



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Producción de proteínas recombinantes para el desarrollo de métodos de diagnóstico frente al virus *Myxoma*



Departamento de Bioquímica y Biología molecular

LUIS EULALIO PAÑOS MOLERO

CURSO 2019-2020

CONVOCATORIA EXTRAORDINARIA: SEPTIEMBRE



Dr. **Kevin P. Dalton** del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “**Producción de proteínas recombinantes para el desarrollo de métodos de diagnóstico frente al virus Myxoma**” ha sido realizado por el graduado en Biología **D. Luis Eulalio Paños Molero** en el **Departamento de Bioquímica y Biología Molecular** bajo su dirección, constituyendo el Trabajo Fin de Máster del/la interesado/a, cuya presentación se autoriza.

Oviedo, a 4 de septiembre de 2020:

Fdo.

Dr. Kevin P. Dalton.



Producción de proteínas recombinantes para el desarrollo de métodos de diagnóstico frente al virus Myxoma

Resumen:

Myxoma virus es un poxvirus causante de una enfermedad que afecta gravemente a las poblaciones de conejos, la mixomatosis. Debido a las grandes pérdidas que supone y a la ausencia de un tratamiento, en los últimos años se han redoblado los esfuerzos en estrategias de prevención y diagnóstico, siendo el ensayo ELISA el método más frecuente. Los ensayos ELISA clásicos para suelen utilizar el virus Myxoma completo como antígeno para detectar la presencia de anticuerpos en suero, lo cual supone grandes costes económicos y de esfuerzo, además de la necesidad de trabajar en condiciones de bioseguridad. Por ello, se planteó en este proyecto la elaboración de un ensayo ELISA a partir de cinco proteínas recombinantes (M029L, M071L, M083L, M115 y M141R) como antígenos, las cuales fueron sometidas a un proceso de sobreexpresión y purificación previo paso a la elaboración del ensayo. Aunque los resultados fueron dispares dependiendo del tipo de proteína e influenciados por ciertos factores como la cantidad de proteína disponible, la solubilidad de estas o la escasez de tiempo para la elaboración del experimento, las perspectivas fueron bastante prometedoras, pues el ensayo fue capaz de detectar la presencia de anticuerpos contra las proteínas recombinantes candidatas utilizadas como antígenos, pudiendo resultar como una eficaz y novedosa forma de diagnóstico de la mixomatosis.

Palabras clave: *Myxoma virus*, mixomatosis, proteínas recombinantes, diagnóstico, ELISA.

Production of recombinant proteins for the development of diagnostic methods against *Myxoma virus*

Abstract:

Myxoma virus is a poxvirus which causes a severe disease that affects rabbit populations, called myxomatosis. Because of the great losses it causes and the lack of treatment, in recent years efforts in prevention and diagnostic strategies have been redoubled, with being the ELISA being the most frequent method used. Classic ELISA assays usually use the complete Myxoma virus as antigen to detect the presence of antibodies in serum, which implies great economic costs and effort, in addition to the need to work under biosafety conditions. Therefore, in this project, the development of an ELISA was proposed using five recombinant proteins (M029L, M071L, M083L, M115 and M141R) as antigens, which were subjected to a process of overexpression and purification before the elaboration of the assay. Although the results were varied depending on the type of protein and influenced by certain factors such as the amount of protein available, its solubility or the limitation of time to carry out the experiment, the prospects were quite promising, since the trial was able to detect the presence of antibodies against the candidate recombinant proteins used as antigens, which may be an effective and novel way of diagnosing myxomatosis.

Keywords: *Myxoma virus*, myxomatosis, recombinant proteins, diagnostic, ELISA



ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Myxoma virus.	1
1.1.1. Taxonomía de <i>Myxoma virus</i>	1
1.1.2. Estructura y genoma de <i>Myxoma virus</i> .	1
1.2. La mixomatosis.	2
1.2.1. Transmisión e infección de la mixomatosis.	2
1.2.2. Cuadro clínico.	3
1.3. Control y vacunación contra <i>Myxoma virus</i> .	3
1.3.1. La importancia de la mixomatosis.	3
1.3.2. Vacunación.	4
1.4. Diagnóstico.	5
1.4.1. Metodología del diagnóstico de <i>Myxoma virus</i> .	5
1.4.2. Nuevos métodos de diagnóstico.	6
1.5. Objetivos del proyecto.	8
2. MATERIALES Y METODOLOGÍA.	8
2.1. Materiales.	8
2.1.1. Programas de análisis bioinformático.	8
2.1.2. Cepas virales.	9
2.1.3. Línea celular.	9
2.1.4. Medios de cultivo.	9
2.1.5. Tampones.	9
2.1.5. Microorganismos.	10
2.1.6. Vectores.	10
2.2. Metodología.	10
2.2.1. Análisis bioinformático.	10
2.2.2. Primeras pruebas en cultivos celulares.	11
2.2.3. Experimentos a partir de cepas bacterianas.	11
2.2.4. Purificación mediante cromatografía.	14
2.2.5. Ensayo ELISA.	16
3. RESULTADOS.	17



3.1. Análisis bioinformático.....	17
3.1.1. Análisis de las mutaciones de la cepa vacunal de Myxoma <i>virus</i> con respecto a la cepa de referencia.....	17
3.1.2. Regiones antigénicas.	19
3.1.3. Regiones transmembrana.	20
3.2. Inducción de genes candidatos y sobreexpresión de sus proteínas.	21
3.2.1. Análisis de los geles de la inducción en volúmenes de 2 y 10 mL de medio LB + kanamicina.	22
3.2.2. Análisis de la solubilidad de las proteínas.....	25
3.3. Resultados de la purificación.	28
3.3.1. Purificación de M029L.....	28
3.3.2. Purificación de M071L.....	30
3.3.3. Purificación de M083L.....	32
3.3.4. Purificación de M115L.....	34
3.4. Resultados de la cuantificación de las proteínas.	37
3.5. Resultados del ensayo ELISA.	37
3.5.1. Muestras control de PBS.	39
3.5.2. M029L.....	39
3.5.2. M083L.....	40
3.5.3. M115L.....	41
4. DISCUSIÓN	42
4.1. Análisis de la sobreexpresión de las proteínas candidatas.	42
4.2. Análisis de la solubilidad de las proteínas candidatas	43
4.3. Análisis de la purificación de las proteínas candidatas.	43
4.4. Análisis de los resultados del ensayo ELISA.	45
5. CONCLUSIONES	47
6. BIBLIOGRAFÍA.	48
ANEXOS	50



1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Myxoma virus.

1.1.1. Taxonomía de *Myxoma virus*

Myxoma virus o virus del mixoma es un agente infeccioso perteneciente al género *Leporipoxvirus*, situado en la subfamilia *Chordopoxvirinae* dentro de la familia Poxviridae [Cameron et al, 1999]. Al igual que el resto de Poxvirus, *Myxoma virus* se caracteriza por presentar un genoma de gran tamaño con ADN de doble cadena, así como una morfología compleja y envoltura [Cameron et al, 1999]. Además, su replicación tiene lugar en el citoplasma de las células infectadas, teniendo la capacidad de evadir o interrumpir los factores clave en la respuesta antiviral de su huésped [Herrero, 2016]

1.1.2. Estructura y genoma de *Myxoma virus*.

Los viriones de *Myxoma virus* presentan una morfología de ladrillo y unas dimensiones de aproximadamente 250 nanómetros de diámetro, 300 nanómetros de longitud y 200 nanómetros de altura, a lo que se suma la presencia de dos estructuras denominadas cuerpos laterales en su superficie, habituales de los Poxvirus. [Griffiths et al, 2001]

En lo que respecta a su genoma (Fig.3), este posee una longitud de 161, 8 kb, con un alto contenido de GC (aproximadamente un 40 %) y secuencias redundantes repetidas en ambos extremos. En su longitud total, codifica para 171 marcos de lectura abiertos (en inglés *open reading frame* u ORF) con potencial de ser transcritos a ARN y posteriormente traducidos a proteínas [Cameron et al. 1999]. De esos 170 marcos de lectura, se distinguen entre 159 marcos que se corresponden a la región central del genoma de *Myxoma virus* y que abarca desde el gen M009L hasta el M156R (incluyendo a ambos). En esta región se hallan todos los genes fundamentales del virus. [Cameron et al, 1999]. También presenta 12 marcos adicionales que se duplican en secuencias de repeticiones invertidas (en inglés, *inverted terminal repeats*, ITRs) que son cadenas sencillas de nucleótidos seguidas de su complemento inverso y que contienen genes no esenciales para la replicación viral pero que podrían estar



implicados en la historia evolutiva del virus de una forma que todavía no se conoce del todo [Kerr, 2013].

1.2. La mixomatosis.

La mixomatosis es una enfermedad infecciosa descubierta por primera vez en Uruguay a primeros del siglo XIX, si bien no se identificaría a su causante como un Poxvirus hasta 1927. Aunque *Myxoma virus* tiene la capacidad de infectar in vitro células de diferentes especies de lagomorfos y ardillas, e incluso de primates como el chimpancé o células cancerosas en el ser humano [Spiesschaert et al, 2011], lo cierto es que en lo que respecta al desarrollo de la enfermedad es muy específico, pues solo es capaz de eludir la respuesta inmune de ciertas especies de conejo [Rodríguez et al, 2006] como el conejo de cepillo norteamericano (*Sylvilagus bachmani*), el tapetí de la jungla (*Sylvilagus brasiliensis*) o el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*). Además, en los últimos años, se han detectado casos de infecciones por *Myxoma virus* en la liebre europea (*Lepus europaeus*) [Barlow et al, 2014] y en la liebre ibérica (*Lepus granatensis*) [Dalton et al, 2019]

1.2.1. Transmisión e infección de la mixomatosis.

La propagación de la mixomatosis se produce principalmente a través de vectores intermediarios como la pulga y el mosquito, artrópodos parasitarios del conejo europeo, quienes ingieren el virus al tomar la sangre de sus huéspedes [Fenner et al, 1965], siendo capaz de transmitirlo a otros individuos de la especie. Sin embargo, esta no es la única vía de transmisión, pues la mixomatosis también puede infectar por contacto directo (bien a través de las fosas nasales o bien a través del tejido conjuntivo) con el tejido un individuo enfermo o a través del contacto con superficies u objetos inanimados que se hallen contaminados por el virus [OIE, 2018]. Durante el proceso de infección, *Myxoma virus* es capaz de evadir la respuesta inmune del hospedador sintetizando diversas proteínas que son capaces de unirse al complejo de inflammasoma activador de la caspasa-1. De este modo, *Myxoma virus* es capaz de inhibir la actividad de las caspasas de las células anfitrionas y por tanto su apoptosis [Mahy et al, 2008]. También pueden actuar como imitadores de receptores del factor de necrosis tumoral (en inglés,



tumoral necrosis factor, TNF) reduciendo así la respuesta inmune natural del huésped [Mahy et al, 2008].

1.2.2. Cuadro clínico.

La enfermedad presenta un periodo de incubación de entre 2 y 10 días antes de la aparición de los primeros síntomas que comienzan con una inflamación del borde de los párpados (blefaritis) dificultando la visión del animal [Sobey, 1975]. Y prosiguiendo con la aparición de tumefacciones y nódulos cutáneos, los cuales se propagan desde el foco de infección hasta otras zonas del cuerpo, especialmente la cabeza y los genitales. En el resto de la cabeza la inflamación alrededor de los ojos suele evolucionar en conjuntivitis o incluso ceguera en casos extremos, mientras que en los genitales se desarrollan lesiones cutáneas secundarias como edemas [Martín Carrillo, 2018] que conllevan el desarrollo de fiebre, así como otros síntomas como apatía y pérdida de apetito [OIE, 2018]. También pueden venir acompañadas de un fuerte descenso de la fertilidad en machos y un mayor número de abortos en hembras [Gurri, 1996]. En etapas finales de la infección tiene lugar una fuerte inmunosupresión que favorece la aparición de infecciones de carácter bacteriano, las cuales provocan un cuadro similar a la neumonía que acaba llevando a la muerte aproximadamente entre 8 y 12 días después de la infección [Carrillo, 2018]. La tasa de mortalidad era de aproximadamente un 90 % en los primeros casos de mixomatosis. Sin embargo, la supervivencia y posterior reproducción de individuos resistentes ha hecho que en algunas poblaciones la mortalidad haya descendido hasta el 50 % con el paso de las generaciones [Silvers et al, 2006].

1.3. Control y vacunación contra *Myxoma virus*.

1.3.1. La importancia de la mixomatosis.

La mixomatosis supone un asunto de elevada importancia debido a las pérdidas económicas que supone para las granjas de conejos en toda Europa a causa de brotes de mixomatosis entre sus poblaciones de conejos europeos [Jiménez Rubio et al, 2016], así como la alteración de las cadenas tróficas de las cual forma parte el conejo europeo, ya que especies como el águila imperial o el lince ibérico, depredadoras naturales de *Oryctolagus cuniculus*, ven mermada su cantidad de alimento [Delibes et al, 1978].



Debido a la ausencia de un tratamiento efectivo contra la mixomatosis (únicamente se pueden utilizar antiinflamatorios y antibióticos para tratar de evitar las infecciones secundarias producidas por bacterias) la vacunación es la mejor opción como herramienta de prevención, complementadas por medidas de higiene [OIE, 2018].

1.3.2. Vacunación.

Con respecto a las vacunas desarrolladas contra la mixomatosis, existen dos tipos diferentes basadas en la utilización de cepas atenuadas de *Myxoma virus* o de otra especie del género *Leporipoxvirus* (como el virus de fibroma de conejo). En ambos casos la vacuna no puede desarrollarse a partir de virus muertos pues es necesario que este pueda replicarse y generar nuevos viriones en las células del hospedador.

1.3.2.1. Vacunas con cepas atenuadas de *Myxoma virus*.

Las vacunas con cepas vivas atenuadas suelen ser las más efectivas, si bien presentan el riesgo de que la protección que generan resulte ineficaz. Además, pueden causar efectos secundarios que, en el peor de los casos, conduzcan al conejo a la inmunosupresión, haciéndole igualmente propenso a otras infecciones secundarias [Marlier et al, 2010].

