ISBN: 978-607-00-2083-4

Expresión heteróloga de la fracción antigénica de las proteínas LKTA y PlpE de *Mannheimia haemolytica*.

María Saray Quintero Fabián[1], Carolina Guzmán Brambila[1], Álvaro de Obeso Fernández del Valle[1], José Pedro Castruita Domínguez[2], Beatriz Flores Samaniego[2], Daniel Ortuño Sahagún[1] (dortuno@cucba.udg.mx)

[1]*Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural.*
Instituto de Neurobiología. Edificio L, 1er piso.
Departamento de Biología Celular y Molecular, CUCBA.
Universidad de Guadalajara,

[2]*Laboratorio de Investigación y Desarrollo* Bio-Zoo, S.A. de C.V.

Introducción y antecedentes

El complejo respiratorio bovino (CRB; Trigo 1987), es causado por infecciones virales y bacterianas que en combinación con otros factores desencadenan un conjunto de síntomas característicos de esta enfermedad; la cual provoca grandes pérdidas económicas en las explotaciones ganaderas. El CRB es la causa principal de morbilidad y mortalidad en los establos, por lo que su prevención y control mediante inmunización resulta importante.

Entre los agentes etiológicos relacionados al CRB destaca la bacteria *Mannheimia haemolytica*, habitante natural del tracto respiratorio bovino. Sin embargo, cuando existe una combinación de estrés con infección viral, se convierte en agente desencadenante del CRB, debido a que cuando el animal se encuentra inmunodeprimido, los mecanismos de defensa normales del aparato respiratorio disminuyen y las bacterias pueden descender y colonizar el pulmón. De esta forma, *M. haemolytica* causa la denominada fiebre de embarque, o neumonía bovina (Rice et al. 2007).

Actualmente se utilizan vacunas polivalentes para prevenir el CRB y la gran mayoría de las vacunas que existen en el mercado están diseñadas bajo este esquema (Todd 1974). Sin embargo, se ha documentando que existen reacciones sistémicas adversas al aplicar bacterinas formuladas con combinaciones de bacterias gram-negativas.

Debido a lo anterior, nos hemos planteado la posibilidad de formular una vacuna polivalente que incluya protección contra *M. haemolytica*, en la que se hayan eliminado los factores determinantes de reacciones adversas (Srikumaran et al. 2007), para lo cual proponemos desarrollar cepas recombinantes de *Escherichia coli* que expresen las

proteínas antigénicas leucotoxina (LKTA) y PlpE de *M. haemolytica*, en los vectores de expresión hetérologa pExSec1 y pQE-30 Xa, para posteriormente utilizarlo en la formulación de una vacuna polivalente contra CRB.

Metodología

Extracción de DNA total bacteriano

Se empleó el kit de extracción *Illustra bacteria genomic prep mini spin* (GE Healthcare), según especificaciones del proveedor, a partir de cultivos de la cepa de *M. haemolytica*.

Diseño de oligonucleótidos y amplificación por PCR

A partir del análisis de la secuencia de las proteínas LKTA y PlpE de *M. haemolytica,* se diseñaron los oligonucleótidos que corresponden a las fracciones antigénicas de las proteínas ya mencionadas, a los cuales se les incluyó sitios de restricción necesarios para su posterior subclonaje en los vectores de expresión. Las condiciones de amplificación para LKTA y PlpE, cuyos amplicones se clonaron en el vector pQE-30 Xa, iniciaron con una desnaturalización a 94°C durante 3 minutos y se continuaron con 30 ciclos: desnaturalización a 94°C por 30 s, anillamiento a 60 °C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. Al finalizar se realizó una extensión final por 5 min a 72 °C. En el caso de los amplicones clonados en el vector pExSec1, las condiciones fueron las siguientes; con una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos y se continuaron con 30 ciclos: desnaturalización a 94°C por 30 s, anillamiento a 63 °C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min. Al finalizar se realizó una extensión final por 5 min a 72 °C. Los productos de la PCR fueron analizados por electroforesis y teñidos con SYBR Green (Invitrogen). Se tomaron fotografías con una cámara digital en un transiluminador (Slimline).

