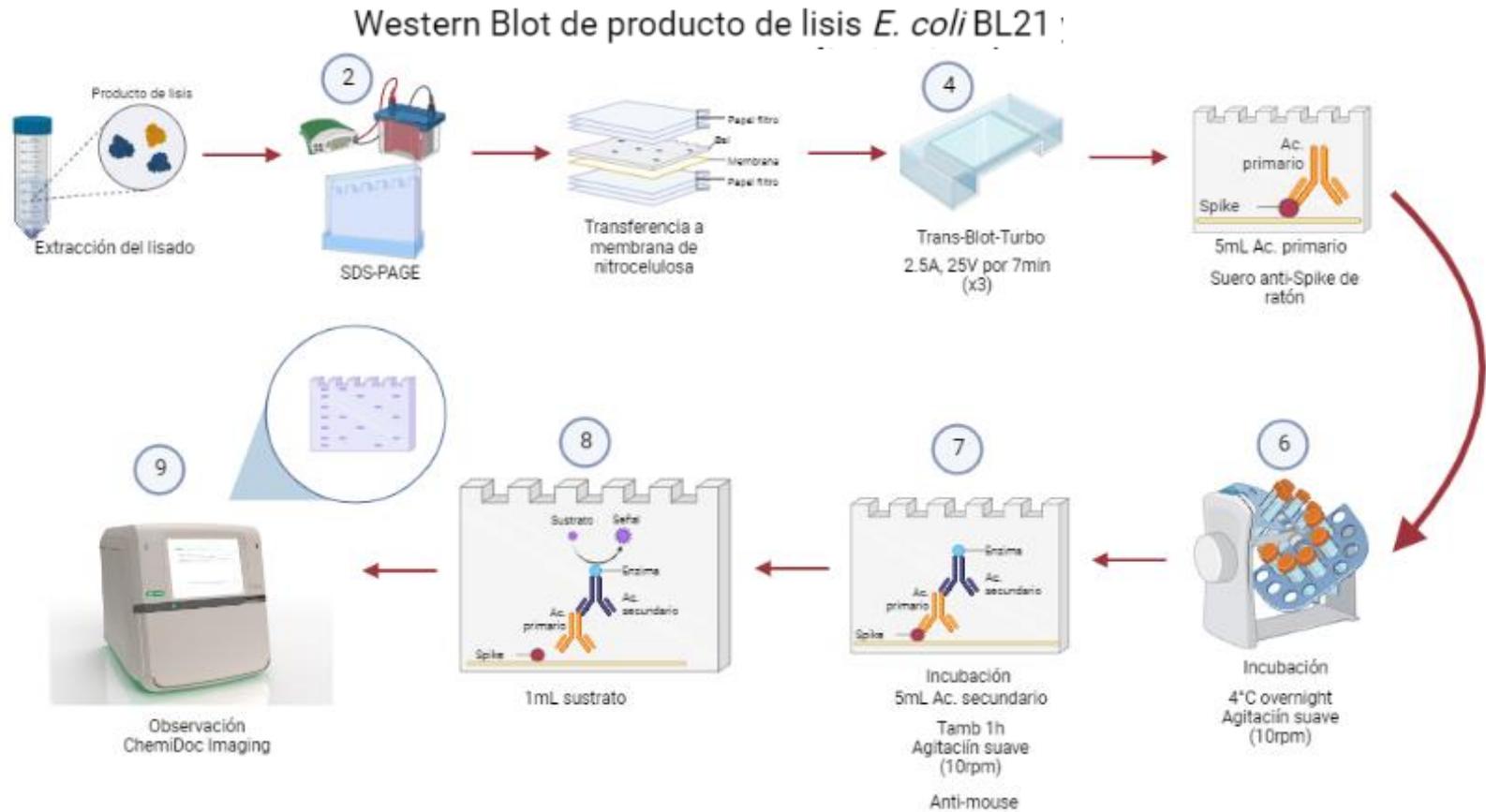


Inducción de Spike mediante IPTG (0.5-0.6 O.D.600)



