



Código: PICYDT-CAyT-01-2020

“DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE INTERÉS BIOTECNOLÓGICO. PRODUCCIÓN DE ADN POLIMERASAS TERMOESTABLES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS”

Director: PALACIOS, Carlos Adolfo

Codirector: MATTION, Nora Marta

Integrantes: BUCCI, Paula Lorena; ACOSTA, Eugenia; RIZZI, Lucia; SALAS, Victoria; NIETO, Aldana.

Año: 2023



Informe Final de Proyectos de Investigación Universidad Nacional de Moreno

Identificación del proyecto

Tipo de proyecto y año de convocatoria:	PICYDT UNM 2019
Nombre completo del proyecto:	Desarrollo de una plataforma para la producción de proteínas recombinantes de interés biotecnológico. Producción de ADN Polimerasas termoestables para la amplificación de ácidos nucleicos.
Director/a:	Carlos Adolfo Palacios
Lineamiento prioritario ¹	DEPARTAMENTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA Bioprocesos
Fecha de inicio:	01/06/2020
Fecha de finalización:	31/01/2023
Unidad de localización: Departamento/centro/ Programa	Licenciatura en Biotecnología Departamento de Ciencias Aplicadas y Tecnología, DCAyT. Programa de Investigación e Innovación en Biotecnología, PAIIB
Resumen: <i>a(máx. 300 palabras)</i>	Entre las metodologías más difundidas en biotecnología y diferentes ciencias biológicas afines, se encuentran la amplificación de ácidos nucleicos utilizando enzimas purificadas con actividad de polimerasas, las cuales son aplicadas en diversas técnicas, tales como la de amplificación de ADN por medio de la ADN polimerasa (PCR), la conversión de moléculas de ARN a ADN por medio de la transcriptasa reversa (retrotranscripción, RT), o amplificación isotérmica de ADN por medio de una ADN polimerasa específica (LAMP , del inglés " <i>Loop-mediated isothermal AMPlification</i> "). Considerando que este grupo de enzimas son muy utilizadas en metodología moleculares tanto en investigación científica, diagnóstico o laboratorios académicos, es de gran interés por lo brevemente expuesto, obtener fuentes confiables de dichas enzimas de manera local para poder cubrir necesidades en los mencionados ámbitos, para poder llevar adelante prácticos orientados a docencia, aplicar estos reactivos en diferentes desarrollos y tener disponibilidad de dichas enzimas para el diagnóstico local de patógenos de interés veterinario y humano. Para el caso de las polimerasas a producir en el presente proyecto, entre las etapas iniciales se realizarán ensayos moleculares para evaluar principalmente su actividad, el grado de pureza alcanzado y en última instancia la estabilidad en el almacenamiento de los stocks producidos.

¹ Según Resolución CS 326/17 Líneas de investigación científica y desarrollo tecnológico prioritarias 2016-21/ó Res. R 449/18 Lineamientos estratégicos generales de Investigación y transferencia 2019/21 del CEDET

Palabras claves:	ADN polimerasas, ARN polimerasas, <i>Escherichia coli</i> , proteínas recombinantes
------------------	---

Parte I

Informe de resultados para el repositorio²

1. Introducción y objetivos (mínimo 1 página- máximo 2 páginas)

- Realizar una presentación general del estudio (tema/problema) y una justificación de su relevancia (motivos para estudiarlo, aportes potenciales).

- Indicar el objetivo general de la investigación y los interrogantes efectivamente trabajados en el proyecto.

Desde el punto de vista de desarrollos de interés biotecnológico, la expresión de proteínas recombinantes involucra por lo general la síntesis y purificación de grandes cantidades de una proteína en particular, utilizando mediante la tecnología del ADN recombinante sistemas de expresión específicos para diferentes huéspedes, bacterias, células de mamífero, células de insectos, levaduras, etc.

Entre las metodologías más difundidas en biotecnología y diferentes ciencias biológicas afines, se encuentran la amplificación de ácidos nucleicos utilizando enzimas altamente purificadas que tienen actividad de polimerasas, las cuales son aplicadas en diversas técnicas, tales como la de amplificación de ADN por medio de la ADN polimerasa (PCR), la conversión de moléculas de ARN a ADN por medio de la transcriptasa reversa (retrotranscripción, RT), o amplificación isotérmica de ADN por medio de una ADN polimerasa específica (LAMP, del inglés "*Loop-mediated isothermal AMPlification*").

Considerando que este grupo de enzimas son muy utilizadas tanto en docencia, investigación científica y diagnóstico mediante técnicas moleculares, es de gran interés por lo brevemente expuesto, obtener fuentes confiables de dichas enzimas de manera local para poder cubrir necesidades en el ámbito académico, para poder llevar adelante prácticos orientados a docencia, aplicar estos reactivos en diferentes desarrollos y tener disponibilidad de dichas enzimas para el diagnóstico local de patógenos de interés veterinario y humano.

En el contexto de la carrera de Licenciatura en Biotecnología de la Universidad de Moreno, es esencial el uso de enzimas para la síntesis y modificación de ácidos nucleicos con el fin de llevar a cabo trabajos prácticos de diferentes disciplinas, realizar tareas de investigación y desarrollo de metodologías de diagnóstico, con el potencial de realizar extensión de servicios hacia la comunidad.

Por lo tanto, montar una Unidad o Grupo de Investigación en Biología Molecular, que realice desarrollos en cuanto a la expresión y purificación de proteínas recombinantes con actividad enzimática es de interés para cubrir las necesidades propias de la Universidad Nacional de Moreno, pero con un alto valor agregado que es el de proveer una plataforma de desarrollo para potenciales productos de calidad para la industria local. Actualmente en nuestro país los tiempos que involucran a los procesos de importación, o los costos aplicados para muchos productos son elevados e incluyen reactivos utilizados en biología molecular, tales como las enzimas mencionadas. Debido a esta variabilidad en la facilidad y costos de suministro de este tipo de reactivos, es de gran interés disminuir la falta de stock o demoras en importaciones, evitando problemas de planificación y ejecución de proyectos de docencia, investigación y desarrollo.

Si bien existe cierta oferta de este tipo de productos en el territorio argentino, el presente proyecto estará direccionado al establecimiento de una plataforma de producción de proteínas recombinantes en sistemas procariotas en la Universidad de Moreno, iniciando dicha plataforma con el clonado y expresión de diferentes enzimas con actividad de polimerasas, con el valor agregado de tener disponible dicha estructura productiva para futuros candidatos propuestos, por grupos de investigación dentro y fuera de la UNM.

Para el caso de las ADN polimerasas a producir en el presente proyecto, entre las etapas iniciales se realizarán ensayos moleculares para evaluar su estabilidad y actividad en función del tiempo, además del grado de pureza alcanzado.

² Se solicita brindar información detallada en los campos que componen esta Parte I, ya que será publicada en el Repositorio on line de la UNM. Esto permitirá difundir de manera amplia la investigación, sus resultados y visibilizar la labor de los miembros del equipo de investigación.

La escala productiva se realizará en escala de laboratorio, llegando en un futuro a escala de biorreactores de volumen reducido, con la intención de obtener stocks suficientes de moléculas activas y altamente purificadas.

Por último, el establecimiento de esta plataforma se puede extender, de manera interdisciplinaria, a la producción de antígenos para el desarrollo de vacunas a subunidad o de proteínas de interés para el desarrollo de herramientas de diagnóstico, evaluación antigénica en el uso de proteínas recombinantes como inmunógenos, estudio de modelado molecular por medio de herramientas bioinformáticas, modelado matemático de bioprocesos productivos, etc., de manera de integrar todos los aspectos inherentes a la formación de profesionales en el campo multidisciplinario biotecnológico. El desarrollo y aplicación de este tipo de metodologías en el seno de la carrera de Licenciatura en Biotecnología de la Universidad Nacional de Moreno, conducirá no sólo al establecimiento de una plataforma de producción de proteínas recombinantes, sino que brindará la formación de recursos humanos especializados en estas metodologías.

Las hipótesis de trabajo consisten en:

- 1.- El protocolo de diseño, permitiría obtener ADN polimerasas termoestables recombinantes con elevada actividad.
- 2.- La productividad en las condiciones establecidas permitiría el abastecimiento de estas enzimas de forma sustentable.

Objetivo general:

Producción a escala de laboratorio de ADN polimerasas termoestables recombinantes.

Objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Producción, purificación, análisis de actividad y estabilidad de la *Taq* ADN polimerasa expresada en *E. coli*.

Objetivo específico 2: Clonado y expresión de las enzimas *Pfu* y *Bst* ADN polimerasas en *E. coli*.

Purificación, análisis de la actividad y estabilidad.

Objetivo específico 3: Escalado de la producción de las tres enzimas.

2. Marco de referencia (min. 2 páginas- máx. 5 páginas)

Describir en qué campo (temático, disciplinar) se inserta la investigación, indicando:

- estudios antecedentes (propios o no) sobre el tema, avances y áreas de discusión.

- marco teórico o encuadre de referencia de la investigación: con qué enfoque, conceptos, dimensiones o modelos se abordó el tema/problema.