1.3.2.2. Vacunas con otros virus.

Debido a su importancia, *Myxoma virus* es un agente infeccioso detalladamente estudiado, compartiendo grandes similitudes con otros *Leporipoxvirus* como el virus de fibroma de conejo, el cual ha sido empleado para desarrollar vacunas contra la mixomatosis. Sin embargo, este tipo de vacunas no proporcionan una protección a largo plazo, pues su efecto no es permanente [Marlier et al, 2010] y se requiere la administración de nuevas dosis cada cierto tiempo para controlar los brotes de mixomatosis en las granjas habilitadas para la cría de conejos, los cuales siguen siendo frecuentes [Marlier et al, 2010].

1.3.2.3. Avances y nuevas estrategias en la vacunación.

En los últimos años, se han elaborado diferentes estudios en busca de cepas recombinantes de *Myxoma virus* de las cuales se han eliminado genes esenciales capaces de inducir la infección sistémica, permitiendo de ese modo ser capaces de



replicarse en el hospedador sin causar la enfermedad, una estrategia de vacunación empleada con muchos virus [Spiesschaert et al, 2011]

Además, también se está investigando la posibilidad de trabajar con nuevas estrategias, como por ejemplo desarrollar vacunas marcadas que permitan generar anticuerpos característicos. [Ryder et al, 2015].

1.4. Diagnóstico.

1.4.1. Metodología del diagnóstico de *Myxoma virus*.

Aunque los signos clínicos de la mixomatosis suelen ser claros y bien definidos, las infecciones bacterianas u otras enfermedades causadas por virus similares (como el virus de fibroma de conejo) pueden inducir confusión o errores en el diagnóstico [OIE, 2018]. Usualmente el diagnóstico de la mixomatosis puede hacerse con facilidad en el caso de las formas clásicas de la enfermedad, sin embargo, el diagnóstico de la mixomatosis en sus formas atenuadas o atípicas (amixomatosas) puede resultar una labor mucho más complicada que requiere de la identificación y aislamiento del virus o bien de la realización de pruebas serológicas [OIE, 2018].

1.4.1.1. La identificación del agente.

Para el reconocimiento del virus, usualmente se hace uso de muestras de mixomas en párpados, de la mucosa genital o de órganos internos. Las técnicas de identificación son variadas, incluyendo la microscopía electrónica, la histopatología y el cultivo celular. Las técnicas de cultivo viral requieren el empleo de líneas celulares adecuadas, como por ejemplo las RK-13 (Rabbit Kidney) obtenidas a partir de muestras de riñón de conejo [OIE, 2018].

1.4.1.2. Pruebas serológicas.

La infección causada por *Myxoma virus* viene acompañada con una respuesta inmunitaria fuerte y adaptativa en la cual el hospedador produce anticuerpos de dos tipos: IgM e IgG. [OIE, 2018]. Los niveles de IgM comienzan a incrementarse a los 5 o 6 días del comienzo de la infección, pudiendo detectarse durante los 30 o 40 días posteriores, mientras que los niveles de IgG alcanzan su pico a los 20



o 30 días, y puede seguir detectándose hasta 2 años después de la infección [OIE, 2018]. Debido a ello, la serología es muy útil en diferentes aplicaciones, como demostrar ausencia de infección en individuos o poblaciones, confirmar casos clínicos o determinar el estado inmunitario tras la vacunación. Se han desarrollado técnicas de serología como la prueba de inmunofluorescencia directa o la prueba de fijación de complemento, sin embargo, estas no son recomendables debido a que presentan una baja sensibilidad [Kerr, 1997]. Sin embargo, las pruebas de diagnóstico más frecuentes y eficaces son los ensayos ELISA [Gelfi et al, 1999], cuyo rendimiento y los resultados han sido mucho mejores que otros métodos serológicos.

1.4.1.3. Los ensayos ELISA en *Myxoma virus*.

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA se basa en un proceso de reconocimiento entre anticuerpo y antígeno de forma selectiva y específica. Dicha interacción puede visualizarse mediante enzimas enlazadas a antígenos o a anticuerpos secundarios y sirve para detectar la presencia de anticuerpos.

Para el diagnóstico de *Myxoma virus* se han desarrollado ELISA indirectos que depositan el antígeno directamente en la fase sólida [Kerr, 1997; Gelfi, 1999] o bien un ELISA de competición en el cual se utiliza un marcador de anticuerpo (1E5) que reconoce de forma específica la proteína de la envoltura IMV- marco abierto de lectura M071L [OIE, 2018]. Tal y como se ha mencionado antes, ambos métodos son más eficaces que otro tipo de técnicas serológicas de diagnóstico, si bien su especificidad y sensibilidad varía en función de las condiciones de cada laboratorio [OIE, 2018]. Estos modelos de ELISA, al igual que los ELISA comerciales actuales para el diagnóstico de *Myxoma virus*, utilizan el virus completo como antígeno, lo cual suele requerir un proceso difícil y costoso tanto en tiempo como en recursos, además de la necesidad de trabajar en condiciones de bioseguridad.

1.4.2. Nuevos métodos de diagnóstico.

Si bien los ensayos ELISA que utilizan la cepa completa de *Myxoma virus* como antígeno han probado resultar eficaces, la posibilidad de optimizar los recursos



económicos, así como utilizar metodologías más asequibles y seguras ha abierto la posibilidad a desarrollar ensayos ELISA alternativos que no requieran del virus completo como antígeno [García et al, 2013].

1.4.2.1. Las proteínas recombinantes.

Una de las alternativas a la hora de realizar el diagnóstico mediante un ELISA consiste en reemplazar el virus completo por una selección de varias proteínas recombinantes que puedan actuar como antígenos. Dichas proteínas son codificadas a partir de un gen que puede clonarse mediante su introducción en un plásmido bacteriano insertado en un hospedador bacteriano que posteriormente se divide, obteniendo de este modo una gran cantidad de proteína [García et al, 2013].

1.4.2.2. Pruebas de diagnóstico con proteínas recombinantes.

Este procedimiento ha probado ser eficaz en estudios realizados para el diagnóstico de otros Poxvirus, en particular con las especies pertenecientes a *Capripoxvirus*. En 2012, se realizaron pruebas de diagnóstico a partir de la expresión en *Escherichia coli* y posterior purificación de las proteínas recombinantes F13L y P32 de *Goatpoxvirus* [Kumar et al, 2019], que demostraron que podían utilizarse como antígenos potenciales tanto de forma individual como combinada para elaborar un diagnóstico serológico de infecciones producidas por *Goatpoxvirus* [Kumar et al, 2012]. En 2016, otro estudio probó la inmunogenicidad de las proteínas estructurales SPPV-ORF 060, SPPV-ORF 095, SPPV-ORF 117 y SPPV-ORF 122 de *Sheep poxvirus* en células de riñón de oveja, siendo el primer informe realizado con este virus que demostraba dicha actividad [Taylakova et al, 2016].

Ambos ensayos son un buen ejemplo de que el uso de proteínas recombinantes supone una ventaja muy importante en el desarrollo de futuros ELISA pues permite que estos no solo puedan ser más seguros y específicos, sino que pueden desarrollarse sin necesidad de cultivar el virus necesitando únicamente la secuencia génica.



1.5. Objetivos del proyecto.

Considerando la ventaja que supone el uso como antígeno de proteínas recombinantes en lugar de la cepa completa del virus y teniendo en cuenta los estudios previos con otros Poxvirus, el objetivo principal de este proyecto consiste en la elaboración de una prueba de diagnóstico ELISA utilizando proteínas recombinantes producidas por genes previamente seleccionados de *Myxoma virus*, con el posterior análisis acerca de su especificidad y efectividad. Además, durante el proyecto se cumplimentarán objetivos secundarios durante cada una de sus etapas y que desempeñarán un papel clave en los experimentos, los cuales son:

- La correcta selección de los genes que codifiquen para las proteínas que puedan actuar como antígenos en la detección y diagnóstico de *Myxoma virus*, así como el análisis de dichos genes, incluyendo sus mutaciones en cepas vacunales y regiones antigénicas, mediante el uso de técnicas bioinformáticas.
- La selección y diseño de un plásmido que pueda servir como vector para la clonación de los genes de interés y la obtención de las proteínas.
- La sobreexpresión y purificación de dichas proteínas en concentraciones suficientes para poder realizar la prueba ELISA.

2. MATERIALES Y METODOLOGÍA.

2.1. Materiales.

2.1.1. Programas de análisis bioinformático.

La parte bioinformática del proyecto requirió de la aplicación Blast del NCBI (National center for Biotechnology Information) y del programa UGene para los alineamientos de la secuencia de aminoácidos de los genes candidatos para el ELISA. Los análisis de las regiones antigénicas y transmembrana se realizaron utilizando el programa Emboss (European Molecular Biology Open Software Suite).



2.1.2. Cepas virales.

Se utilizó la cepa de referencia Lausanne de *Myxoma virus* con $2,8 \times 10^6$ ufp/mL y una multiplicidad de infección o moi (el número de genomas virales que infectan una célula) de 0,05 durante todo el proyecto.

2.1.3. Línea celular.

Se usaron células de la línea celular RK-13 (Rabbit Kidney) ATCC CCL-37 epiteliales de riñón de *Oryctolagus cuniculus* durante los experimentos.

2.1.4. Medios de cultivo.

El medio utilizado durante las pruebas iniciales en cultivos celulares fue el DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) de Thermo Fisher Scientific suplementado con suero fetal bovino (en inglés, *fetal bovine serum*, FBS) al 10 %, penicilina/estreptomicina, gentamicina y anfotericina. Las células cultivadas en dicho medio fueron mantenidas en un incubador a 37 ° C y un nivel de CO₂ del 5 %. Para el cultivo de *E. coli* se utilizó medio LB (Luria-Beltani) con 1,5 % de agar para las placas de cultivo y kanamicina (concentración: 50µg/mL) como antibiótico para la selección de transformantes.

2.1.5. Tampones.

Se utilizaron diferentes tampones durante los experimentos, incluyendo tampón fosfato salino o PBS (NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 Mm y Na₂HPO₄ 5,1 mM) para la preparación de las soluciones de bloqueo o para la realización de lavados cuando fueron necesarios. Para la electroforesis de los geles de acrilamida se utilizó tampón corredor o de migración 1X (25mM Tris; 190mM glicina; 0,1% SDS a pH 8,3). Para la transferencia de los geles a membranas de nitrocelulosa se utilizó tampón de transferencia 10X (Metanol 20 %, tampón de transferencia 1X con 25mM Tris y 190mM Glicina y agua destilada). Por último, para las soluciones con anticuerpos primarios y secundarios se utilizó PBS con 0,05 % de Tween 20.



2.1.5. Microorganismos.

Los genes de las proteínas candidatas fueron expresados en la cepa bacteriana de *Escherichia coli* BL-21 con genotipo F^- , *ompT*, *hsdSB* (rB^- , mB^-), *dcm*, *gal*, $\lambda(DE3)$, *pLysS*, *Cmr*.

2.1.6. Vectores.

Para la amplificación de proteínas recombinantes se encargaron las construcciones a una empresa externa a partir de un diseño modificado del plásmido pUC28a.

Para la sobreexpresión de las proteínas de los genes candidatos, se utilizó el plásmido comercial pET28 a(+)

2.2. Metodología.

2.2.1. Análisis bioinformático.

A partir de la recopilación de información bibliográfica y basándose en estudios previos con otros poxvirus en genes homólogos, se realizó una lista provisional de 12 genes candidatos que posteriormente se redujeron a 5 como potenciales genes codificantes de proteínas capaces de proporcionar un resultado eficaz en el ensayo ELISA diseñado para el diagnóstico del virus Myxoma.

2.2.1.1. Análisis de mutaciones.

Para una correcta evaluación de los genes candidatos, se realizó un análisis de las mutaciones de una cepa vacunal de *Myxoma virus* con respecto a la cepa de referencia para determinar si dichos genes podrían verse afectados, así como comprobar si las regiones afectadas por la mutación se encuentran muy conservadas, así como si el resto de los genes presentan un alto grado de homología.

2.2.1.2. Análisis de regiones antigénicas y transmembrana.

Mediante el programa EMBOSS de EMBNet, se realizó una búsqueda de las regiones antigénicas de cada gen candidato en busca de zonas de reconocimiento y unión de los anticuerpos. Por último, con ayuda del programa



Transmembrane Helix Hidden Markov Model (TMHMM) de DTU Bioinformatics (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) se localizaron las regiones transmembrana (zonas de las proteínas codificadas por los genes candidatos que atraviesan la bicapa y que podrían suponer problemas de detección durante la elaboración del ELISA) con el fin de eliminarlas.

2.2.2. Primeras pruebas en cultivos celulares.

Se realizó un experimento inicial que consistió en la multiplicación del virus Myxoma completo a partir de cultivos celulares infectando células RK-13. Para ello, a partir de un T75 confluyente (aproximadamente 1×10^6 células/mL) se prepararon 2 frascos T75, uno para servir como Stock de futuros experimentos y otro para elaborar la infección. Ambos T75 se dejaron incubar durante 2 días a 37 °C. Una vez el T75 alcanzó una confluencia del 85-90 %, se sembró una placa de cultivo de 6 pocillos con 1/5 del contenido (2 ml) y se llevó a un volumen final de 12 ml con DMEM, sembrando 2 ml en cada pocillo de la placa. Sin embargo, debido a que tras 3 intentos no se consiguieron obtener resultados, se decidió prescindir de experimentos con cultivos celulares y proseguir el proyecto utilizando plásmidos y cepas bacterianas, lo cual presenta ciertas ventajas tales como la mayor seguridad y la no necesidad de cultivar el virus completo.

2.2.3. Experimentos a partir de cepas bacterianas.

2.2.3.1. Inducción y sobreexpresión de las proteínas de los genes candidatos.

Inducción en volumen de 2 ml.

Una vez descartados los cultivos del virus, se procedió a la sobreexpresión mediante el uso del plásmido PET28a+ introducido en la cepa bacteriana de *E. coli* BL-21 DE3. Esta cepa contiene el profago λ DE3 que transporta el gen de la T7 RNA Polimerasa, el cual permite la expresión de genes que se encuentran bajo el control de promotores T7, presente en el plásmido PET28 a+ (ver apartado 1 del anexo I).