Lisis de biomasa *E. coli* BL21



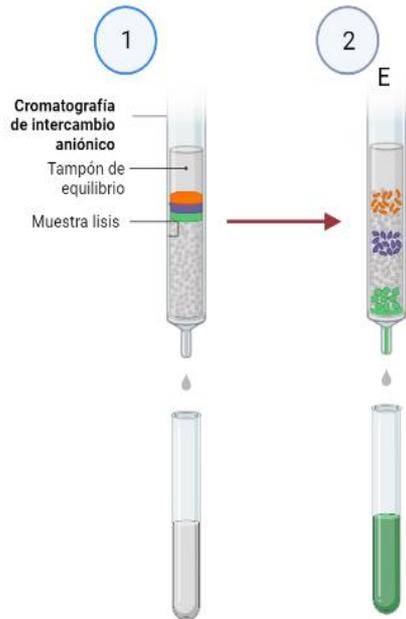


Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com)

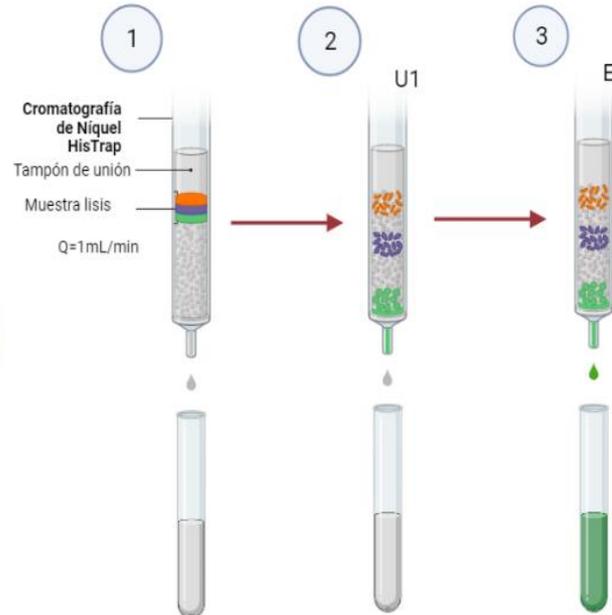


Combinación de IEX y AC para la purificación de Spike *E. coli* BL21

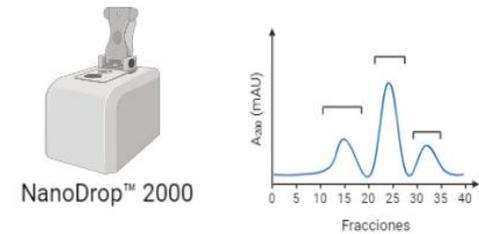
Cromatografía de intercambio aniónico



