

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Producción de péptidos contra influenza A
H1N1 en *Chlamydomonas reinhardtii***

Tesis que presenta

Karen Lizbeth Reyes Barrera

Para obtener el grado de

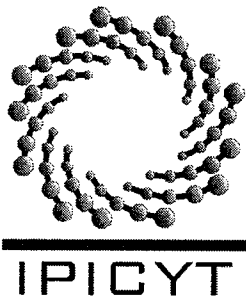
Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

San Luis Potosí, S.L.P., julio de 2016



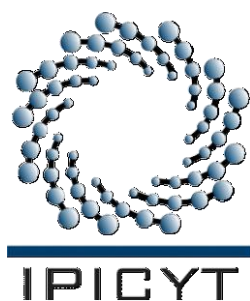
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Producción de péptidos contra influenza A H1N1 en Chlamydomonas reinhardtii***" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Karen Lizbeth Reyes Barrera** y aprobada el trece de julio del dos mil dieciséis por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Director de la tesis

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz
Miembro del Comité Tutorial

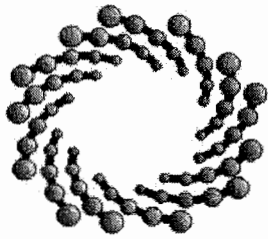
Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Miembro del Comité Tutorial



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección de los Dres. Ángel Gabriel Alpuche Solís y Ruth Elena Soria Guerra.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 331786) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., se contó con el apoyo del proyecto de Ciencia Básica CONACYT 56980 y FOMIX FMSLP-2013-C01-209337.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 152 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 13 días del mes de julio del año 2016, se reunió a las 17:30 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz

Presidenta

IPICYT

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Secretario

IPICYT

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Sinodal externo

UASLP

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Karen Lizbeth Reyes Barrera

sobre la Tesis intitulada:

Producción de péptidos contra influenza A H1N1 en Chlamydomonas reinhardtii

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

Dra. Ruth Elena Soria Guerra (UASLP)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 13 días del mes de julio de 2016.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mis padres Eloy Reyes Maya y Esperanza Barrera Hernández por darme la vida, el amor, la sabiduría y la confianza.

A mis hermanos Marco Polo, Edwin Mijaíl y Shorili por darme la felicidad e impulso para poder superar las adversidades de la vida.

Al Ing. Israel Cruz Jimenez por ser mi base al éxito, ya que siempre ha aportado ideas y conocimientos objetivos en los proyectos que hemos emprendido.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por darme su confianza, el apoyo incondicional y las herramientas para el desarrollo del proyecto. Sobre todo por su paciencia, consejos y amistad durante esta etapa de mi formación académica.

A la Dra. Ruth Elena Soria Guerra por la codirección del presente trabajo y por haberme brindado los conocimientos y enseñanzas que fueron el eje rector para la realización de presente proyecto y por haber sido mi mentora durante mi formación profesional.

A la Dra. Lina Raquel Riego Ruiz, por sus valiosos comentarios, consejos y su amistad brindada desde mi ingreso al IPICYT.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga y al Dr. Guillermo Pastor Palacios por sus sabias recomendaciones.

A la Dra. Ana Erika Ochoa Alfaro por su enseñanza y amistad.

Al Q.F.B. Rosalba Castillo Collazo y al Biol. Salvador Ambríz Granados por todas las asistencias brindadas.

A mis compañeros y amigos Norma, Teresa, Ana Luz, Mayra, Benita, Luzmila, Angélica, Aarón, Emmanuel, Marcela, Fabiola, Nadia y Leonardo del laboratorio de Biología Molecular de Plantas del IPICYT y Ana, Eugenio, Carolina, Mariana, Frida, Celma, Rodrigo y Marcos del laboratorio de Biotecnología Molecular de Células Vegetales de la UASLP .

A la Sra. Rosita por ser el elemento esencial del laboratorio.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por la oportunidad para continuar mis estudios.

Al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) por las facilidades otorgadas.

También agradezco profundamente al CONACYT por el financiamiento 331786 para la realización del presente trabajo.

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis.....	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen de grado	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos.....	vi
Contenido.....	vii
Lista de tablas	ix
Lista de figuras.....	x
Anexos	xi
Resumen.....	xii
Producción de péptidos contra influenza A H1N1 en <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .	xii
Abstract.....	xiii
KEYWORDS: Antiviral proteins, vaccines, microalgae as bioreactors, influenza. .	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1. REACTIVOS Y EQUIPO.....	10
2.2. DISEÑO DE LOS PÉPTIDOS.....	10
2.2.1. Péptido antiviral.....	10
2.2.2. Péptido antigénico.....	10
2.3. DISEÑO DE LOS MODELOS 3D in silico.....	13
2.4. CONTRUCCIONES GENÉTICAS.....	14
2.4.1. Construcciones para la transformación nuclear	14
2.4.2. Construcciones para la transformación de cloroplasto.....	15
2.5. TRANSFORMACIÓN DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CON LAS CONSTRUCCIONES NUCLEARES.....	16
2.6. MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA <i>C.</i> <i>reinhardtii</i>	17
2.7. TRANSFORMACIÓN NUCLEAR DEL PÉPTIDO EB Y EL PÉPTIDO ANTIGÉNICO	18
2.7.1. Transformación nuclear mediada por <i>A. tumefaciens</i>	18
2.8. TRANSFORMACIÓN DE GENÉTICA DE CLOROPLASTOS POR EL MÉTODO DE BIOBALÍSTICA.....	19
2.8.1. Preparación de las células	19
2.8.2. Preparación de las micropartículas de oro con el ADN a transformar..	19

2.8.3. Bombardeo de las microalgas.....	20
2.9. ANÁLISIS DE LAS LINEAS TRANSFORMANTES.....	20
2.9.1. Extracción de ADN genómico	20
2.9.2. PCR para identificar la integración nuclear de las líneas transgénicas.....	21
2.9.3. PCR para identificar la integración de la construcción EB-p463 en el cloroplasto.....	22
2.10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	24
2.10.1. Extracción de proteínas solubles e insolubles.....	24
2.10.2. Cuantificación de proteínas totales extraídas por el método de Lowry	25
2.10.3. Dot Blot	26
2.10.4. Detección del péptido antiviral EB mediante ELISA	27
3. RESULTADOS	28
3.1. DISEÑO DE LOS GENES SINTÉTICOS	28
3.1.1. Diseño del péptido EB.....	28
3.1.2. Diseño del péptido antigénico	29
3.2. MODELOS 3D DE LOS GENES SINTÉTICOS	31
3.2.1. Estructura terciaria del péptido antiviral EB.....	31
3.2.2. Estructura terciaria del péptido antigénico	31
3.3. TRANSFORMACIÓN VÍA NUCLEAR DE <i>C. reinhardtii</i> POR <i>A. tumefaciens</i>	33
3.3.1. Construcción EB-pChlamy_1	33
3.3.2. Construcción PA-pChlamy_1	34
3.4. TRANSFORMACIÓN DEL CLOROPLASTO DE <i>C. reinhardtii</i> POR BIOBALÍSTICA	36
3.4.1. Construcción EB-p463	36
3.4.2. Construcción PA-p463	38
3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEINAS	40
3.5.1. Detección la proteína recombinante por Dot Blot.....	40
3.5.2. Detección la proteína recombinante por ELISA	41
4. DISCUSIÓN	44
5. CONCLUSIONES.....	49
6. PERSPECTIVAS.....	50
7. REFERENCIAS	51
8. ANEXOS	56

Lista de tablas

1. Genoma y proteínas del virus de la influenza A	3
2. Vacunas profilácticas licenciadas por la FDA	6
3. Condiciones de reacción de la PCR y oligonucleótidos específicos para los genes de los péptidos nucleares	15
4. Condición de reacción de la PCR y oligonucleótidos para amplificar el gen <i>Aph7</i>	22
5. Condiciones de reacción de la PCR para verificar homoplastía	23
6. Condiciones de reacción de la PCR Oligonucleótidos específicos para los genes de los péptidos de cloroplasto	24
7. Concentración de BSA para hacer la curva patrón	25
8. Lista de reactivos utilizados	56

Lista de figuras

1. Estructura del virus de la influenza A	2
2. Diseño de los péptido contra influenza A H1N1	13
3. Método de transformación nuclear del péptido EB	19
4. Construcción genética para la transformación nuclear del péptido EB	29
5. Construcción genética para la transformación nuclear del péptido antigénico	30
6. Modelado de la estructura terciaria de los péptidos contra influenza	32
7. Análisis de las líneas transgénicas nucleares con el péptido EB en <i>C. reinhardtii</i>	33
8. Líneas transformadas con el péptido EB vía nuclear	34
9. Análisis de las líneas transgénicas nucleares con el péptido EB en <i>C. reinhardtii</i>	35
10. Líneas transformadas con el péptido antigénico vía nuclear	36
11. Transformación de cloroplasto con el péptido EB	37
12. Líneas transformadas con el péptido EB vía cloroplasto	38
13. Construcciones con el péptido antigénico para la expresión en el cloroplasto	39
14. Líneas transformadas con el péptido antigénico vía cloroplasto	40
15. Dot blot del extracto insoluble del péptido EB vía cloroplasto	41
16. Curva estándar de PTPFHA para la cuantificación del péptido EB	42
17. Análisis ELISA para la detección del péptido EB	43

Anexos

A) Reactivos	56
B) Equipo	58
C) Preparación de células calcio-competentes y transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico	59
D) Preparación de células electro-competentes de <i>A. tumefaciens</i>	60
E) Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina	60
F) Medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato)	61
G) Reactivos para la cuantificación por Lowry	63

Resumen

Producción de péptidos contra influenza A H1N1 en *Chlamydomonas reinhardtii*

La infección por el virus de la influenza es la mayor causa de las enfermedades respiratorias en el mundo. El virus tiene mecanismos para la evasión del sistema inmune y para crear nuevas cepas pandémicas, por tal razón, las vacunas deben actualizarse anualmente. El objetivo del este trabajo fue expresar un péptido antigénico basado en epítomos conservados del virus de la influenza A H1N1 y del péptido antiviral bloqueador de entrada (EB), en la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, ya que es un sistema rápido y económico para producción de proteínas recombinantes. Los genes del péptido antigénico y del péptido antiviral EB se diseñaron con base en ensayos *in silico* y se optimizaron para su expresión en la microalga tanto para la transformación nuclear como en el cloroplasto. Las construcciones para expresión nuclear se clonaron en el vector pChlamy_1 y se transformaron vía *Agrobacterium tumefaciens*. Para la transformación de los cloroplastos por biobalística se usó el vector p463. Las líneas transgénicas nucleares y transplastómicas para el gen *EB* fueron confirmadas por PCR, al igual que para el gen de resistencia *APH7* y para corroborar la homoplastia. El dot blot indicó que el péptido EB en la línea transplastómica se acumula en la fracción insoluble, sin embargo, no se pudo detectar el péptido EB por dot blot en las líneas transgénicas. La cuantificación de la proteína realizada por ELISA mostró que las líneas transgénicas nucleares producen de 0.3 a 1.8 μg de del péptido EB por cada gramo de biomasa húmeda; mientras que, para la líneas transplastómicas, se obtiene de 0.09 a 18 μg del péptido EB por gramo de biomasa húmeda. La transformación nuclear de la construcción PA-pChlamy_1 permitió la obtención de 170 clonas resistentes a higromicina, mientras que la transformación del cloroplasto permitió la obtención de 500 clonas resistentes a espectinomicina. Estamos por realizar el análisis de efectividad biológica del péptido EB en líneas celulares y la efectividad de las proteínas antigénicas en ratones para detectar la producción de anticuerpos y demostrar su funcionalidad. Los resultados preliminares indican que es posible utilizar a *C. reinhardtii* como plataforma para la producción de péptidos que posiblemente que ayuden a combatir al virus de la influenza.

Palabras clave: Proteínas antivirales, vacunas, microalgas como biorreactores, influenza.

Abstract

Production of peptides against influenza A H1N1 in *Chlamydomonas reinhardtii*

Influenza infections are the major cause of respiratory diseases in the world. The viruses have evasion mechanisms of the immune system, so new pandemic strains can arise. For this reason, the influenza vaccines need to be redesigned annually. The aim of the current work was to express an antigenic peptide based on the conserved epitopes from influenza virus A H1N1 and the antiviral peptide entry blocker (EB) in *Chlamydomonas reinhardtii*, which is a fast and economic system for recombinant protein production. Antigenic peptide genes and antiviral peptide, were designed with *in silico* assays and were optimized for algae expression both for nuclear and chloroplast transformation. Constructs for nuclear expression were cloned in the pChlamy_1 vector and were transformed via *Agrobacterium tumefaciens*. For chloroplast transformation, via biolistic, p463 vector was used. Nuclear transgenic and transplastomic lines from EB gene were confirmed by PCR, they were also tested for the presence of resistance gene and for homoplasty. Dot blot indicated that EB peptide in the transplastomic lines was accumulated in the insoluble fraction, however was not detected by dot blot in the transgenic line. ELISA protein quantitation showed that nuclear transgenic lines produced between 0.3 to 1.8 µg per gram of wet biomass. While for transplastomic lines, 0.09 to 18 µg EB peptide per gram of wet biomass was obtained. We obtained 170 hygromycin resistant clones for PA-pChlamy_1 nuclear transformation and 500 spectinomycin resistant clones for chloroplast transformation. We will perform biological assays to test the activity of EB peptide in cellular lines and also the biological assay of antigenic proteins in mice to demonstrate if they have biological activity. Preliminary results showed that is possible to use *C. reinhardtii* as a platform to produce recombinant peptides that perhaps can fight the influenza virus.

KEYWORDS: Antiviral proteins, vaccines, microalgae as bioreactors, influenza.

1. INTRODUCCIÓN

La influenza es una de las principales causas de las enfermedades respiratorias en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó de 3 a 5 millones de casos severos de influenza y alrededor de 250,000 a 500,000 muertes anuales (WHO, 2014). El virus de la influenza se considera una amenaza global constante para la humanidad en materia de salud debido a su alta tasa de mutación, rápida propagación y capacidad de afectar a todos los grupos de edades (Richt y Webby, 2013).

En la historia de la humanidad, el virus de la influenza ha causado importantes pandemias como la gripa española causada por H1N1 en 1918, la gripa asiática en 1957 por H2N2 y la gripa de Hong Kong en 1968 por H3N2 (Richt y Webby, 2013). A principios de abril del 2009 en México y Estados Unidos surgió una nueva cepa patógena del virus de la influenza A H1N1 la cual se expandió en 40 países debido a su fácil transmisión y nula inmunidad en la población humana. Por tal motivo la OMS activó la alerta de pandemia a nivel 5 (Smith et al., 2009). Esta cepa está conformada de segmentos génicos que no habían sido reportados en puercos, humanos y aves; tiempo después se determinó que estos segmentos pertenecen a linajes porcinos de Norteamérica y Eurasia (Garten et al., 2009).

El virus de la influenza pertenece a la familia Orthomyxoviridae y con base en sus diferencias genéticas y antigénicas se reconoce tres tipos: A, B y C. El virus tiene un genoma segmentado de ARN (-) uncatenario. La partícula viral tiene una envoltura lipídica derivada de la célula huésped y 9 ó 10 proteínas estructurales (Tabla 1 y Fig.1). Las proteínas de la superficie como la hemaglutinina (HA) y la

neuraminidasa (NA) son esenciales para la absorción, replicación y disipación del virus (Richt y Webby 2013).

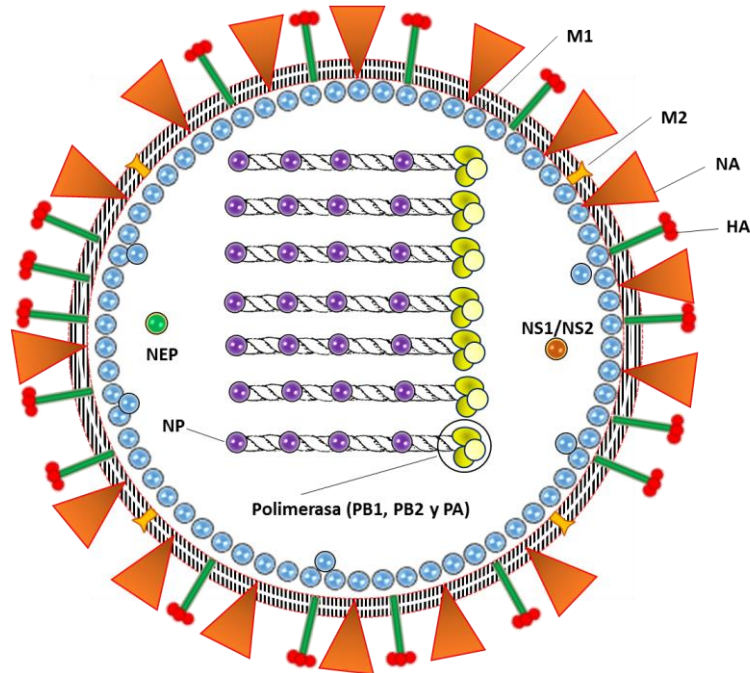


Figura 1. Estructura del virus de la influenza A

Esquema del virus de la influenza A. Su genoma está segmentado de ARN (-), y es monocatenario, sostenido por la nucleoproteína (NP), mientras que la ARN polimerasa dependiente de ARN está constituida por las proteínas PB1, PB2 y PA. En la superficie destacan la hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), la proteína del canal iónico (M2) y la proteína estructural de la cápside denominada de matriz 1 (M1). También contienen otras proteínas no estructurales 1 (NS1), proteína no estructural 2 (NS2) y la proteína de exportación nuclear (NEP): (modificado de Richt y Webby, 2013).