Las enzimas son biomoléculas de naturaleza proteica que catalizan transformaciones químicas, fenómeno que ocurre por una disminución de la energía de activación necesaria de una reacción específica, promoviendo y acelerándola sin sufrir alteración durante la misma. Difieren de los catalizadores químicos convencionales en dos aspectos principales: son altamente específicas de su sustrato y mucho más potentes (Engel, 2020).

Como catalizadores, son excepcionalmente poderosas, reconocen sustratos moleculares y los procesan en sitios activos presentes en su estructura. Por lo general, estas macromoléculas se construyen a partir de sólo 20 tipos de aminoácidos, y su actividad catalítica se constituye mediante grupos químicos pertenecientes a las cadenas laterales de algunos aminoácidos que la conforman. Su acción es dependiente de la temperatura, el pH, y de la presencia de cofactores tanto orgánicos como inorgánicos (Nelson, 2019).

Actualmente, los avances tecnológicos aplicados a la comprensión de procesos metabólicos en distintas plataformas, han permitido el uso de enzimas purificadas en una amplia diversidad de aplicaciones, tales como en la industria alimenticia (Fernandes, 2010; Raveendran et al., 2018), para la obtención de biocombustibles (Rajnish et al., 2021), para uso terapéutico (Dean et al., 2017; Kumar and Abdulhameed, 2017), en biorremediación y detoxificación de químicos (Thakur et al., 2019), en producción farmacéutica, de detergentes y en la industria del papel (Chapman et al., 2018), entre otros. Adicionalmente cabe destacar que, como agentes biológicos en procesos tecnológicos, las enzimas presentan múltiples ventajas, entre las que se destacan no sólo su especificidad y operación en condiciones controlables, sino que también que, al ser biodegradables, los tratamientos enzimáticos disminuyen la carga contaminante de los efluentes industriales (Malajovich, 2012).

En relación con el presente proyecto, las metodologías enzimáticas para la amplificación rápida de ácidos nucleicos son de gran utilidad y ampliamente utilizadas en biotecnología, incluyendo su uso para el diagnóstico de enfermedades, clonado y expresión de genes heterólogos y preparación de ADN para su

secuenciación (Bachmann et al., 1990; Manzur et al., 2006). En el caso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional, conocida comúnmente como PCR, del inglés "*Polymerase Chain Reaction*", ésta es una de las técnicas de laboratorio más poderosas, destacando la facilidad de su preparación, su costo relativamente bajo, la combinación de especificidad y sensibilidad con una gran flexibilidad ha permitido una revolución en el campo de la biología molecular. Esta técnica fue desarrollada por Kary Mullis y colegas a comienzos de los 1980's, siendo presentado formalmente por primera vez en 1985 en una aplicación clínica (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1992), una de las mejoras sustanciales que ha recibido esta técnica es el uso de enzimas termoestables, permitiendo también el desarrollo de cicladores térmicos, desde entonces la PCR se ha diseminado a nivel global aplicándose ampliamente en las ciencias biológicas y de la salud, siendo una avance tan grande que llevó al reconocimiento de dicho avance con el Premio Nobel en 1993.

El proceso de amplificación involucra procesos de ciclos repetidos de desnaturalización por calor de un templado de ADN, seguida de la hibridación de oligonucleótidos iniciadores específicos a las hebras complementarias de ADN, continuando con una síntesis de ADN a partir de dichos cebadores, por medio de enzimas con actividad de polimerasas de ADN que incorporan deoxinucleótidos resultando, luego de numerosos ciclos, en la amplificación exponencial de la secuencia flanqueada por los oligonucleótidos específicos. A causa de las etapas de desnaturalización del ADN, es necesario el uso de enzimas altamente termoestables durante la reacción de amplificación, ya que involucra ciclos repetidos de desnaturalización térmica. Dos de las enzimas ampliamente utilizadas para PCR son enzimas provenientes de microorganismos extremófilos, como la enzima *Taq* polimerasa de *Thermus aquaticus* y *Pfu* de *Pyrococcus furiosus*. Estas enzimas presentan una alta estabilidad y fidelidad en las reacciones de PCR.

Otra metodología de amplificación de ácidos nucleicos, desarrollada desde hace más de 20 años, consiste en la amplificación enzimática a baja temperatura, dicha técnica de amplificación isotérmica (LAMP, del inglés "*Loop-mediated isothermal AMPlification*"), la cual tiene ciertas ventajas sobre la PCR convencional tales como la de requerir menos tiempo de reacción y un equipamiento simple para poder realizarla. La técnica de LAMP es muy utilizada en el diagnóstico de patógenos de interés en salud humana, veterinaria y en agronomía para el caso de cultivos. El ensayo por LAMP, es una reacción de amplificación enzimática, utilizando la *Bst* ADN polimerasa que deriva del microorganismo *Geobacillus stearothermophilus*. Dicha enzima tiene una actividad de polimerasa en sentido 5'-3' en ausencia de actividad exonucleasa 5'-3', y presenta una elevada estabilidad térmica, siendo utilizada en un rango de 60 a 72°C dependiendo de su variante.

Por otro lado, el descubrimiento de las ADN polimerasas ARN-dependientes en 1970 (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970), resolvió por qué ciertos virus de genoma ARN podían ser copiados a ADN en células infectadas o transformadas, hasta su primer uso para obtener los primeros cDNAs en 1971 (Kacian et al., 1972; Ross et al., 1972; Verma et al., 1972), fue el puntapié inicial del uso exitoso de una actividad enzimática de origen viral, y que actualmente es una de las moléculas centrales en la detección de patógenos de ARN como el SARS-CoV-2 (Moelling, 2021).

La transcripción inversa acoplada con la PCR (o RT-PCR) es comúnmente utilizada para detectar la presencia de mARNs, pre-mARNs, u otros tipos de ARN tales como ARNs no codificantes. El método involucra el uso de un primer que hibrida con el ARN de interés. Este híbrido ADN:ARN sirve como templado durante la transcripción reversa, en la cual la transcriptasa inversa (RT) genera un ADNc simple hebra, copia de la molécula ARN. Este ADNc puede ser utilizado como templado para la PCR, y mediante el uso de *primers* específicos, se puede amplificar una porción de ARN de interés (Rio, 2014). Adicionalmente, como el resultado de la amplificación es proporcional a la cantidad de ARN inicial, se aplicó el uso moléculas fluorescentes para desarrollar reacciones cuantitativas específicas, denominadas RT-qPCR (Doak and Zair, 2012).

Tres principales fuentes de DNA polimerasas ARN-dependientes que se conocieron inicialmente y representaron la base de la mayor parte de los desarrollos iniciales: Enzimas mesofílicas codificadas por el virus de la mieloblastosis aviar (AMV), el virus Moloney de la leucemia murina (MMLV), variantes de RT-MMLV sin actividad de ARNasa H, y la ADN polimerasa *Tth* de *Thermus thermophilus*, que exhibe la actividad de transcriptasa inversa en presencia del catión bivalente Mn^{2+} (Sambrook and Russell, 2001).

Al igual que sucedía con el fragmento *Klenow* de la DNA pol I, en la PCR convencional, un problema para la síntesis de ADNc a temperaturas elevadas era la falta de una RT termoestable eficiente. Esta limitación pudo superarse mediante la estabilización térmica de las RT mesófilas o mediante la utilización y mejora

de la actividad de RT de las ADN polimerasas dependientes de ADN termófilas (Sambrook and Russell, 2001).

Las transcriptasas inversas (RT) son enzimas de tipo polimerasas, con un rol clave en el ciclo de replicación de los retrovirus, convierten el ARN monocatenario viral en el ADN bicatenario que conforma posteriormente el provirus en el genoma celular. Poseen tres actividades: la ADN polimerasa dependiente de ARN, la ADN polimerasa dependiente de ADN y la RNasa H, que degrada la cadena de ARN en el híbrido ARN-ADN. Las RT se utilizan ampliamente para generar bibliotecas de ADNc (ADN copia) para clonación, análisis de *microarrays*, amplificación de ARN y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (Sambrook and Russell, 2001).

La RT-PCR se ha utilizado para caracterizar ARNm, diagnosticar la presencia de determinadas enfermedades, e identificar y aislar genes que se expresan diferencialmente en distintas células o condiciones ambientales (Ohan and Heikkila, 1993).

Las enzimas más utilizadas para realizar retrotranscripción son la RT-MMLV y RT-AMV, de la primera, algunas de las presentaciones comerciales más difundidas internacionalmente son las de la línea SuperScript™ RT en sus diferentes generaciones, AffinityScript, etc. (Kotewicz et al., 1988; Gerard et al., 1997; Arezi and Hogrefe, 2009; Baranauskas et al., 2012). La RT catalizará la síntesis de ADNc a partir del OH-3' de la dupla del templado y, a diferencia de otras polimerasas, la RT puede utilizar como templado ADN o ARN, y en estas reacciones se pueden producir interrupciones en la síntesis en caso de encontrarse estructuras secundarias. La actividad RNasa H de la RT degrada el ARN del híbrido ARN:ADN que se genera en la reacción, dicha actividad es independiente de la de polimerización y ocurre una competencia entre estas actividades que determina en parte el rendimiento de la reacción global. El uso de mutantes de RT-MMLV deficientes en su actividad RNasa H (RT-MMLV H⁻), permite mejorar la síntesis de ADNc completos, aumentando el rendimiento.