Cromatografía de afinidad de níquel



Análisis de fracciones

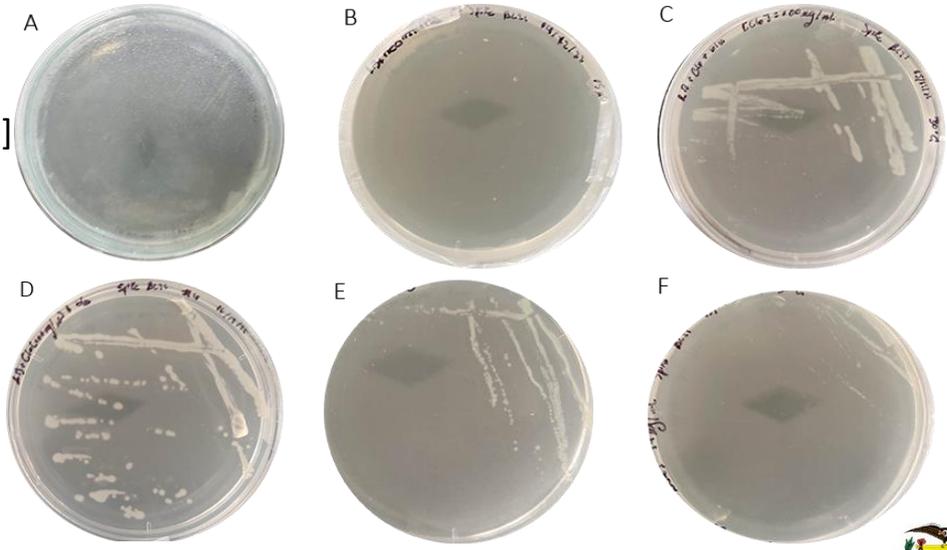
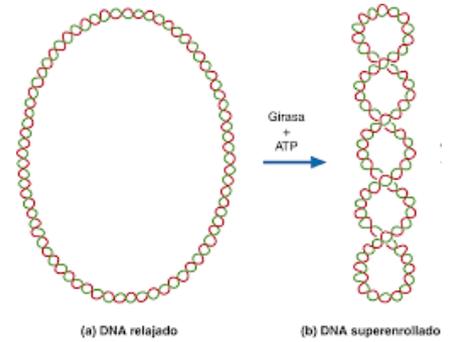
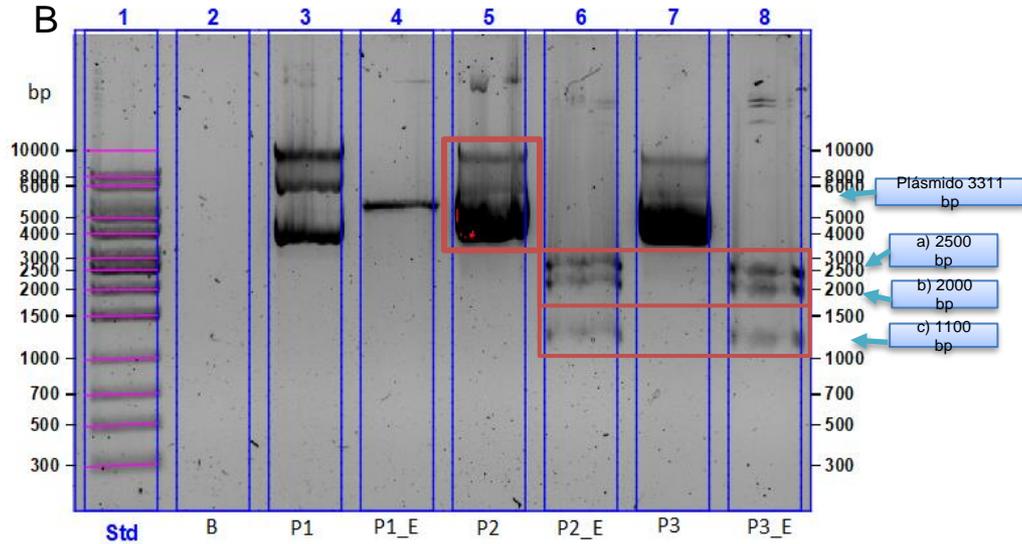


SDS-PAGE

A



B

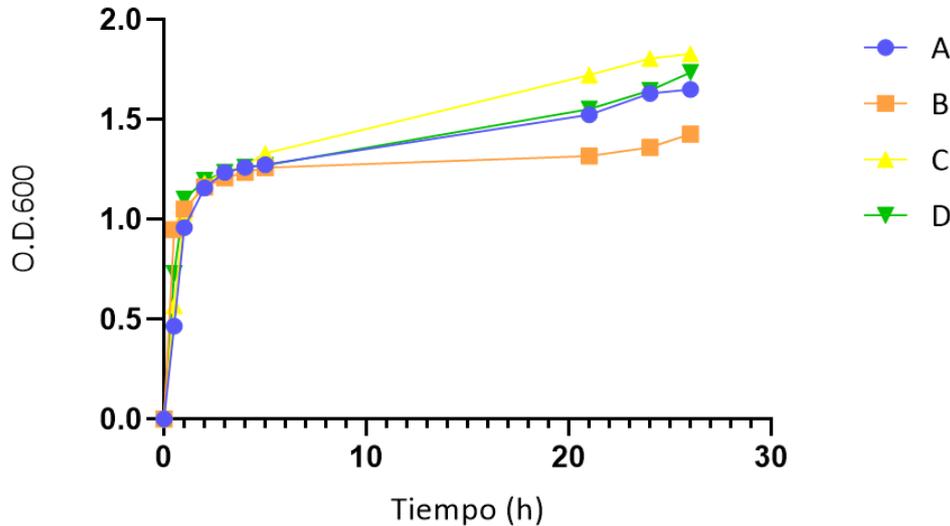


| n | [Clor]ug/m |
|---|------------|
| A | C- (Amp) |
| B | C- (medio) |
| C | 25 |
| D | 50 |
| E | 100 |
| F | 200 |