Tabla 1. Genoma y proteínas del virus de la influenza A

Segmento	Nucleótido	Proteína	A.A	Función
1	2341	PB2	759	Subunidad de unión al Cap de la RdRp (ARN polimerasa dependiente de ARN)
2	2341	PB1	757	Localización central del dominio polimerasa de la RdRp
		PB1-F2	87-91	Actividad proapoptótica
3	2233	PA	716	Subunidad endonucleasa de la RdRp
4	1778	HA	566	Glicoproteína de superficie: unión al receptor y fusión de membrana
5	1565	NP	498	Nucleoproteína: encapsulación genómica y de ARN antígenica
6	1413	NA	454	Glicoproteína de superficie: destruye receptor de la neuraminidasa
7	1027	M1	252	Proteína de matriz
		M2	97	Canal iónico
8	890	NS1	230	Regulación de la actividad RdRp: potencia la traducción del ARNm viral
		NEP	121	Factor de exportación nuclear

(Tomado de Richt y Webby, 2013).

El éxito en la proliferación del virus de la influenza se debe a los mecanismos de generación de variabilidad genética, la tasa de evolución del virus y su amplio repertorio de hospederos. Dentro de los mecanismos de variabilidad genética destacan los errores de la ARN polimerasa, el reordenamiento y la recombinación de diferentes segmentos (Richt y Webby, 2013). Estos mecanismos permiten que el virus escape de ser reconocido por el sistema inmune (Koel et al., 2015), por tal

razón, las vacunas deben actualizarse anualmente y desarrollar nuevos fármacos con la capacidad de combatir a las cepas resistentes.

En la actualidad, existen medicamentos aptos para tratar la gripe pero producen a su vez efectos colaterales. Los fármacos utilizados son los derivados de adamantanos e inhibidores de la neuraminidasa (WHO, 2014). Desafortunadamente, las diferentes cepas de virus circundantes, especialmente las de A (H1N1), han generado resistencia a los medicamentos antivíricos (WHO, 2010). Un ejemplo de ellos es el aislamiento del virus de influenza A H1N1 (pandémica, 2009) que tiene las mutaciones E119D y H257Y en la neuraminidasa, la cual muestra un aumento en la resistencia al uso del Zanamivir, Oseltamivir, Peramivir y Laninamivir (L'Huillier et al., 2015). Este suceso demuestra la necesidad urgente del desarrollo de nuevas estrategias de control del virus de la influenza. Una estrategia viable es uso de péptidos antivirales capaces de bloquear la entrada del virus a las células de mucosa respiratoria.

El péptido EB (entry blocker) de 20 aminoácidos es derivado de la secuencia señal del factor 4 de crecimiento del fibroblasto. En un inicio mostró inhibición a la entrada del virus del herpes simple sin embargo, después se comprobó que podía prevenir la infección de diferentes virus como el de la influenza y el de vaccinia. El péptido tiene la capacidad de inhibir el ataque a los receptores celulares debido a que se une específicamente a la hemaglutinina viral, además no muestra toxicidad en distintas líneas celulares. Por lo tanto, el péptido EB es considerado como una alternativa de terapia antiviral contra el virus de la influenza (Akkarawongsa et al., 2006; Jones et al., 2006; Altmann et al., 2012).

Otra estrategia para combatir al virus de la influenza es la implementación de vacunas profilácticas. El uso de vacunas comenzó en 1945, esta contenía virus de influenza A y B producidos en embriones de pollo e inactivados con formalina. Posteriormente surgen vacunas de virus atenuados, que pueden ser aplicadas por vía intranasal. Sin embargo, pronto se determinó que la protección suele ser breve (Compans y Orenstein 2009). A partir de estas primeras vacunas, han surgido nuevas que actualmente se encuentran licenciadas (Tabla 2).

La U.S. Food and Drug Administration (FDA) es una organización americana que supervisa los productos médicos que pueden ser utilizados en humanos. Actualmente ha licenciado varias vacunas anti-influenza (Tabla 2) dentro de las que destacan vacunas de virus inactivos (IIVs), vacunas de virus vivos atenuados (LAIVs), vacunas trivalentes inactivas (TIVs), vacunas cuadrivalentes inactivas (QIVs) y una vacuna de HA recombinante (FDA, 2016).

Tabla 2. Vacunas profilácticas licenciadas por la FDA

Tecnología	Plataforma	Nombre del producto	Marca	Farmacéutica
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1)2009	S/N	CSL limited
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1)2009	S/N	MedImmune LLC
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1)2009	S/N	ID Biomedical Corp of Quebec
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1) 2009	S/N	Novartis Vaccines and Diagnostics limited
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de Influenza A (H1N1) 2009	S/N	Sanofi Pasteur, Inc.
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna de Virus Influenza H5N1	S/N	Sanofi Pasteur, Inc.
IIVs	Embriones de pollo	Vacuna monovalente de influenza A (H5N1) con adyuvante	S/N	ID Biomedical Corp of Quebec
TIVs	Embriones de pollo	Trivalente (A y B)	Afluria	CSL Limited
TIVs	Embriones de pollo	Trivalente (A y B)	FluLaval	ID Biomedical Corp of Quebec
TIVs	Embriones de pollo	Trivalente (A y B) con MF59 como adyuvantes	FLUAD	Novartis Vaccines and Diagnostics limited
LAIVs	Embriones de pollo	Vacuna intranasal trivalente (A y B)	FluMist	MedImmune,LLC
TIVs	Embriones de pollo	Trivalente (A y B)	Fluarix	GlaxoSmithKline Biologicals

TIVs (antígenos de superficie)	Embriones de pollo	Trivalente (A y B)	Fluvirin	Novartis Vaccines and Dignostixs Ltd
TIVs (antígenos de superficie)	Embriones de pollo	Trivalente (A y B)	AGRIFLU	Novartis Vaccines and Dignostixs Ltd
TIVs	Embriones de pollo	Trivalente (A y B)	Fluzone	Sanofi Pasteur, Inc.
TIVs	Células MDCK	Trivalente (A y B)	Flucelvax	Novartis Vaccines and Dignostixs Ltd
Vacuna de HA recombinante	Células de insecto	Vacuna de HA0r recombinante trivalente (A y B)	Flublok	Protein Sciences Corporation
LAIVs	Embriones de pollo	Vacuna intranasal cuadrivalente (A y B)	FluMist Quadrivalent	MedImmune, LLC
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B)	Fluarix Quadrivalent	GlaxoSmithKline Biologicals
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B)	Fluzone Quadrivalent	Sanofi Pasteur, Inc
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B)	Flulaval Quadrivalent	ID Biomedical Corporation
QIVs	Embriones de pollo	Vacuna cuadrivalente (A y B)	Flucelvax Quadrivalent	Seqirus, Inc

IIVs (Inactivated influenza vaccine; vacuna de influenza virus inactivos); LAIV (Live attenuated influenza vaccine; vacuna de influenza virus vivos atenuados); TIV (Trivalent inactivated vaccine; vacuna trivalente inactivada); HA (Hemaglutinina); S/N (sin nombre) (Tomado de la FDA, 2016).

La mayoría de estas vacunas se caracterizan por ser producidas en huevos embrionados de pollos. Esta metodología tiene las siguientes desventajas: requerir de instalaciones especializadas, el escalamiento en la producción no es factible, el proceso de producción es tardado y las cepas reproducidas no siempre tienen

inmunidad óptima (Treanor et al., 2007). Además, aún existe incertidumbre con respecto a la vacunación en niños que presentan asma y alergia a las proteínas de huevo (Turner et al., 2015). Por otro lado, existe el riesgo de que las dosis sean muy altas para los niños, como es el caso de la vacuna Afluria producida en embriones de pollo, que está asociada a convulsiones febriles en niños de 6 meses a 9 años de edad (Bernstein y Bocchini 2010).

La implicación inherente a las vacunas profilácticas contra el virus de la influenza son las actualizaciones anuales con las cepas circulantes para incrementar la eficiencia de la vacuna. Por lo tanto, se están buscando nuevas estrategias o tecnologías para el desarrollo de vacunas en menor tiempo y que induzcan una inmunoprotección más amplia.

Una alternativa viable para la producción de vacunas en un corto tiempo es *Chlamydomonas reinhardtii*. Esta microalga es un organismo unicelular ovalado (10 micras de longitud), biflagelar y fotosintético además puede crecer autotrófica, mixotrófica o heterotróficamente (Rochaix,1995). Actualmente se ha utilizado como una plataforma para la producción de proteínas terapéuticas gracias a las siguientes ventajas: producción rápida de proteínas recombinantes con cantidades que van de miligramos a gramos, el cultivo es relativamente económico, de confinamiento total, fácilmente escalable y libre de contaminantes exógenos, la transformación genética nuclear o de cloroplasto es relativamente rápida y estable, la expresión de proteína vía cloroplasto muestra un plegamiento correcto y un ensamble complejo similar al que ocurre en los mamíferos; además es reconocida por la FDA como categoría GRAS (Generally Reconized as Safe), por lo

consiguiente la microalga puede ser consumida vía oral y fungir como vía de entrega de la proteína terapéutica (Mayfield et al., 2003; Mayfield et al., 2007).

De acuerdo con lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue expresar un péptido antiviral (péptido EB) en el núcleo y en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, así como expresar un péptido antigénico (vacuna multiepítopo) capaz de proteger contra el virus de la influenza.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. REACTIVOS Y EQUIPO

Los reactivos y el equipo utilizado en la presente investigación se muestran en anexos A y B.

2.2. DISEÑO DE LOS PÉPTIDOS

2.2.1. Péptido antiviral

Para el diseño del péptido EB de integración nuclear, nos basamos en la secuencia publicada por (Jones et al., 2006) y se adicionó un péptido señal al extremo 5', mientras que en la región 3' se adicionó un sitio de corte de enteroquinasa (ETQ), una etiqueta de histidina (HIS), una secuencia de retención a retículo endoplásmico (KDEL) y codón de paro (ALTO) (Fig. 2a).

Al péptido EB para la expresión en cloroplasto se le adicionaron en los extremos sitios de unión a ribosoma (RBS), hacia el extremo 3' se le colocó un sitio de corte de enteroquinasa (ETQ), una etiqueta de histidina (HIS) y codón de paro (ALTO) (Fig. 2b).

2.2.2. Péptido antigénico

El diseño del péptido antigénico fue realizado por la elección de epítomos relevantes de la Hemaglutinina (HA), Neuraminidasa (NA), Nucleoproteína (NP), Proteína de Matriz 1 (M1) y la Proteína de Matriz 2 (M2) del virus de la influenza A H1N1. La elección de epítomos relevantes de cada proteína se realizó con los siguientes análisis bioinformáticos.

Para la selección de los aminoácidos conservados se descargaron del Influenza Research Database (<http://www.fludb.org/brc/home.spg?decorator=influenza>) las secuencias de aminoácidos de las proteínas del virus de la influenza A H1N1 reportadas para México y circulantes en el mundo durante el periodo 2014-2015. Las secuencias repetidas se eliminaron, por lo tanto fueron analizadas 179 secuencias de HA, 124 secuencias de NA, 55 secuencias de NP, 32 secuencias de M1 y 43 secuencias de M2. Estas secuencias fueron alineadas utilizando el programa MEGA 6.06 (<http://www.megasoftware.net/>) utilizando el complemento MUSCLE (Robert, 2004) como parámetros de penalización -2.8 por Gap de apertura, 0 por Gap de extensión y 1.2 de multiplicador de hidrofobicidad.

Tomando la secuencia de aminoácidos conservados se realizaron los análisis de antigenicidad utilizando el programa Antheprot 6.6.6 (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr/>). Este programa permite obtener epítomos antigénicos, tomando en cuenta valores hidrofiliidad y parámetros de retención experimental en HPLC de péptidos sintéticos (Parker et al., 1986).

Los análisis de reconocimiento de los aminoácidos en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC class I) se realizaron en el programa SYFPEITHI (Rammensee et al., 1999), donde se obtuvieron las regiones reconocidas para los alelos HLA-A*0201 (humano) y Kd (ratón). Para la elección de epítomos reconocidos por el MHC clase II se obtuvo el consenso de la predicción para todos los alelos HLA-DRB1 disponibles en el programa Propret (Singh y Raghava 2001).

Una vez realizados estos análisis se eligieron 15 epítomos de las regiones proteicas que tuvieron la mayor cantidad de características mencionadas anteriormente (regiones conservadas, antigénicas, reconocidas por el MHC de clase I y II). Los epítomos se unieron por espaciadores o “linkers” de prolinas y glicinas, con la finalidad de que la exposición de los epítomos sea de manera lineal (Livingston et al., 2002). Posteriormente en los extremos 5´ y 3´ de la proteína antigénica y del péptido antiviral EB se le adicionaron un péptido señal (para dirigirlo a retículo endoplásmico), sitio de corte de proteasas, etiqueta de histidina, secuencia de retención a retículo endoplásmico (KDEL), sitio de unión a ribosoma y sitios de restricción (Figs. 2 c y d).

Las construcciones finales se analizaron con el programa AllerTop para verificar que la proteína no fuera alergénica (Dimitrov et al., 2013).

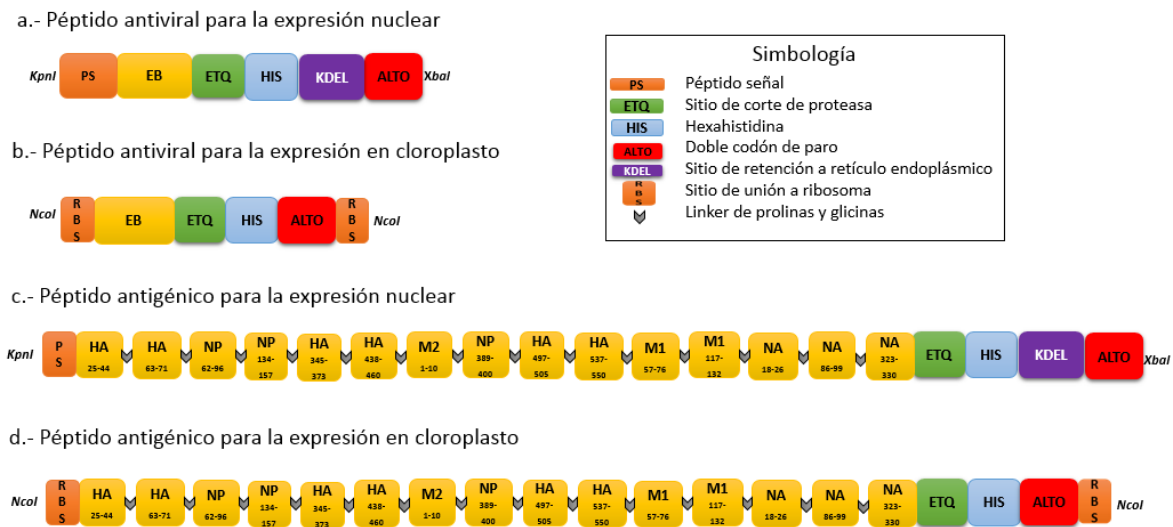


Figura 2. Diseño de los péptidos contra influenza A H1N1

Diseños del péptido antigénico y antiviral EB para la expresión nuclear y en cloroplastos de *Chlamydomonas reinhardtii*: a) Péptido antigénico para la expresión nuclear, contiene los sitios de restricción *KpnI* y *XbaI* para clonarse en el vector pChlamy_1; b) Péptido antigénico para la expresión en cloroplasto, tiene el sitio para *NcoI* para clonarse en el vector p463; c) Péptido antiviral para la expresión nuclear, contiene los sitios de restricción *KpnI* y *XbaI* para clonarse en el vector pChlamy_1; d) Péptido antiviral para la expresión en cloroplasto, contiene los sitios *NcoI* para clonarse en el vector p463.