Se prepararon placas a partir de 200 ml de LB con agar 1,5 % suplementado con 200 μ L de kanamicina 50 mg/ml para sembrar 12 placas (2 por cada gen candidato y una a modo de reserva para todos los genes). A continuación, se



mezclaron las muestras de ADN con el medio LB y se conservaron en hielo durante 30 minutos. Después se pusieron a 42 °C durante 45 segundos y de nuevo 2 minutos en hielo. Después se inocularon durante 1 hora en 500 ml de medio LB sin antibiótico para recuperarse del choque térmico. A continuación, se sembraron 100 µL de la muestra correspondiente en la placa y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Una vez hubieron proliferado, se procedió a realizar la inducción con isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido, o IPTG (concentración: 200mM). El IPTG funciona como un buen inductor ya que activa la expresión del promotor T7 a partir de la inactivación del promotor del operón de la lactosa. La inducción permitirá confirmar que las colonias expresan los genes candidatos de interés. Para tal fin, se prepararon 10 tubos con 2 ml de medio con kanamicina. Por cada placa se sembraron 2 tubos (2 tubos por gen) denominados A y B, y se transfirió una muestra de cada placa a una única placa nueva a modo de copia de seguridad. Las muestras se dejaron en agitación durante 2 horas a 37 °C. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 4 µL de IPTG 0,1 M a cada tubo y se dejaron inducir en agitación a 37 °C durante 1 hora. Después, el contenido se transfirió a tubos eppendorf y se centrifugaron durante 5 minutos a 13000 rpm con una centrífuga 24X1.5/2ml Laboratory Benchtop High Speed Centrifuge Se eliminó el sobrenadante y se congelaron las muestras hasta el día siguiente.

Para comprobar qué colonias expresan los genes de interés, se realizó una electroforesis en gel de acrilamida 12 %. Para ello, los pellets se resuspendieron en 75 µL de agua y 25 µL de tampón de disociación 4X (Tris 0,5M pH 6,8; SDS 10 % 0M125 M, 2-mercaptoetanol 25 %; glicerol 25 % y azul de bromofenol 0,1 mg/mL.). El mercaptoetanol del tampón permite romper los puentes disulfuro y reciclar los grupos hidroxilo favoreciendo la solubilidad de las proteínas, mientras que el SDS actúa como agente desnaturizante.

Antes de cargar las muestras en el gel, se sometieron a un baño a 90 °C durante 5 minutos y a una posterior centrifugación a 13000 rpm. A continuación, se cargaron las calles de gel en el siguiente orden y con las siguientes muestras: 3 µL de marcador PageRuler™ Prestained NIR Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific utilizado para muestras preteñidas, 5 µL de una muestra sin inducir



para ser utilizada como blanco y 5 μ L de muestra de cada uno de los tubos inducidos (M029La, M029Lb, M071La, M071Lb, M083La, M083Lb, M115La, M115Lb, M141Ra, M141Rb).

Se realizó la electroforesis a 150 voltios en 350 ml de tampón corredor 1X durante una hora. A continuación, se realizó una tinción con azul de Coomassie (15 % etanol, 10 % ácido acético 0,25 % azul brillante y 45 % H₂O) de Thermo Fisher Scientific en agitación durante 15 minutos y luego se aplicó una solución de desteñir (88 % H₂O, 7 % ácido acético y 5 % metanol)

Inducción en volumen de 10 mL

Una vez evaluado el gel (ver el apartado resultados) se repitió la prueba con un volumen mayor para obtener una mayor cantidad de proteína. Los pasos de preparación de las muestras fueron similares a los descritos en el apartado anterior, con la diferencia de que en esta ocasión se prepararon 6 tubos inducidos con IPTG (uno por cada uno de los genes de las proteínas de interés: M029L, M071L, M083L, M115L y M141R) y un control sin inducir (en este caso, el M071L). En esta ocasión, el análisis del gel en el cual se cargaron las muestras se realizó mediante la prueba de Western-Blot, para la cual se dispuso el gel (junto con una membrana de nitrocelulosa Amersham™ Protran™ de GE Healthcare y 6 membranas de transferencia de Fluoruro de polivinilideno EMD Millipore Immobilon™-P de Merck Millipore) en el aparato de transferencia Semi-dry western blot transfer unit a 100 miliamperios durante 30 minutos. Una vez la proteína se hubo transferido a la membrana, se añadieron 50 mL de solución de bloqueo 5 % de leche (2,5 g de leche en polvo disueltos en 50 mL de PBS pH 7,4) y se dejó en agitación durante una hora. Concluido el bloqueo, se retiró la solución y se añadieron 12 ml de PBS-Tween (0,05 % de Tween 20 de Thermo Scientific) con 0,5 % de leche a los que previamente se les habían añadido los anticuerpos primarios Monoclonal Anti-6X His tag SAB2702218 de Sigma Aldrich y Anti-Myxo 418-3 tc-401 (1:1) en diluciones 1 en 3000 y 1 en 500, respectivamente. Se dejó en agitación durante una hora y a continuación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween dejando 5 minutos en agitación en cada



uno de ellos. Después, se añadieron 20 ml de PBS-Tween con una dilución 1 en 20000 de los anticuerpos secundarios IRDDye 680 CW anti-rabbit y IRDDye 800 CW anti-mouse, los cuales presentan una visibilidad de longitud de onda de 700 nm (en rojo) y 800 nm (en verde) y se dejó una vez más en agitación durante una hora. Por último, se realizaron 3 lavados adicionales (de 5 minutos cada uno) con PBS-Tween y se procesó la membrana con un escáner para la obtención de imágenes a partir del programa ImageStudio.

Determinación de la solubilidad de las proteínas.

Los pellets de 10 ml congelados en la prueba anterior se sometieron a un proceso de sonicación, para el cual: se añadieron 3 ml de tampón de lisis (Imidazol 10mM, lisozima 50ng/ml y DNAsal 5u/mL) a cada muestra y se dejaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se sonicaron las muestras mediante la aplicación de 3 pulsos de 2 minutos (20 segundos ON + 20 segundos OFF) a 20 % amp utilizando un Ultrasonic Cell Disruptor Homogenizer BJED-201200 de Beijing ultrasonic. Sonicadas las muestras, se centrifugaron durante 30 minutos a 18000 rpm y 4 °C con una centrífuga Allegra 64R Benchtop Centrifuge. Después, se recolectaron por separado el pellet (fracción soluble) y el sobrenadante (fracción insoluble). Por último, para confirmar la existencia de proteína en la fracción soluble, se cargaron muestras de cada proteína, procedentes tanto del pellet como del sobrenadante, en dos geles que luego fueron procesados mediante una tinción con azul de Coomassie y una prueba Western-blot, respectivamente.

2.2.4. Purificación mediante cromatografía.

Todas las fracciones solubles de las proteínas candidatas se sometieron de forma individual a un proceso de purificación que consistió en los siguientes pasos: primero, se preparó una columna de purificación empaquetándola con 300 µL de resina Chelating Sepharose Fast Flow de GE Healthcare y se realizaron dos lavados con 3 ml de agua desionizada. Después se cargó la matriz con 3 mL de cloruro de níquel (NiCl₂) 300 mM disuelto en PBS y se realizó un lavado adicional con 3 mL de agua desionizada. Antes de añadir el extracto de



proteína, se equilibró la columna con 3 mL de buffer de lavado con Imidazol 50 mM a pH 7,4 antes de añadir el extracto a purificar. A continuación, se añadió el extracto que contenía la proteína de interés a ser purificada y se taponó la columna. Se dejó interactuar con la matriz durante una hora en la noria a 4 °C.*

**Nota: a partir de este punto se recogieron en cada paso las diferentes muestras que salían de la columna en tubos Eppendorf de 2mL.*

Concluida la interacción, se recogió la muestra que no quedó pegada a la columna y se realizaron 3 lavados con 3mL de buffer de lavado con Imidazol 50mM y se eluyó la proteína 5 veces (3 con volúmenes de 1 mL y 2 con volúmenes de 0,5 mL) utilizando buffer de elución con Imidazol 250mM. Como paso final, se resuspendió la matriz con 1 mL de buffer de elución con Imidazol 250 mM. En total se obtuvieron 11 muestras por cada purificación (4 purificaciones): muestra original (Org), muestra no pegada a la columna (nC), muestras de los lavados 1, 2 y 3 (L1-L3), muestras de las 5 eluciones (E1-E5) y por último muestra pegada a la columna (C)

2.2.4.1. Análisis de la purificación de las proteínas.

Por cada proteína purificada, se prepararon 2 geles, uno para la detección mediante tinción con azul de Coomassie y otro para un ensayo Western-Blot. Las calles de ambos geles fueron cargadas con las muestras siguiendo el siguiente orden: 3 µL de marcador PageRuler™ Prestained NIR Protein Ladder de Thermo Fisher Scientific y 5 µL de cada muestra en el orden de la purificación (muestra original (Org), muestra no pegada a la columna (nC), muestras de los lavados 1, 2 y 3 (L1-L3), muestras de las eluciones (E1-E5) y por último muestra pegada a la columna (C)). Una vez se hubo localizado la muestra en la cual se encontraba cada proteína (ver resultados), se procedió a realizar una cuantificación para determinar la cantidad disponible de cada candidata como paso previo para la elaboración del ensayo ELISA.

2.2.4.2. Cuantificación de las proteínas.

La cantidad de proteína presente en cada muestra fue cuantificada mediante el método de Bradford. Para elaborar la recta patrón, se prepararon diluciones de



25, 50, 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estándar de proteína BSA 1mg/ml a los cuales se añadieron 200 μL de Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent de Thermo Fisher Scientific y se llevaron a un volumen final de 1mL con agua destilada. A continuación, las muestras se cargaron en el espectrofotómetro a una absorbancia de 595 nm. A partir de la recta patrón resultante se pudo determinar las concentraciones de las muestras cuantificadas (ver resultados). También se realizaron dos geles, uno para una tinción con Coomassie y otro para un western-blot, en los cuales se cargaron muestras de las tres proteínas candidatas a igual concentración.

2.2.5. Ensayo ELISA

Utilizando una placa 96 WELL, Clear Flat Bottom Corning de Thermo Fisher Scientific, se siguieron los siguientes pasos:

— **Antígenos:** se prepararon diluciones en PBS de 50 ng/mL, 100 ng/mL, 150 ng/mL y 200 ng/mL de cada una de las proteínas candidatas que actuarán como antígenos y se cargaron 100 μL por pocillo (cada muestra por triplicado). Posteriormente, se añadió una solución de bloqueo con 5 % de leche y las muestras se dejaron incubar durante una hora a 37 °C. A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,05 % (200 μL /pocillo) antes de inocular las diluciones en suero.

— **Sueros:** se prepararon tres sueros diferentes a distintas diluciones con PBS-Tween 0,05 %: uno conjugado con el pool de sueros Anti-Myxo en dilución 1/100 para la detección de anticuerpos en las muestras, otro conjugado con el anticuerpo primario Anti-Histag en dilución 1/1000 para actuar como control positivo y un suero en dilución 1/100 procedente de conejo sin anticuerpos para actuar como control negativo. Cada muestra se preparó por triplicado, por lo tanto, el volumen final necesario de cada muestra fue de 300 μL . Finalmente, se cargaron 100 μL por pocillo de dilución en suero y se dejaron incubar nuevamente durante 1 hora y luego se lava de nuevo 3 veces con PBS-Tween al 0,05 % (200 μL /pocillo) antes de añadir los conjugados.

— **Conjugados:** se usaron anticuerpos secundarios conjugados de ratón IRDDye 800 CW anti-mouse y de conejo IRDDye 680 CW anti-rabbit, ambos de LI-COR Biosciences. El anticuerpo de conejo se utilizó con una dilución 1/3000 para los sueros Anti-Myxo y control negativo, mientras que el anticuerpo de ratón se utilizó con una dilución 1/1000 para el Anti-His tag. Una vez añadidos los conjugados, se volvió a incubar la placa durante 1 hora a 37 °C. Finalizada la incubación, se realizaron dos lavados a la placa con PBS-Tween 0,05 % (200 µL/pocillo) y uno con PBS (200 µL/pocillo). Por último, se añadió el sustrato 3-3',5-5'-Tetrametilbenzidina líquida (sustrato peroxidasa) en un volumen de 200µL por pocillo y se dejó en oscuridad durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, se detuvo la reacción con 200 µL de H₂SO₄ 0,18 M y se analizaron los resultados.

3. RESULTADOS.

3.1. Análisis bioinformático.

A partir de la búsqueda de información en el NCBI y en base a estudios en genes homólogos en otros poxvirus, se seleccionaron los siguientes genes candidatos: M029L, M071L, M083L, M115L, M141R (ver tabla 1)

Tabla 1: resumen de los genes candidatos seleccionados.

Listado de genes candidatos			
Gen de MYXV	Homólogo en VACV	Posición	Función
M029L	E3L	29307-28963	Resistencia al IFN
M071L	H3L	68179-67208	Proteína estructural
M083L	x	82636-81779	Proteína de membrana de virión
M115L	A27L	13289-112726	Proteína de fusión/Formación de EEV
M141R	x	137069-137722	Dominio de inmunoglobulina

3.1.1. Análisis de las mutaciones de la cepa vacunal de Myxoma virus con respecto a la cepa de referencia.

El estudio basado en la comparación entre las cepas de referencia y vacunal de Myxoma virus a partir de la secuenciación de la cepa vacunal, la localización de la posición de los genes candidatos en el genoma virus con los datos disponibles del NCBI y la identificación de las regiones afectadas por mutaciones en la cepa vacunal obtuvo los siguientes resultados (ver apartado 1.1 del anexo II):



— 3 genes codificantes de proteínas candidatas mantuvieron la misma secuencia en la cepa de referencia y en la cepa vacunal al no haber mutaciones en las posiciones que ocupan: M029L, M071L y M115L.

— 2 genes codificantes de proteínas candidatas sí presentaron mutaciones en la cepa vacunal: M083L y M141R.

M083L

El análisis a partir de la secuencia FASTA del gen M083L (ver apartado 1.2 del anexo II) permitió la localización de la mutación en la posición 82418, que en la cepa vacunal produce la adición de una citosina. Esto provoca un cambio en el patrón de lectura de los aminoácidos pues conforma un codón diferente a partir del aminoácido posterior a la serina de la posición 72. Por lo tanto, el codón GAA (que codifica para el aminoácido ácido glutámico) se transforma en CGA (que codifica para arginina) teniendo lugar una sustitución. Además, el aminoácido 84 deja de ser un ácido glutámico para transformarse en un codón de parada (TGA) lo que supone que el tamaño de la proteína será menor ya que la traducción se detendrá en ese triplete. Y dando como resultado una proteína mucho más ligera y pequeña de 84 aminoácidos y un peso teórico de 9,54 kDa. En lo que respecta al efecto de la mutación, la reducción del tamaño de la proteína afecta a las regiones antigénicas y transmembrana, provocando su eliminación al ser revocado un fragmento que presenta ambos factores (ver apartados regiones antigénicas y regiones transmembrana).