Estandarización de [Cloranfenicol]

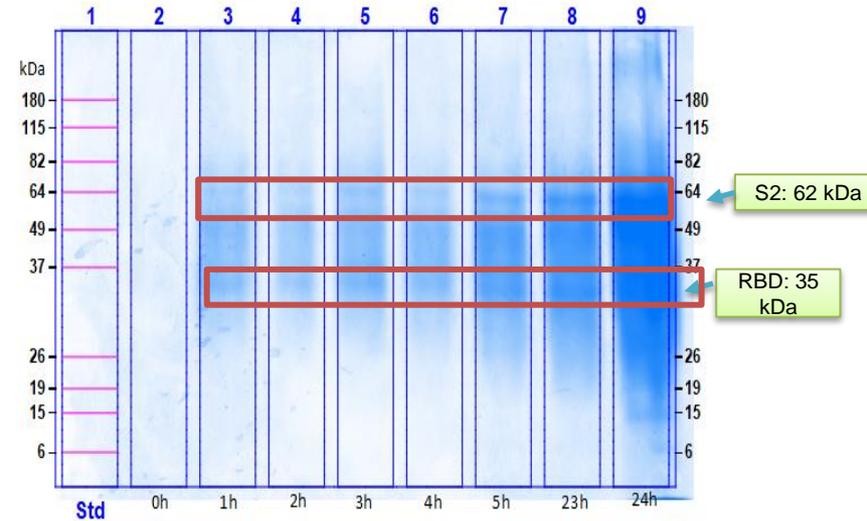


Cinética de crecimiento *E. coli* recombinante aplicando IPTG

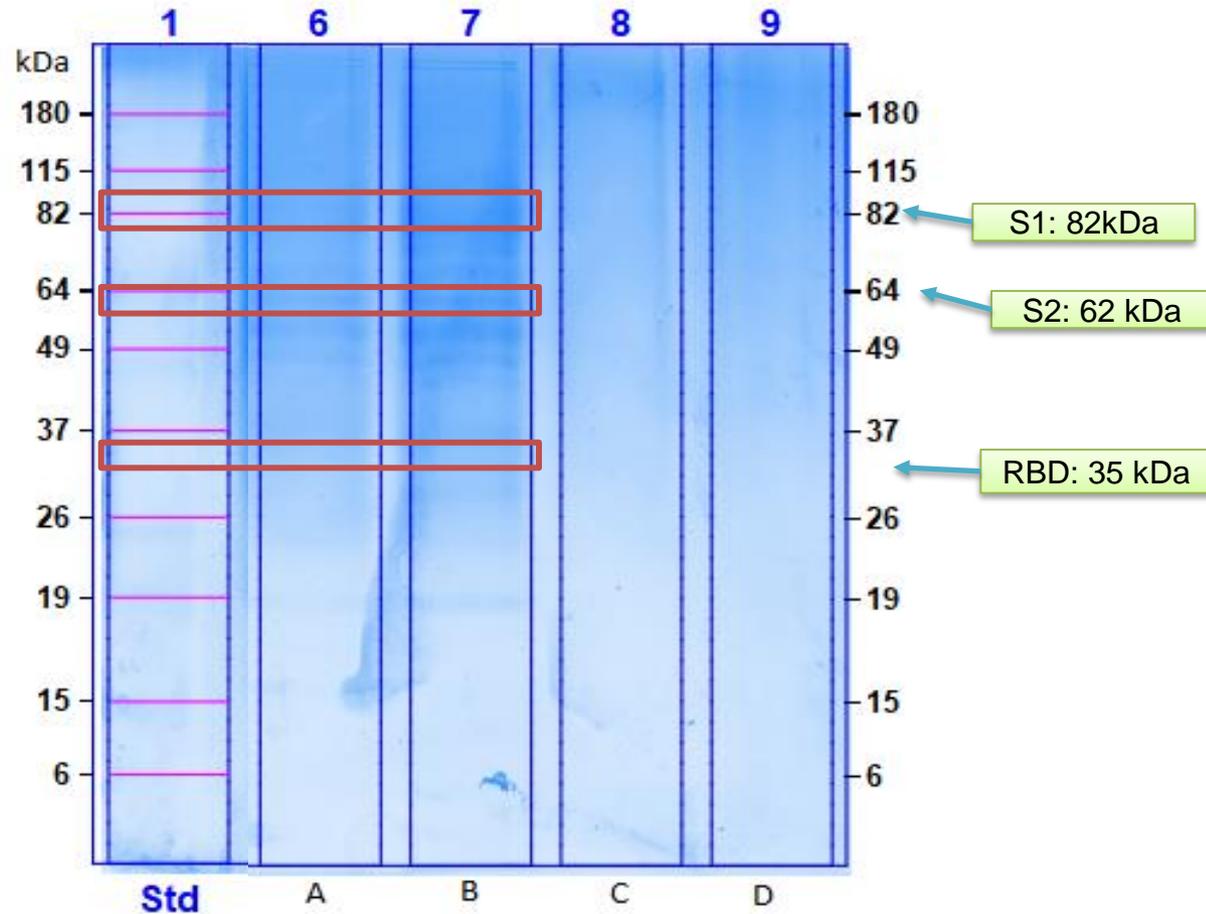


Nota. La cinética de crecimiento fue evaluada cada hora hasta 24h, las repeticiones tuvieron los siguientes tratamientos a 1mM [IPTG] y 37° C (A), 1mM [IPTG] y temperatura ambiente (B), 0.5mM [IPTG] y 37° C (C), 0.1 mM y [IPTG] 37° C (D). La grafica fue realizada con GraphPad Prism 8.

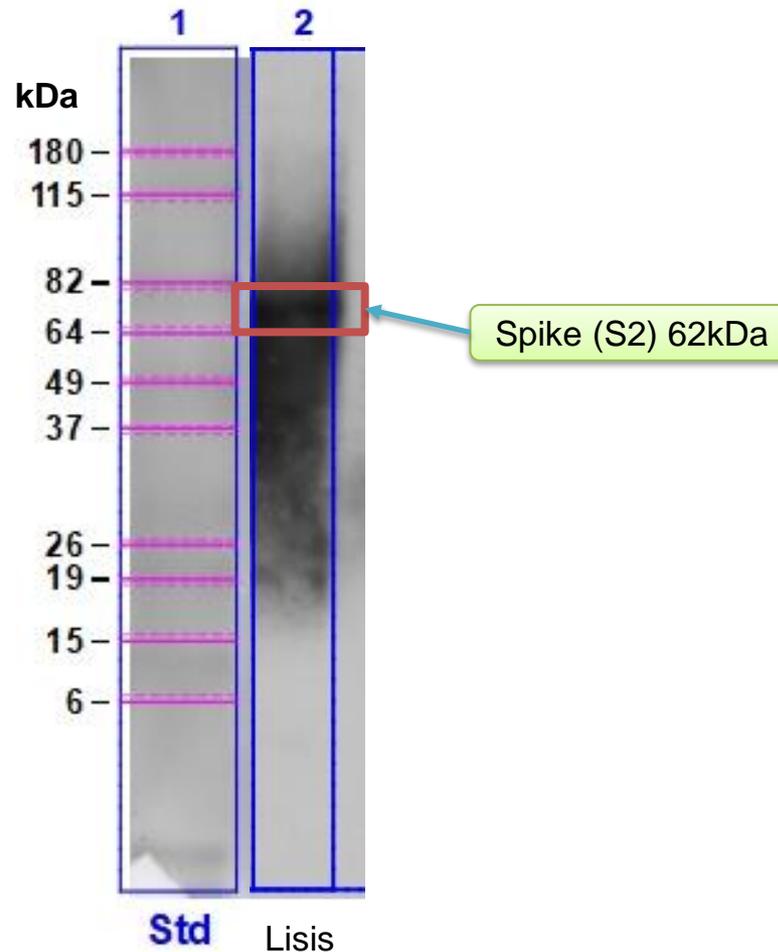
SDS-PAGE de cinética de crecimiento *E. coli* BL21



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%)