Clonaje de amplicones

Una vez obtenidos los productos de amplificación por PCR, estos se clonaron de forma directa en el plásmido pCR 2.1 TOPO 3.9 kb (Invitrogen) y con dichas construcciones se transformaron células de *E. coli (*TOP 10), las cuales fueron seleccionadas en medio LB con ampicilina [100 µg/µl]. El DNA clonado se purificó en minipreparaciones por lisis alcalina y se trató con RNAsa. A partir de estos clones positivos, se liberó el inserto mediante la digestión con las enzimas de restricción según el vector de expresión en el cual fueran a ser subclonadas: pQE-30Xa (3.5 Kb) o pExSec 1 (3.38 Kb), Stu I/Hind III y Sac I/Bam HI respectivamente.

Se llevó a cabo la reacción de ligación direccional de los insertos liberados en los vectores correspondientes y se transformaron células de *E. coli* (M15 y DH5- α 18). Los clones positivos se identificaron en medio LB con ampicilina [100 µg/µl] y kanamicina [50 µg/µl] para pQE-30Xa y pExSec 1 respectivamente. Posteriormente, se obtuvo el DNA plasmídico por el método de lisis alcalina. Los clones así obtenidos se secuenciaron para verificar su identidad.

Secuenciación de insertos y verificación de la identidad de los fragmentos amplificados

La secuenciación de los insertos obtenidos se realizó por el método automático de Sanger aplicado por Applied Biosystems. Para la lectura de las secuencias se utilizó el secuenciador de tecnología capilar ABI Prism 310. El análisis y comparación para la búsqueda de homólogos de las secuencias se realizó con el programa PSI-BLAST y consultas al GenBank del *National Center for Biotechnology Information*. El alineamiento de secuencias y su análisis se realizó mediante el software DNAstar.

El análisis inicial de las proteínas en estudio se realizó con información de las siguientes bases de datos: NCBI-BLAST (National Center for Biotechnology Information), UniProtKB/Swiss-Prot, UniProtKB/TrEMBL y PROSITE del Swiss Institute of Bioinformatics, el Motif Scan y el Pfam en el Sanger Institute.

Resultados

El producto de la amplificación por PCR de los fragmentos seleccionados se ilustra en la figura 1. En la que se puede observar los tamaños aproximados esperados para los fragmentos de LKTA y PlpE (846 pb y 1029 pb respectivamente).

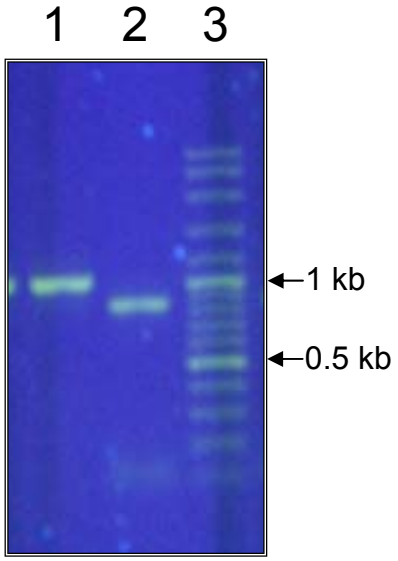

Figura 1. Productos de amplificación. 1) PlpE de 1029 pb, 2) LKTA de 846 pb, 3) Marcador de tamaño molecular de 0.1 kb.

Una vez obtenidos los productos de amplificación, se clonaron en el vector pCR 2.1 TOPO 3.9 kb. Se realizaron minipreparaciones por el método de lisis alcalina para la identificación de clones positivos (figura 2) y posteriormente se liberaron los insertos mediante digestión enzimática (figura 3).

Los insertos liberados fueron subclonados en forma direccional en los vectores de expresión y nuevamente se identificaron los clones positivos mediante minipreparaciones. De cada clonaje se seleccionaron al menos dos clones para su secuenciación y poder así realizar la comparación de secuencias con las bases de datos.