2.3. DISEÑO DE LOS MODELOS 3D *in silico*

2.3.1. Modelado del péptido EB

Las secuencias del péptido EB para la expresión nuclear y la de cloroplastos fueron analizadas en el portal del programa Raptorx (<http://raptorx.uchicago.edu/>). Este portal nos permite obtener la predicción de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas basándose en el modelado por homología. Los resultados fueron visualizados utilizando el programa UCSF Chimera versión 1.10.1. (Pettersen et al., 2004).

2.3.2. Modelado del péptido antigénico

La secuencia del péptido antigénico fue analizada a través del servidor del programa I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) el cual realiza un enfoque jerárquico de la estructura de la proteína y su función. Los resultados fueron visualizados con el programa UCSF Chimera versión 1.10.1.

2.4. CONTRUCCIONES GENÉTICAS

2.4.1. Construcciones para la transformación nuclear

Los genes se optimizaron para el uso de codones de *C. reinhardtii* y fueron sintetizados por la compañía GenScrip en EUA. Los genes sintéticos llegaron clonados en un pUC57 y fueron disueltos en 20 μ L de agua estéril. De los genes nucleares se tomaron 400 ng para realizar las reacciones de digestión con las enzimas de restricción *Xba*I y *Kpn*I. Estas reacciones fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % (TBE 1X), posteriormente se tiñó con bromuro de etidio (0.01%) y se observaron en un fotodocumentador de la marca UVP bajo luz UV. Los fragmentos liberados de ADN fueron purificados por el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Technicall Bulletin. Los fragmentos nucleares fueron ligados con la T4 DNA ligasa (New England Biolabs) siguiendo las especificaciones del proveedor al vector pChlamy_1. Las mezclas de ligación se usaron para transformar células calcio-competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F') mediante choque térmico (Anexo C). Las clonas resistentes ampicilina se seleccionaron y se propagaron para aislar ADN de plásmido por el método de lisis alcalina (anexo D).

Las construcciones nucleares fueron confirmadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla 3). La mezcla maestra de reacción (25 μ L) contenía buffer Colorless de Promega (1X) MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (0.2mM), oligonucleótidos (0.4 μ M) y Taq polimerasa (1U). La reacción se llevó a cabo bajo las condiciones especificadas en la Tabla 3. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2% (TBE 1X) corridos a 70 V y posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio (0.01%) y visualizados bajo luz UV en el fotodocumentador Chemisystem (UVP) empleando el software Labworks.

Tabla 3. Condiciones de reacción de la PCR y oligonucleótidos específicos para los genes de los péptidos nucleares

Gen	Tamaño del amplicón (pb)	Oligonucleótido	Condiciones de la reacción de la PCR						
			Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final		
			1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo		
EB-nuclear	116	F-5' TGCTGCTGTTCTGGTGAT3'	94°C 5 Min	94°C 30 s	62° C 30 s	72°C 30 s	72°C 3 Min		
		R-5' GTGGTGCTTGTCGTCGTC3'							
PA-nuclear	238	F-5' CGAGCGCCGCAACAAG 3'						65°C 30 s	72°C 30 s
		R-5' GCCGTACCAGCCGTCCACC 3'							

2.4.2. Construcciones para la transformación de cloroplasto

Los genes para la transformación de cloroplasto clonados en el pUC57 se rehidrataron con 20 μ L de agua estéril. De esta dilución se tomaron 600 ng para realizar reacciones de digestión con la enzima *Nco*I. Estas reacciones fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (TBE 1X),

posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio (0.01%) y se observaron en un fotodocumentador UVP bajo luz UV. Los fragmentos liberados de ADN fueron purificados.

El vector p463 fue linearizado al digerirlo con la enzima *NcoI* y posteriormente el vector se desfosforiló usando la fosfatasa antártica (New England, Biolabs). Los fragmentos purificados fueron ligados con la T4 DNA ligasa (New England Biolabs) utilizando las especificaciones del proveedor al vector.

Las mezclas de ligación se usaron para transformar células calcio-competentes de *Escherichia coli* (Top 10 F[']) mediante choque térmico (Anexo C). Las clonas resistentes a la ampicilina se seleccionaron y se propagaron para aislar ADN de plásmido por el método de lisis alcalina (Ehrt y Schnappinger, 2003).

Las construcciones de cloroplasto se analizaron por perfil de restricción, utilizando las enzimas *ClaI* y *NotI* para verificar el número de fragmentos clonados en el vector, los productos de la digestión se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

2.5. TRANSFORMACIÓN DE *Agrobacterium tumefaciens* CON LAS CONSTRUCCIONES NUCLEARES

Las construcciones nucleares EB-pChlamy_1 y PA-pChlamy_1 fueron transferidas a *A. tumefaciens* por electroporación. Para ello se tomó 1 µg de la construcción y se mezcló con 50 µL de células electro-competentes previamente preparadas (Anexo D). Se incubaron por 1 minuto en hielo y se transfirieron a la cubeta de electroporación de 2 mm Bio-Rad y se les aplicó un pulso eléctrico (25 µF, 2.4 KV

de voltaje y 200 Ω de resistencia) en un equipo BTX mod. 630. Posteriormente a las células se le añadieron 500 μ L de medio LB, y se transfirió a un tubo Ependorff de 1.5 mL y se incubó por dos horas a 28 °C en oscuridad a 200 rpm. Pasado este tiempo se tomaron 100 μ L de la suspensión de bacterias y se fueron sembraron en medio LB sólido con 100 mg/L de ampicilina. Estas bacterias crecieron a 28°C y en oscuridad por dos días.

Para confirmar la transformación se tomaron colonias aisladas y se dejaron crecer en medio LB líquido para posteriormente extraer el ADN plasmídico por lisis alcalina (Anexo E). Posteriormente se realizó una PCR con los oligonucleótidos específicos (Tabla 3) y los productos de reacción se visualizaron a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

2.6. MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA *C. reinhardtii*

Las cepa CC-137 mt(+) de *C. reinhardtii* fue utilizada para las transformaciones de los transgenes de interés. Los cultivos de las microalgas se desarrollaron en medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato) líquido y sólido a 23°C con un fotoperiodo de 18 horas luz y 8 horas oscuridad. El mantenimiento de las células fue en placas de medio TAP sólido (20 gramos de agar bacteriológico/L), las células fueron resembradas cada 15 días. Los cultivos en líquido se realizaron en 30 mL de medio TAP, los cuales se mantuvieron con agitación constante (120 rpm).

2.7. TRANSFORMACIÓN NUCLEAR DEL PÉPTIDO EB Y EL PÉPTIDO ANTIGÉNICO

2.7.1. Transformación nuclear mediada por A. tumefaciens

Las microalgas crecidas por 5 días en 30 mL de medio TAP líquido se colectaron por centrifugación (3 min a 2500, rpm) y posteriormente se sembraron 200 μ L de las células en la totalidad de una caja con medio TAP sólido. Por otro lado se crecieron *A. tumefaciens* portadoras de las construcciones (EB-pChlamy_1 y PA-pChamy_1) en obscuridad y en medio LB líquido. Una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.5, se adicionó acetosiringona para lograr una concentración de 100 μ M. De esta solución se tomaron 200 μ L para adicionarlos sobre las microalgas previamente sembradas. Este co-cultivo se incubó por dos días en obscuridad a 25°C. Pasado este tiempo se adicionó 1.5 mL de medio TAP líquido para despegar las células del medio, estas células se colectaron en un tubo Eppendorf y se centrifugó a 2,500 rpm, se retiró el sobrenadante y al tubo se le adicionó 1 mL de medio TAP, este paso se repitió cuatro veces (Kumar et al. 2004). En el último ciclo de lavado las células se resuspendieron en medio TAP con cefotaxima 500 mg/L. Posteriormente se pasaron al medio TAP sólido con 10 mg/ L de higromicina B y 500 mg/L de cefotaxima (Fig. 3).

Las células sembradas se mantuvieron a 23°C con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de obscuridad. Una vez que se empezaron a visualizar las posibles transformantes estas se aislaron en una nueva placa con los mismos antibióticos y se resembraron cada 15 días.

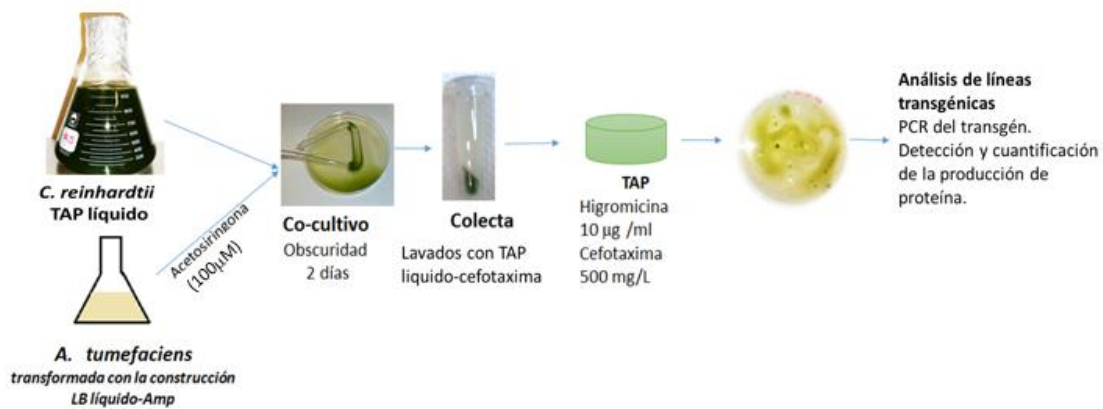


Figura 3. Método de transformación nuclear de *C. reinhardtii* con *A. tumefaciens*.

2.8. TRANSFORMACIÓN DE GENÉTICA DE CLOROPLASTOS POR EL METODO DE BIOBALÍSTICA

2.8.1. Preparación de las células

Las microalgas crecidas por 5 días en 30 mL de medio TAP líquido se colectaron por centrifugación (3 min a 2,500 rpm) y posteriormente se sembraron 200 µL de las células en la totalidad de una caja con medio TAP sólido.

2.8.2. Preparación de las micropartículas de oro con el ADN a transformar

Cincuenta miligramos de partículas de oro de 0.6 µm (Bio-Rad) previamente esterilizadas se colocaron en un tubo Eppendorf y se les añadió 10 µg/mL de ADN de la construcción (EB-p463 o PA-p463) y se mezcló con vórtex por 5 segundos. Posteriormente se le adicionaron 50 µg de CaCl₂ (2.5 M) esterilizado por filtración y se mezcló por vórtex para después se adicionar 20 µL de espermidina (0.1 M) y mezclar por vórtex a 4 °C por 20 min. Después se agregaron 200 µL de etanol

absoluto, se mezcló por vórtex y fue centrifugado a 10,000 rpm durante 3 min, este paso se repitió durante 4 veces. En seguida se resuspendieron las partículas en 30 μ L de etanol absoluto y se mantuvo en hielo. Sobre la membrana de acarreo se colocaron 5 μ L de las partículas preparadas.

2.8.3. Bombardeo de las microalgas

Para realizar el disparo en la pistola de Helio Bio-Rad, se utilizaron discos de ruptura de 1,100 psi. La presión del manómetro de salida se ajustó a 1,400 psi. Se encendió la bomba de vacío y la cámara de vacío para realizar los disparos. La caja Petri con las microalgas se colocaron a una distancia de 9 cm y posteriormente la cámara de vacío fue cerrada. Se generó vacío hasta que el indicador marcara 25 Hg (mm de mercurio), para realizar el disparo. Posterior al disparo, las cajas Petri se cerraron herméticamente y se incubaron por dos días a 23°C. Posteriormente se agregó 1 ml de medio TAP y se recuperaron las células, las cuales se resembraron en medio TAP sólido con espectinomicina (50 mg/L), Las células se mantuvieron a 23 °C por 15 días. Las colonias aisladas se resembraron en medio TAP sólido con espectinomicina (100 mg/L). Las colonias aisladas se cambiaron a medio nuevo cada 15 días.

2.9. ANÁLISIS DE LAS LINEAS TRANSFORMANTES

2.9.1. Extracción de ADN genómico

Las líneas de *C. reinhardtii* resistentes al medio de selección y la cepa sin transformar se crecieron en 15 mL de medio TAP líquido por 5 días. La biomasa fue colectada por centrifugación (2,500 rpm por 3 min). La pastilla de microalgas

fueron lavadas con 1 ml de buffer TEN frío (NaCl 150 mM, EDTA 10 mM pH=8, Tris-HCl 10 mM pH=8), Posteriormente se centrifugó por 2 minutos a 3,000 rpm y fue retirado el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 150 μ L de agua fría y 350 μ L de buffer SDS-EB (NaCl 400 mM, EDTA 40 mM pH=8, Tris-HCl 10 mM pH=8, SDS 2%) y se adicionaron 400 μ L de fenol-cloroformo mezclándose vigorosamente y se centrifugó por 6 minutos a 13,000 rpm. Se tomó la fase acuosa y transfirió a otro microtubo y se añadió un volumen de isopropanol y 1/10 de volumen de acetato de sodio (3 M pH=5.2). Se incubó en hielo por 30 min y se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 75% y se secó la pastilla a temperatura ambiente. Al final la pastilla se resuspendió en 25 μ L de agua Milli Q estéril, y se incubó con RNAsa (20 μ g/mL) por 30 min a 37 °C (Newman et al., 1990).

La calidad de ADN extraído se observó mediante electroforesis en un gel de agarosa 1%, mientras que la cantidad de ADN y la pureza se midieron con el Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). El ADN purificado fue almacenados a -20 °C.

2.9.2. PCR para identificar la integración nuclear de las líneas transgénicas.

Se analizó por PCR el ADN de las líneas resistentes a higromicina, transformadas con la construcción EB-pChlamy_1, utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *EB*-nuclear y para el gen *Aph7* (gen que le confiere resistencia a higromicina B) (Tabla 4). La mezcla maestra de reacción (25 μ L) contenía buffer Colorless de Promega (1X) MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (0.2mM), oligonucleótidos (0.4 μ m), Taq

polimerasa (1U) y 100 ng del ADN de la muestra. La reacción de PCR para el Gen EB se llevó a cabo bajo las condiciones especificadas en la Tabla 3 y las condiciones para la aplicación del gen *Aph7* se indican en la Tabla 4. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (TBE 1X) corridos a 70 V y posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio (0.01%) y los fragmentos fueron visualizados bajo luz UV en el fotodocumentador marca Chemisystem (UVP) empleando el software Labworks.

Tabla 4. Condición de reacción de la PCR y oligonucleótidos para amplificar el gen *Aph7*

Gen	Tamaño del amplicón (pb)	Oligonucleótido	Condiciones de la reacción de la PCR				
			Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
			1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
<i>Aph7</i>	141	F-5' AACTGCATCTCAACGCCTTC3'	94°C 5 Min	94°C 30 s	62° C 30 s	72°C 30 s	72°C 3 Min
		R-5' GTCTCCTCGAACACCTCGAA3'					

2.9.3. PCR para identificar la integración de la construcción EB-p463 en el cloroplasto

Se analizó por PCR el ADN de las líneas resistentes a espectinomicina transformadas con la construcción EB-p463 (Tabla 5.) para verificar la homoplasia utilizando oligonucleótidos que alinean en la región *tsaA* “region trans-splicing requerida para la unión del exón 1 y 2 del gen *psaA*” y en la región *ch1N* “gen de síntesis de clorofila independiente de la luz” localizado en el genoma del cloroplasto. Estos oligonucleótidos amplifican un producto de 2.7 Kb si están transformados con la construcción nuclear o un producto de 0.8 Kb si no están transformados. La PCR se realizó con la misma mezcla de reacción antes

mencionada (sección 2.8.2), pero utilizando 150 ng de ADN de la microalga y con el programa de reacción especificado en la Tabla 5. El producto de amplificación se analizó utilizando electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Debido a que al final del proceso de clonación encontramos que el gen EB se clonó en tándem al realizar la PCR con los oligonucleótidos específicos amplifica dos productos uno de 276 pb y otro de 491 pb, los cuales se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

También se realizó una PCR oligonucleótido específico para el gen EB-addA (especificaciones en la Tabla 6), tomando en cuenta que en la construcción se clonaron dos copias del gen EB, se obtuvieron dos productos uno de 276 pb y el otro de 491 pb, los cuales se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 5. Condiciones de reacción de la PCR para verificar homoplastía

Oligonucleótido	Condiciones de la reacción de la PCR				
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
tscA 5'- ACTCCGAAGCAGGCAGTTGCAG-3'	94°C	94°C	55° C	72°C	72°C
ch1N 5'TGCCCGATTAGCTGTGTAGCTTGG-3'	5 MIN	1 MIN	1MIN	3 MIN	5 MIN

Tabla 6. Condiciones de reacción de la PCR Oligonucleótidos específicos para los genes de los péptidos de cloroplasto

			Condiciones de la reacción de la PCR				
Gen	Tamaño del amplicón (pb)	Oligonucleótido	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
			1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
EB-addA	266	F-5' GGAGGACCGAATGCGTAAA 3'	94°C 5 Min	94°C 30 s	59.5°C 30 s	72°C 40 s	72°C 3 Min
		R-5' TCAATATCACTGTGTGGCTTC 3'					
PA-addA	439	F-5' ATTATCCTAAAGGTCCTGGTC 3'					
		R-5' GATGACGCCAACTACCTCT 3'					
					58°C 40 s	72°C 40 s	

2.10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

2.10.1. Extracción de proteínas solubles e insolubles

La biomasa de las líneas transgénicas y de la cepa sin transformar se colectó a partir de un cultivo de cinco días de crecimiento en 50 mL de medio TAP (para las líneas transgénicas EB-pChlamy_1 suplementado con 10 mg/L de higromicina y las líneas transplastómicas de EB-p463 con 50 mg/L de espectinomicina).