Con lo expuesto en la introducción y en este marco de referencia, consideramos que la producción de este tipo de enzimas es de gran interés para poder proveer localmente de una fuente segura y sustentable de dichos reactivos de biología molecular, tanto para investigación y desarrollo, como para el ámbito académico que lo requiera. Nuestra hipótesis consistió en que la producción de diferentes ADN polimerasas, inicialmente en presentaciones enriquecidas y/o purificadas, pueden obtenerse activas, y ser producidas en el futuro en la Universidad Nacional de Moreno.

Las hipótesis de trabajo consisten en:

- 1.- El protocolo de diseño, permitiría obtener ADN polimerasas recombinantes con elevada actividad.
- 2.- La productividad en las condiciones establecidas permitiría el abastecimiento de estas enzimas de forma sustentable.

Objetivo general:

Producción a escala de laboratorio de ADN polimerasas recombinantes.

Objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Producción, purificación, análisis de actividad y estabilidad de la Taq ADN polimerasa expresada en *E. coli* y RT de MMLV.

Objetivo específico 2: Clonado y expresión de las enzimas *Pfu* y *Bst* ADN polimerasas en *E. coli*.

Purificación, análisis de la actividad y estabilidad.

Objetivo específico 3: Escalado de la producción de las tres enzimas.

3. Métodos y técnicas (min. 2 páginas- máx. 4 páginas)

Indicar el trabajo de campo, documental y/o de laboratorio realizado, la forma de recolección de datos y sus fuentes. Al respecto, describir los métodos, técnicas, instrumentos y materiales utilizados para indagar el problema de investigación. Explicitar las unidades de análisis, los criterios de selección de muestras o casos. Indicar asimismo las formas de procesamiento y análisis de los datos recolectados.

Las metodologías utilizadas en este trabajo son las convencionales para realizar el clonado molecular y ensayos de expresión en *Escherichia coli* de Taq ADN polimerasa, Transcriptasa inversa de MMLV, vHP47-

*Bst*LF, y por último *Pfu* ADN polimerasa, para la producción, purificación, análisis de actividad y estabilidad de las mismas, adicionalmente, se ensayó la actividad de una *Xenopolimerasa RTX (exo-)*, en colaboración con Grupo de Investigación y Desarrollo de Fundación Pablo Cassará.

Adicionalmente, describen las condiciones empleadas para el ensayo de la actividad de *Taq*, *KOD* y *RTX (exo-)* polimerasas, se han utilizado diferentes templados y oligonucleótidos, de manera de poder determinar que se obtuvieron enzimas activas.

Líneas celulares utilizadas

Vero (ATCC: CCL-81TM) derivada inicialmente de células epiteliales de riñón de *Cercopithecus aethiops*. Se utilizaron para la propagación de Virus de Distemper Canino.

MA104 (ATCC:CRL-2378) obtenidas de riñón de simio *Macaca mulata*. Estas células se utilizan para la propagación de rotavirus (Matsuno et al., 1977) como las cepas *Wa* y *RRV*.

Cultivo de células eucariotas

Las células se cultivaron en recipientes específicos para cultivo celular, (Greiner BioOne Frickenhausen, Alemania), y se mantuvieron en estufa de cultivo de células, a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂ y saturada con H₂O.

El medio de cultivo empleado para mantenimiento de todas las líneas celulares fue Minimum Essential Medium Eagle (MEM, N° cat.: M4655, SIGMA Life Science, St. Louis, MO, EUA), suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Internegocios S.A., Argentina) al 10% para lograr el crecimiento celular, y SFB al 2%, el cual fue utilizado en el estudio de las infecciones en los diferentes experimentos llevados a cabo. Cabe destacar que no se utilizaron antibióticos en los cultivos.

Virus utilizados

Rotavirus cepas *RRV* (N° taxonómico: 444185) y *Wa* (N° taxonómico: 10962).

Virus Distemper Canino cepa Lederle (ATCC VR-128).

Virus de la rabia cepa Pitman-Moore

Extracción de ARN viral de Virus Distemper Canino y Rotavirus Wa y RRV

Las extracciones de ARN viral se realizaron utilizando el producto Kit PureLink® Invitrogen™ Viral RNA/DNA Mini Kit, Cat. N° 12280-050, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Plásmidos

[*pTaqUNM*]

Esta construcción fue cedida gentilmente por el Mg. Fernando Raibenberg y el Lic. Oscar Pérez, de la Universidad Nacional de Moreno. La misma fue la diseñada para la expresión de la enzima *TaqPol*, en el plásmido comercial pTTQ18, bajo el control del promotor híbrido tac confiriéndole a la bacteria que es transformada con el mismo, la resistencia al antibiótico ampicilina (Stark, 1987).

[*pPfuUNM*]

Esta construcción fue cedida gentilmente por el Mg. Fernando Raibenberg y el Lic. Oscar Pérez, de la Universidad Nacional de Moreno. La misma fue la diseñada para la expresión de la enzima *Pfu* polimerasa.

[*pET21a (+) /RT-MMLV*]

Esta construcción fue diseñada en el presente trabajo de investigación. La síntesis del plásmido se realizó a través del servicio de la empresa Gene Universal Inc. Newark DE 19713, USA (www.geneuniversal.com). Cabe destacar que la secuencia clonada es la versión *wild type* de la RT-MMLV, publicada en (Baranauskas et al., 2012), en el plásmido de expresión [*pET21a (+)*], que confiere resistencia a ampicilina a las bacterias transformadas.

[*pET-21a(+)-HP47-BstLF*]

Esta construcción fue diseñada en el presente trabajo de investigación. La síntesis del plásmido se realizó a través del servicio de la empresa Gene Universal Inc. Newark DE 19713, USA (www.geneuniversal.com).

La secuencia clonada es una versión modificada genéticamente de la enzima *Bst* de *Geobacillus stearothermophilus* que tiene actividad ADN polimerasa tanto a partir de ADN o ARN como templado. Se realizó la construcción en el plásmido de expresión [*pET21a(+)*], que confiere resistencia a ampicilina a las bacterias transformadas. La secuencia de HP47-BstLF fue cedida gentilmente por el Laboratorio de Dr. Andrew D. Ellington: Center for Systems and Synthetic Biology, Institute for Cellular and Molecular Biology, Department of Molecular Biosciences, University of Texas, USA.

[*pET_RTX (exo-)*]

Esta construcción fue diseñada por el Grupo de Investigación más Desarrollo (I+D) del Laboratorio Pablo Cassará y la síntesis de la secuencia del inserto se realizó a través del servicio de la empresa GeneScript USA Inc., www.genescript.com, y se clonó en el plásmido de expresión [*pET22*] que confiere resistencia a

ampicilina a las bacterias transformadas. La enzima fue expresada y purificada, pero no fue utilizada en ensayos para la amplificación de secuencias correspondientes a virus ARN, incorporando estos ensayos preliminares al presente trabajo. La secuencia de RTX fue cedida gentilmente por el Laboratorio de Dr. Andrew D. Ellington: Center for Systems and Synthetic Biology, Institute for Cellular and Molecular Biology, Department of Molecular Biosciences, University of Texas, 2500 Speedway, Austin, TX 78712, USA. Publicada en (Ellefson et al., 2016).

[*pHSV-VP6/VP2/EGFP*], [*pHSV-Doble/VP7*], [*pHSVNSP4/EGFP*], [*pECFP-N1*],

Plásmidos utilizados como templado para amplificar VP6 de RV cepa Wa (Wa-VP6), VP7 de RV cepa Wa (Wa-VP7), NSP4 de RV cepa Wa (Wa-NSP4), la proteína fluorescente CFP Número de catálogo: 6900-1. Clontech Laboratories, Inc., Takara Bio Company, CA, EEUU, respectivamente.

Mini-mapeo de restricción

El plásmido [*pET21a(+)/RT-MMLV*] fue digerido con la enzima *EcoRV* (Cat. N° NEB R0101S), y con las enzimas *Sall* (Cat. N° NEB R0138S) y *XhoI* (Cat. N° NEB R0146S) se realizó la digestión parcial del plásmido [*pET-21a(+)-HP47-BstLF*] fueron llevadas a cabo para evaluar que el patrón de restricción resultante, sea el esperado. Para esto se siguieron las indicaciones del fabricante. Brevemente, se trataron 0,5 µg de ADN plasmídico, adicionando 2 µL de NEBuffer r3.1, 0,5 µL de enzima *EcoRV* (10 unidades) y agua libre de nucleasas en cantidad suficiente para alcanzar 20 µL de reacción finales. La mezcla de reacción se incubó en un baño termostático a 37°C durante 2 horas. Los fragmentos de restricción obtenidos fueron luego analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

Cepas de *Escherichia coli* utilizadas

Para la amplificación de ADN se utilizaron las bacterias *E. coli* DH5α. Esta cepa utilizada generalmente en el clonado y subclonado de genes, le otorga estabilidad a las construcciones que se propagan en ella, obteniéndose mejores rendimientos y calidad del ADN plasmídico, por ser mutantes en *recA1* y *endA* respectivamente. Genotipo: F- Φ80*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1*.