De los clones secuenciados, se seleccionaron aquellos que no tuvieran ningún cambio en su secuencia, así mismo se comprobó que los fragmentos clonados entraran en la fase correcta de lectura en los vectores de expresión. En la figura 4 se muestra un ejemplo de un electroferograma obtenido de la secuenciación, donde se puede observar un cambio puntual introducido por la polimerasa en una de las secuencias, la cual por lo tanto fue descartada. De esta forma se seleccionaron los clones que resultaron con la secuencia exacta al compararla con la reportada en las bases de datos, para garantizar que la proteína expresada corresponda con la descrita.

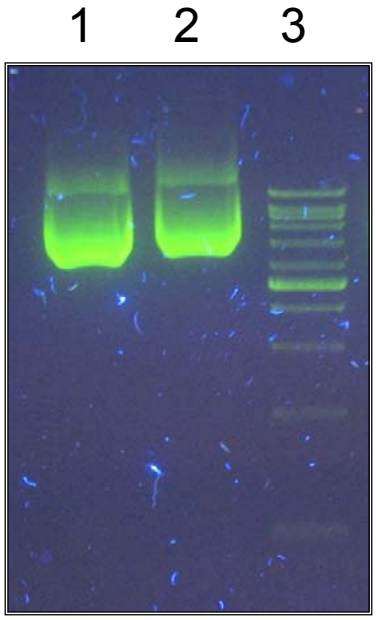

Figura 2. Plásmidos cerrados de clones positivos. 1) LKTA en TOPO 2.1, 2) PlpE en TOPO 2.1, 3) Marcador de tamaño molecular.

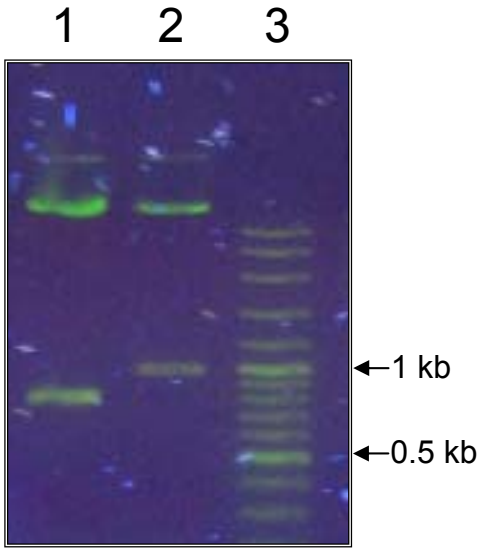

Figura 3. Insertos liberados del plásmido por digestión enzimática. 1) LKTA de 846 pb 2) PlpE de 1029 pb 3) Marcador de tamaño molecular de 0.1 kb.