Las células fueron resuspendidas en 200 μ L Buffer de extracción de proteínas (Tris-HCl 50 mM pH=8, NaCl 40 mM, 0.1% Tween y 0.1% de coctel de inhibidores de proteasas). Esto fue sonicado a una amplitud de 30% por 5 segundos y se dejó reposar por 5 segundos, este procedimiento se repitió tres veces y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min, posteriormente se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo (fracción soluble). Para obtención de la fracción insoluble la pastilla restante del tubo se disolvió en 200 μ L buffer de urea (urea 8 M, NaPO₄ 20 mM pH=7.4 y NaCl 500 mM) y centrifugó a 12,000 rpm por 2 min, el sobrenadante se pasó en un tubo nuevo (fracción insoluble). Los extractos se guardaron a -70°C.

Para eliminar la clorofila que pudiera interferir con la señal quimioluminiscencia del dot blot a 50 μL de extracto de proteína se le agregaron 400 μL de acetona fría y se dejó precipitando toda la noche a -20°C . Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm y se eliminó el sobrenadante, la pastilla fue resuspendida en 25 μL de buffer (Tris-HCl 20 mM pH=7.4). Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en hielo.

2.10.2. Cuantificación de proteínas totales extraídas por el método de Lowry

Se preparó la siguiente curva estándar de albumina sérica bovina (BSA) por duplicado en tubos Eppendorf.

Tabla 7. Concentraciones de BSA para hacer la curva patrón

Proteína (μg)	Sol. Proteína (μL)	H ₂ O	Volumen Total
0	0	20	20
0.5	0.5	19.5	20
1	1	19	20
5	5	15	20
10	10	10	20
15	15	5	20
20	20	0	20

Se realizó una dilución de la muestra utilizando 19 μL de H₂O y 1 μL de extracto de proteína. Tanto a la muestra problema como a las diluciones de la curva se les adicionaron 150 μL de la solución A+B (ver anexo F), La mezcla se agitó vigorosamente y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Después se adicionó 15 μL del reactivo Folín diluido 1:1 se mezcló vigorosamente y se incubó

por 30 min protegido de la luz. Posteriormente las muestras se cargaron en una placa de ELISA y se leyó la O.D a 750 nm en el espectrómetro GloMax®-Multi+ Microplate Multimode Reader with Instinct® (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Las concentraciones de proteína de las muestras se determinaron utilizando la ecuación de la línea recta de la curva estándar.

2.10.3. Dot Blot

En la membrana de nitrocelulosa se marcó con lápiz el sitio de depósito de la muestra, posteriormente se cargaron 2 μ L de cada extracto de proteína tanto insoluble como soluble de las líneas transgénicas y transplastómicas con el gen que codifica para el péptido EB. Como control positivo se usó la proteína purificada con cola de histidinas (PTPFHA) donado por la M. en C. Karla Sánchez Alvarez y como control negativo los extractos de proteínas solubles e insolubles de la cepa sin transformar. Las muestras se dejaron secar por 15 min, posteriormente se les adicionó el buffer de bloqueo (BSA al 10% en PBS) y se mantuvo en agitación por una hora. Posteriormente se le hicieron tres lavados con PBS-T por 5 min en agitación. Después se incubó la membrana, en agitación constante a 37 °C por una hora, con el anticuerpo primario anti-histidinas a una dilución a 1:3000 en PBS. Pasado este tiempo se hicieron tres lavados con PBS-T por 5 minutos en agitación. Después se agregó el anticuerpo secundario anti-ratón a una dilución 1:4000 en PBS y se incubó por una hora a 37° C. Posteriormente se hicieron tres lavados con PBS-T por 5 minutos en agitación. Para revelar la membrana se agregó 0.5 ml de la solución 1 y 2 del kit PIERCE ECL-Western Blotting Substrate

(Thermo scientific) se incubó por 1 min en ausencia de luz y se expuso a quimioluminiscencia en el fotodocumentador.

2.10.4. Detección del péptido antiviral EB mediante ELISA

En una placa para ELISA se inmovilizaron 5 µg de proteína total soluble o insoluble de los extractos a analizar con 50 µL de buffer de carbonatos durante toda la noche a 4°C. En la placa también se incluyó una curva estándar de diluciones seriadas, extractos de la cepa no transformada, blancos con buffer de extracción y un blanco con agua. Al día siguiente se bloquearon los sitios libres de proteína utilizando una solución de leche descremada al 6% en PBS por 1 hora y después se le realizaron tres lavados con 250 µL de PBS-T (PBS+Tween20 0.05%). Después los pozos se incubaron a 37°C por dos horas con un anticuerpo anti-histidina (1:1000). Posteriormente fue removido el anticuerpo con 3 lavados de PBS-T y se adicionó el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina (1:10,000) durante 1 hora. Fue eliminado el segundo anticuerpo con lavados con PBS-T y se le agregó *p*-nitrofenilfosfato como sustrato disuelto en el buffer de fosfatasa alcalina (1mg/mL) y fue colocado en el lector de microplacas Bio-Rad modelo 550. La absorbancia se midió a 415 nm empleando el software Microplate Manager 5.1. A los resultados de la absorbancia se le restó los valores de sus respectivos blancos.

3. RESULTADOS

3.1. DISEÑO DE LOS GENES SINTÉTICOS

3.1.1. Diseño del péptido EB

El péptido EB contiene 20 aminoácidos derivados de la secuencia señal del factor 4 del crecimiento del fibroblasto y está optimizado para expresarlo en el núcleo y en el cloroplasto de *C. reinhardtii* (Fig. 2). La secuencia de aminoácidos del diseño está optimizada en el uso de codones de *C. reinhardtii*. La construcción contiene los elementos péptido señal, sitio de corte de proteasas, etiqueta de histidina y una secuencia KDEL, además la construcción para cloroplasto cuenta con dos sitio de unión a ribosoma (uno para el gen específico y el siguiente para el gen de resistencia)(Fig. 4).

a) Secuencia optimizada para el gen EB nuclear

```
GGTACCATGGGCTTCGTGCTGTTTCAGCCAGCTGCCAGCTTCCTGCTGGTCAGCACCCCTGCTGCTGTTTCCT
KpnI péptido señal
GGTGATCAGCCACAGCTGCCGCGCCCGCAAGAAGGCCGCGGTGGCCCTGCTGCCCGCGGTGCTGCTGGCCC
péptido EB
TGCTGGCGCCC GACGACGACGACAAGCACCACCACCACCACCACAAGGACGAGCTGTAATAATCTAGA
sitio de proteasa Hexahistidina KDEL Alto XbaI
```

b) Secuencia optimizada para el gen EB cloroplasto

```
CCATGGCACAGGAGGACCGAATGCGTAAAAAAGCTGCAGTTGCTTTATTACCAGCAGTATTATTAGCTTTA
NcoI RBS péptido EB
TTAGCACCTGATGATGATGATAAACATCACCATCACCATCAC TAATAAAGGAGGCCATGG
sitio de proteasa Hexahistidina Alto RBS NcoI
```

Figura 4. Construcción genética para la transformación nuclear del péptido EB.

a) Secuencia nucleotídica del gen EB optimizada para la expresión nuclear por la compañía GeneScript. b) Secuencia de nucleótidos correspondientes al gen EB para la expresión en el cloroplasto. Se muestran los sitios de restricción para las enzimas *KpnI*, *XbaI* y *NcoI*, sitio de unión a ribosoma (RBS), sitio de corte de proteasa, hexahistidina y el doble codón de paro (Alto).

3.1.2. *Diseño del péptido antigénico*

El diseño del péptido está constituido por 15 epítomos que corresponden a los siguientes aminoácidos: HA (25-44, 63-71, 345-375, 438-460, 497-505, HA 537-550); NA (18-26, 89-99, 323-330); NP (62-96, 134-157, 389-400); M1 (57-76, 117-132) y M2 (1-10). Estos epítomos son reconocidos por MHC I y II y basados en el software anteprot son probablemente antigénicos. Estos epítomos están unidos entre sí con linker de prolinas y glicinas. La construcción para cloroplasto contiene un sitio de unión a ribosoma. La secuencia optimizada del gen se muestra a continuación (Fig.5).

a) Secuencia optimizada para el péptido antigénico nuclear

GGTACCATGGGCTTCGTGCTGTTTCAGCCAGCTGCCAGCTTCCTGCTGGTCAGCACCTGCTGCTGTTCCCTGGTGATCAGCCACAG
KpnI Péptido señal
CTGCCGCGCGCACGCGAACAAACAGCACCCGACACCGTGGACACCGTGTGGAGAAGAAGCTGACCGTGACGGGCCCCGGCCGGGGC
CGGTGGCCCCCTGCACCTGGGCAAGGGCCCCGGCCCCGGCACCATCGAGCGCATGGTGTGAGCGCCTTCGACGAGCGCCGCAAC
AAGTACCTGGAGGAGACCCAGCGCGGCAAGGACCCCAAGAAGACCGGGGCCCCATCGGCCCGGGCCGGGCACCCACATCAT
GATCTGGCACAGCAACCTGAACGACGCCACCTACCAGCGCACCCGCGGCTGGTGGCACGGGCCCGGGCCCCGGCGCCTGTTCC
GCGCCATCGCGGGGAGGGCGGCTGGACCGGCATGGTGGACGGCTGGTACGGCTACCACCACAGAACGAGGGCCCCGGCCCCGGC
 Péptido Antigénico
TACAACGCGGAGCTGCTGGTGTGCTGGAGAACGAGCGCACCCCTGGACTACCAGCAGCAACCTGAAGGGCCCCGGCCCCGGCAT
GAGCCTGCTGACCGAGTGGAGACCCCCGGCCCCGGCCCCGGCCGACCCCGAGCGGGCGCAACCAACCAGCAGAAGGGCCCCG
GCCCCGCAAGAACGGCACCTACGACTACCCGAAAGGTCCGGGCCCCGGCGCCAGCAGCCTGGTGTGTTGCTGAGCCTGGGCGCG
ATCGGCCCCGGCCCCGGCAAGGGCATCCTGGGCTTCGTGTTACCCCTGACCGTGCCAGCAGCGCGGCTGCAGCGCGGCCCGG
CCCCGGCCTGAGCTACAGCACCGGCGCCCTGGCGAGCTGCATGGGCCTGATCTACGGCCCCGGGCCCGGGCATGGCCAACCTGA
TCCTGCAGATTGGTCCGGGCCCCGGCAGCAGCCTGTGCCCGTGGAGCGGCTGGGCCATCGGTCCGGGTCCCGGGCGGACAACCC
CGCCCCAACGACGACGACGACAAGCACCACCACCACCACCAAGGACGAGCTGTAATAATCTAGA
 sitio de proteasa Hexahistidina KDEL Alto *XbaI*

b) Secuencia optimizada para el péptido antigénico para cloroplasto

CCATGGCACAGGAGGACCGAATGCACGCTAATAATAGTACAGATACAGTTTTAGAAAAGAAATGTTACAGTTACAGGT
NcoI RBS
CCAGGTCCAGGTGGTGTGCTCCATTACATTTAGGTAAAGGTCCAGGTCCTGGTACAATTGAACGTATGGTATTAAGTCTTTCCGA
TGAACGTCGTAATAAATATTTAGAAGAACACCCCTTCAGCTGGTAAAGATCCAAGAAAACAGGTGGTCCATTTGGTCCAGGTCCCTG
GTACTCATATTATGATTTGGCACTCAAATTTAAATGATGCTACATATCAACGTACTCGTGCATTAGTTTCGTACAGGTCCAGGTCCT
 Péptido antigénico
GGTGGTTTATTCGGTGTATTGCAGGTGAAGGTGGTGGACTGGTATGGTAGATGGTGGTATGGTTATCATCACCAAATGAAGG
TCCAGGTCCTGGTTATAATGCTGAATTATTAGTTTTATTAGAAAATGAACGTACATTAGATTATCATGATTCAAATGTTAAAGTCC
CAGGTCCAGGTATGCTTTTATTAACAGAAGTAGAAACTCCAGGTCCTGGTCCAGGTGCTACAGTTTCAGGTGGTAATACTAATCAA
CAAAAAGGTCTGGTCCAGGTAAAAATGGTACTTATGATTATCTAAAGGTCCTGGTCCAGGTGCTTCATCTTTAGTATTAGTTGT
ATCTTTAGGTGCAATTTGGTCCCTGGTAAAGGTATTTAGGTTTCGTTTTACATTAACTGTACCATCTGAACGTGGTTTAC
AACGTGGTCCAGGTTTATCTTATAGTACAGGTGCTTTAGCAAGTTGTATGGGTTAATTTATGGTCCAGGTCCAGGTGGT
ATGGCTAATTTAATTTTACAAATTTGGTCCAGGTAGTTCATTATGTCAGTTTCAGGTGGGCTATTGGTCCAGGTCCAGG
TGGTGATAATCCTCGTCCAAATGATGATGATGATAAACACCACCACCACCATTTAATAAAGGAGGCCATGG
 sitio de proteasa Hexahistidina Alto RBS *NcoI*

Figura 5. Construcción genética para la transformación nuclear y de cloroplasto del péptido antigénico

a) Secuencia nucleotídica del gen del péptido antigénico optimizado para la expresión nuclear por la compañía GeneScript. b) Secuencia de nucleótidos correspondientes al gen del péptido antigénico para la expresión en el cloroplasto. Se muestran los sitios de restricción para las enzimas *KpnI*, *XbaI* y *NcoI*, sitio de unión a ribosoma (RBS), sitio de corte de proteasa, hexahistidina y el doble codón de paro (Alto).

3.2. MODELOS 3D DE LOS GENES SINTÉTICOS

3.2.1. Estructura terciaria del péptido antiviral EB

El modelo de la estructura terciaria del péptido EB para la expresión nuclear muestra una conformación de dos alfas hélices unidas por un giro beta. Además muestra que la exposición de la etiqueta de histidinas y el péptido señal están expuestos hacia la parte hidrofílica (Fig. 6c). El modelo del péptido EB para la expresión en cloroplasto muestra una conformación de una sola alfa hélice y la etiqueta de histidina también se localiza expuesta a la parte hidrofílica (Fig. 6d).

3.2.2. Estructura terciaria del péptido antigénico

El modelado por threading del péptido antigénico para la expresión nuclear y de cloroplasto muestra que la mayor parte de los aminoácidos se encuentra en una estructura lineal, concordando con diseño empleado. En los modelos también destaca que la etiqueta de histidina se encuentra expuesta hacia la parte hidrofílica (Fig. 6a y b), lo cual es requerido para la detección de la proteína recombinante.