En el caso de M083L no se ha podido hacer una comparación con proteínas homólogas de otros poxvirus al no existir genes homólogos en ninguno de los virus mencionados con anterioridad, ni siquiera en *Vaccinia virus*.

M141R

El análisis a partir de la secuencia FASTA de la proteína M141R y su comparación con los datos disponibles acerca de las regiones afectadas por mutaciones en la cepa vacunal (ver apartado 1.3 del anexo II), permitió la localización de la mutación en la posición 137225 correspondiente al aminoácido 53 de 218 que en la cepa vacunal produce la delección de una adenina. Esto



provoca un cambio en el patrón de lectura de los aminoácidos pues conforma un codón diferente a partir del aminoácido posterior a la asparagina de la posición 53, sustituyendo el codón AAT por un codón ATA. Además, el aminoácido 57 de 218 deja de ser una isoleucina para transformarse en un codón de parada (TAG) lo que supone que el tamaño de la nueva proteína será de 57 aminoácidos ya que la traducción se detendrá en ese triplete dando como resultado una proteína mucho más ligera y pequeña.

Al comparar la secuencia de la cepa vacunal con proteínas homólogas en Shope fibroma virus (NP_052027.1), Goatpox virus (QEJ79286.1) y Sheeppox virus (NP_659708) (ver apartado 1.4 del anexo II) hay una importante diferencia de tamaño (60 aminoácidos frente a los 219 de la cepa de referencia, los 225 de la proteína homóloga de SFV, los 188 de GPV y los 183 de SPV) con respecto a estas (ver Fig. 9). En la región no eliminada de la cepa vacunal, se encuentran varios aminoácidos conservados como la leucina de la posición 9, las cisteínas de las posiciones 21 y 37, la serina de la posición 41 y toda la secuencia desde los aminoácidos 48 a 52. La mutación del aminoácido 53 afecta a una región conservada, pues esta se mantiene idéntica de la posición 48 a la 54 (ITWKKNNET) en todas las demás proteínas.

Al examinar en la cepa de referencia la región ausente en la cepa vacunal y compararla con las regiones homólogas de SPV y GPV (ver apartado 1.4 del anexo II) se encontró una región conservada en la serina de la posición 86. Por tanto, la mutación de la cepa vacunal afecta a una región conservada entre las posiciones 48 y 54, y la reducción de tamaño de 219 a 57 aminoácidos supone la pérdida de una región conservada en la posición 86.

3.1.2. Regiones antigénicas.

Mediante el uso del programa Emboss, se realizó un análisis sobre las regiones de las proteínas codificadas por los genes candidatos con mayor probabilidad de actuar como lugares de reconocimiento y unión a anticuerpos.



— Para el gen candidato M029L, los resultados indicaron la presencia de cuatro potenciales regiones antigénicas, las cuales se muestran ordenadas de mayor a menor puntuación obtenida en el apartado 1.5.1. del anexo II

— Para el gen candidato M071L, los resultados indicaron la presencia de tres potenciales regiones antigénicas, las cuales se muestran ordenadas de mayor a menor puntuación obtenida en el apartado 1.5.2. del anexo II

— Para el gen candidato M083L, los resultados indicaron la presencia de trece potenciales regiones antigénicas, las cuales se muestran ordenadas de mayor a menor puntuación obtenida en el apartado 1.5.3. del anexo II

— Para el gen candidato M115L, los resultados indicaron la presencia de seis potenciales regiones antigénicas, las cuales se muestran ordenadas de mayor a menor puntuación obtenida en el apartado 1.5.4. del anexo II

— Para el gen candidato M141R, los resultados indicaron la presencia de doce potenciales regiones antigénicas, las cuales se muestran ordenadas de mayor a menor puntuación obtenida en el apartado 1.5.5. del anexo II

3.1.3. Regiones transmembrana.

Utilizando el programa TMHMM se realizó la evaluación de posibles regiones transmembrana ya que es importante su detección y posterior eliminación, pues las regiones transmembrana de las proteínas pueden conducir a un mal plegamiento y por lo tanto generar errores durante el reconocimiento de los anticuerpos. La búsqueda de las regiones transmembrana obtuvo los siguientes resultados (ver apartado 1.6 del anexo II)

— El modelo de predicción obtenido a partir del TMHMM para las proteínas M029L, M115L y M14R señaló que el número de regiones transmembrana predichas es de 0 para los tres casos, por lo que ninguna de las tres proteínas candidatas presentó regiones transmembranales.

— El modelo de predicción obtenido a partir del TMHMM para la proteína del gen M071L señaló que el número de regiones transmembrana es de 2 (posiciones



283-305 y 312-334), mientras que el número esperado de aminoácidos ubicados en hélices transmembrana fue de 45,93. También hubo una región de la proteína situada en el citoplasma, en la posición 306-311. Estos datos coinciden con el número de aminoácidos que conforman ambas regiones transmembrana (22 en ambos casos para un total de 44 aminoácidos ubicados en regiones transmembrana). La probabilidad de encontrar los primeros 60 aminoácidos en regiones transmembrana fue muy próxima a 0, así como la probabilidad de que el extremo N-terminal de la proteína se encontrase en el lado citoplasmático de la membrana puesto que no se encontró en una región transmembrana.

— El modelo de predicción obtenido a partir del TMHMM para la proteína del gen M083L señaló que el número de regiones transmembrana fue de 1 (posición 248-270), mientras que el número esperado de aminoácidos ubicados en hélices transmembrana fue de 22,95. Estos datos coinciden con el número de aminoácidos que conforman la región transmembrana (22). La probabilidad de encontrar los primeros 60 aminoácidos en regiones transmembrana fue muy próxima a 0, así como la probabilidad de que el extremo N-terminal de la proteína se encontrase en el lado citoplasmático de la membrana puesto que no se halló en una región transmembrana.

3.2. Inducción de genes candidatos y sobreexpresión de sus proteínas.

Los genes candidatos se construyeron mediante la eliminación de sus regiones transmembrana para evitar posibles errores de plegamiento y su posterior amplificación mediante el plásmido pUC28a mediante solicitud a una empresa externa. Este tipo de plásmido posee un MCS (*multiple cloning site*) con varios sitios de reconocimiento para enzimas de restricción como EcoRI, BamHI y PstI. A partir de cortar el MCS, se puede introducir el ORF del gen candidato para posteriormente introducirlo en un huésped bacteriano (como *E.coli*) para su multiplicación. Para la inducción de los genes candidatos estos fueron introducidos en el plásmido pET-28a (+) junto con el promotor T7 para permitir la síntesis y expresión de los genes de interés en *Escherichia coli* gracias al

profago Λ DE-3 que transporta el gen de la T7 RNA Polimerasa (ver Fig. 16). El plásmido fue construido a partir del diseño comercial de pET-28a (+) modificado con el programa GenScript (ver apartado 2.1 del anexo II). Dicho plásmido fue sometido a una optimización de codones para favorecer su expresión en *Escherichia coli*.

3.2.1. Análisis de los geles de la inducción en volúmenes de 2 y 10 mL de medio LB + kanamicina.

Para determinar si las proteínas analizadas en los geles presentaban el tamaño esperado, previamente se calculó el peso de cada una de ellas mediante la herramienta Protein Molecular Weight de Bioinformatics con el fin de obtener el tamaño esperado de las proteínas candidatas en los resultados (ver apartado 2.2. del anexo II)

3.2.1.1. Prueba de sobreexpresión a pequeña escala (2mL)

El proceso de sobreexpresión de las proteínas candidatas siguió los pasos mencionados en el apartado material y métodos: a partir de las colonias de las placas de LB con agar + kanamicina se prepararon muestras de 2 mL que se sometieron a un procedimiento de inducción con IPTG 0,1 M y una posterior comprobación de los resultados mediante una electroforesis en gel de acrilamida 12 % y una tinción de dicho gel con azul de Coomassie. La prueba se realizó en un volumen de 2 mL debido a la necesidad de comprobar la viabilidad del experimento en una prueba a una escala más pequeña.

Los resultados obtenidos en el gel sometido a la tinción con azul de Coomassie mostraron multitud de bandas en todas las calles. Sin embargo, varias parejas de calles (representantes de la misma proteína) mostraron una banda de proteína más intensa que corresponde con la proteína sobre expresada tras la inducción (ver Fig. 1):

— Las calles III y IV, correspondientes a las colonias M029La y M029Lb mostraron una banda más intensa con un tamaño de entre 11 y 15 kDa que corresponde con el peso teórico de la proteína (12,81 kDa)

- Las calles V y VI correspondientes a las colonias M071La y M071Lb mostraron una banda más intensa con un tamaño de entre 34 y 43 kDa que corresponde con el peso teórico de la proteína (36,85 kDa)
- Las calles VII y VIII correspondientes a las colonias M083La y M083Lb mostraron una banda más intensa con un tamaño cercano a 34 kDa que corresponde con el peso teórico de la proteína (32, 26kDa)
- La calle X correspondiente a las colonias M115Lb mostró una banda más intensa con un tamaño cercano a 26 kDa que corresponde con el peso teórico de la proteína (21, 59kDa). Cabe señalar que en el caso del M115La, la nula visibilidad de proteína en el gel utilizado para la tinción de Coomassie no se debió a una falta de inducción, sino que no se seleccionó correctamente la muestra debido a un error de pipeteo que provocó que no hubiese crecimiento de la colonia.
- Las calles XI y XII correspondientes a las colonias M141Ra y M141Rb mostraron nula sobreexpresión en la colonia a y una muy ligera sobreexpresión en la colonia B, con un tamaño de entre 15 y 26 kDa que corresponde con el peso teórico de la proteína (23,70 kDa).

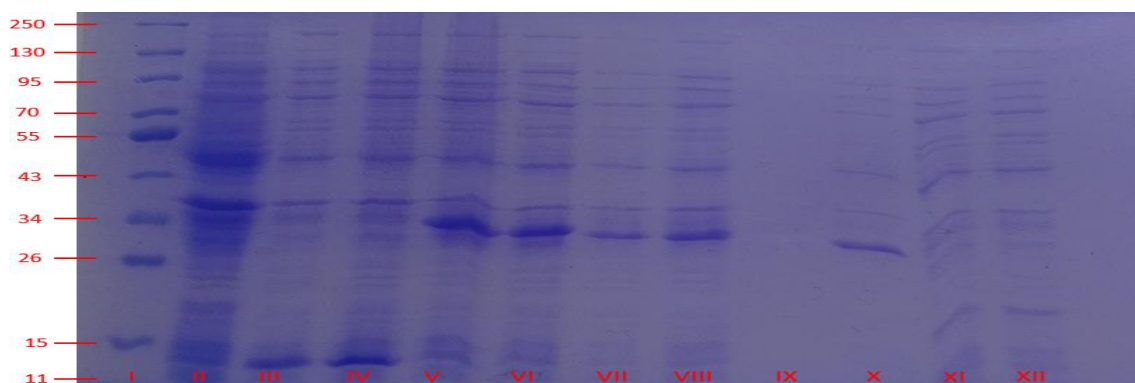


Fig. 1: Imagen correspondiente a la tinción con azul de Coomassie al gel realizado con las muestras obtenidas a partir de la inducción en 2 mL de medio LB de los genes codificantes de las proteínas candidatas. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo (I: PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: control sin inducir III: M029La (inducida) ; IV: M029Lb (inducida); V: M071La (inducida); VI: M071Lb (inducida):: VII: M083La (inducida); VIII: M083Lb (inducida); IX: M115La (no inducida) X: M115Lb (inducida); XI: M141Ra (inducida); XII: M141Rb (inducida)).

Por tanto, los resultados obtenidos a partir del experimento a pequeña escala mostraron que hubo sobreexpresión en al menos una colonia de todas las

proteínas, concretamente en todas las denominadas como “b” (M029Lb, M071Lb, M083Lb, M115Lb, M141Rb).

3.2.1.2. Prueba de sobreexpresión en 10 mL

Se repitió el experimento de inducción del apartado anterior, pero en esta ocasión utilizando un volumen de 10 mL. Se cargó una muestra sin inducir y una muestra inducida de cada proteína candidata, ambas obtenidas de la colonia “b” correspondiente. En esta ocasión el análisis de los geles se realizó con un Western-Blot utilizando pool de sueros mezclados 418-3 tc-401 (1:1) Anti-myxo y Monoclonal Anti-6X His tag antibody conjugados con anticuerpo secundario 680 IRDDye CW anti-rabbit y IRDDye 800 CW anti-mouse respectivamente.

Los resultados no se ajustaron a lo esperado utilizando el pool de suero Anti-Myxo (ver Fig. 2), únicamente se detectaron dos bandas con gran cantidad de proteína en las calles V y IX, correspondientes a las muestras inducidas de M071L (con un tamaño cercano a 34 kDa) y M115L con un tamaño de entre 26 y 34 kDa). En el caso de M071L se ajusta a su peso teórico (36,85 kDa), pero en el caso de M115L su tamaño es mayor que el esperado (21,59 kDa).