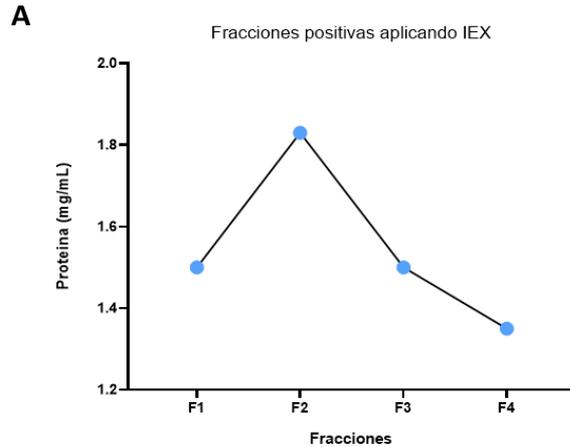


Nota. Las repeticiones del tratamiento A y B se aplicó un tampón lisis 5%v/v (20mM TrisHCl, Tritón X-100 (1% v/v)), 137mM NaCl, 50uM EDTA pH 7.4). Se realizó una incubación de 30 min en hielo (A y C) y sonicación 5 min (1 min pulso/paró) solo para B. Se determinó S1 (82kDa), S2 (62kDa) y RBD (35kDa).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

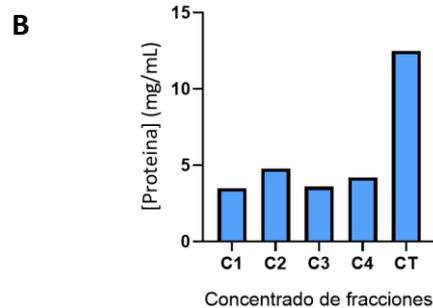


Nota. La expresión heteróloga de *E. coli* BL21 se verificó mediante Western Blot después de realizar la lisis, utilizando un suero de ratón (inmunizado con Spike) como anticuerpo primario mientras que se usó un antimouse IgG (Ref. ab197780) como anticuerpo secundario. Spike (S2) mostró un tamaño de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

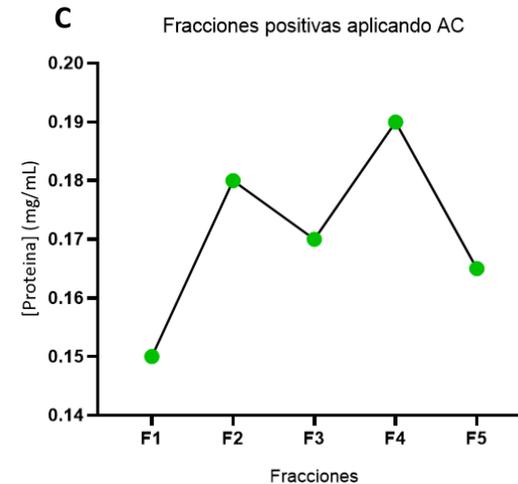
Cromatografía de intercambio aniónico (IEX) para producto de lisis.



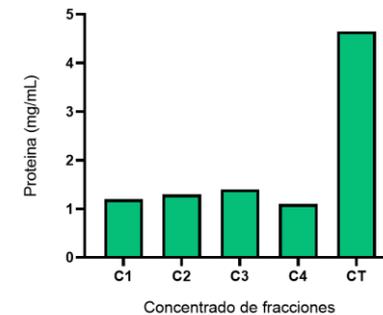
Concentración de fracciones IEX a partir de producto de lisis