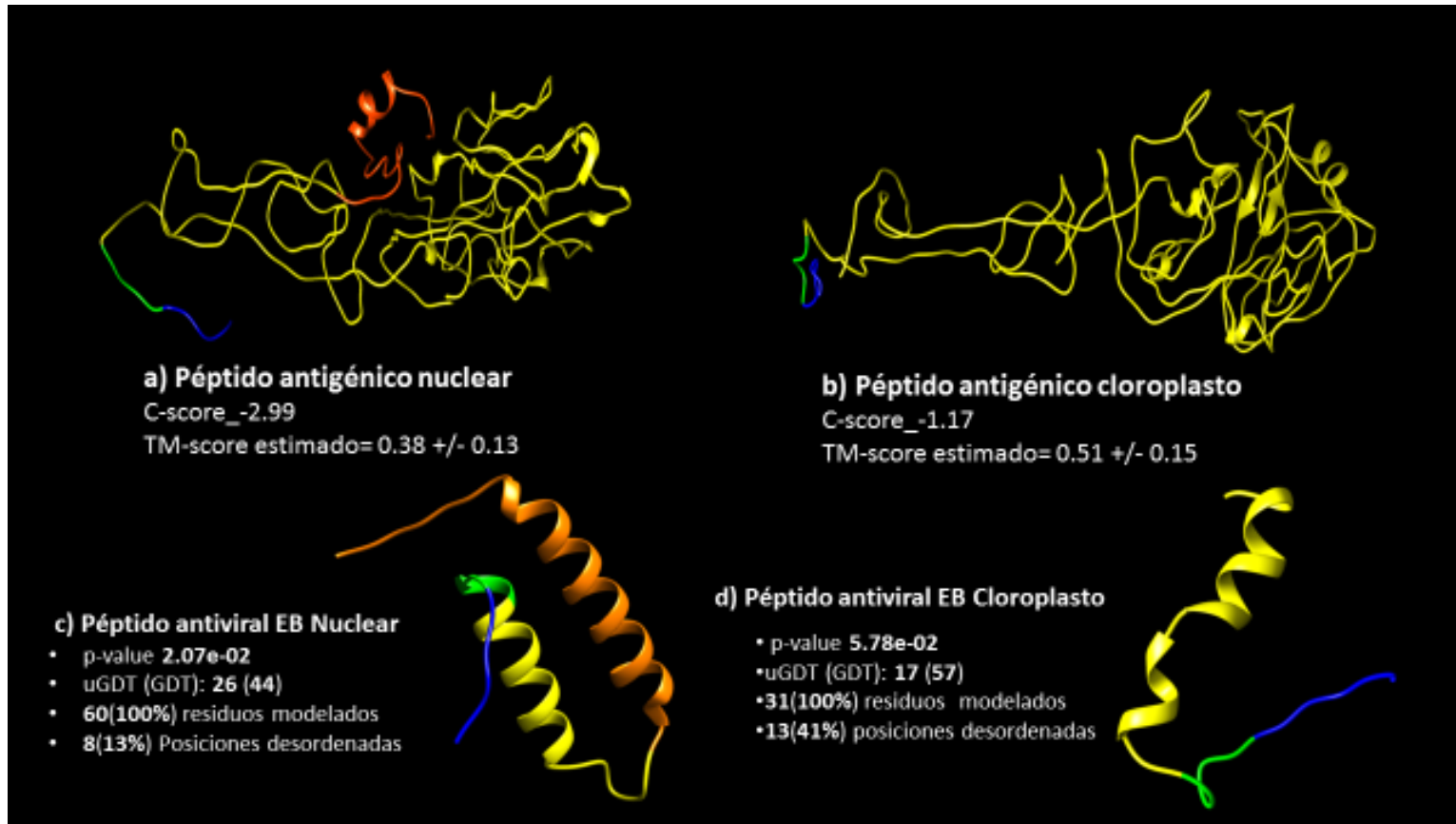


Figura 6. Modelado de la estructura terciaria de los péptidos contra influenza.

a) Modelo del péptido antigénico para la expresión Nuclear; b) Modelo del péptido antigénico para la expresión en cloroplasto; c) Modelo del péptido antiviral para la expresión nuclear; d) Modelo del péptido antiviral para la expresión en cloroplasto. El color naranja indica el péptido señal, el amarillo el péptido antigénico o antiviral, el verde el sitio de corte de proteasa y el color azul la cola de histidina.

3.3. TRANSFORMACIÓN VÍA NUCLEAR DE *C. reinhardtii* POR *A. tumefaciens*

3.3.1. Construcción EB-pChlamy_1

El gen sintético del péptido EB con codones optimizados para *C. reinhardtii* se clonó en vector pChlamy_1. La construcción que se esquematiza en la Fig. 7a fue confirmada por PCR (Fig. 7b) y secuenciación. Posteriormente la construcción con la que se transformó *A. tumefaciens* GV3101 se confirmó por PCR (Fig. 7b). Después del evento de transformación se aislaron diez colonias transgénicas capaces de crecer en el medio de selección (Fig. 8), solo tres amplifican el gen EB (Fig. 7c) y cuatro amplifican un fragmento del gen de aminoglucósido fosfotransferasa de *Streptomyces hygrosopicus* (*APH7*) (Fig. 7d).

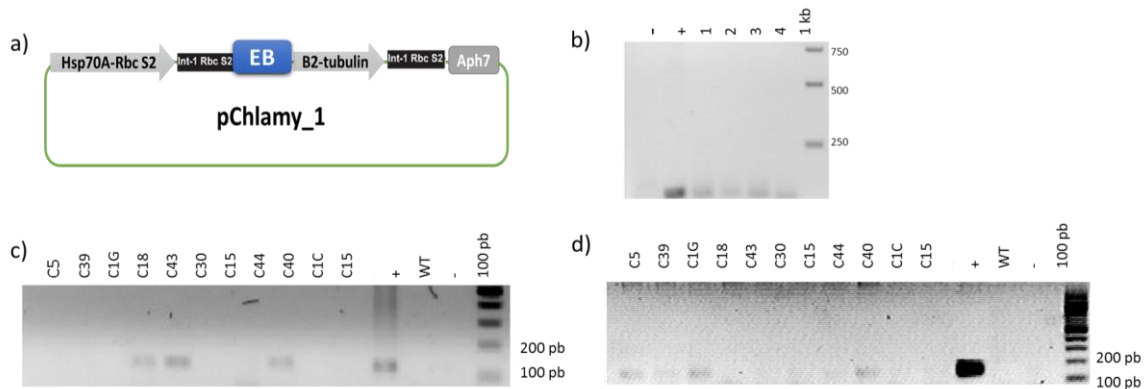


Figura 7. Análisis de las líneas transgénicas nucleares con el péptido EB en *C. reinhardtii*.

a) Esquema de la construcción del péptido EB en el vector pChlamy_1; b) PCR del gen EB del plásmido purificado de *E. coli* y *A. tumefaciens*. El fragmento amplificado es de 116 pb; (+)-EB-pChlamy_1 purificado de *E. coli*; 1-4 clonas de *A. tumefaciens*; c) Amplificación de un producto de 116 pb del gen EB de las líneas transgénicas nucleares (C5-C44), (+)-EB-pChlamy_1 purificado de *E. coli*, (-) control negativo y (WT) cepa sin transformar; d) Amplificación de un producto de 141 pb del gen de resistencia a higromicina (*APH7*) en las diferentes clonas transgénicas nucleares (C5-C44), (+)-EB-pChlamy_1 purificado de *E. coli*, (-) control negativo y (WT) cepa sin transformar.

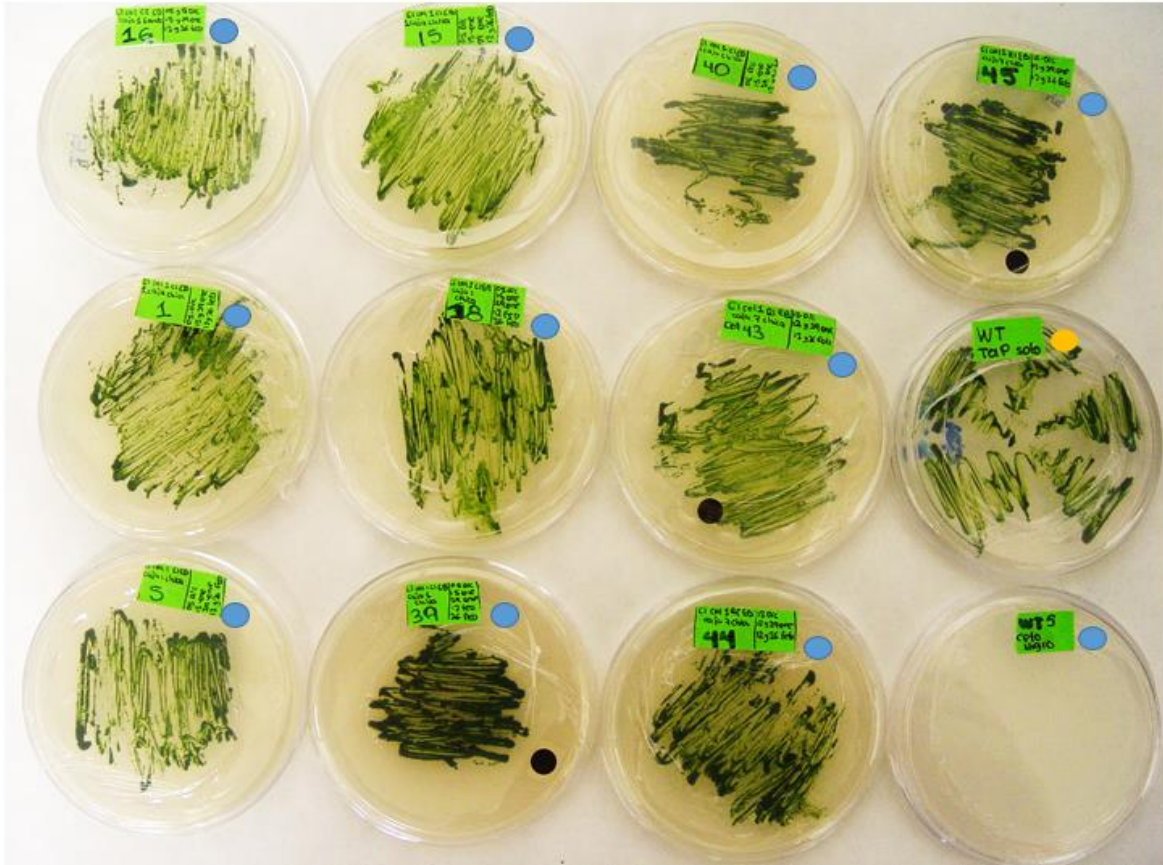


Figura 8. Líneas transformadas con el péptido EB vía nuclear.

Microalgas transgénicas sembradas en medio TAP de selección con higromicina 10 mg/L y cefotaxima 500 mg/L (círculo azul). La cepa no transformada no creció en medio de selección (higromicina 10 mg/L y cefotaxima 500 mg/L) en comparación con su crecimiento en medio TAP (círculo amarillo).

3.3.2. Construcción PA-pChlamy_1

El gen del péptido antigénico para la expresión nuclear está clonado dentro del vector pChlamy_1 (Fig. 9a), esta construcción se confirmó por secuenciación. Con esta construcción se logró transformar *A. tumefaciens* y la correcta transformación se confirmó por PCR (Fig. 9b). Una vez que aparecieron colonias aisladas de microalgas se resembraron en medio sólido Tris-Acetato-Fosfato (TAP) con higromicina 15 mg/L y cefotaxima 500 mg/L.

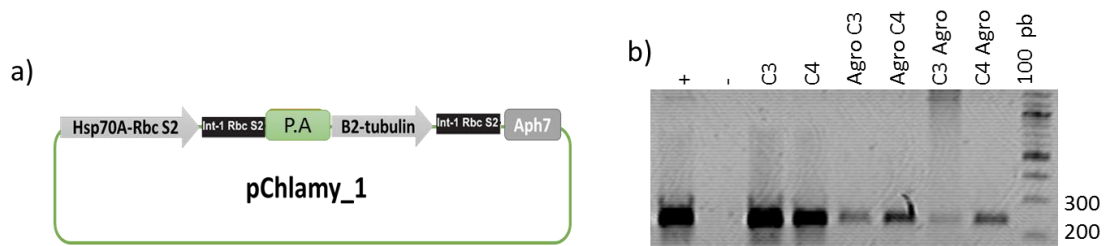


Figura 9. Análisis de las líneas transgénicas nucleares con el péptido EB en *C. reinhardtii*.

a) Esquema de la construcción del péptido antigénico (P.A) en el vector pChlamy_1; b) PCR del gen P.A del plásmido purificado de *E. coli* y *A. tumefaciens*. El fragmento amplificado es de 238 pb; (+)-P. A-pChlamy_1 purificado de *E. coli*; (-) Negativo, (C3 y C4) clonas P. A-pChlamy_1. (Agro C3 y C4) extracto de ADN de plásmido de *A. tumefaciens* por kit; (C3 y C4) extracto de ADN del plásmido de *A. tumefaciens* (lisis alcalina).

Se cuenta con aproximadamente 170 líneas transgénicas putativas creciendo en medio TAP con higromicina 15 mg/L y cefotaxima 500 mg/L (Fig. 10) y aproximadamente 250 colonias creciendo en TAP con higromicina 10 mg/L y cefotaxima 500 mg/L. De las líneas transgénicas con mejor crecimiento se tomarán 10 y serán analizadas por PCR para el gen del péptido antigénico y para el gen de resistencia *APH7*.

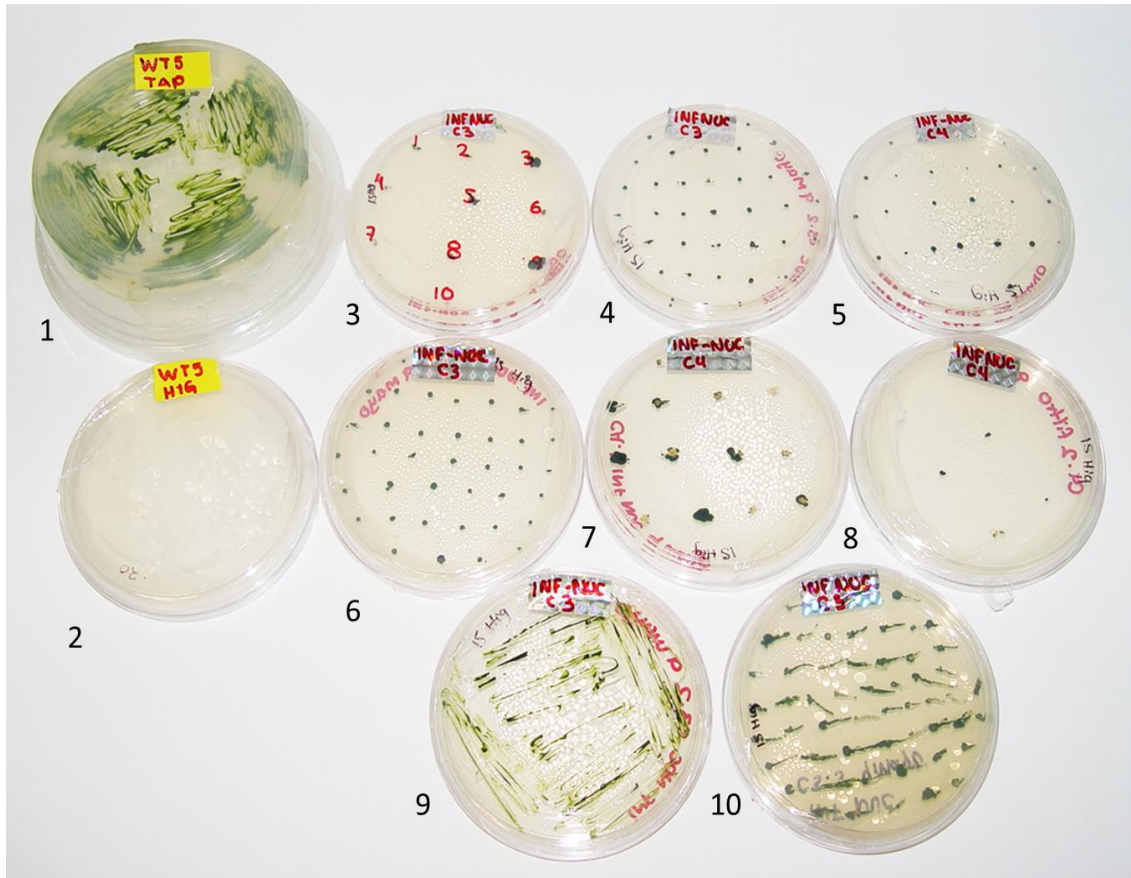


Figura 10. Líneas transformadas con el péptido antigénico vía nuclear.

1.-Microalgas sin transformar sembradas en medio TAP; 2.-Microalgas sin transformar sembradas en medio TAP higromicina 15 mg/L y cefotaxima 500 mg/L; 3-10.Microalgas transgénicas sembradas en medio TAP de selección con higromicina 15 mg/L y cefotaxima 500 mg/L (3-10).

3.4. TRANSFORMACIÓN DEL CLOROPLASTO DE *C. reinhardtii* POR BIOBALÍSTICA

3.4.1. Construcción EB-p463

El gen sintético del péptido EB con codones optimizados para el cloroplasto de *C. reinhardtii* se clonó en vector p463 (Fig. 11a) para poder transformar el cloroplasto. La integración se analizó por digestión (Fig. 11b) mientras que la orientación se

hizo por secuenciación. Las células de *Chlamydomonas* fueron transformadas por biobalística con la construcción que se muestra en la Fig. 5a.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las microalgas resistentes a espectinomicina son homoplásticas (Fig.11d), además el gen de la proteína antigénica se detectó con una PCR de usando los oligonucleótidos específicos EB-*aadA* (Fig. 11c). Con base a lo anterior, a la fecha se cuenta con 7 líneas transplastómicas y homoplásticas para la construcción EB-p463.