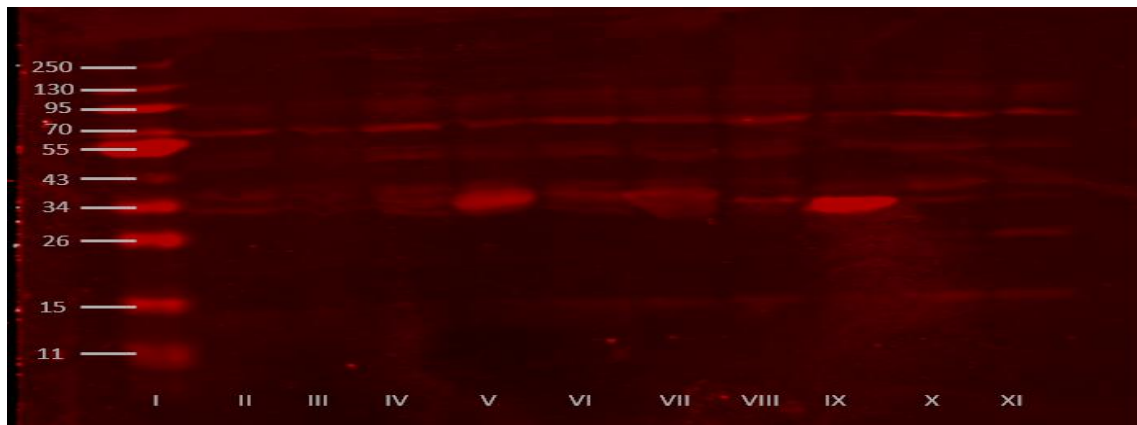


Fig. 2: imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de las muestras de colonias bacterianas contenedoras de los genes que codifican las proteínas candidatas e inducidas en un volumen de 10 mL tratada con el pool de suero 418-3 tc-401 (1:1) Anti-myxo y conjugada con anticuerpo secundario IRDDye 680 CW anti-rabbit. (I: PageRuler Prestained NIR Protein Ladder. II: M029L (no inducida) ; III: M029L (inducida); IV: M071L (no inducida); V: M071L (inducida); VI: M083L (no inducida); VII: M083L (inducida); VIII: M115L (no inducida) ;IX: M115L (inducida); X: M141R (no inducida); XI: M141R (inducida))

Los resultados obtenidos utilizando el Anti Histag (ver Fig. 3) ofrecieron más información. Además de aparecer las mismas bandas y en los mismos tamaños que en la prueba con el pool de suero Anti-Myxo en las calles V y IX

(correspondientes a las muestras inducidas de M071L y M115L) apareció una banda con un tamaño cercano a 15 kDa en la calle III correspondiente a la muestra inducida de M029L y que coincide con su peso teórico (12, 81 kDa). También se apreciaron bandas con un tamaño cercano a 26 kDa en las calles X y XI correspondientes a las muestras sin inducir e inducidas de M141R que coinciden con su peso teórico de 23,70 kDa. Por último, en las calles VII y VIII de las muestras sin inducir e inducida de M083L se apreciaron bandas más intensas de proteína en un tamaño entre 26 y 34 kDa, que se corresponden con su peso teórico (32,26 kDa). Sin embargo, la calle VIII correspondiente a la muestra inducida presenta bandas de proteína en un rango de tamaños de entre 26 y 55 kDa, lo que sugiere tanto la alta sensibilidad de la prueba como la presencia de otras proteínas con sitios de unión para el Anti Histag (concretamente, una cola de 6 residuos de histidina)

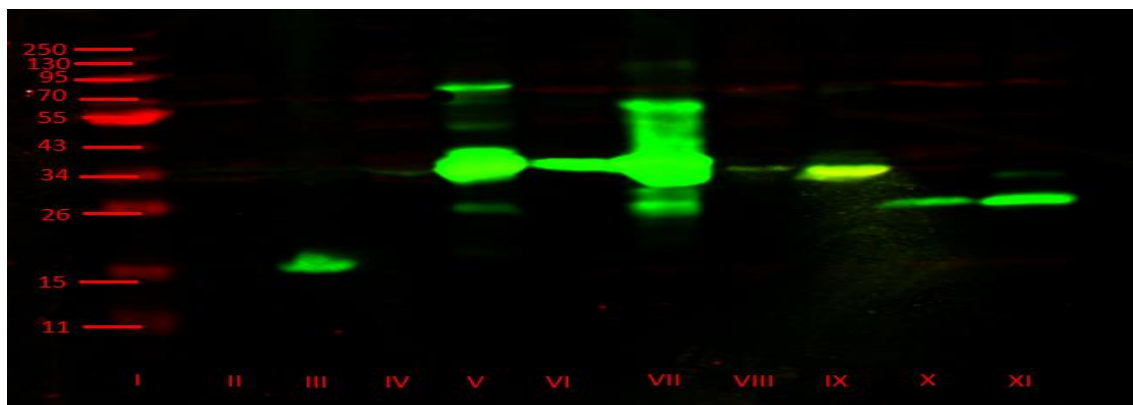


Fig. 3: figura correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de las muestras de colonias bacterianas contenedoras de los genes que codifican las proteínas candidatas e inducidas en un volumen de 10 mL tratada con Monoclonal Anti-6X His tag antibody y conjugada con anticuerpo secundario IRDDye 800 CW anti-mouse (I: PageRuler Prestained NIR Protein Ladder. II: M029L (no inducida) ; III: M029L (inducida); IV: M071L (no inducida); V: M071L (inducida); VI: M083L (no inducida); VII: M083L (inducida); VIII: M115L (no inducida); IX: M115L (inducida); X: M141R (no inducida); XI: M141R (inducida)).

Estos resultados indicaron el éxito de la inducción a escala real, pues se apreciaron bandas de proteína más intensas en tamaños aproximados a los esperados.

3.2.2. Análisis de la solubilidad de las proteínas.

Las muestras de las proteínas candidatas inducidas se separaron en fracción insoluble (pellet) y soluble (sobrenadante) mediante tratamiento con tampón de lisis, sonicación y posterior centrifugación con el fin de utilizar la fracción soluble

de forma directa (sin tener que recurrir a procesos de solubilización) en el experimento. Los geles permitieron determinar si había proteína en la fracción soluble de cada muestra candidata.

En el gel analizado mediante la técnica de Western Blot tratado con el pool Anti-Myxo (ver Fig. 4) se apreció una ligera banda entre 11 y 15 kDa en la calle IV correspondiente a la fracción insoluble de M029L que coincide con el tamaño teórico de la proteína (12,81 kDa). Todas las calles de la VI a la XI presentaron bandas de proteínas. Las calles VI y VII correspondientes a las fases insoluble y soluble de M071L presentaron bandas de proteína con un tamaño cercano a 34 kDa, que coincide con el peso teórico de la proteína (36,85). Las calles VIII y IX correspondientes a las fases insoluble y soluble de M083L presentaron bandas de proteína también cercanas a 34 kDa, que también coinciden con el tamaño teórico de la proteína (32,26 kDa). Las calles X y XII correspondientes a las fases insoluble y soluble de M115L presentaron bandas de proteína con un tamaño cercano a 26 kDa, coincidiendo con el peso teórico de la proteína (21,59 kDa). Las calles XII y XIII correspondientes a las fases insoluble y soluble de M141R no presentaron bandas. Tampoco se apreció ninguna banda en las calles II y III debido a que se trataba de la muestra control sin inducir.

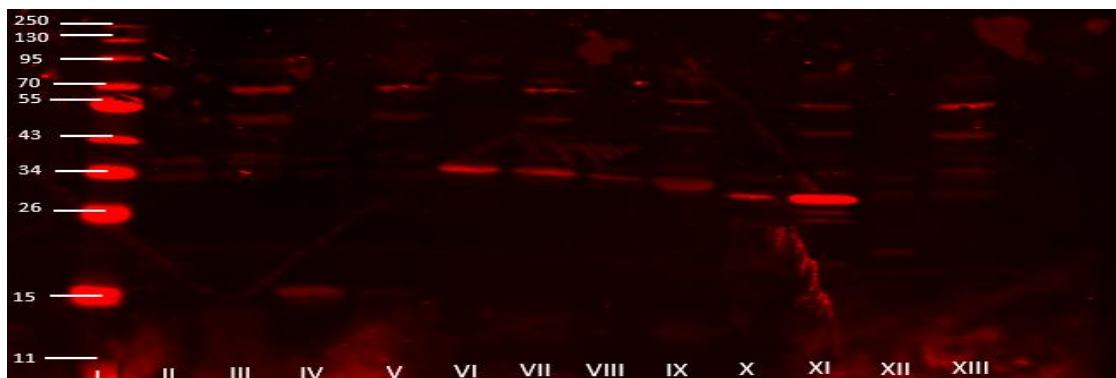


Fig. 4: imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de las fracciones solubles e insolubles de una proteína control M071L sin inducir y las proteínas correspondientes a los genes candidatos previamente inducidos M029L, M071L, M083L, M115L y M141R de Myxoma virus. Las muestras fueron tratadas con el pool Anti-myxo 418-3 tc-401 (1:1) y con anticuerpo secundario IRDDye 680 CW anti-rabbit. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: fase insoluble del control; III: fase soluble del control; IV: fase insoluble de M029L; V: fase soluble de M029L; VI: fase insoluble de M071L; VII: fase soluble de M071L; VIII: fase insoluble de M083L; IX: fase soluble de M083L; X: fase insoluble de M115L; XI: fase soluble de M115L; XII: fase insoluble de M141R; XIII: fase soluble de M141R).

El gel analizado mediante la técnica de Western Blot tratado con el Anti Histag (ver Fig. 5) presentó bandas de proteína en las mismas calles y con los mismos tamaños que los mencionados en el gel tratado con el pool Anti Myxo. Además:

— La calle V correspondiente a la fracción soluble de la proteína M029L presentó una banda de proteína en un tamaño de entre 11 y 15 kDa coincidiendo con el peso teórico de la proteína (12,81 kDa)

— Las calles VI y VII correspondientes a la fracción insoluble y soluble de la proteína M071L presentaron dos bandas con un tamaño de entre 55 y 70 kDa que no se corresponden con el peso teórico de la proteína.

— La calle XII correspondiente a la fracción insoluble de la proteína M141R presentó una banda con un tamaño de entre 15 y 26 kDa que coincide con el peso teórico de la proteína (23,70 kDa).

No se apreció ninguna banda en las calles II y III debido a que se trataba de la muestra control sin inducir.

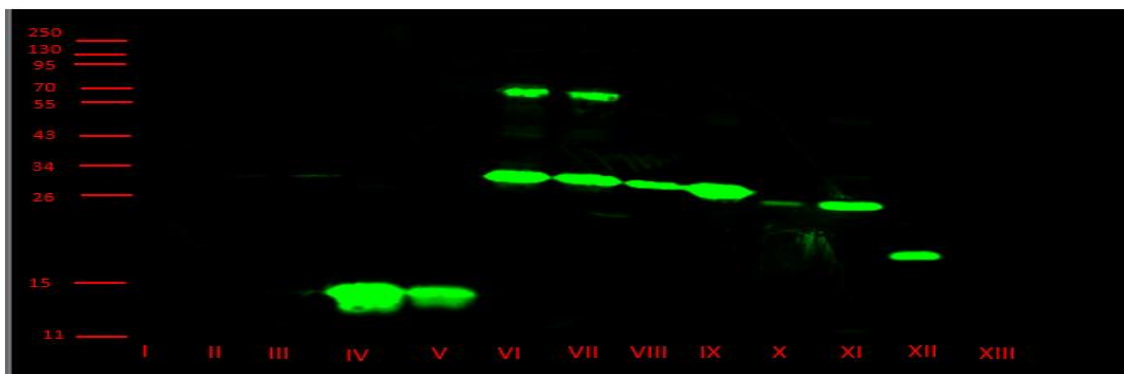


Fig. 5: imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de las fracciones solubles e insolubles de una proteína control M071L sin inducir y las proteínas correspondientes a los genes candidatos previamente inducidos M029L, M071L, M083L, M115L y M141R de Myxoma virus. Las muestras fueron tratadas con Monoclonal Anti-6X His tag antibody y conjugadas con anticuerpo secundario IRDDye 800 CW anti-mouse. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: fase insoluble del control; III: fase soluble del control; IV: fase insoluble de M029L; V: fase soluble de M029L; VI: fase insoluble de M071L; VII: fase soluble de M071L; VIII: fase insoluble de M083L; IX: fase soluble de M083L; X: fase insoluble de M115L; XI: fase soluble de M115L; XII: fase insoluble de M141R; XIII: fase soluble de M141R).

Aunque las imágenes obtenidas a partir del tratamiento con el pool Anti-Myxo no permitieron obtener muestras claramente visibles de todas las proteínas candidatas, el uso del anti Histag sí que presentó reacción a las colas de histidina en todas las proteínas codificadas por los genes candidatos.



No obstante, considerando que es la fracción soluble la que presentaba interés, el gen M141R fue descartado como candidato ya que su fracción soluble (situada en la calle XIII) no presentó sensibilidad alguna ni al anti Myxo ni al anti Histag.

3.3. Resultados de la purificación.

Debido a que las proteínas de interés se encontraban junto con otras proteínas en la fracción soluble, estas fueron separadas y purificadas mediante una cromatografía de afinidad utilizando iones de níquel inmovilizados. La purificación de las proteínas se realizó siguiendo los pasos previamente descritos en el apartado material y métodos: una vez empaquetada la resina Chelating Sepharose (la cual permite retener los iones de níquel y que las proteínas queden pegadas a la matriz al ser procesadas a través de la columna y cargada la matriz con NiCl_2 , se añadió el extracto de la proteína candidata correspondiente dejando que interactuase con la matriz durante 30 minutos para después realizar 3 lavados con buffer imidazol 50 mM y 5 eluciones con buffer imidazol 250 mM, recogiendo en cada caso las muestras correspondientes más un extracto final recuperado de la matriz. De cada purificación se analizaron por electroforesis dos geles, los cuales fueron sometidos a una tinción con azul de Coomassie y un western-blot respectivamente para determinar si hubo purificación de la proteína y en que muestra se encontraba.

3.3.1. Purificación de M029L.

Los geles analizados a partir de la purificación de M029L presentaron los siguientes resultados: la tinción con azul de Coomassie (ver Fig. 6) mostró bandas de un tamaño de entre 11 y 15 kDa en las calles II y III, que se corresponden con la muestra original antes de interactuar con la matriz en la columna y la muestra no pegada a la columna después de interactuar con la matriz. No se apreció proteína en las calles correspondientes a las muestras sometidas a los procesos de lavados (IV, V y VI), pero tampoco se observó en las eluciones (calles VII-XI) ni en la muestra final. Por lo tanto, no se pudo determinar a partir de la tinción si se logró purificar proteína y dónde se

encuentra, bien porque no hubo purificación o bien porque la técnica no es lo suficiente sensible.



Fig. 6: imagen correspondiente a la tinción con azul de Coomassie al gel realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M029L de Myxoma virus. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

En el gel analizado mediante la técnica de Western Blot no se detectó ninguna cantidad de proteína (ni siquiera en las calles II y III de la muestra original y muestra no pegada a la columna que sí fueron visibles en la tinción con Coomassie) cuando se trató con el pool Anti-Myxo (ver Fig.7).