Para la expresión de proteínas recombinantes, se utilizaron las cepas de *E. coli*: **BL21(DE3)**, que contiene el profago λDE3 incluyendo el gen de la ARN polimerasa T7 (T7RNAP) bajo control de un promotor de *lacUV5*, inducible con IPTG. No contiene la proteasa *lon*, y es deficiente en la proteasa de la membrana externa *OmpT*, reduciendo la degradación de las proteínas heterólogas expresadas en estas bacterias. (Genotipo: F- *ompT hsdSB*(rB-, mB-) *gal dcm* (DE3)) y **BL21 AI**, tienen insertado en su genoma el gen de la T7RNAP, en el locus *araB* del operón *araBAD*, quedando la regulación del T7RNAP bajo el control del promotor *araBAD* inducible de arabinosa, generando un sistema de inducción estrictamente regulado a la presencia de arabinosa. Al igual que la cepa anterior, carece de proteasa *lon* y es deficiente en *OmpT*, disminuyendo la posibilidad de degradación de las proteínas heterólogas expresadas en este sistema. (Genotipo: F-*ompT hsdSB* (rB-, mB-) *gal dcm araB::T7RNAP-tetA*).

Cultivo de *Escherichia coli*

En todos los cultivos bacterianos se utilizó el medio de cultivo "LB" o "*Lysogeny Broth*" (Bertani, 2004), para los cultivos en general y para cultivos de inóculos se suplementó con 15 gramos de glucosa por litro, y ampicilina 50 µg/ml (Sambrook and Russell, 2001), incubando a 37°C con una agitación de 200 rpm.

Preparación y transformación de *Escherichia coli* competentes

Bacterias químicamente competentes:

El método químico que se utilizó para la transformación está adaptado de la metodología desarrollada por Mandel y Higa (Mandel and Higa, 1970), alcanzando actualmente frecuencias de transformación entre 10⁶ y 10⁹ transformantes/µg de ADN superenrollado (Hanahan, 1983). Las transformaciones se realizaron mediante un choque térmico y recuperación de las bacterias, para luego incubarlas en un medio selectivo en presencia de ampicilina (Sambrook and Russell, 2001).

Bacterias electro-competentes:

La electroporación se utiliza para la introducción de ADN en células eucariotas y procariotas. La metodología desarrollada en la década de 1980, en la cual una suspensión de bacterias que se encuentran a mitad de su fase exponencial, se colectan y se prepara una suspensión de alta densidad en un buffer adecuado (~2x10¹⁰ cél./ml) (Chassy and Flickinger, 1987), para la obtención de las células electro-competentes se siguió lo indicado en el manual "*Molecular Cloning*" (Sambrook and Russell, 2001). Las transformaciones se realizaron en cubetas específicas para electroporación, y el equipo electroporador se preparó en 25 µF de capacitancia, 2,5 kV de voltaje, y resistencia de 200 ohm, recuperando las bacterias como se define en el manual *Molecular Cloning* (Sambrook and Russell, 2001).

Preparación de ADN plasmídico

El aislamiento de ADN se realizó mediante la lisis alcalina tanto con soluciones preparadas en el laboratorio, como mediante el uso de un producto comercial para tal fin, QIAprep® Spin Miniprep Kit, Qiagen™ (Número de catálogo: 27104), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN plasmídico nativo purificado se utilizó para las transformaciones, reacciones de digestión, o de PCR (Sambrook and Russell, 2001).

Electroforesis en gel SDS-PAGE

Para analizar la expresión de las proteínas recombinantes TaqPol, RT-MMLV y HP47-BstLF, se realizó la separación de las proteínas presentes en la muestra por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 8%, a 70V constantes, en condiciones reductoras (Sambrook and Russell, 2001).

Electroforesis en gel de agarosa

El análisis de las reacciones de PCR, RT-PCR, fragmentos de restricción y purificación de ARNs fue llevado a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles fueron preparados siguiendo las indicaciones de (Sambrook and Russell, 2001), al 1%, y a 60 V constantes. Para visualizar las bandas, se utilizó reactivo SYBRSAFE revelando las bandas correspondientes con luz ultravioleta. Las imágenes fueron tomadas con un transiluminador Fotodyne UVP.

Enriquecimiento de Taq ADN polimerasa

La Taq ADN polimerasa expresada en *E. coli* BL21(DE3) fue enriquecida siguiendo una modificación del protocolo de (Engelke et al., 1990).

Inducción de expresión en *E. coli* BL21 AI, RT-MMLV y HP47-BstLF polimerasas

Para cada transformación se inocularon 2 ml de medio LB, conteniendo 50 µg/ml de ampicilina a partir de una colonia o de un vial con glicerol de uno de los clones seleccionados. El cultivo se incubó a 37°C durante toda la noche en agitación a 200 rpm, para que se alcance un DO 600 nm de un valor de 1 a 2.

Al día siguiente, se marcan los tubos de 1 a 5 y se agregan 10 a 100 ml de LB conteniendo 50 µg/ml de ampicilina. Cada tubo se inocula con un volumen de cultivo ON suficiente para una dilución 1/100. El cultivo se vuelve a incubarse a 37°C en agitación de 200 rpm durante 2-2,5h para alcanzar una DO 600 nm de 0,5 a 0,8. Luego de alcanzar una DO de 0,5 a 0,8, se toma 1 ml de muestra del cultivo, se centrifuga en microtubo a máxima velocidad durante 30 segundos, se elimina el sobrenadante y se almacena el pellet en freezer -20°C para tener la muestra de tiempo cero. Luego se adiciona Arabinosa al 20% para alcanzar una concentración de 0,2% final. El cultivo se incubó nuevamente a 28°C en agitación a 200 rpm hasta la mañana siguiente (aproximadamente 16h). Al día siguiente, se toma muestra de 1 ml para poder tenerla disponible y correrla junto a la de tiempo cero y tiempos intermedios para el caso de realizar muestreo a diferentes tiempos.

Reacciones de RT-PCR

Se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR para evaluar la actividad de la enzima RTX (exo-). Los ARNs utilizados como templado, obtenidos mediante extracción de ARN mencionada anteriormente en la sección de metodología, fueron los de: Rotavirus RRV, Rotavirus Wa, Virus Distemper Canino (CDV) y Virus de la rabia (RABV). Las condiciones de reacción aplicadas para el caso de los primeros tres ARNs virales se detalla en la *Tabla 2*, y para RABV en la *Tabla 3*. Los *primers* utilizados para la amplificación se detallan en la *Tabla 4*.

Tabla 1. Reactivos y condiciones de reacción de la RT-PCR con RTX (exo-) para Rotavirus Wa-RV, RRV y CDV.

Reactivos para la reacción	Concentración final	
Buffer ensayo 10X (600 mM Tris-HCl (pH8.4), 250 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM KCl)	1X	
MgSO ₄	1 mM	
dNTPs	200 μM	
Primers <i>Fow</i> y <i>Rev</i>	400 nM	
Polimerasa RTX	0,2 μg	
ARNs	1-3 μl ARN.	
H ₂ O	c.s.p.: 25 μL	
Condiciones de reacción:		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
68°C	30 minutos	1
95°C	30 segundos	30
58°C	30 segundos	
68°C	30 segundos	
68°C	5 minutos	

Tabla 2. Reactivos y condiciones de reacción de la RT-PCR con RTX (exo-) para RABV.

Reactivos para la reacción	Concentración final	
Buffer ensayo 10X (600 mM Tris-HCl (pH8.4), 250 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM KCl)	1X	
MgSO ₄ 25 mM	1 mM	
dNTPs	200 μM	
Primers <i>Fow</i> y <i>Rev</i>	400 nM	
Polimerasa RTX (exo-)	0,2 μg	
ARN templado	1 μL	
H ₂ O	c.s.p.: 25 μL	
Condiciones de reacción:		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
45°C	30 minutos	1
94°C	2 minutos	1
94°C	15 segundos	40
60°C	30 segundos	
68°C	30 segundos	
68°C	5 minutos	

Tabla 3. Primers utilizados para la RT-PCR de Virus Distemper Canino, Rotavirus RV, Wa, y Virus de la rabia (RABV). Se detalla el N° de acceso a la secuencia de cada virus en la base de datos de la NCBI, la temperatura de melting de cada oligonucleótido, (T_m), y el tamaño del producto esperado en la reacción de amplificación (Sacramento et al., 1992; Frisk et al., 1999; Palacios, 2016).