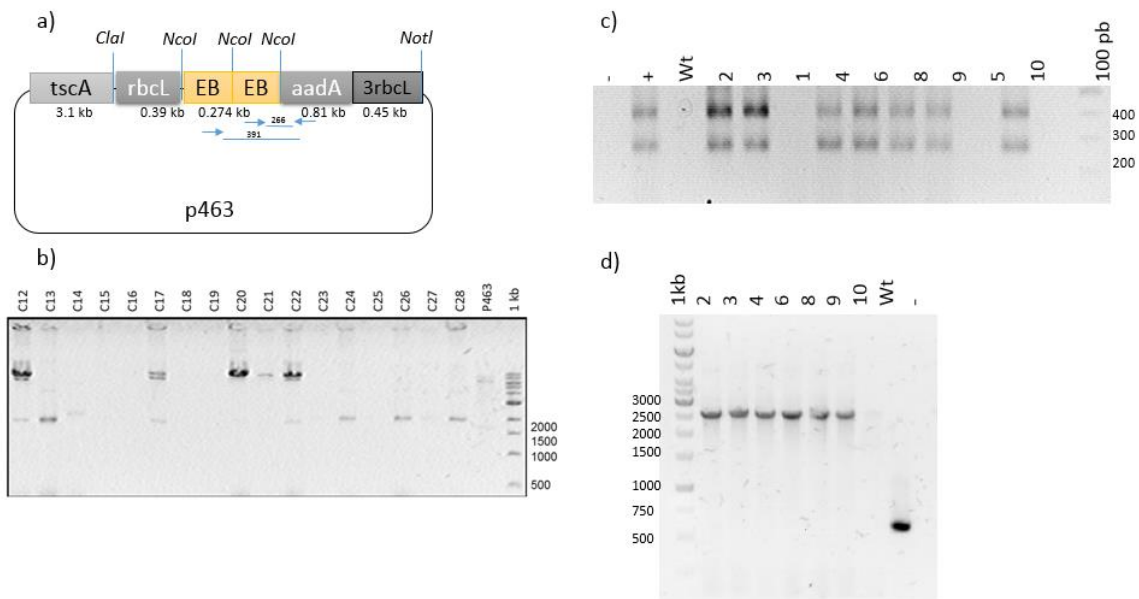


Figura 11. Transformación de cloroplasto con el péptido EB.

a) Esquema de la construcción EB-p463; b) Digestión de las construcciones con las enzimas *NotI* y *Clal* para analizar el número de insertos clonados dentro del vector, el vector vacío libera un fragmento de 9 kb y otro de 1,650 pb; cuando el vector que cuenta con una copia el fragmento pequeño mide 1,787 pb, mientras cuando tiene dos fragmentos de EB mide 1,924 pb. c) PCR para el gen EB-*aadA*, los productos de amplificación miden 266 pb y 391 pb. (+) Construcción EB-p463, (-) control negativo, (Wt) cepa sin transformar, (1-10) Líneas transplastómicas de *C. reinhardtii*. d) PCR para verificar la homoplasía, en una cepa sin transformar (Wt) se amplifica un fragmento 851 pb, mientras que las líneas transplastómicas (2-10) amplifican un fragmento de 2.7 kb, (-) control negativo.



Figura 12. Líneas transformadas con el péptido EB vía cloroplasto.

1.-Microalgas sin transformar sembradas en medio TAP; 2.-Microalga sin transformar sembrada en medio TAP con 100 mg/L de espectinomicina; 3-9. Microalgas transplastómicas sembradas en medio TAP con 100 mg/L de espectinomicina.

3.4.2. Construcción PA-p463

El gen sintético del péptido antigénico se clonó en el vector p463 (Fig. 13a). La construcción se confirmó por digestión (Fig. 13b) y la orientación se verificó por secuenciación.

Las microalgas lograron transformarse con la construcción PA-p463. Actualmente hay 500 colonias aisladas que están creciendo en medio de selección.

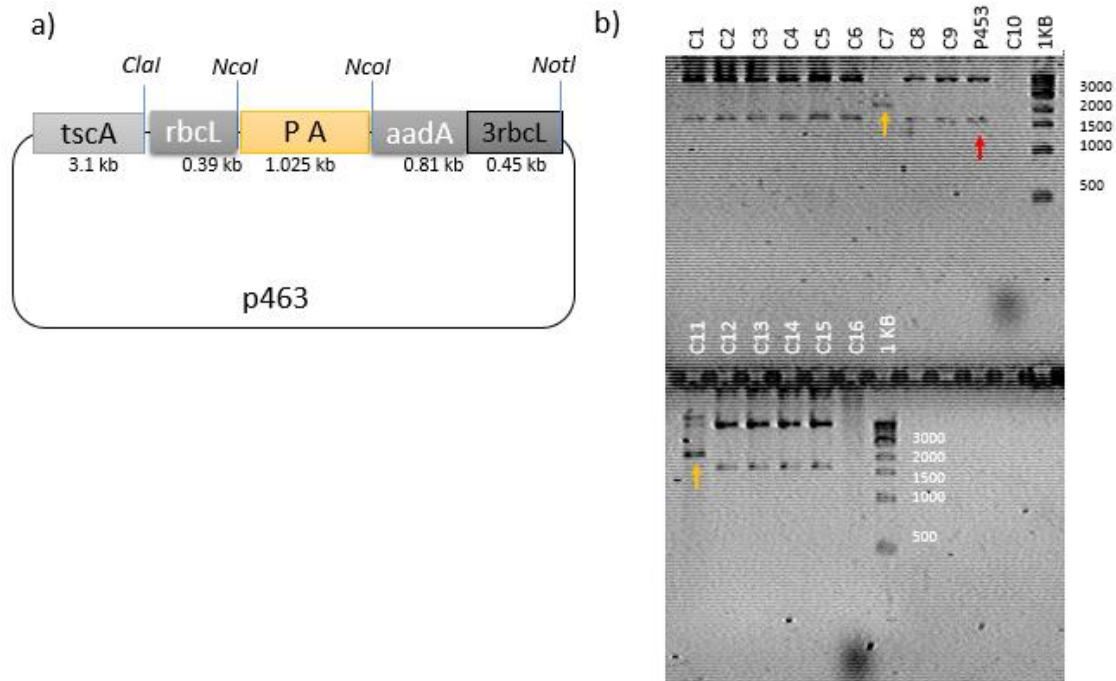


Figura 13. Construcciones con el péptido antigénico para la expresión en el cloroplasto.

a) Esquema de la construcción PA-p463 para la transformación de cloroplasto; b) Comprobación de la construcción PA-p463. Doble digestión con las enzimas *NotI* y *Clal* de las construcciones. El fragmento liberado de vector vacío es de 1,650 pb (flecha roja), mientras que el fragmento liberado que tiene incluido el gen sintético mide 2,675 pb (flecha amarilla).

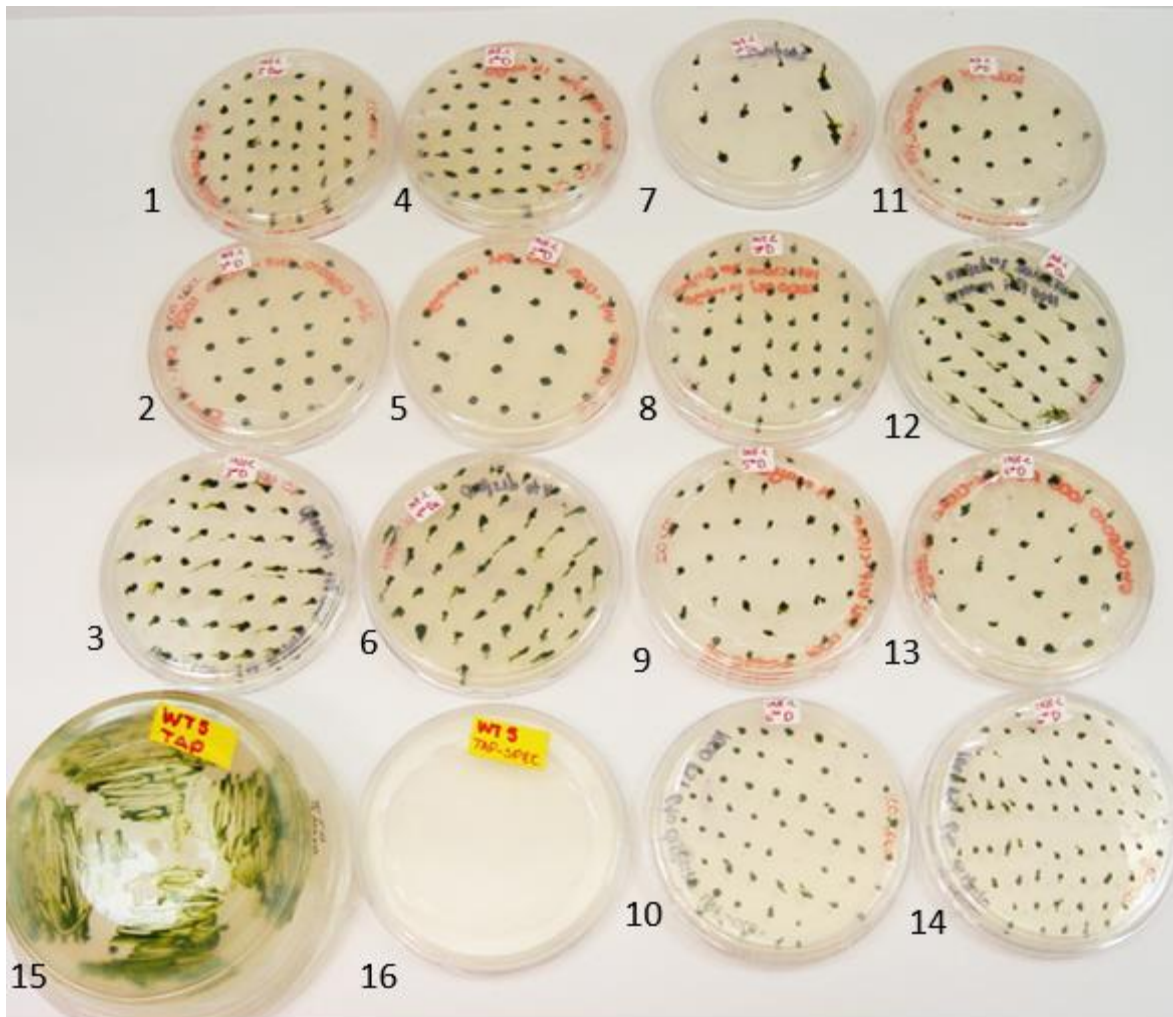


Figura 14. Líneas transformadas con el péptido antigénico vía cloroplasto.

Líneas putativamente transplastómicas de *C. reinhardtii* en medio TAP sólido con 100 mg/L de espectinomicina (1-14); cepa sin transformar sembrada en medio TAP (15); cepa sin transformar sembrada en medio TAP con 100 mg/L de espectinomicina (16).

3.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEINAS

3.5.1. Detección la proteína recombinante por Dot Blot.

El péptido antiviral EB tiene unida una etiqueta de histidina, lo que le permite ser reconocida con un anticuerpo anti-histidina. Basándonos en este principio los extractos totales solubles e insolubles de las líneas transgénicas y

transplastómicas del péptido EB fueron analizadas. La proteína PTPFHA se usó como control positivo debido a que tiene una etiqueta de histidinas. Usando esta técnica se observó señal en algunos extractos de proteína total insoluble (PTI) de cloroplasto (Fig.15a). Esta señal solo emite en las orillas, ya que la mayor parte de la señal tiene interferencia con la clorofila de los extractos, al eliminar la clorofila de los extractos, la señal se observó más intensa en todas las fracciones de PTI de las microalgas transplastómicas con el péptido EB (Fig.15b).

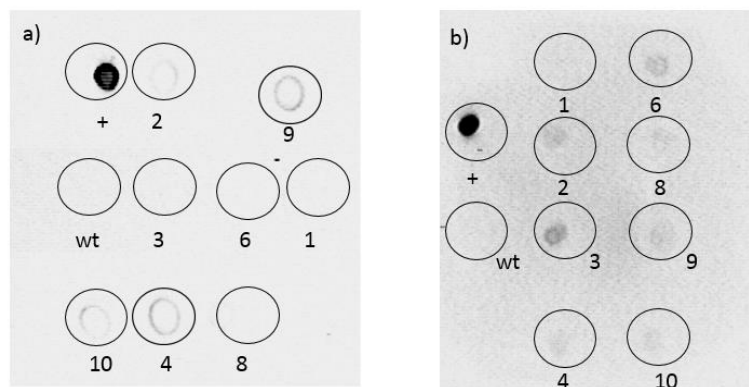


Figura 15. Dot blot del extracto insoluble del péptido EB producido en cloroplasto.

a) Dot blot de los extractos de proteína total insoluble (PTI). b) Dot blot de los extractos de (PTI) sin clorofila. (+) Control positivo; (wt) control negativo; (1-10) extractos de PTI de las líneas transplastómicas del péptido EB.

3.5.2. Detección la proteína recombinante por ELISA

A través del método de ELISA se detectó al péptido antiviral EB en los extractos insolubles de las microalgas transformadas (tanto vía nuclear como cloroplasto). Este ensayo incluyó una curva estándar (Fig. 16) en la que se interpolan las lecturas de absorbancias obtenidas para las fracciones de las microalgas.

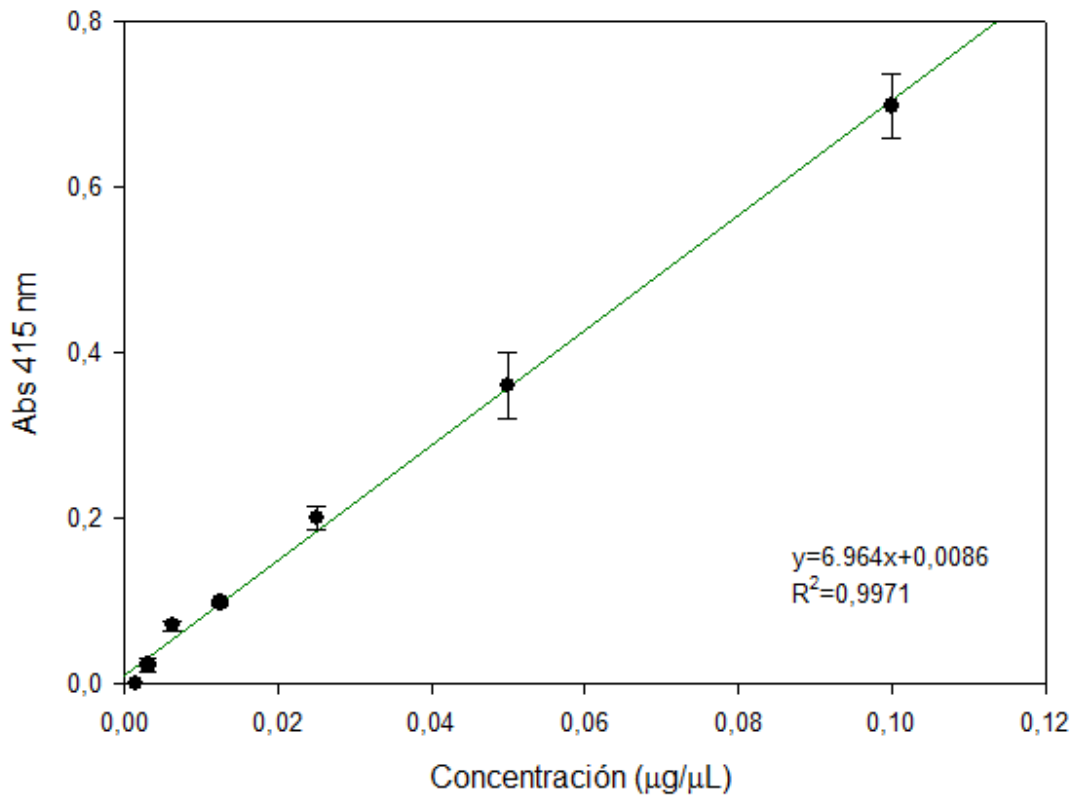


Figura 16. Curva estándar de PTPFHA para la cuantificación del péptido EB.

El análisis por ELISA nos permitió cuantificar la producción del péptido EB. La Figura 17a muestra los resultados de la producción del péptido EB de tres líneas transgénicas nucleares. La acumulación de la proteína se da en un rango de 0.2 a 0.89% de proteína total insoluble (PTI) y el rendimiento de producción está un rango de 0.3 a 1.8 µg de proteína recombinante por gramo de biomasa húmeda. Por otro lado, la línea transplastómica 10 del péptido EB, que muestra la mayor acumulación de proteína recombinante, que fue de 1.5% de PTI lo cual equivale a 18 µg de proteína recombinante por gramo de biomasa húmeda. El rendimiento de las líneas transplastómica va de 0.09 a 18 µg de proteína recombinante por gramo de biomasa húmeda (Fig.17b).