Fig. 7 imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M029L de Myxoma virus tratado con el pool de suero Anti-myxo 418-3 tc-401 (1:1) y conjugado con el anticuerpo secundario IRDDye 680 CW anti-rabbit. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

Sin embargo, utilizando el Anti Histag (ver Fig. 8) sí se detectó una pequeña cantidad de proteína en la calle VII con un tamaño de entre 11 y 15 kDa, lo cual se aproxima a su tamaño esperado (12,81 kDa) y que coincidió con la banda que se sitúa en la calle II correspondiente a la muestra original. Por lo tanto, se determinó que logró purificarse una ligera cantidad de proteína en la calle VII que se corresponde con la muestra de la elución 1.

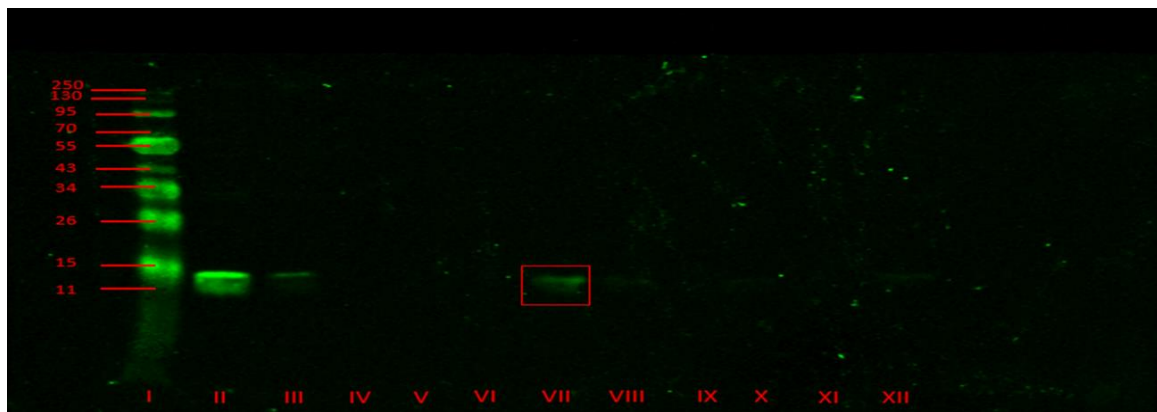


Fig. 8: imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M029L de Myxoma virus tratado con el Monoclonal Anti-6X His tag antibody y conjugadas con anticuerpo secundario IRDDye 800 CW anti-mouse. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

3.3.2. Purificación de M071L.

En el caso de los geles de la proteína M071L, la tinción con azul de Coomassie (ver Fig. 9) mostró bandas de un tamaño de entre 34 y 43 kDa en la calle II que se corresponde con la muestra original antes de interactuar con la matriz en la columna. No se apreció proteína en ninguna calle más, ni siquiera las calles correspondientes a las muestras de las eluciones (calles VII-XI) ni en la muestra final. Por lo tanto, no se pudo determinar a partir de la tinción si se logró purificar proteína ni dónde se encuentra, bien porque no hubo purificación o bien porque la técnica no es lo suficiente sensible.



Fig. 9: imagen correspondiente a la tinción con azul de Coomassie al gel realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M071L de Myxoma virus. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

En el gel analizado mediante la técnica de Western Blot no se detectó ninguna cantidad de proteína en ninguna banda cuando se trató con el pool Anti-Myxo (ver Fig.10) a excepción de en la calle II correspondiente a la muestra original donde se aprecia una banda con un tamaño de entre 34 y 43 kDa.

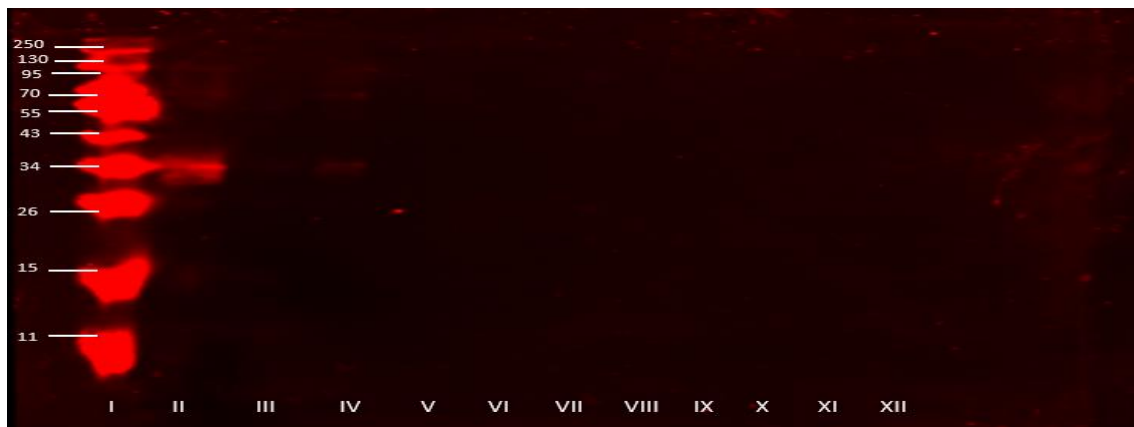


Fig. 10: imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M071L de Myxoma virus tratado con el pool de suero Anti-myxo 418-3 tc-401 (1:1) y conjugado con el anticuerpo secundario IRDDye 680 CW anti-rabbit. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

Utilizando el Anti Histag (ver Fig. 11) el resultado fue similar, pues únicamente se apreció con claridad una banda de proteína en la calle II correspondiente a la muestra original. Sin embargo, en la calle XI pudo observarse muy ligeramente

una banda de un tamaño entre 34 y 43 kDa que sugirió que una ínfima cantidad de proteína purificada en la elución 5. Sin embargo, tal cantidad resultó ser demasiado pequeña en comparación con la cantidad de proteína que presentaba la muestra original.

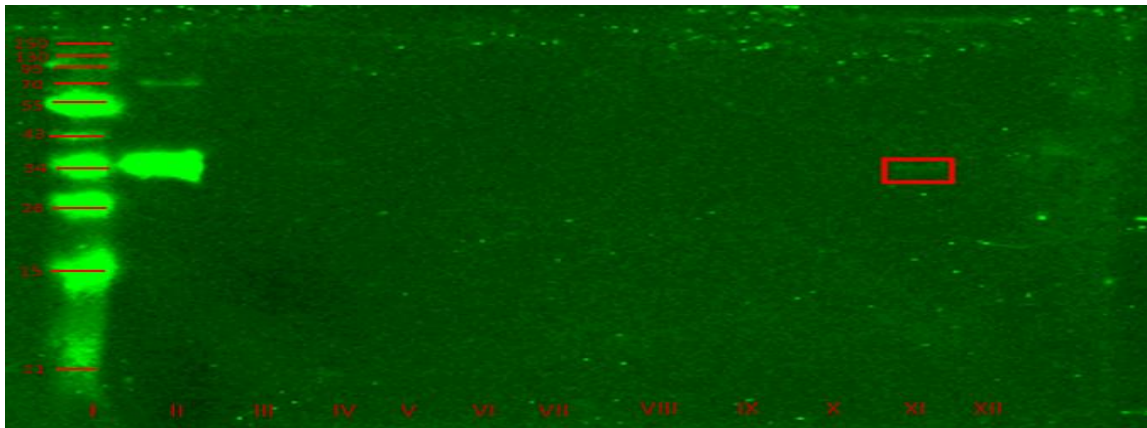


Fig. 11: imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M071L de Myxoma virus tratado con el Monoclonal Anti-6X His tag antibody y conjugadas con anticuerpo secundario IRDDye 800 CW anti-mouse. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

Por tanto, ni la tinción con Coomassie ni la prueba de Western-Blot con Anti-Myxo consiguieron revelar con precisión la ubicación de la proteína, mientras que la prueba de Western-Blot con Anti Histag reveló una cantidad demasiado pequeña en la elución 5.

Al no haber podido realizar la purificación de manera exitosa, se descartó la proteína M071L como candidata al ensayo.

3.3.3. Purificación de M083L.

El gel resultante de la purificación de M083L sometido a una tinción con azul de Coomassie (ver Fig. 12) mostró bandas de un tamaño próximo a 34 kDa (un tamaño que se ajusta al peso teórico de la proteína, de 32,26 kDa) en las calles II y III que se corresponden con la muestra original antes de interactuar con la matriz en la columna y la muestra no pegada a la columna después de interactuar con la matriz. No se apreció proteína en las calles correspondientes a las muestras sometidas a los procesos de lavados (IV, V y VI), pero sí se observaron

bandas de proteína (también con un tamaño entre 34 y 43 kDa) en todas las calles correspondientes a las muestras resultantes de las eluciones (calles VII-XI), así como en la muestra final (calle XII), por lo que la cantidad de proteína purificada fue la suficiente grande como para que pudiese detectarse con una tinción.

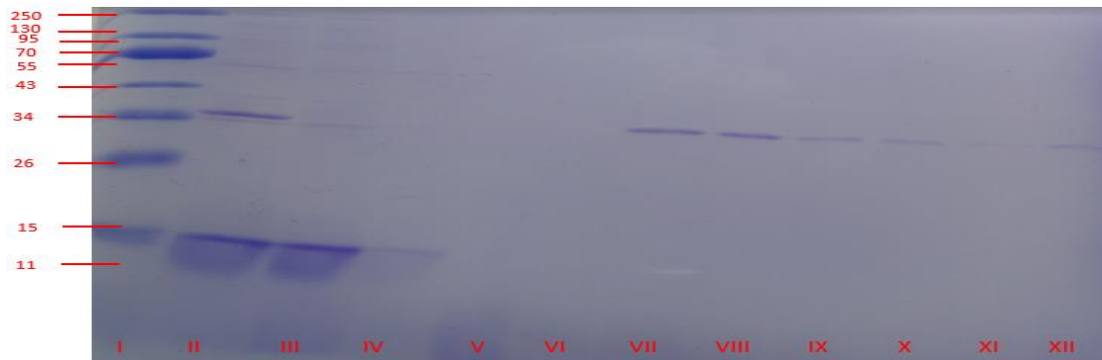


Fig. 12: imagen correspondiente a la tinción con azul de Coomassie al gel realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M083L de Myxoma virus. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

En el gel analizado mediante la técnica de Western Blot no se detectó ninguna cantidad de proteína en ninguna banda cuando se trató con el pool Anti-Myxo (ver Fig.13) a excepción de en las calles II y III correspondientes a la muestra original y la muestra no pegada a la columna, donde se aprecian una banda en cada calle con un tamaño de entre 34 y 43 kDa.

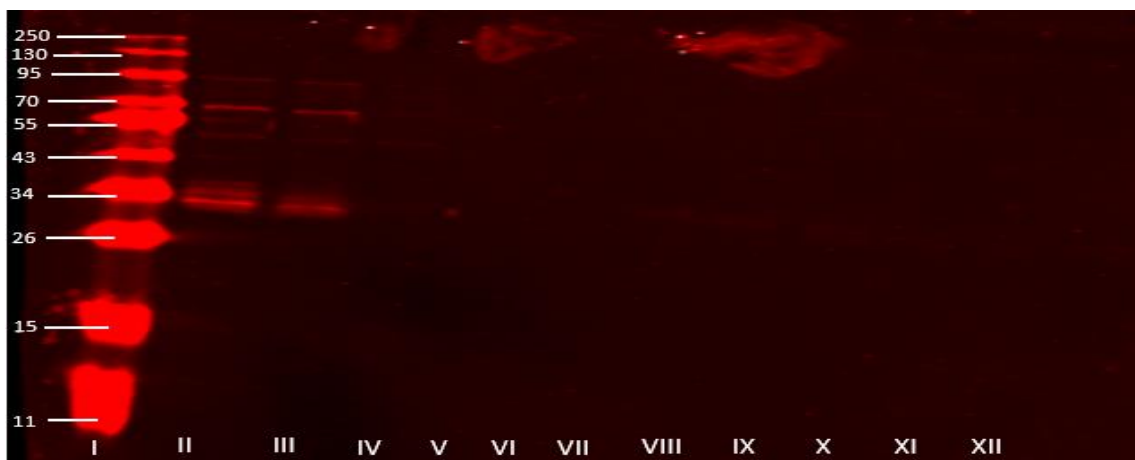


Fig. 13: imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M083L de Myxoma virus tratado con el pool de suero Anti-myxo 418-3 tc-401 (1:1)

y conjugado con el anticuerpo secundario IRDDye 680 CW anti-rabbit. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

Por el contrario, la prueba realizada con Western blot presentó una sensibilidad muy alta ante el anticuerpo Anti-Histag (ver Fig. 14) ofreciendo resultados similares a la tinción con azul de Coomassie y detectando bandas con una gran cantidad de proteína en las calles correspondientes a las muestras obtenidas en las eluciones (calles VII-XI), siendo la calle VII (correspondiente a la elución 1) la que más cantidad de proteína presentó.

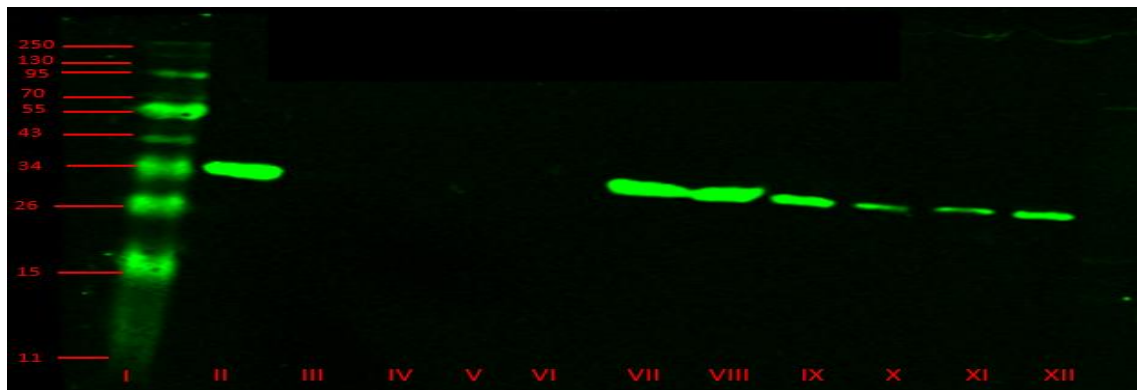


Fig. 14: imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M083L de Myxoma virus tratado con el Monoclonal Anti-6X His tag antibody y conjugadas con anticuerpo secundario IRDDye 800 CW anti-mouse. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

3.3.4. Purificación de M115L.

En el caso de los geles de la purificación de M115L, el gel sometido a la tinción con azul de Coomassie (ver Fig. 15) mostró bandas de un tamaño cercano a 30 kDa en la calle II que se corresponde con la muestra original antes de interactuar con la matriz en la columna, si bien este tamaño no termina de ajustarse al tamaño teórico de la proteína (21,59 kDa).