ID oligonucleótido	Secuencia	T _m (°C)	Tamaño del producto	N° ID en NCBI
NP1For	ACAGGATTGCTGAGACCTAT	55	287pb	EF418783.1
NP2rev	CAAGATAACCATGTACGGTGC	54		
RRV-VP6int F	TTGACTATTGATGTGC	46,5	618pb	EF583009.1
RRV-VP6 R	CCGATTCATTAAATGAGCATGCTTC	55,8		
Wa-NSP4 F	GTGACATGGATAACTTGCCGACCTC	63,4	528pb	AF093199
Wa-NSP4 R	TTCGAATGACATGGATGCACTCAC	58,2		
G	GACTTGGGTCTCCGAACTGGGG	63,5	354pb	D11257
Phi 1	GACTTGAATCTACCCAGTTG	52,8		
Phi 2	TCTCTAGCAGTTTCAGTGA	50,6	261pb	D11257
Phi 3	AGCTTAGATGACCCACCACT	55,8		
Phi 2	TCTCTAGCAGTTTCAGTGA	50,6	459pb	D11257
L	CAAAGGAGAGTTGAGATTGTATC	53,1		
Phi 4	AGTGTGGTCTATTAAGC	54,5	218pb	D11257
L	CAAAGGAGAGTTGAGATTGTATC	53,1		

Reacciones de PCR

Para evaluar la actividad de la TaqPol producida en el presente trabajo, se llevaron a cabo reacciones de PCR, utilizando como templado ADN plasmídicos conteniendo las secuencias codificantes de genes para RRV-VP6, Wa-VP7, Wa-NSP4 de Rotavirus y por último una construcción con la secuencia del marco abierto de lectura codificante de la proteína cian fluorescente (CFP). Como control positivo de reacción, se realizaron las mismas reacciones, pero utilizando la enzima KOD polimerasa (Novagen®, TOYOBO, MD Chemicals, Inc., Darmstadt, Germany, Cat. N°: 71086). Las reacciones de PCR con TaqPol se llevaron a cabo con 1, 2 y 4 μL del producto enriquecido. Las condiciones de reacción para la TaqPol se detallan en la *Tabla 5*, y para KOD polimerasa en la *Tabla 6*. Los *primers* utilizados se detallan en la *tabla 7*.

Tabla 4. Reactivos y condiciones de reacción de PCR con TaqPol.

Reactivo	Concentración final	
Buffer GoTaq SX	1X	
dNTPs (2 mM c/u)	200 µM	
Primers <i>Fow</i> y <i>Rev</i>	400 nM	
Polimerasa TaqPol	X µL (X=1, 2 o 4)	
ADNs	<0.5 ng	
H ₂ O	c.s.p. 25 µL	
Programa de PCR:		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 minutos	1
94°C	1 minuto	5
52°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
94°C	1 minuto	35
55°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	

Tabla 5.. Reactivos y condiciones de reacción de PCR con KOD ADN polimerasa.

Reactivo	Concentración final	
Buffer 10X KOD ADN Polimerasa	1X	
25 mM MgSO ₄	1.5 mM	
dNTPs (2 mM c/u)	200 µM	
Primers <i>Fow</i> y <i>Rev</i>	300 nM (c/u)	
Polimerasa KOD ADN Polimerasa	0,02 U/µL	
ADN	<0.5 ng	
H ₂ O	c.s.p. 25 µL	
Programa de PCR:		
Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	3 minutos	1
94°C	1 minuto	5
52°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	
94°C	1 minuto	35
55°C	1 minuto	
72°C	1 minuto	

Tabla 6. Primers utilizados para la PCR de los plásmidos [pHSV-VP6/VP2/EGFP], [pHSV-Doble/VP7], [pHSVNSP4/EGFP] y [pECFP-N1]. Se detalla el N° de acceso a la secuencia de cada virus en la base de datos de la NCBI, la temperatura de melting de cada oligonucleótido, (T_m), y el tamaño del producto esperado en la reacción de amplificación.

ID oligonucleótido	Secuencia	T _m (°C)	Tamaño del producto	N° ID en NCBI
Wa-VP6 F	GTCGACATGGAGTTCTGACTCA	46,5	1194 pb	EF583009.1
Wa-VP6 R	TTCGAATCACTTAATCAACATGCTTC	55,8		
Wa-VP7 F	TCGCCAATGTATGGTATTGAATATAC	53,9	1062 pb	K02033.1
Wa-VP7 R	TCGGCACTACTCTATAATAAAAAG	51,3		
Wa-NSP4 F	GTCGACATGGATAAGCTTGGCCAGCCTC	63,4	528 pb	AF093199
Wa-NSP4 R	TTCGAATCACATGGATGAGTCAC	58,2		
CFP F	GAGCTCATGGTGAGCAAGGGCCAGG	67,5	732 pb	[pECFP-N1]
CFP R	CAGCTGTTACTTGTACAGCTCGTCC	56,3		

4. Resultados y discusión (min. 5 páginas- máx. 15 páginas)

Desarrollar los resultados, en relación a los objetivos del proyecto, especificando (de ser posible) los siguientes aspectos:

- nuevos conocimientos obtenidos sobre los casos o unidades bajo estudio.
- avances en materia de conocimiento científico sobre el tema bajo estudio, formulación de enfoques originales e innovadores (modelos, conceptos, etc.).
- Contribuciones para la resolución de problemas específicos y/o formulación de herramientas de intervención, diseño o mejora de productos y procesos.

Por último, desarrollar las conclusiones y reflexiones finales a las que se llegó luego de la investigación, en relación a los interrogantes y objetivos planteados.

En esta etapa se produjeron de manera recombinante tres ADN polimerasas, una termoestable cuyo origen es la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (*Taq*), y las dos no termoestables son una transcriptasa inversa de origen viral (*RT-MMLV*) y la enzima ADN polimerasa para amplificación isotérmica derivada de *Bacillus stearothermophilus*, HP47-BstLF.

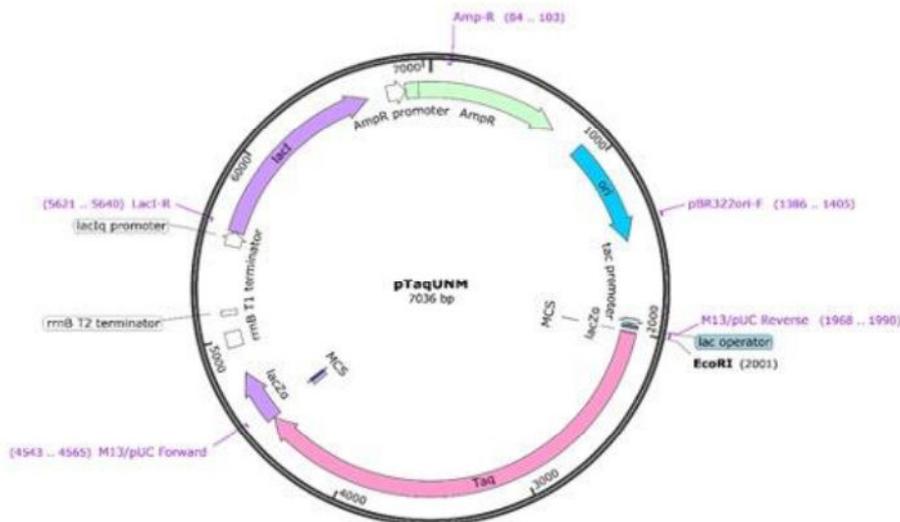
Para el caso de la *Taq*Pol, esta enzima será usada en sistemas de amplificación de ácidos nucleicos mediante la técnica de PCR. Se trabajará a partir de enzimas recombinantes originadas de clones bacterianos productores, previamente establecidos en la bacteria mesófila *E. coli*. Los respectivos clones se cultivarán en condiciones que permitan mantener el plásmido en el que se encuentra clonada la secuencia codificante de la *Taq* polimerasa. Dichos clones serán empleados para la transformación de las bacterias competentes adecuadas tipo *E. coli DH5alfa*, cepa adecuada para la obtención de grandes cantidades de ADN plasmídico, y luego con este material se transformarán cepas adecuadas para la sobre-expresión inducible de proteínas recombinantes, como por ejemplo *E. coli BL21(DE3)pLys*. La enzima *Taq* polimerasa recombinante obtenida se purificará mediante un enriquecimiento inicialmente y en etapas posteriores se propondrá realizar una cromatografía de intercambio iónico para poder aislar aún más el producto de otros contaminantes. El producto enriquecido obtenido se analizará en cuanto al grado de pureza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) revelado mediante tinción azul de coomassie. Lo mismo se realizó con las enzimas RT-MMLV y HP47-BstLF.

La actividad de la *Taq* ADN polimerasa obtenida se evaluará sobre distintas diluciones seriadas del stock de enzima pura. Se empleará ADN de diferente origen y concentración, sobre los cuales se ensayarán protocolos de amplificación de regiones de diferente longitud para ello se utilizarán oligonucleótidos iniciadores de uso rutinario en diagnóstico clínico molecular. Como control de referencia de actividad enzimática, se utilizarán polimerasas obtenidas comercialmente, permitiendo la validación del producto.

Para cada una de las enzimas propuestas, se seguirá una serie de etapas productivas similares, la construcción de cada plásmido será previamente evaluada respecto de su secuencia correcta antes de ser clonada en el vector de expresión seleccionado. El sistema de expresión de dichas enzimas recombinantes será *E. coli*. Los clones productores seleccionados, serán evaluados en función del tiempo de inducción para optimizar la productividad y purificación de las proteínas recombinantes.