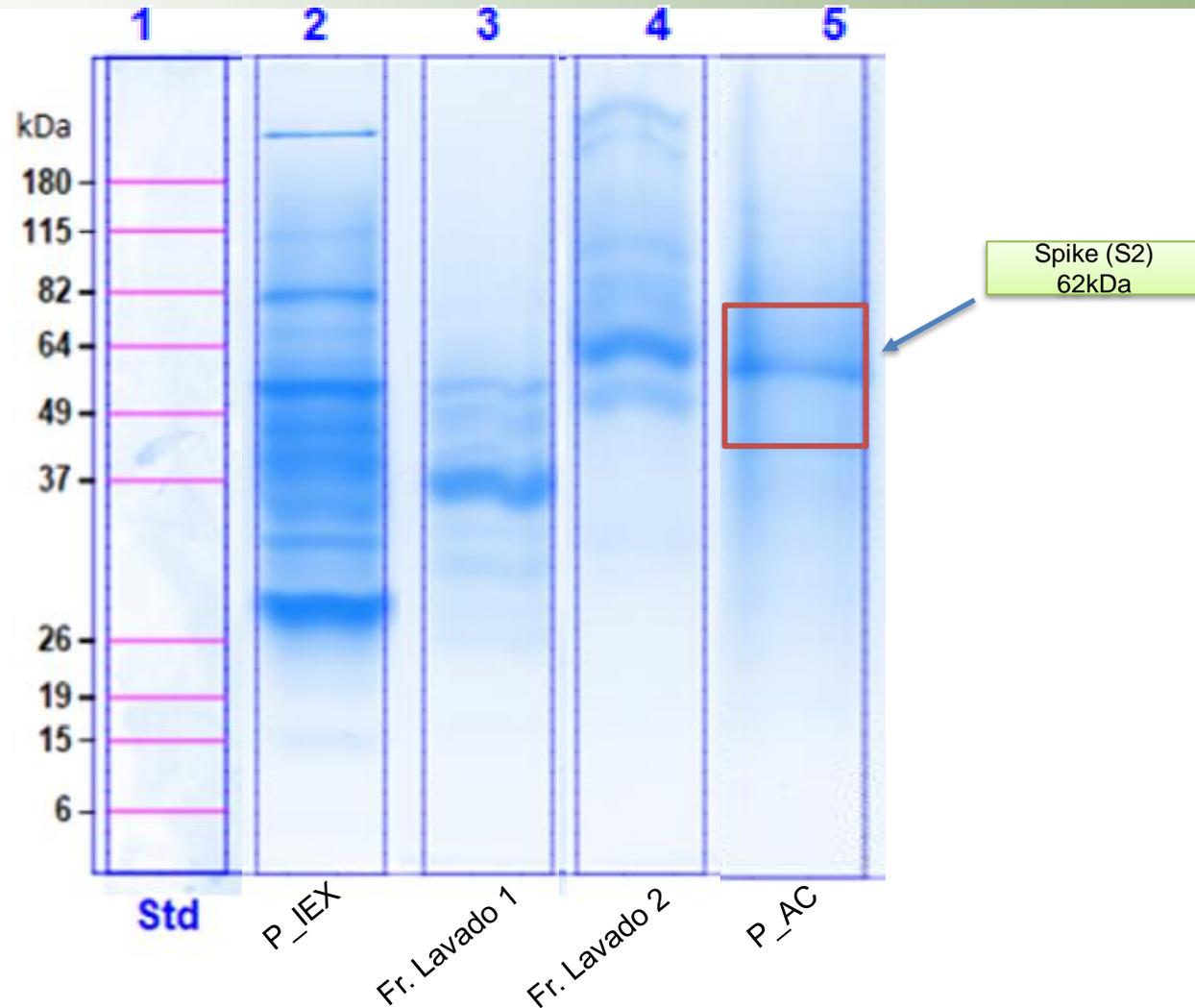
Cromatografía de afinidad de níquel (AC) para el producto de IEX



D Concentración de fracciones AC, purificación final



Nota. Las fracciones positivas se puede observar en (1.3-1.8mg/mL) A y (0.15-0.19mg/mL) C para IEX y AC respectivamente, estas fracciones se concentraron mediante dispositivos Amicon 50K, la concentración de cada columna se encuentra en B y D para IEX y AC respectivamente, finalmente se obtiene una concentración de 2.53mg/mL de Spike (D-CT).



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.

Conclusiones

Se expresó Spike con un tamaño de 62kDa en *E. coli* BL21 a una concentración final de 2.53mg/mL.