No se apreció proteína en ninguna calle más, ni siquiera las calles correspondientes a las muestras de las eluciones (calles VII-XI) ni en la muestra final. Por lo tanto, no se pudo determinar a partir de la tinción si se logró purificar

proteína ni dónde se encuentra, bien porque no hubo purificación o bien porque la técnica no es lo suficiente sensible



Fig. 15: imagen correspondiente a la tinción con azul de Coomassie al gel realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M115L de Myxoma virus. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

En el gel analizado mediante la técnica de Western Blot tratado con el pool Anti-Myxo (ver Fig. 16) detectó tanto la muestra original de la calle II correspondientes a la muestra original como bandas en las 5 calles correspondientes a las eluciones (calles VII-XI). También se detectó una importante cantidad de proteína en la muestra que quedó pegada a la columna (calle XII). En todos los casos, las bandas tuvieron un tamaño próximo a 26 kDa que se ajusta al peso teórico de la proteína (21,59 kDa).



Fig. 16: imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M115L de Myxoma virus tratado con el pool de suero Anti-myxo 418-3 tc-401 (1:1) y conjugado con el anticuerpo secundario IRDDye 680 CW anti-rabbit. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de

la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

La prueba realizada con Western blot presentó una sensibilidad muy alta ante el anticuerpo Anti-Histag (ver Fig. 17) ofreciendo resultados similares a la prueba con el pool Anti-Myxo y detectando bandas con una gran cantidad de proteína en las calles correspondientes a las muestras obtenidas en las eluciones (calles VII-XI), todas con un tamaño aproximado de 26 kDa y que coincide con el tamaño teórico de la proteína (21,59 kDa). También mostró de nuevo una gran cantidad de proteína en la muestra final de la calle XII, asociada con la muestra pegada a la columna.

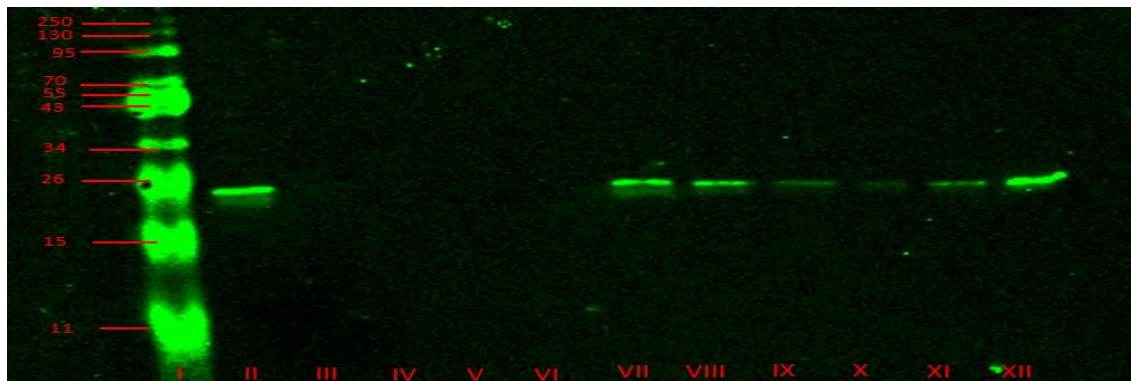


Fig. 17: imagen correspondiente al western blot realizado con las muestras obtenidas a partir de la purificación de la proteína resultante del gen candidato M0115L de Myxoma virus tratado con el Monoclonal Anti-6X His tag antibody y conjugadas con anticuerpo secundario IRDDye 800 CW anti-mouse. Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el ensayo, conteniendo las diferentes fases de la proteína (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: extracto original; III: extracto sin lavar tras interactuar con la matriz cargada con NiCl₂; IV: extracto del primer lavado; V: extracto del segundo lavado; VI: extracto del tercer lavado; VII: extracto de la primera elución; VIII: extracto de la segunda elución; IX: extracto de la tercera elución; X: extracto de la cuarta elución; XI: extracto de la quinta elución; XII: extracto final recuperado de la matriz).

Por tanto, se consiguieron purificar total o parcialmente 3 de las 4 proteínas (M029L, M083L y M115L) resultando ser sensibles a al menos dos de los tres análisis en los geles (ver tabla 2)

Tabla 2: resumen de los resultados de la purificación.

Resultados de la purificación de las proteínas candidatas			
Proteína candidata	Detección por azul de Coomassie	Detección Western-Blot (Anti-Myxo)	Detección Western-Blot (Anti-Histag)
M029L	No	No	Sí
M071L	No	No	No
M083L	Sí	No	Sí
M115L	No	Sí	Sí

3.4. Resultados de la cuantificación de las proteínas.

Después de purificar las proteínas y de comprobar en qué fase de la elución se encontraba cada una, se procedió a cuantificar la cantidad disponible con el objetivo de determinar si había cantidad suficiente de proteína como para poder realizar el ELISA.

Las muestras de albúmina sérica bovina 1mg/mL disueltas en PBS preparadas a distintas concentraciones obtuvieron los valores de absorbancia en el espectrofotómetro y la curva de calibración (ver apartados 3.2 y 3.3. del anexo II) que permitieron determinar las siguientes concentraciones para las proteínas candidatas (ver tabla 3), cuya absorbancia se determinó previamente mediante la cuantificación por el método de Bradford:

Tabla 3:: concentraciones de las proteínas candidatas obtenidas a partir de la recta patrón.

Muestra	Absorbancia (595nm)	Concentración (µg/ml)
M029L	0,011	0,25
M083L	0,083	2,1
M115L	0,148	3,1

A partir de estas concentraciones se prepararon las correspondientes diluciones y volúmenes siguiendo los pasos previamente descritos (ver apartado materiales y métodos). Además, la tinción con Coomassie y el western-blot realizado con las muestras de las proteínas candidatas a igual concentración obtuvo el resultado que se muestra en el apartado 3.4 del anexo II. Cabría esperarse que las 3 muestras fuesen visibles al encontrarse en la misma concentración, sin embargo, los resultados no se ajustan a lo esperado, pues únicamente pudo verse la banda perteneciente a la proteína M083L en las tres pruebas.

3.5. Resultados del ensayo ELISA.

El ensayo ELISA consistió en la preparación de una placa con muestras por triplicado de las tres proteínas candidatas que superaron todos los procesos anteriores de inducción, determinación de solubilidad y purificación, a diferentes concentraciones y tratadas con tres sueros diferentes que funcionaron como



muestra problema, control positivo y control negativo respectivamente. Las muestras se distribuyeron de la siguiente forma en la placa de acuerdo con la figura del apartado 4.1. del anexo II: los pocillos situados dentro del cuadro amarillo corresponden a la proteína candidata M029L, mientras que los cuadros verde y púrpura corresponden a las proteínas M083L y M115L; respectivamente. Los números señalan la concentración correspondiente (50, 100, 150 o 200 ng/ml), mientras que los colores de los pocillos señalan el suero utilizado, siendo los pocillos rojos los cargados con el pool de sueros Anti-Myxo (muestra problema), los verdes los cargados con Monoclonal Anti-6X His tag antibody (control positivo) y los azules los cargados con el suero de conejo sin anticuerpos (control negativo). Los controles problema y negativo fueron además conjugados con anticuerpo secundario. Como dato adicional, la proteína candidata M029L fue utilizada únicamente a dos concentraciones (50 y 100 ng/mL) dada la escasa cantidad de proteína disponible.

Se esperaban unos valores de absorbancia bajos para aquellos pocillos tratados con muestras de PBS y suero de conejo sin anticuerpos que actúa como control negativo, pues no hay antígenos que puedan ser detectados. Las muestras tratadas con el Monoclonal Anti-6X His tag antibody deberían presentar valores de absorbancia más altos, ya que actúan como control positivo al existir reacción con las colas de histidina de las proteínas. Los valores de las muestras cargadas con el pool de Myxo serán las que determinen si el uso de unas pocas proteínas antigénicas puede resultar en un ensayo ELISA eficaz para el diagnóstico siempre y cuando los valores de referencia de los controles positivo y negativo se ajusten a lo esperado. Sin embargo, debería esperarse que para una misma proteína los valores de absorbancia se incrementen si aumenta la concentración de esta.

Los valores de absorbancia para cada tipo de muestra de proteína fueron los mostrados en el apartado 4.2 del anexo II.

3.5.1. Muestras control de PBS.

Los pocillos cargados con PBS mostraron valores de absorbancia próximos a 0,04, lo cual se ajustó a lo esperado pues no tienen ningún tipo de suero o antígenos que puedan ser detectados.

3.5.2. M029L

La proteína M029L presentó los siguientes resultados (ver tabla 4), siendo cada color un suero distinto. Los números de la derecha de cada pocillo representan la concentración de la proteína (en ng/mL):

Tabla 4: Pocillos de la placa ELISA cargados con la proteína candidata M029L.

	1		2		3	
A	1,746	50	1,231	50	1,710	50
B	1,879	100	2,513	100	0,597	100
C	0,985	50	1,393	50	0,498	50
D	1,020	100	1,617	100	2,515	100
E	0,427	50	0,724	50	0,354	50
F	0,478	100	0,931	100	0,558	100

— Los valores de los pocillos de la placa con suero control negativo (en azul) deberían tener valores similares a los del PBS. En este caso, los valores son algo más elevados que en el caso de PBS, si bien se mantienen en un rango bajo (entre 0,4 y 0,9).

— Los valores de los pocillos de la placa con suero control positivo (tratados con el Monoclonal Anti-6X His tag antibody, en verde) se ajustan a lo esperado, pues tienen valores entre 1 y 2,5, más altos que los del PBS y el suero control negativo al haber reacción con las colas de histidina. Sin embargo, hay muestras idénticas que presentan valores muy dispares entre sí (por ejemplo, C1 y C3 tienen un valor demasiado bajo en comparación con el resto de las placas). No obstante, esto puede deberse a un error de pipeteo.

— Los pocillos de la placa con el suero control problema (tratados con el pool de suero Anti Myxo, en rojo) presentaron valores elevados (superiores a 1, e incluso de 2 en el pocillo B2) y un valor muy bajo (cercano a 0,5) en el pocillo 3B, que pudo deberse a un error de pipeteo. Estos valores se aproximan a los

presentados por el suero control positivo, por lo que se ajustan a lo esperado al haber habido detección del antígeno.

3.5.2. M083L

La proteína M083L presentó los siguientes resultados (ver tabla 5), siendo cada color un suero distinto. Los números de la derecha de cada pocillo representan la concentración de la proteína (en ng/mL):

Tabla 5: pocillos de la placa ELISA cargados con la proteína candidata M083L

	4		5		6	
A	0,607	50	0,917	50	1,899	50
B	0,610	100	0,745	100	1,816	100
C	2,663	150	0,973	150	1,371	150
D	2,753	200	1,479	200	2,312	200
	7		8		9	
A	0,185	50	0,327	50	0,304	50
B	0,675	100	1,290	100	2,100	100
C	2,001	150	2,637	150	2,436	150
D	1,613	200	1,448	200	2,858	200
	10		11		12	
A	0,784	50	0,172	50	0,262	50
B	0,527	100	0,388	100	0,457	100
C	0,484	150	0,868	150	2,115	150
D	0,392	200	0,584	200	1,188	200

— Los valores de los pocillos de la placa con suero control negativo (en azul) deberían tener valores similares a los del PBS. En este caso, los valores, al igual que los del M029L, son bajos (entre 0,1 y 0,9) a excepción del pocillo C12, que no solo tiene unos valores demasiado altos de absorbancia para tratarse de un suero control negativo, sino que es un valor con una diferencia demasiado grande con respecto a C10 y C11 tratándose de la misma muestra con la misma concentración y tratadas con el mismo suero. Sin embargo, esto también puede deberse al ya mencionado error de pipeteo.

— Los valores de los pocillos de la placa con suero control positivo (tratados con el Monoclonal Anti-6X His tag antibody, en verde) no se ajustaron a lo esperado, pues muchos de ellos obtuvieron valores demasiado bajos (por ejemplo, los pocillos A7 a A9 obtuvieron valores de entre 0,1 y 0,3) y muy dispares entre las mismas muestras (B7 y B9 tienen valores de absorbancias con una diferencia de prácticamente 1,5)

— Los pocillos de la placa con el suero control problema (tratados con el pool de suero Anti Myxo, en rojo) presentaron valores de absorbancia bastante bajos (entre 0,6 y 0,9) a concentraciones de 50 y 100 ng/mL (con la excepción de las

muestras A6 y B6) pero más altos a concentraciones de 150 y 200 ng/mL (con la excepción del pocillo 5C, con un valor menor de 1).

3.5.3. M115L.

La proteína M115L presentó los siguientes resultados (ver tabla 6), siendo cada color un suero distinto. Los números de la derecha de cada pocillo representan la concentración de la proteína (en ng/mL):

Tabla 6: pocillos de la placa ELISA cargados con la proteína candidata M115L

	4		5		6	
E	5,324	50	4,567	50	5,023	50
F	5,766	100	5,072	100	4,965	100
G	5,624	150	5,660	150	5,284	150
H	5,129	200	4,921	200	4,993	200
	7		8		9	
E	0,320	50	0,288	50	0,302	50
F	0,616	100	0,305	100	0,671	100
G	0,860	150	0,794	150	0,703	150
H	0,722	200	0,848	200	0,987	200
	10		11		12	
E	1,162	50	0,709	50	0,990	50
F	0,625	100	1,658	100	1,172	100
G	1,822	150	1,154	150	1,258	150
H	1,151	200	1,434	200	1,193	200

— Los valores de los pocillos de la placa con suero control negativo (en azul) deberían tener valores similares a los del PBS. Sin embargo, en esta ocasión los valores son bastante más altos, situándose en cifras de entre 0,6 y 1,8), no ajustándose a lo esperado.

— Los valores de los pocillos de la placa con suero control positivo (tratados con el Monoclonal Anti-6X His tag antibody, en verde) tampoco se ajustaron a lo esperado, pues todos los pocillos presentaron valores de absorbancia muy bajos, incluso inferiores a los del control negativo.