Construcciones obtenidas o utilizadas en el presente trabajo:

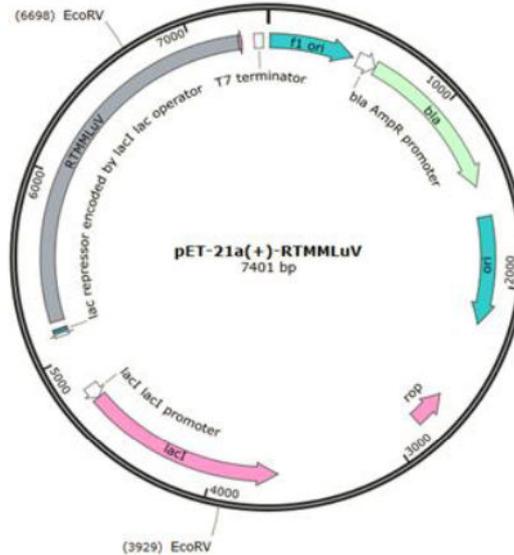
ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*



ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*

Mapa del plásmido [pTaqUNM], indicando el sitio de clonado con *EcoRI*. Este esquema representa la construcción utilizada en el presente trabajo. En el mismo se indica el marco abierto de lectura para la Taq ADN polimerasa. Se indica también el gen de resistencia al antibiótico ampicilina (*Amp^R*) para la propagación en bacterias de dicho plásmido. El clon molecular fue cedido por Fernando Raibenberg y Oscar Pérez de UNM.

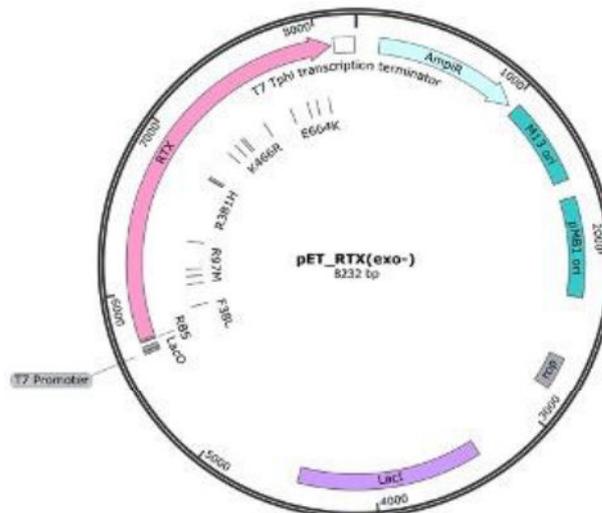
Transcriptasa inversa de *Murine Moloney Leukemia Virus*



Transcriptasa inversa de *Murine Moloney Leukemia Virus*

Mapa del plásmido [pET21a(+)-RT-MMLV], indicando el sitio de restricción *EcoRV*, utilizado para un mini-mapeo. Esta construcción fue diseñada en el presente trabajo de investigación. La síntesis del plásmido se realizó a través del servicio de la empresa Gene Universal Inc. Newark, USA (www.geneuniversal.com). Cabe destacar que la secuencia clonada es la versión wild type de la RT-MMLV, en el plásmido de expresión [pET21a (+)], que confiere resistencia a ampicilina a las bacterias transformadas.

Xenopolimerasa derivada de ADNpol de *Thermococcus kodakarensis*



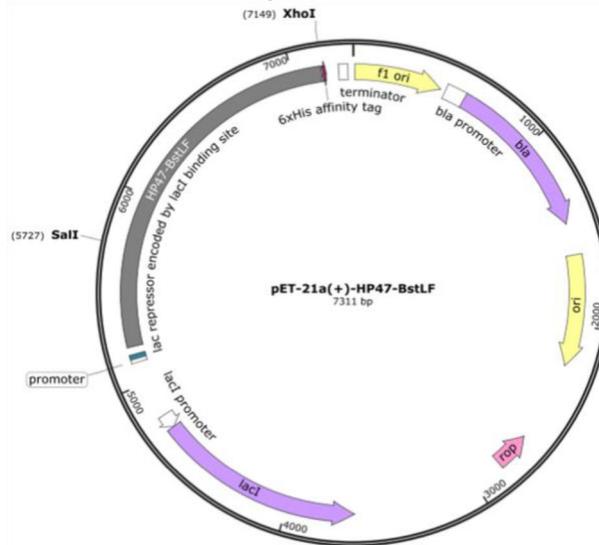
Xenopolimerasa derivada de ADNpol de *Thermococcus kodakarensis*

Mapa del plásmido [pET-RTX(exo-)]. Esta construcción fue diseñada por el Grupo de I+D del Laboratorio Pablo Cassará. RTX(exo-) se clonó en el plásmido de expresión [pET22] que confiere resistencia a ampicilina a las bacterias transformadas..

La enzima fue expresada y purificada, y utilizada en el presente trabajo en ensayos para la amplificación de secuencias correspondientes a virus ARN. La secuencia de RTX fue cedida gentilmente por el

Laboratorio de Dr. Andrew D. Ellington: Center for Systems and Synthetic Biology, Institute for Cellular and Molecular Biology, Department of Molecular Biosciences, University of Texas, USA.

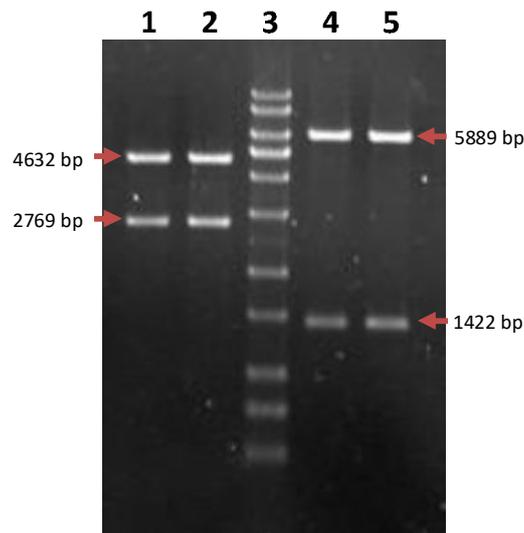
ADN polimerasa de *Geobacillus stearothermophilus*



ADN polimerasa de *Geobacillus stearothermophilus*

Mapa del plásmido [pET-21a(+)-HP47-BstLF], indicando los sitios de restricción *XhoI* y *Sall* utilizados para un mini-mapeo. Esta construcción fue diseñada en el presente trabajo de investigación. La síntesis del plásmido se realizó a través del servicio de la empresa Gene Universal Inc. Newark, USA. La secuencia clonada es una versión modificada genéticamente de la enzima *Bst* de *Geobacillus stearothermophilus* que tiene actividad ADN polimerasa tanto a partir de ADN o ARN como templado. Se realizó la construcción en el plásmido de expresión [pET21a(+)], que confiere resistencia a ampicilina a las bacterias transformadas. La secuencia de HP47-BstLF fue cedida gentilmente por el Laboratorio de Dr. Andrew D. Ellington: Center for Systems and Synthetic Biology, Institute for Cellular and Molecular Biology, Department of Molecular Biosciences, University of Texas, USA.

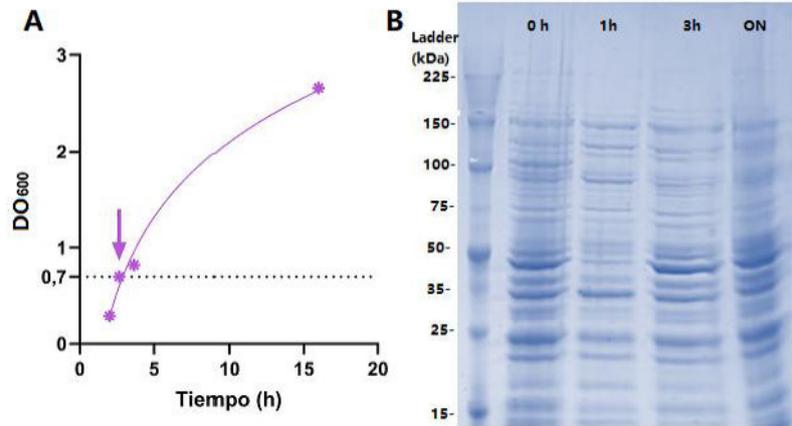
Resultados de minimapeos de restricción de los plásmidos



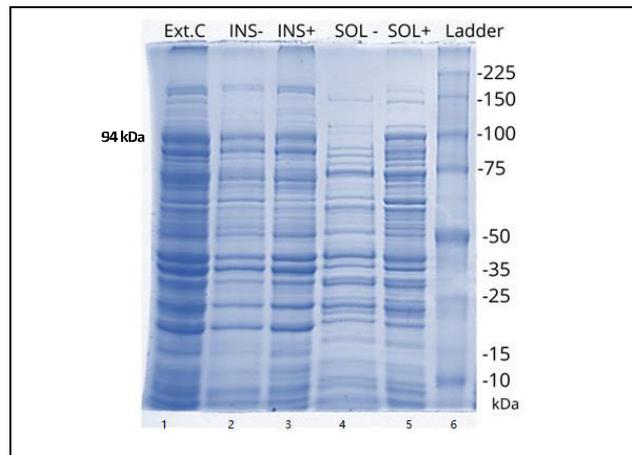
Análisis de restricción de [pET21a(+)/RT-MMLV] y [pET21a(+)/HP47BstLF]. Calles 1 y 2) Análisis parcial por mapeo con *EcoRV* de dos clones conteniendo la secuencia de RT-MMLV, donde se observan dos bandas específicas de 4632 y 2769 bp. Calles 4 y 5) Análisis parcial por mapeo con *Sall* y *XhoI* de dos clones con la secuencia de HP47BstLF, donde se observan dos bandas específicas de 5889 y 1422 bp. Calle 3) Marcador de tamaño molecular 1 kbp Plus DNA Ladder (N° Cat.: 10787018, Invitrogen).