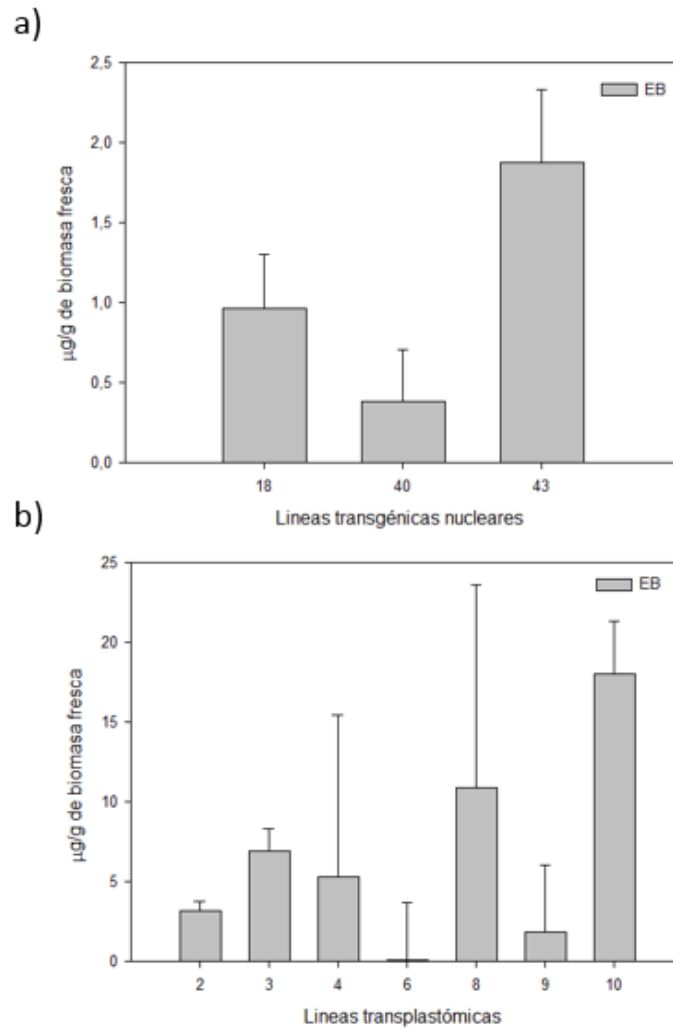


Figura 17. Análisis ELISA de para la detección del péptido EB.

a) Producción del péptido EB por gramos de biomasa fresca de las líneas transgénicas nucleares (18, 40 y 43). b) Producción del péptido EB por gramos de biomasa fresca de las líneas transplasmáticas (2, 3, 4, 6, 8, 9 y 10).

4. DISCUSIÓN

El virus de la influenza es uno de los patógenos que ha mantenido a la humanidad en constante riesgo, pues ha sido el causal de diversas pandemias. Los mecanismos de evasión al sistema inmune y la facilidad de generar cepas resistentes a medicamentos antivirales hace que constantemente se esté en búsqueda del desarrollo de nuevos y mejores tratamientos o plataformas eficientes, rápidas y escalables para la producción de vacunas eficientes. En nuestro grupo de investigación hemos implementado la transformación tanto nuclear como de cloroplasto del *C. reinhardtii* para la producción de un péptido antiviral (péptido EB) y una proteína antigénica (vacuna multiepítopo).

A pesar de los constantes cambios en la secuencia de los aminoácidos de proteínas del virus de la influenza, existen regiones conservadas entre diferentes subtipos del virus A, las cuales están principalmente formando partes estructurales esenciales del virus, por ejemplo el ectodominio de la proteína M2 (Ebrahimi y Tebianian, 2011).

Los programas bioinformáticos nos permitieron hacer un análisis de varios aspectos importantes para la elección de epítomos conservados, antigénicos y reconocidos por el MHC de clase I y II. Con esta información se eligieron 15 epítomos de las proteínas HA, NA, NP, M1 y M2. Algunas regiones de aminoácidos elegidos coinciden con epítomos del virus de la influenza A capaces de inducir memoria en los linfocitos T citotóxicos (CTL) detectados en individuos que han tenido una infección natural, estos epítomos son M58 (GILGFVFTL) y M59 (ILGFVFTLTV) y fueron identificados como generados durante la infección por

virus de la influenza. Además tienen reacción cruzada con diferentes moléculas de HLA de tipo A2.1 en humanos (Gianfrani et al., 2000). Este último dato coincide con el encontrado por (Alexander et al., 2010) quienes estudiaron la asociación de epítomos conservados entre subtipos de virus de la influenza A con el HLA de tipo A. Por otro lado Los epítomos elegidos para HA tienen concordancia con el epítomo HA 63, que ha demostrado inducir la memoria de CTL en modelos transgénicos HLA-A11/Kb (Gianfrani et al., 2000) y el epítomo 5 de la vacuna multimeric-001 (Atsmon et al., 2012). Nuestro diseño también contiene los primeros aminoácidos del ectodominio de M2, el cual ha mostrado una protección completa contra el virus de la influenza H2N2, pues se ha demostrado que se conserva entre los influenza virus del tipo A (Park et al., 2011).

Por otro lado, la predicción de la estructura terciaria de la proteína antigénica evidenció que los espaciadores de prolina y glicinas permiten una exposición lineal de los epítomos lo cual es deseable para el correcto reconocimiento por el MHC de clase I y II. Esto se puede confirmar a través del modelado de la estructura terciaria del péptido antigénico (PA).

Tanto para el péptido antigénico como el péptido antiviral EB que se expresan nuclearmente, se requiere de la adición del péptido señal Pr1a para dirigirlo al retículo endoplasmático (Sharma et al., 2000), así como una etiqueta de histidina y una secuencia de retención a retículo de endoplasmático. La secuencia de retención a retículo es importante para evitar la degradación por proteasas, la cual es alta en las microalgas (Surzycki et al., 2009).

La transformación nuclear vía *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 de la construcción EB-pChlamy_1 y PA-pChlamy_1 tuvo una alta eficiencia de

transformación ya que se obtuvieron un gran número de colonias resistentes a higromicina. Esta metodología es eficiente y económica y tiene la particularidad de que se pueden obtener una gran cantidad de líneas transgénicas en un solo evento de transformación cuando se utiliza acetosiringona como inductor (Kumar et al., 2004).

Al analizar las colonias transformadas con la construcción EB-pChlamy_1 por PCR específico para el gen EB, solo tres muestras dieron positivo, mientras que para el gen de resistencia *APH7* amplifican la mayoría. Esto nos indica que posiblemente que estén ocurriendo eventos de integración incompleta del plásmido. Las colonias transformadas con la construcción PA-pChlamy_1 no se han analizado por PCR hasta el momento.

El método de transformación por biobalística es un método efectivo, rápido y con una alta tasa de transformación, de tal modo que en poco tiempo se pueden obtener líneas transplastómicas (Mayfield y Kindle 1990; Mayfield et al., 2007). Este método fue utilizado para la transformación de cloroplastos con las construcciones EB-p463 y PA-p463. La obtención de más de 500 líneas resistentes a espectinomicina, nos indica que se alcanzó una alta eficiencia de transformación. La transformación con la construcción EB-p463 fue confirmada por PCR. El PCR de homoplastía nos indicó que la transformación fue sitio dirigida hacia la región TSA del cloroplasto. Las transformantes para la construcción PA-p463 todavía no se han analizado por PCR.

El péptido EB en las líneas transgénicas nucleares y de cloroplasto se logró detectar en la fracción insoluble del extracto. La acumulación del péptido antiviral en la fracción insoluble puede estar asociada a su alto contenido de aminoácidos

hidrofóbicos. Además, se ha demostrado la generación de cuerpos de inclusión en el estroma del cloroplasto, esto fue observado en la sobreexpresión de las mutantes de subunidades a y b de la ATP sintasa, las cuales al no ser capaces de incorporarse a la membrana tilacoidal, se agregaron como cuerpos de inclusión (Ketchnr, 1995). La alta expresión de una proteína también puede causar que se agregue en cuerpos de inclusión, como ocurrió al expresar la Albúmina de Suero Humana en cloroplastos de tabaco. Además las altas concentraciones de una proteína recombinante suelen provocar que se exceda el límite de solubilidad de la proteína y que ésta se agregue (Fernandez-San Millan et al., 2003). Otro ejemplo puede ser la Rubisco la cual es producida en *Chlamydomonas* en altas cantidades por lo que se empaqueta dentro del pireniode y esta acumulación hace que la proteína pueda cristalizarse (Engel et al., 2015).

En cuanto a la producción de proteína recombinante, en las líneas transplastómicas se presentó una mayor acumulación de proteína (0.09 a 18 μg de proteína recombinante por gramo de biomasa) en comparación con las transgénicas nucleares (0.3 a 1.8 μg de proteína recombinante por gramo de biomasa húmeda), este resultado está asociado a que el cloroplasto tiene una tasa metabólica alta pues cuenta con ochenta copias del genoma, a que la inserción del transgén es sitio dirigida y a que no se presenta silenciamiento génico (Wannathong et al., 2016).

La producción obtenida para el péptido EB va de 0.2 a 0.89% de la de proteína total insoluble, este valor es mayor al reportado para la expresión de angiotensina II (con el promotor *HSP70/RBCS2*), donde se obtuvo una expresión del 0.05% de

la proteína total soluble (Soria-Guerra et al., 2014) y una expresión equiparable con la expresión de un antígeno de VIH con el promotor *HSP70/RBCS2*, donde se alcanzó un 0.25% de la proteína total de la microalga (Barahimipour et al., 2016) *HSP70/RBCS2*. Estos niveles de expresión pueden estar asociados al promotor fusionado. *HSP70/RBCS2*, el cual es considerado un promotor constitutivo. En general la expresión vía nuclear es baja y esto suele estar relacionado con el sitio de inserción del transgén, a la inducción de la heterocromatización y la alta cantidad de proteasas presentes en la *Chlamydomonas*.

La expresión del péptido EB en las líneas transplastómicas es de 1.57% de PTI. Estos valores son bajos con respecto al trabajo de Campos-Quevedo et al. (2012), en donde se utiliza el mismo vector de transformación (p463) y se reporta que la expresión de péptidos bioactivos derivados de leche es de 2.5% de la proteína total soluble. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que nuestra proteína se puede encontrar agregada y posiblemente el método de extracción que empleamos en este trabajo no sea el mejor. También es posible que estemos subestimando la cantidad de péptido EB que se está produciendo, pues se ha llegado a obtener hasta un 11.1% de la proteína total que se encuentra en los cuerpos de inclusión del cloroplasto (Fernandez-San Millan et al., 2003).

El presente trabajo nos muestra que *Chlamydomonas reinhardtii* puede ser utilizada como una plataforma para expresar proteínas heterólogas que pudieran permitirnos combatir al virus de la influenza A H1N1 una vez que hallamos demostrado su eficiencia biológica.

5. CONCLUSIONES

- Las estructuras tridimensionales obtenidas por Threading del péptido antigénico para la expresión nuclear y de cloroplasto muestran que éste se encuentra mayormente no estructurado, exponiendo así los epítomos de manera lineal.
- La transformación nuclear de *C. reinhardtii* mediante el co-cultivo con *A. tumefaciens* utilizando la construcción EB-pChlamy_1 permite la obtención de tres líneas transgénicas que tienen integrado en su genoma el gen del péptido antiviral EB y el gen de resistencia *APH7*.
- Las líneas transgénicas nucleares obtenidas con la construcción EB-pChlamy_1 son capaces de producir 0.3 a 1.8 µg del péptido EB por cada gramo de biomasa fresca colectada.
- La transformación por biobalística con la construcción EB-p463 en *C. reinhardtii* permite la obtención de 7 líneas transplastómicas y homoplásticas portadoras del gen EB, las cuales son capaces de producir de 0.09 a 18 µg del péptido EB por gramo de biomasa fresca, lo cual es 10 veces mayor a lo obtenido en nuestro grupo en las líneas transgénicas.
- La transformación nuclear de *C. reinhardtii* mediante co-cultivo con *A. tumefaciens* utilizando la construcción PA-pChlamy_1 permitió la obtención de 170 clonas capaces de crecer en medio TAP sólido con higromicina (15 mg/L).
- La transformación por biobalística con la construcción PA-p463 en *C. reinhardtii* permitió la obtención 500 clonas capaces de crecer en medio TAP sólido con espectinomicina (100 mg/L).

6. PERSPECTIVAS

- Analizar las propiedades antivirales del péptido EB mediante retos en líneas celulares MCDK y el virus de la influenza.
- Confirmar por PCR que las líneas resistentes a higromicina contengan integrado en su genoma el transgén del péptido antigénico, así como detectar y cuantificar la producción de dicho péptido.
- Confirmar por PCR que las líneas putativas transplastómicas resistentes a espectinomicina, contengan integrado en su genoma el transgén del péptido antigénico y sean homoplásticas, además de detectar y cuantificar la producción de dicho péptido.
- Probar la inmunogenicidad del péptido antigénico a través de ensayos de inmunización oral en ratones BALB/c.

7. REFERENCIAS

- Akkarawongsa R, Cullinan AE, Zinkel A, Clarin J, Brandt CR (2006) Corneal toxicity of cell-penetrating peptides that inhibit Herpes simplex virus entry. *J Ocul Pharmacol Ther* 22:279-289
- Alexander J, Bilsel P, del Guercio MF, Marinkovic-Petrovic A, Southwood S, Stewart S, Ishioka G, Kotturi MF, Botten J, Sidney J, Newman M, Sette A (2010) Identification of broad binding class I HLA supertype epitopes to provide universal coverage of influenza A virus. *Hum Immunol* 71:468-474
- Altmann SE, Brandt CR, Jahrling PB, Blaney JE (2012) Antiviral activity of the EB peptide against zoonotic poxviruses. *Virology* 449:6
- Atsmon J, Kate-Ilovitz E, Shaikevich D, Singer Y, Volokhov I, Haim KY, Ben-Yedidia T (2012) Safety and immunogenicity of multimeric-001--a novel universal influenza vaccine. *J Clin Immunol* 32:595-603
- Barahimipour R, Neupert J, Bock R (2016) Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga *Chlamydomonas*: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker. *Plant Mol Biol* 90:403-418
- Bernstein HH, Bocchini JA (2010) Afluria should not be used routinely in children younger than 9 years. *AAP News* 31:1
- Campos-Quevedo N, Rosales-Mendoza S, Paz-Maldonado LMT, Martínez-Salgado L, Guevara-Arauza JC, Soria-Guerra RE (2012) Production of milk-derived bioactive peptides as precursor chimeric proteins in chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *PCTOC* 113:217-225
- Cangelosi GA, Best EA, Martinetti G, Nester EW (1991) Genetic analysis of *Agrobacterium*. *Methods Enzymol* 204:384-397
- Compans RW, Orenstein WA (2009) Vaccines for pandemic influenza. Preface. *Curr Top Microbiol Immunol* 333: v-viii
- Dimitrov I, Flower DR, Doytchinova I (2013) AllerTOP--a server for *in silico* prediction of allergens. *BMC Bioinformatics* 14 Suppl 6:S4
- Ebrahimi SM, Tebianian M (2011) Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. *Virus Genes* 42:1-8

- Edgar RC. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792-1797.
- Ehrt S, Schnappinger D (2003) Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis. *Methods Mol Biol* 235:75-78
- Engel BD, Schaffer M, Kuhn Cuellar L, Villa E, Plitzko JM, Baumeister W (2015) Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography. *Elife* 4
- FDA, 2016. Influenza Virus Vaccine Safety & Availability. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/VaccineSafety/ucm110288.htm>
- Fernandez-San Millan A, Mingo-Castel A, Miller M, Daniell H (2003) A chloroplast transgenic approach to hyper-express and purify Human Serum Albumin, a protein highly susceptible to proteolytic degradation. *Plant Biotechnol J* 1:71-79
- Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, Sessions WM, et al. (2009) Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Sci* 325:197-201
- Gianfrani C, Oseroff C, Sidney J, Chesnut RW, Sette A (2000) Human memory CTL response specific for influenza A virus is broad and multispecific. *Hum Immunol* 61:438-452
- Jones JC, Turpin EA, Bultmann H, Brandt CR, Schultz-Cherry S (2006) Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells. *J Virol* 80:11960-11967
- Ketchnr S, Drapier D, Olive J, Gaudriault S, Girard-Bascou J, Wollman FA. (1995) Chloroplasts can accommodate inclusion bodies. Evidence from a mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in the assembly of the chloroplast ATP synthase. *J Biol Chem* 270:15299-15306
- Koel BF, Mogling R, Chutinimitkul S, Fraaij PL, Burke DF, van der Vliet S, de Wit E, Bestebroer TM, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Smith DJ, Fouchier RA, de Graaf M (2015) Identification of amino acid substitutions supporting antigenic change of influenza A(H1N1)pdm09 viruses. *J Virol* 89:3763-3775