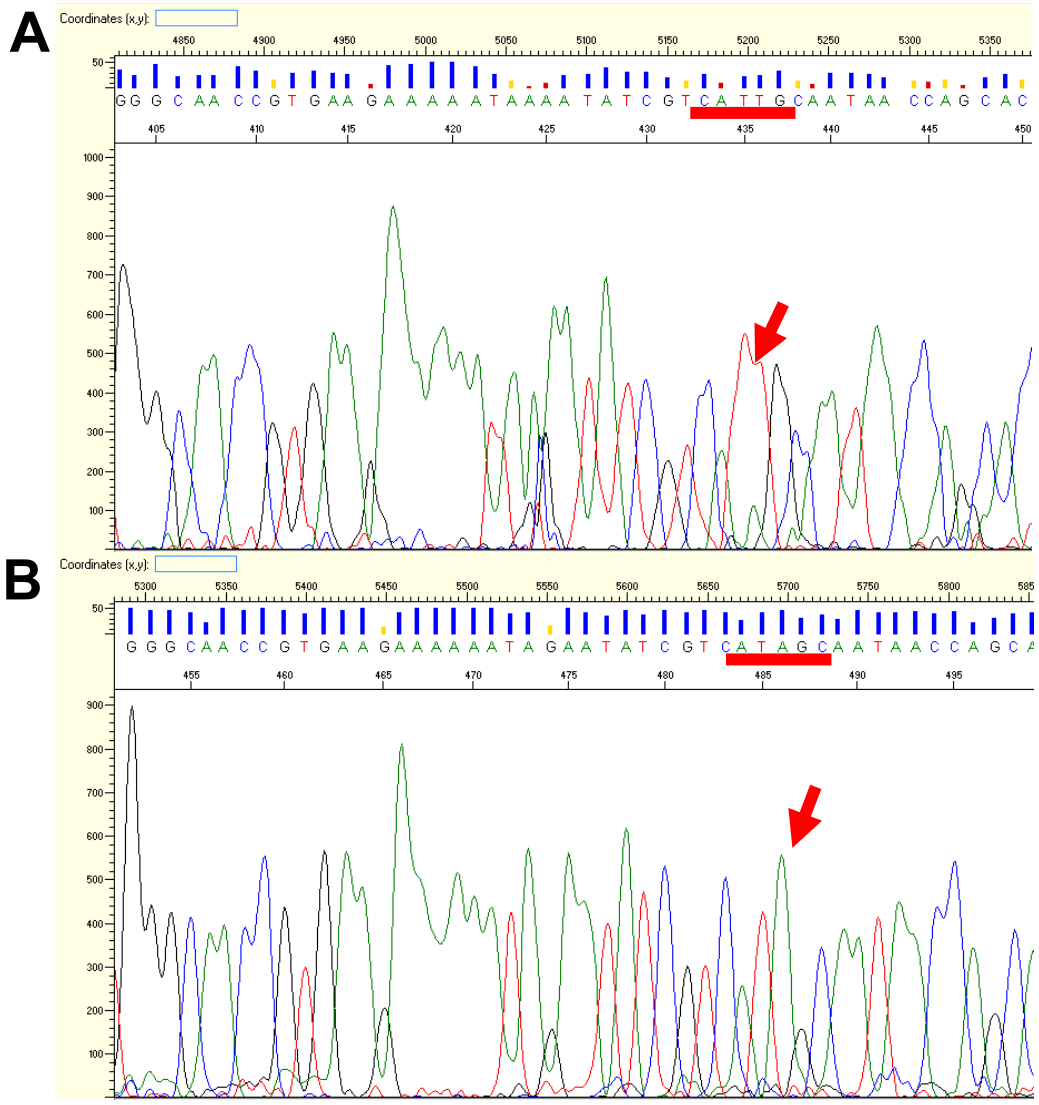

Figura 4. Electroferogramas de secuenciación. A) secuencia obtenida del clon 1 de LKTA, 2) secuencia obtenida del clon 2 de LKTA, la flecha roja indica el nucleótido que cambia en el clon 2 con respecto al 1.

Conclusiones

Se logró la amplificación y el clonaje de los insertos correspondientes a las fracciones antigénicas de las proteínas LKTA y PlpE de *M. haemolytica*.

El siguiente paso será la inducción de la expresión de estas proteínas de fusión para la purificación de las mismas y su empleo en la obtención de anticuerpos, así como para la formulación de la vacuna correspondiente.

Agradecimientos

El presente trabajo de investigación es apoyado por el Conacyt mediante el proyecto 71496 para BFS con becas de tesis de licenciatura para MSQF y AOFV, el proyecto CONACYT U48002-M para DOS, además de la beca Doctoral 237076 para CGB. Los resultados aquí presentados son parte del trabajo de tesis de licenciatura de MSQF.

Referencias

Rice, J.A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D.C., & P.E. Shewen., 2007. Mannheimia haemolytica and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev. 8**(2)**:117-128.

Srikumaran, S., Kelling, C.L., & A. Ambagala. 2007. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex. Anim Health Res Rev. 8**(2)**:215-229.

Todd, J.D., 1974. Development of intranasal vaccination for the immunization of cattle against infectious bovine rhinotracheitis, Canadian Veterinary Journal 15**(9)**:257–259.

Trigo, F.J., 1987. Complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. Ciencia Veterinaria 4:1-37.