Ensayos de expresión de las enzimas recombinantes:

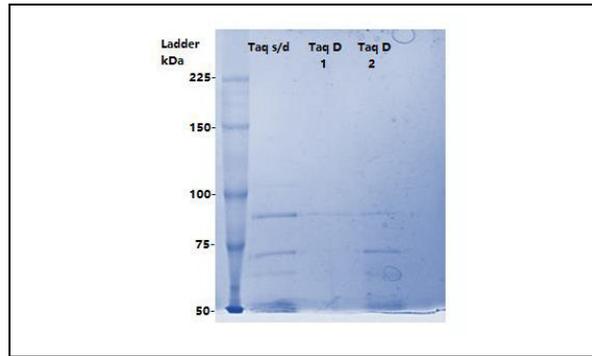
ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*: TaqPol



Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) del extracto crudo de las bacterias transformadas con pTaqUNM. A: Se indica la curva de crecimiento de *E. coli* como Densidad Óptica (DO) a 600 nm en función del tiempo. En violeta se señala con una flecha la DO₆₀₀ a la que se realizó la inducción del cultivo con IPTG, 0,7. B: SDS-PAGE. Se indica el tamaño esperado de la banda correspondiente a la TaqPol, de 94 kDa. en el extracto crudo en los tiempos 0h, 1h, 3h y ON luego de la inducción con IPTG.

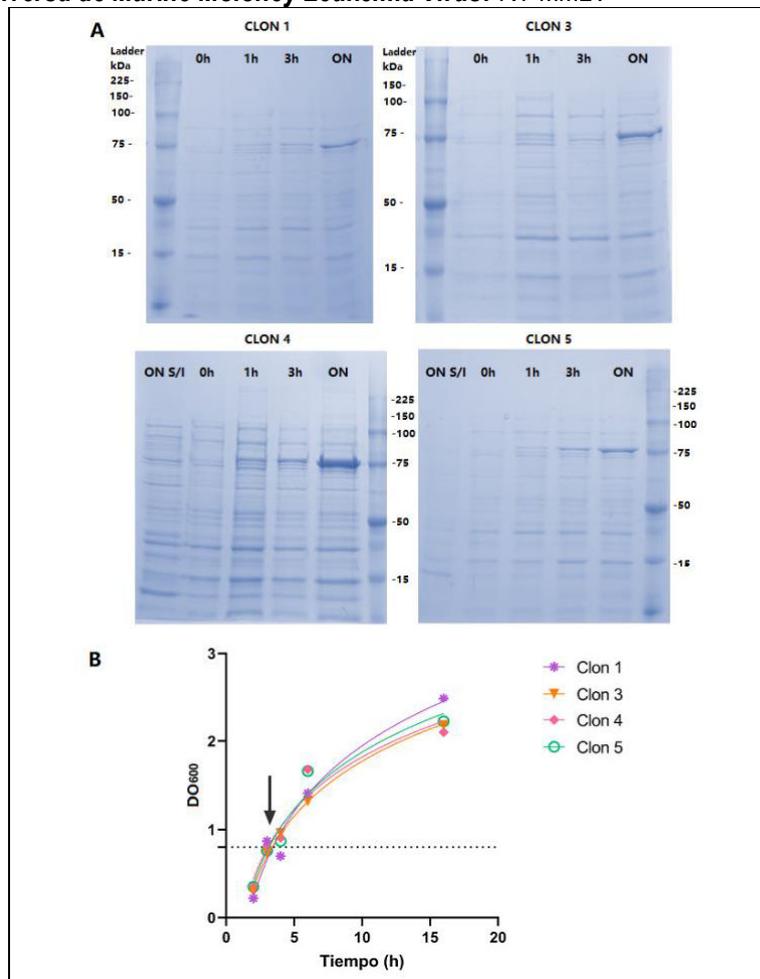


Expresión de Taq Pol. Electroforesis en gel de poliacrilamida(SDS-PAGE) evidenciando la presencia de la banda del peso esperado (94 kDa). Calle 1, Extracto crudo. Calle 2, Fracción insoluble sin inducir. Calle 3, Fracción insoluble inducida. Calle 4, Fracción soluble sin inducir. Calle 5, Fracción soluble inducida. Calle 6, Ladder (poner que ladder).



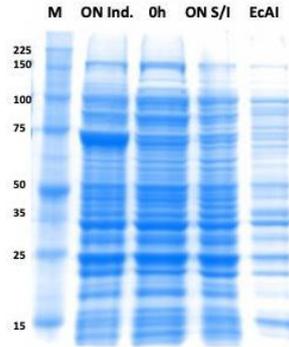
Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE del enriquecimiento de TaqUNM. *Taq s/d* corresponde a la proteína obtenida previo al paso de diálisis, y *Taq D 1* y *2* corresponden a dos fracciones de proteína obtenidas luego de dializar. Se indica con una flecha la banda correspondiente a la *TaqPol* de 94 kDa.

Transcriptasa inversa de Murine Moloney Leukemia Virus: RT-MMLV



Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de los clones recombinantes 1, 3, 4 y 5, para analizar la expresión de RT-MMLV. A: ON: Cultivo inducido toda la noche. ON S/I: Cultivo toda la noche sin inducir. 0, 1, 3 refieren a los tiempos 0, 1 y 3 horas luego de la inducción con IPTG. La flecha en cada gel indica la banda esperada de 75 kDa para la RT-MMLV, sobre expresada en los cultivos ON inducidos. B: Gráfico de OD600 vs tiempo, indicando con flecha la densidad óptica a la que se indujo el cultivo, para los clones 1 (0,87), 3 (0,73), 4 (0,81,) y 5 (0,86).

ADN polimerasa de *Geobacillus stearothermophilus*: HP47-BstLF

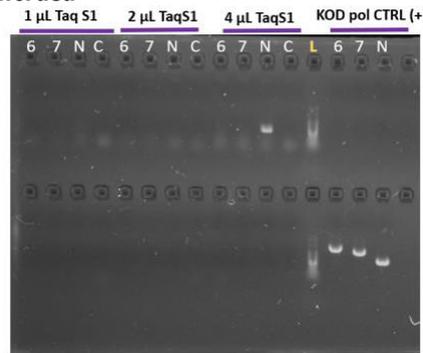


Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) del clon recombinante 1, para analizar la expresión de HP47-BstLF. M: Marcador de peso molecular, ON Ind: Cultivo inducido toda la noche. ON S/I: Cultivo toda la noche sin inducir. 0h refiere a la bacteria en el momento de la inducción con IPTG. La banda de sobreexpresión esperada de unos 73 kDa, se observa aproximadamente a la altura de la banda de 75 kDa para la HP47-BstLF, en el cultivo inducido ON.

Xenopolimerasa derivada de ADNpol de *Thermococcus kodakarensis*: RTX(exo-)

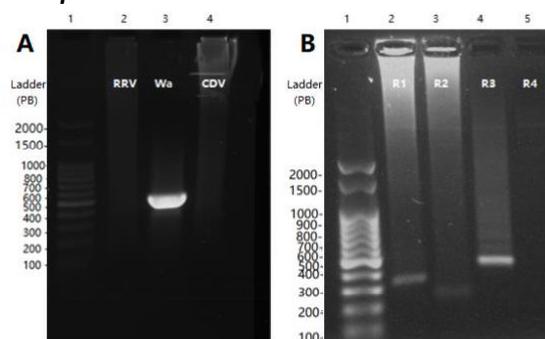
La enzima RTX (exo-) purificada, cedida por el grupo de Investigación y Desarrollo del Laboratorio Pablo Cassará, la cual fue utilizada para realizar ensayos de actividad de la misma, utilizando ARN y ADN como templado.

Ensayos de PCR con Taq polimerasa



Electroforesis en gel de agarosa con los productos de PCR utilizando la enzima Taq UNM y KOD polimerasa como control positivo. Se indica la reacción positiva para NSP4 con la Taq enriquecida, fracción S1. Donde las calles indican: 6: Producto de PCR esperado para el plásmido conteniendo el gen de VP6, 7: plásmido de VP7, N: plásmido de NSP4 y C: plásmido de la proteína cian fluorescente. L: Ladder 100 pb (PB-L). El tamaño de los productos esperados es el siguiente: Wa-VP6: 1194 pb, Wa-VP7: 1062 pb, Wa-NSP4: 528 pb y CFP: 723 pb.