- Kumar SV, Misquitta RW, Reddy VS, Rao BJ, Rajam MV (2004) Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci* 166:731-738
- L'Huillier AG, Abed Y, Petty TJ, Cordey S, Thomas Y, Bouhy X, Schibler M, Simon A, Chalandon Y, van Delden C, Zdobnov E, Boquete-Suter P, Boivin G, Kaiser L (2015) E119D Neuraminidase Mutation Conferring Pan-Resistance to Neuraminidase Inhibitors in an A(H1N1)pdm09 Isolate From a Stem-Cell Transplant Recipient. *J Infect Dis* JID:1-9
- Livingston B, Crimi C, Newman M, Higashimoto Y, Appella E, Sidney J, Sette A (2002) A rational strategy to design multiepitope immunogens based on multiple Th lymphocyte epitopes. *J Immunol* 168:5499-5506
- Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA (2003) Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:438-442
- Mayfield SP, Kindle KL (1990) Stable nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by using a *C. reinhardtii* gene as the selectable marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2087-2091
- Mayfield SP, Manuell AL, Chen S, Wu J, Tran M, Siefker D, Muto M, Marin-Navarro J (2007) *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin Biotech* 18:126-133
- Newman SM, Boynton JE, Gillham NW, Randolph-Anderson BL, Johnson AM, Harris EH (1990) Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genet* 126:875-888
- Park KS, Seo YB, Lee JY, Im SJ, Seo SH, Song MS, Choi YK, Sung YC (2011) Complete protection against a H5N2 avian influenza virus by a DNA vaccine expressing a fusion protein of H1N1 HA and M2e. *Vaccine* 29:5481-5487
- Parker JM, Guo D, Hodges RS (1986) New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25:5425-5432

- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 25: 1605-1612
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213-219
- Richt J, A., Webby R, J. (2013) Swine influenza. Vol 370. Springer New York
- Rochaix JD (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu Rev Genet* 29:209-230
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sharma A, Sharma R, Imamura M, Yamakawa M, Machii H (2000) Transgenic expression of cecropin B, an antibacterial peptide from *Bombyx mori*, confers enhanced resistance to bacterial leaf blight in rice. *FEBS Lett* 484:7-11
- Singh H, Raghava GP (2001) ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics* 17:1236-1237
- Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, Ma SK, Cheung CL, Raghvani J, Bhatt S, Peiris JS, Guan Y, Rambaut A (2009) Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459:1122-1125
- Soria-Guerra RE, Ramírez-Alonso JI, Ibáñez-Salazar A, Govea-Alonso DO, Paz-Maldonado LMT, Bañuelos-Hernández B, Korban SS, Rosales-Mendoza S (2014) Expression of an HBcAg-based antigen carrying angiotensin II in *Chlamydomonas reinhardtii* as a candidate hypertension vaccine. *PCTOC* 116:133-139
- Surzycki R, Greenham K, Kitayama K, Dibal F, Wagner R, Rochaix JD, Ajam T, Surzycki S (2009) Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals* 37:133-138
- Treanor JJ, Schiff GM, Hayden FG, Brady RC, Hay CM, Meyer AL, Holden-Wiltse J, Liang H, Gilbert A, Cox M (2007) Safety and immunogenicity of a

baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine: a randomized controlled trial. *JAMA* 297:1577-1582

Turner PJ, Southern J, Andrews NJ, Miller E, Erlewyn-Lajeunesse M (2015) Safety of live attenuated influenza vaccine in atopic children with egg allergy. *J Allergy Clin Immunol*

Wannathong T, Waterhouse JC, Young RE, Economou CK, Purton S (2016) New tools for chloroplast genetic engineering allow the synthesis of human growth hormone in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:5467-5477

World Health Organization (2014). Influenza (Seasonal).<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>

World Health Organization (2010). Pandemic (H1N1) 2009: frequently asked questions.http://www.who.int/csr/disease/swineflu/frequently_asked_questions/en/

8. ANEXOS

A) Reactivos

Reactivo	Proveedor
2- mecaptoetanol	Sigma-Aldrich Chemistry, USA
Acetato de sodio	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Acetona	Golden Bell Reactivos, MEX
Ácido acético	Golden Bell Reactivos, MEX
Ácido ascórbico	Sigma Chemical Co. USA
Ácido bórico	Sigma Chemical Co. USA
Ácido fosfórico	Caledon Laboratory Chemicals, CAN
Acrilamida	IBI SCIENTIFIC, USA
Agar grado bacteriológico	Invitrogen., USA
Agarosa	Promega. USA
Agarosa	vivantis, usa
Albúmina de suero bovino	Sigma Chemical Co. USA
Alcohol etílico	AZ, MEX
Alcohol isopropílico	Golden Bell Reactivos, MEX
Alcohol metílico	Caledon Laboratory Chemicals, CAN
Ampicilina	Sigma Chemical Co. USA
Anticuerpo antihistidinas	Genscript
Anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina	Sigma Chemical Co. USA
Azul Comassie (Blue Brilliant G-250)	Sigma-Aldrich Chemistry, USA
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich Chemistry, USA
Bicarbonato de sodio	Sigma-Aldrich Chemistry, USA
Bicarbonato de sodio	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Bisacrilamida	IBI SCIENTIFIC, USA
Bromuro de etidio	Promega. USA
Buffer de reacción para PCR	Promega. USA
Cefotaxima	Gold Biotechnology
Cloroformo	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Cloruro de amonio	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Cloruro de calcio	Riedel de Haen. USA
Cloruro de calcio dihidratado	Reasol, USA
Cloruro de cobalto hexahidratado	PhytoTechnology Laboratories, USA
Cloruro de magnesio hexahidratado	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Cloruro de manganeso tetrahidratado	Phytotechnology Laboratories, USA
Cloruro de potasio	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Cloruro de sodio	J.T. Baker. USA, ; Karal Reactivos Analíticos, MEX
Desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Promega. USA
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	USB. USA

EDTA	Phyto Technology Lab. USA
Enzimas de restricción	Promega, Roche y New England Biolabs. USA
Etanol 96%	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Extracto de levadura	Fluka. USA
Fenol	Invitrogen. USA
Fosfato de potasio	J.T. Baker. USA
Fosfato de potasio dibásico	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Fosfato de potasio monobásico	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Glicerol	USB. USA
Glicina	Riedel de Haen. USA
HEPES	USB. USA
Hidróxido de potasio (KOH)	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Hidróxido de sodio	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México.
Higromicina B	Sigma Chemical Co. USA
Hipoclorito de sodio	Cloralex. México
Isopropanol	Industrial Kem de León S.A. de C.V. México
Kit Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo scientific
Kit QIAEXII® gel extraction kit (purificación de ADN de fragmentos de agarosa) Cat NO. 20021	Qiagen. USA
Leche descremada	Svelty, Nestle. USA
Marcador de ADN de 1 kb	Invitrogen. USA
Marcador de ADN de 100 pb	Invitrogen. USA
Molibdato de amonio tetrahidratado	Karal, MEX
Nitrato de potasio	Riedel de Haen. USA
Oligonucleótidos	Invitrogen. USA
p_Nitro fenil fosfato	Sigma Chemical Co. USA
Persulfato de amonio (APS)	IBI Scientific, USA
PSMF	Sigma Chemical Co. USA
RNAsa	Roche. USA
Sacarosa	Phyto Technology Lab. USA
Spectinomicina	Sigma Chemical Co. USA
Sulfato de cobre	Phyto Technology Lab. USA
Sulfato de cobre pentahidratado	Karal Reactivos Analíticos, MEX
Sulfato de hierro heptahidratado	Herschi Trading, MEX
Sulfato de magnesio	Sigma Chemical Co. USA
Sulfato de magnesio heptahidratado	Herschi Trading, MEX
Sulfato de manganeso	Sigma Chemical Co. USA
Sulfato de manganeso monohidratado	Phytotechnology Laboratories, USA
Sulfato de Zinc	Phyto Technology Lab. USA

Sulfato de zinc heptahidratado	Reasol, USA
Sulfato ferroso	Sigma Chemical Co. USA
T4 ADN Ligasa	Invitogen. USA
Taq ADN Polimerasa casera	Sintetizada en el laboratorio a partir de una cepa de <i>E. coli</i>
Tiamina	Phyto Techology Lab USA
tTricina	Promega. USA
Triptona	Phytotechnology Laboratories, USA
Tris base	Promega. USA
Trizol	Invitrogen. USA
Tween 20	Sigma Chemical Co. USA

B) Equipo

1. Agitador orbital de mesa con plataforma Daigger modelo MX2139E
2. Autoclave eléctrica Sterilmatic modelo STM-E tipo C
3. Balanza analítica eléctrica Scientech modelo SA210D
4. Balanza granataria Ohaus modelo 1400
5. Baño María digital Fisher Scientific modelo Isotemp 1025
6. Bomba de vacío Felisa modelo FE 1402
7. Cámara bioclimática Lumistell modelo Mac-510
8. Cámara de electroforesis horizontal BIO-RAD modelo minisub-cell GT
9. Cámara fotográfica Sony Cyber Shot modelo DSCF717
10. Campana de extracción de humos Fischer Alder modelo CS línea 2000
11. Campana de flujo laminar Fisher Alder
12. Campana de flujo laminar Lumistell modelo L-120
13. Campana de flujo laminar Lumistell modelo LP-09
14. Centrifuga refrigerada Kendro modelo Hareus Biofuge fresco
15. Centrifuga Sorvall modelo RC 5C Plus
16. Congelador Nieto modelo CVC15
17. Cuarto de incubación de cultivos vegetales Lumistell
18. Electroporador BTX modelo ECM 630
19. Espectrofotómetro Beckman modelo DU 530
20. Fluorómetro TECAN modelo Genios
21. Fotodocumentador de geles UVP modelo EpiChemi3 Darkroom
22. Fuente de poder Termo EC modelo EC105
23. Homogenizador de tejidos Wheaton modelo 903475
24. Horno de microondas LG modelo MS-217XQE
25. Incubadora shaker New Brunswick Scientific modelo 12400
26. Lector de microplacas BIO-RAD modelo 550
27. Microcentrifuga Eppendorf modelo mini Spin

28. Micropipetas Gilson
29. Pistola de biobalística Bio-Rad PDS-1000/He biobalistic
30. Placa de calentamiento Corning modelo PC420
31. Potenciómetro Orion 3 Star Thermo Electro Corporation
32. Refrigerador Torrey modelo R-14
33. Tanque de Helio comprimido Praxair
34. Termociclador Techne modelo Touchene Gradient
35. Termociclador DNA Engine Bio Rad
36. Termomezclador R Eppendorf modelo 22331
37. Ultracongelador Nuaire modelo UN-6613A35
38. Vórtex Fisher Scientific modelo Genie-2

C) Preparación de células calcio-competentes y transformación de *E. coli* por choque térmico.

Se prepararon células competentes a partir del stock de glicerol de *E. coli* Top 10 F'. Se tomó una asada del stock y se inoculó el caldo LB a 37 °C por 24 horas. De este preinóculo se tomaron 250 µL y se añadieron a 25 mL de caldo LB, se incubó por 90 minutos a 37°C y en agitación a 150 rpm. Posteriormente, el cultivo se enfrió en baño de hielo y se centrifugó 7 min a 8,000 rpm. La pastilla se lavó con 7.7 mL de cloruro de calcio 0.1M y glicerol al 15%, y se volvió a centrifugar a 8,000 rpm por 8 min y se eliminó el sobrenadante. Finalmente las células se resuspendieron en 1.27 µL de cloruro de calcio 0.1 M + 15% glicerol y se almacenaron a -70 °C en alícuotas de 60 µL.

Para realizar la transformación, las células competentes se descongelaron sobre hielo y se añadió 3.0 µL del ADN de interés, se mezcló y se incubaron en hielo por 15 minutos. Los tubos se llevaron a un baño a 43°C por 1 minuto y se regresaron inmediatamente al hielo por 10 s. Se añadió 0.5 mL de medio de cultivo

LB y se incubó 60 minutos a 37°C y 150 rpm. Después, 100 µL del cultivo se inocularon en agar LB con 100 mg/L de ampicilina.

D) Preparación de células electro-competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa GV3101 se inoculó en medio de cultivo LB por dos días, de este cultivo (DO 0.04-0.08 a 600nm) se tomaron 5 mL y se les agregó medio LB hasta 100 mL y se incubó a 28 °C, hasta obtener una densidad óptica de 0.5, se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la bacteria en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7, se centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en 40 mL de buffer HEPES 1mM pH 7 y 10% de glicerol. Se centrifugó y se resuspendieron las bacterias en 2 mL de buffer HEPES 1 mM pH 7 y 10% de glicerol y finalmente se centrifugó a 12,000 rpm por 5 minutos a 4°C, se resuspendió la pastilla en 400 µL de buffer HEPES y 10% de glicerol, se tomaron alícuotas de 50 µL y se almacenaron a -70°C (Cangelosi et al., 1991).

E) Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina

Se tomaron 1.5 mL de cultivo bacteriano crecido en el medio de selección apropiado durante 16 horas y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 minutos, se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió golpeando del tubo Eppendorf con el dedo índice y se añadió 150 µL de la solución I de Birnboim (BD) (Tris 0.25 M, pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 10 mM), se mezcló en vórtex y se agregaron 300 µL de la solución II de BD (NaOH 0.2M, SDS 1%) recién

preparada, se agitó por inversión, se añadieron 225 µL de la solución III de BD (acetato de sodio 3M y ácido acético glacial, pH 4.8), se mezcló por inversión y se colocaron los tubos por 10 minutos en hielo, se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos, se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo. El sobrenadante se le adicionó 650 µL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó por 5 min a -70 °C, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70%. Posteriormente se centrifugó por 2 minutos a 13,000 rpm. Se dejó secar la pastilla y se resuspendió la pastilla en 30 µL de agua milli Q estéril. Se agregó RNAsa (2 mg/mL) y se incubó a 37 °C por 30 min. (Sambrook et al., 1989; Ehrt y Schnappinger, 2003)

F) Medio TAP (Tris-Acetato-Fosfato)

Para preparar un litro de medio TAP se requiere

Componente	Cantidad necesaria
Tris base	2.42 g
Sales TAP	25 mL
Amortiguador pH=7 (K)PO ₄	0.375 mL
Solución de metales	1 mL

Ajustar el pH del medio a 7.0 con KOH al 20% (p/v) y CH₃COOH glacial, y posteriormente aforar a 1L y esterilizar a una presión de 15 lb/in² durante 15 minutos.

Para hacer placas con medio solido se le agrega 20 g de agar bacteriológico por litro.

- Sales TAP

Para preparar un litro de sales TAP se realizó de la siguiente manera

Compuesto	Cantidad necesaria
NH ₄ Cl	15.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4.0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	2 g

Aforar a un litro.

- Amortiguador pH=7 (K)PO₄

Cantidad necesaria para preparar 100 mL de amortiguador (aforar con agua desionizada):

Componente	Cantidad necesaria
K ₂ HPO ₄	28.8 g
KH ₂ PO ₄	14.4 g

- Solución de metales

Cada solución se preparó por separado, se mezclaron todas las soluciones siendo la última el FeSO₄·7H₂O para evitar la oxidación y al final se aforó a un litro. Esta solución se mantuvo en refrigeración protegida de la luz.

Compuesto	Cantidad	Disolver en este volumen de agua destilada
EDTA*	63.69 g	250 mL
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22.0 g	100 mL
H ₃ BO ₃	11.4 g	200 mL
MnCl ₂ ·4H ₂ O	5.06 g	50 mL
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.61 g	50 mL
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1.57 g	50 mL
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	1.10 g	50 mL
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.99 g	50 mL

*Calentar la solución de EDTA hasta disolver, cuando este tibia, añadir 85 mL de KOH al 20% (p/v).

G) Reactivos para la cuantificación por Lowry

Las soluciones deben prepararse al momento de usarlas.

Componentes del reactivo A (50 mL)

Componente	Cantidad necesaria
Carbonato de sodio	1 g
Hidróxido de sodio	0.2 g
Tartrato de sodio	0.1 g
SDS	0.5 g

Componentes del reactivo B (1 mL)

Componente	Cantidad necesaria
Sulfato de cobre	0.04 g

Mezcla del reactivo A + B

Reactivo A	Reactivo B
19.8 mL	0.2 mL