Factores de crecimiento

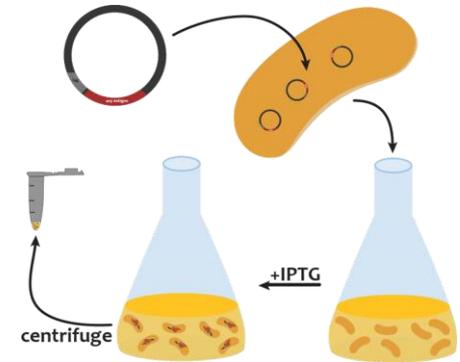
LB
(50ug/mL [Clor], 25 mM [Glu])
37°C, 210rpm

Inducción

O.D 600
0.5-0.6 (2-3h)
[IPTG]= 0.5mM
37°C, 210rpm

Lisis celular

20mM TrisHCl
Triton X-100 (1%v/v)
137mM NaCl
50uM EDTA
pH 7.4



Análisis SDS-PAGE para confirmar la purificación

Purificación por cromatografía de afinidad

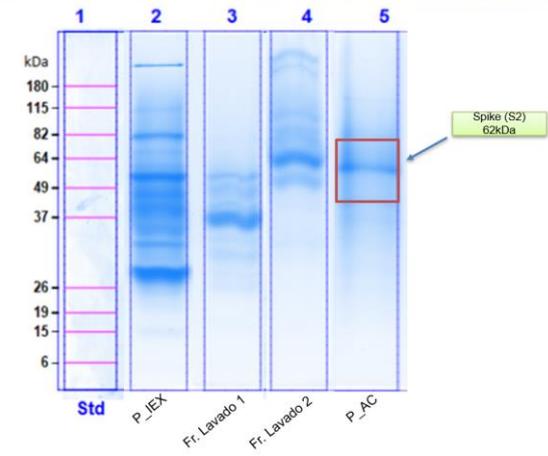
IEX

Eliminación de
compuestos tóxicos
para AC, trazas y ADN

AC

Purificación de la
proteína

2.53mg/mL



Recomendaciones

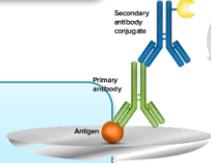
Caracterización de la función de Spike

Cuantificación

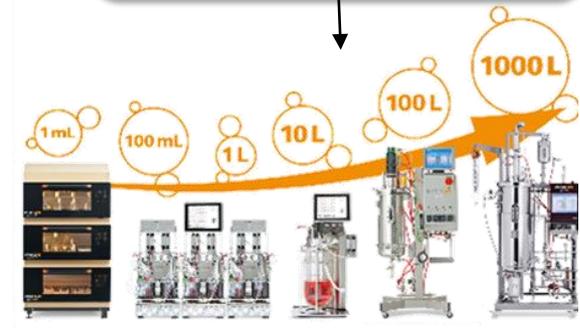
Función

BCA
Bradford

Western Blot
iELISA



Escalamiento a nivel industrial



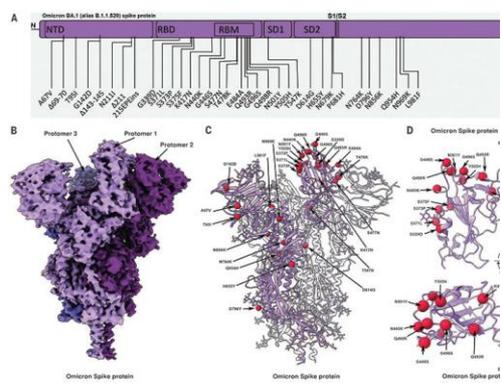
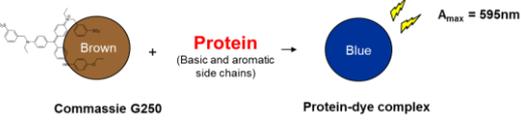
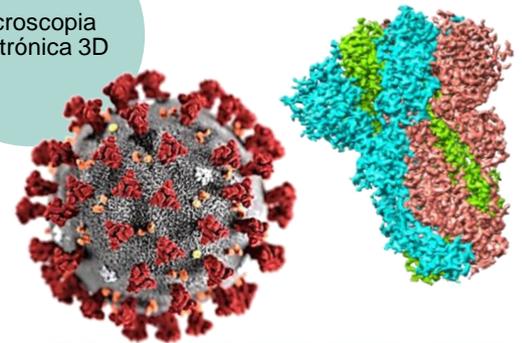
Espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Microscopia crioeléctronica (crio-EM)

Estudio cristalográfico

Microscopia electrónica 3D

Laser de electrones libres de rayo



(Mannar et al., 2022)

Agradecimientos



Marbel Torres Ph.D.
Ing. Andrea Aluisa
Ing. Fernanda Toscano

2020-PICV-019--INV