Ensayo de RT-PCR con RTX polimerasa



Gel de agarosa con los productos de RT-PCR de la reacción con RTX (exo-). A: De izquierda a derecha se indica: Ladder (marcador de peso molecular), RRV negativo, Wa positivo (528 pb) y CDV negativo. B: De izquierda a derecha se indica: Ladder, Reacción 1 utilizando el set de primers G y Phi 1 (354 pb),

Reacción 2 utilizando Phi 2 y Phi3 (251 pb), Reacción 3 con Phi 2 y L (459 pb), siendo estas 3 positivas; y Reacción 4 con el set de primers Phi 4 y L, negativa.

Conclusión:

Los resultados indicaron que los plásmidos construidos y utilizados en el presente trabajo son capaces de expresar las proteínas heterólogas *TaqPol*, *HP47-BstLF* y *RT-MMLV*. Posteriormente, se comprobó la actividad de la enzima *TaqPol* a partir de una fracción enriquecida y, en paralelo, se ensayó la actividad de *RTX* (*exo-*) purificada, brindando los primeros resultados hacia el desarrollo de un sistema de RT-PCR de un sólo paso. Estas dos enzimas analizadas mantuvieron su actividad de manera adecuada, pudiendo ejecutar reacciones de PCR o RT-PCR en un solo paso, respectivamente. Así mismo, los clones productores de *RT-MMLV* han quedado listos para continuar con la purificación de dicha enzima. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, se confirmó que se pueden obtener ADN polimerasas activas, se ejecutaron y establecieron protocolos de expresión para *TaqPol* y *RT-MMLV*, y se pudieron realizar reacciones de amplificación exploratorias con *TaqPol* para PCR y con la enzima *RTX* (*exo-*), para el caso de RT-PCR en un solo paso.

Este trabajo es de gran importancia en el sentido que permite la continuidad para obtener dichas enzimas de manera purificada por metodologías cromatográficas, hacia la obtención de stocks altamente purificados con los cuales realizar ensayos de actividad y estabilidad en función del tiempo simulando almacenamientos prolongados.

5. Nuevos interrogantes y líneas de investigación a futuro

Consignar si la investigación hizo surgir nuevos interrogantes o si emergieron potenciales líneas de investigación a desarrollarse en el futuro a partir de los hallazgos.

La expresión de este tipo de ADN polimerasas, ha abierto otras líneas de investigación hacia la expresión de manera recombinante, de nuevas enzimas para otros fines, tales como la obtención de moléculas de mRNA.

6. Bibliografía (min. 2 página- máx. 4 páginas)

Consignar los textos y fuentes utilizados en la redacción de los campos anteriores.

- Ammerman, N.C., Beier-Sexton, M., Azad, A.F., 2008. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Curr Protoc Microbiol* 11, A.4E.1-A.4E.7. doi:10.1002/9780471729259.mca04es11
- Arezi, B., Hogrefe, H., 2009. Novel mutations in Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase increase thermostability through tighter binding to template-primer. *Nucleic Acids Res* 37, 473–481. doi:10.1093/nar/gkn952
- Bachmann, B., Lüke, W., Hunsmann, G., 1990. Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. *Nucleic Acids Res* 18, 1309–1309. doi:10.1093/nar/18.5.1309
- Baltimore, D., 1970. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature* 226, 1209–1211. doi:10.1038/2261209a0
- Baranauskas, A., Paliksa, S., Alzbutas, G., Vaitkevicius, M., Lubiene, J., Letukiene, V., Burinskas, S., Sasnauskas, G., Skirgaila, R., 2012. Generation and characterization of new highly thermostable and processive M-MuLV reverse transcriptase variants. *Protein Eng Des Sel* 25, 657–668. doi:10.1093/protein/gzs034
- Bertani, G., 2004. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* 186, 595–600. doi:10.1128/jb.186.3.595-600.2004
- Chapman, J., Ismail, A.E., Dinu, C.Z., 2018. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. *Catalysts* 8, 238. doi:10.3390/catal8060238
- Chassy, B.M., Flickinger, J.L., 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *Fems Microbiol Lett* 44, 173–177. doi:10.1111/j.1574-6968.1987.tb02263.x
- Dean, S.N., Turner, K.B., Medintz, I.L., Walper, S.A., 2017. Targeting and delivery of therapeutic enzymes. *Ther Deliv* 8, 577–595. doi:10.4155/tde-2017-0020
- Doak, S.H., Zair, Z.M., 2012. Real-time reverse-transcription polymerase chain reaction: technical considerations for gene expression analysis. *Meth Mol Biology* 817, 251–270. doi:10.1007/978-1-61779-421-6_13
- Ellefson, J.W., Gollihar, J., Shroff, R., Shivram, H., Iyer, V.R., Ellington, A.D., 2016. Synthetic evolutionary origin of a proofreading reverse transcriptase. *Science* 352, 1590–1593. doi:10.1126/science.aaf5409
- Engel, P., 2020. Enzymes: A Very Short Introduction 101–116. doi:10.1093/acrade/9780198824985.003.0007
- Engelke, D.R., Krikos, A., Bruck, M.E., Ginsburg, D., 1990. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 191, 396–400. doi:10.1016/0003-2697(90)90238-5
- Fernandes, P., 2010. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. *Enzym Res* 2010, 862537. doi:10.4061/2010/862537
- Frisk, A.L., König, M., Moritz, A., Baumgärtner, W., 1999. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. *J Clin Microbiol* 37, 3634–3643. doi:10.1128/jcm.37.11.3634-3643.1999
- Gerard, G.F., Fox, D.K., Nathan, M., D'Alessio, J.M., 1997. Reverse Transcriptase. *Mol Biotechnol* 8, 61–77. doi:10.1007/bf02762340
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580. doi:10.1016/s0022-2836(83)80284-8
- Kacian, D.L., Spiegelman, S., Bank, A., Terada, M., Metafora, S., Dow, L., Marks, P.A., 1972. In vitro Synthesis of DNA Components of Human Genes for Globins. *Nat New Biology* 235, 167–169. doi:10.1038/newbio235167a0

- Kotewicz, M.L., Sampson, C.M., D'Alessio, J.M., Gerard, G.F., 1988. Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Nucleic Acids Res* 16, 265–277. doi:10.1093/nar/16.1.265
- Kumar, S.S., Abdulhameed, S., 2017. *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology, Volume 2 : Exploring Potential Biomolecules* 45–73. doi:10.1007/978-981-10-4284-3_2
- Malajovich, M.A.M. de, 2012. *Biotecnología, Biomedicina (Universidad Nacional de Quilmes)*. Universidad Nacional de Quilmes Editorial.
- Mandel, M., Higa, A., 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53, 159–162. doi:10.1016/0022-2836(70)90051-3
- Manzur, M.J., Munoz, R.V., Lucero, A.A., Ayub, M.J., Alvarez, S.E., Ciuffo, G.M., 2006. Production of recombinant enzymes of wide use for research. *Electron J Biotechno* 9, 0–0. doi:10.2225/vol9-issue3-fulltext-16
- Matsuno, S., Inouye, S., Kono, R., 1977. Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. *J Clin Microbiol* 5, 1–4. doi:10.1128/jcm.5.1.1-4.1977
- Moelling, K., 2021. Half a century of the reverse transcriptase—happy birthday! *Genome Biol* 22, 31. doi:10.1186/s13059-020-02219-5
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology Read Mass* 24, 17–27.
- Nelson, A., 2019. Catalytic machinery of enzymes expanded. *Nature* 570, 172–173. doi:10.1038/d41586-019-01596-7
- Ohan, N.W., Heikkila, J.J., 1993. Reverse transcription-polymerase chain reaction: An overview of the technique and its applications. *Biotechnol Adv* 11, 13–29. doi:10.1016/0734-9750(93)90408-f
- Palacios, C.A., 2016. Amplicones y partículas replicantes defectivas derivadas del virus Herpes simplex tipo 1 como vectores transgénicos de proteínas de patógenos de humanos y animales. Universidad Nacional del Litoral.
- Rajnish, K.N., Samuel, M.S., John, A., Datta, S., Narendhar, C., Balaji, R., Jose, S., Selvarajan, E., 2021. Immobilization of cellulase enzymes on nano and micro-materials for breakdown of cellulose for biofuel production—a narrative review. *Int J Biol Macromol* 182, 1793–1802. doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.176
- Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalyma, S.B., Abraham, A., Mathew, A.K., Madhavan, A., Rebello, S., Pandey, A., 2018. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. *Food Technol Biotech* 56, 16–30. doi:10.17113/ftb.56.01.18.5491
- Rio, D.C., 2014. Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc* 2014, pdb.prot080887. doi:10.1101/pdb.prot080887
- Ross, J., Aviv, H., Scolnick, E., Leder, P., 1972. In Vitro Synthesis of DNA Complementary to Purified Rabbit Globin mRNA. *Proc National Acad Sci* 69, 264–268. doi:10.1073/pnas.69.1.264
- Sacramento, D., Badrane, H., Bourhy, H., Tordo, N., 1992. Molecular epidemiology of rabies virus in France: comparison with vaccine strains. *J Gen Virol* 73, 1149–1158. doi:10.1099/0022-1317-73-5-1149
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., Arnheim, N., 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350–1354. doi:10.1126/science.2999980
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, United States of America.
- Stark, M.J.R., 1987. Multicopy expression vectors carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Gene* 51, 255–267. doi:10.1016/0378-1119(87)90314-3