— Los pocillos de la placa con el suero control problema (tratados con el pool de suero Anti Myxo, en rojo) presentó los valores de absorbancia más altos de todas las proteínas candidatas, siendo todos los valores cercanos a 5 con independencia de la concentración de la proteína.



4. DISCUSIÓN

4.1. Análisis de la sobreexpresión de las proteínas candidatas.

El objetivo principal del experimento consistía en determinar el éxito de una prueba de diagnóstico ELISA utilizando unas pocas proteínas recombinantes a partir de una selección específica de genes de *Myxoma virus* sin necesidad de recurrir al virus completo como antígeno. Para ello, previamente se habían fijado unos objetivos complementarios en cada fase del proyecto que establecían las bases de dicha prueba, incluyendo la correcta selección y análisis bioinformático de los genes candidatos, la amplificación y sobreexpresión de las proteínas codificadas por dichos genes y la purificación y cuantificación de dichas proteínas.

El análisis bioinformático permitió identificar cuáles son las regiones antigénicas y las regiones transmembrana de los cinco genes codificantes de proteínas candidatas. En el caso de las regiones transmembrana son nulas en 3 de los genes (M029L, M115L y M141R) y no más de 2 regiones en los otros dos restantes (M071L y M083L). Un número escaso de regiones transmembranas hace que los genes resulten buenos candidatos pues no solo supone menor riesgo de plegamientos erróneos que conduzcan a errores de detección durante el ensayo ELISA, sino que supone eliminar menos aminoácidos y por lo tanto mantener casi toda la estructura completa de la proteína. Todos los genes de las proteínas candidatas, además, presentaron regiones antigénicas que favorecieron tanto su detección en experimentos que formaron parte del proyecto como los análisis de las purificaciones mediante la técnica de Western-Blot o el propio ensayo ELISA. La sobreexpresión de las proteínas candidatas gracias al proceso de inducción también resultó exitosa, pues se consiguió inducir al menos una colonia de cada gen candidato, lo que se comprobó gracias a la prueba a pequeña escala en un volumen de 2 mL de medio LB+Kanamicina. El éxito de la inducción fue reafirmado con la prueba a escala en 10 mL y su posterior análisis de los geles.



Sí que es importante señalar que en los geles correspondientes al análisis mediante Western-Blot de la prueba de inducción de 10 mL (ver fig.2 y 3) las proteínas se situaron en un tamaño que, si bien se aproxima en mayor o menor medida a sus pesos teóricos (ver apartado 2.2 del anexo II), siguen siendo algo más grandes de lo esperado, lo cual sugiere dos posibilidades: la primera, que dado que el peso teórico de las proteínas calculado con el programa Protein Molecular Weight no incluye los 6 residuos de histidina adicionales, el peso real de las proteínas de los geles consiste en su peso teórico más aproximadamente los 0,8 kDa que pesa la cola de histidina. La segunda, que el gel utilizado para dichos análisis presentó algún tipo de error durante su construcción. Teniendo en cuenta que 0,8 kDa es una diferencia muy despreciable y considerando que dicho suceso no se repitió en ningún otro gel, se considera la segunda hipótesis como la más acertada.

4.2. Análisis de la solubilidad de las proteínas candidatas.

Con respecto a la separación en fase soluble e insoluble de las proteínas y la posterior comprobación de la presencia de proteína en la fase soluble, la prueba obligó a descartar una de las 5 proteínas candidatas (la codificada por el gen M141R) pues las limitaciones de tiempo obligaron a trabajar únicamente con la fracción soluble, lo que también redujo la cantidad de proteína disponible para ser purificada y cuantificada. Una forma de optimizar esta parte sería solubilizar la fracción insoluble de las proteínas candidatas mediante un lavado con soluciones desnaturalizantes, una posterior extracción mediante el uso de agentes caotrópicos (agentes capaces de influir en la organización de las moléculas de agua y su interacción con las proteínas) y un proceso de renaturalización para recuperar la estructura terciaria [Middelberg et al, 2002]

4.3. Análisis de la purificación de las proteínas candidatas.

Cada purificación ofreció unos resultados propios, si bien se consiguió purificar proteína, en mayor o menor cantidad, para las cuatro proteínas candidatas:



— La purificación de M029L permitió recuperar una cantidad muy pequeña de proteína como puede apreciarse en la banda de la muestra de la elución 1 (donde se encuentra la proteína purificada), esa banda no pudo ser detectada por la tinción de Coomassie (Fig. 6), ni siquiera con el Western-blot utilizando el pool Anti-Myxo (Fig. 7), únicamente el gel tratado con Anti Histag pudo revelar su ubicación (Fig. 8), resultando en una banda muy poco apreciable cuya explicación radica en la poca solubilidad de la proteína, que puede comprobarse al comparar la cantidad de proteína que presenta la fracción soluble en comparación con la insoluble de M029L en las calles IV y V del gel que analiza la solubilidad de las proteínas candidatas (ver Fig. 5) siendo más intensa la banda correspondiente a la fracción insoluble.

— En la purificación de M071L la cantidad de la proteína fue similar en ambas fracciones (ver calles VI y VII de la Fig. 5), pero ambas bandas tuvieron una menor cantidad de proteína, lo cual también pudo influir en la cantidad de proteína purificada, que resultó tan pequeña que únicamente pudo ser apreciada ligeramente en el gel analizado con la técnica de Western-Blot tratado con el Anti Histag (ver Fig. 11). La cantidad recuperada fue tan pequeña que la proteína tuvo que ser descartada como candidata al ensayo ELISA.

— La purificación de M083L resultó la más exitosa porque tanto el gel con tinción de Coomassie (ver Fig. 12) como los geles analizados por Western-Blot (ver Fig. 13 y 14) mostraron gran cantidad de proteína en casi todas las eluciones. Esta cantidad se justifica porque la proteína M083L fue la más soluble de todas las candidatas, como puede observarse al comprobar la calle IX del gel de la Fig. 5. Por tanto, fue la proteína de la que más cantidad se dispuso desde el primer momento.

— La purificación de M115L también fue exitosa porque, si bien la banda de proteína correspondiente a la fracción soluble (ver calle XI de la Fig. 5) es más pequeña que la de la fracción soluble de M083L, la fracción insoluble de M115L es casi imperceptible, siendo dicha proteína mayoritariamente soluble y permitiendo disponer de una cantidad considerable de la misma en la



purificación. Por lo tanto, puede concluirse que la purificación de las proteínas candidatas fue exitosa, pues las limitaciones estuvieron condicionadas por la falta de proteína en las fracciones solubles (causa del descartamiento de M071L) o por total insolubilidad de la misma (causa del descartamiento de M141R).

En lo que respecta a la cuantificación de las proteínas, la escasa cantidad de proteína presente de M029L y su gran diferencia con respecto a la cantidad de proteína de M083L y M115L (ver tabla 1) está de nuevo justificada por su poca solubilidad. Afortunadamente, la cantidad fue suficiente para poder realizar dos diluciones (50 y 100 ng/mL) de la proteína en la placa ELISA y de ese modo poder determinar si resulta eficaz como antígeno para el diagnóstico de la mixomatosis. Sin embargo, los resultados de la cuantificación no coinciden con la electroforesis realizada posteriormente, en cuyo gel se habían cargado muestras de las 3 proteínas candidatas a iguales concentraciones, utilizando la concentración de M083L (2,1 µg/mL) como referencia (ver apartado 3.4 del anexo II), donde solo se aprecia la banda de dicha concentración. Podría entenderse que no apareciese M029L ya que es posible que la cantidad de proteína fuese demasiado pequeña como para poder disponer de ella a dicha concentración, pero en teoría la concentración de M115L era mayor que la de M083L (ver tabla 1), concretamente de 3,1 µg/mL, por lo que debería apreciarse una banda de proteína. Por lo tanto, es posible que hubiese un error durante la cuantificación y que el valor de absorbancia (y por tanto la concentración resultante) de M115L no sea superior a M083L, sino inferior, siendo esta última la proteína más concentrada y de mayor cantidad. Esta teoría es respaldada por los análisis de los geles durante la prueba de solubilidad (ver Fig. 5) como las purificaciones de ambas proteínas (ver Fig. 14 y 17).

4.4. Análisis de los resultados del ensayo ELISA.

En cuanto al ensayo ELISA, como se mencionó antes, el objetivo principal del proyecto consistía en comprobar su viabilidad para el diagnóstico a partir de unas pocas proteínas candidatas, si bien los resultados han sido distintos para cada proteína:



— En el caso de M029L, la poca cantidad proteínica redujo el número de diluciones de 4 (50,100,150 y 200 ng/mL) a 2 (50 y 100 ng/mL), pero los resultados han sido bastante ajustados a lo que cabría esperarse: valores bajos de entre 0,3 Y 0,9 para el suero control negativo, valores más altos para el suero control positivo y valores similares al control positivo en el suero problema, lo que sugiere que M029L es una proteína que presenta un buen funcionamiento como antígeno. También hay que señalar que algunos pocillos presentan valores que no se ajustan a lo esperado, pero como ya se mencionó en el apartado de resultados, presumiblemente se debe a errores de pipeteo.

— En el caso del M083L, los valores de absorbancia para el suero control negativo se ajustaron a lo esperado, siendo en la mayoría de los casos entre 0,2 y 0,8 (salvo dos excepciones, que pueden achacarse a errores de pipeteo), pero muchos valores tanto del suero control positivo como del suero problema son demasiado bajos (más incluso que los del control negativo), lo cual no coincide en absoluto con lo esperado considerando que el gen codificante de la proteína candidata M083L era de los tres genes “supervivientes” el que presentaba mayor número de regiones antigénicas y por tanto mayor número de lugares de reconocimiento de anticuerpos. Sin embargo, esto podría explicarse si consideramos que la proteína M083L ofreció muy malos resultados al ser tratada con el pool Anti-Myxo (pool de suero utilizado en la muestra problema) especialmente durante la purificación (ver Fig. 13), por lo que podría considerarse que M083L quizá no resulta una proteína candidata adecuada para ser usada como antígeno en el diagnóstico de Myxoma virus.

— En el caso de M115L, los valores de absorbancia para el control negativo son demasiado altos, considerando que todos se encuentran entre 1,1 y 1,9, mientras que los valores de absorbancia del control positivo son demasiado bajos. No obstante, los valores del suero problema son tremendamente altos (de entre 4,5 y 5,6 en todos los casos), lo que implica que el ensayo sí que detecta la presencia de anticuerpos para esta proteína. Además, si antes se mencionó que M083L no había ofrecido buenos resultados en el tratamiento con el pool anti- Myxo, M115L fue la proteína candidata que mejor detección presentó al utilizarse dicho



anticuerpo, lo que explicaría que no necesite demasiada concentración para poder ser detectada. Caso contrario sucedería con el anti Histag. Como se mencionó antes, es probable que hubiese un error de cuantificación y que la concentración de la proteína M115L sea más pequeña de lo que inicialmente se pensaba, lo que explicaría los valores tan bajos de absorbancia al no haber suficientes residuos de histidina con los cuales puede reaccionar el anti Histag, pero sí suficiente sensibilidad a la prueba con el Pool anti Myxo.

Una buena forma de optimizar los resultados y determinar de forma fiable la viabilidad del experimento sería incrementar la cantidad de proteína disponible ya sea utilizando volúmenes más grandes o solubilizando las fracciones insolubles. También es posible, en su defecto, seleccionar proteínas más solubles. Otra posibilidad sería realizar la cuantificación por el método de Bradford en dos o tres ocasiones adicionales para certificar que los resultados obtenidos son los esperados, o bien utilizar otros métodos de cuantificación (ensayo de Lowry, absorción ultravioleta...). También podría tratarse de optimizar el ensayo ELISA a partir de determinar las concentraciones óptimas de detección para cada proteína candidata, procesar adecuadamente las muestras para enriquecer el analito y eliminar otras moléculas que puedan producir interferencias en los datos y seleccionar el sustrato más adecuado. Con estas modificaciones, el experimento debería conseguir unos resultados más cercanos a los esperados.

5. CONCLUSIONES

Todos los objetivos secundarios del proyecto necesarios para elaborar el ensayo ELISA. (selección de genes adecuados, sobreexpresión de las proteínas a partir de la construcción de un plásmido eficaz y purificación de las muestras) se han resuelto de manera eficaz y exitosa, mientras que el propio ensayo ELISA ha sido capaz de detectar la presencia de anticuerpos contra las proteínas recombinantes candidatas utilizadas como antígenos, si bien los resultados han presentado ligeras variaciones dependiendo de la solubilidad de la proteína candidata o de cómo ha reaccionado a los anticuerpos utilizados. El balance



final ofrece unas perspectivas muy prometedoras, pues los resultados que no se han ajustado a lo esperado pueden justificarse mediante lo explicado anteriormente, así como por los errores humanos (como los errores al sembrar las colonias durante la inducción o de pipeteo durante la carga de pocillos de la placa ELISA) cometidos durante el experimento. Perfeccionado de la manera adecuada mediante una selección más precisa de proteínas y un mejor seguimiento de la cuantificación, este tipo de ensayo utilizando unas pocas proteínas recombinantes puede suponer un auténtico avance en el diagnóstico de Myxoma virus, especialmente en lo que respecta al abaratamiento de costes y la menor necesidad de tiempo y recursos.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- Barlow, A., Lawrence, K., Everest, D., Dastjerdi, A., Finnegan, C., & Steinbach, F. (2014). Confirmation of myxomatosis in a European brown hare in Great Britain: Myxomatosis. *Veterinary Record*, 175(3), 75-76.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J. X., Macaulay, C., ... & McFadden, G. (1999). The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology*, 264(2), 298-318.
- Dalton, K. P., Martín, J. M., Nicieza, I., Podadera, A., de Llano, D., Casais, R., ... & Buitrago, D. (2019). Myxoma virus jumps species to the Iberian hare. *Transboundary and emerging diseases*, 66(6), 2218-2226.
- Delibes, M. I. G. U. E. L. (1978). Ecología alimentations del águila imperial ibérica (*Aquila adalberti*) en el Coto Doñana durante la crianza de los pollos. *Doñana Acta Vertebrata*, 5, 35-60.
- Fenner, F., & Ratcliffe, F. N. (1965). *Myxomatosis*. Myxomatosis.
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22(2), 30-39.
- Gelfi, J., Chantal, J., Phong, T. T., Py, R., & Boucraut-Baralon, C. (1999). Development of an ELISA for detection of myxoma virus-specific rabbit antibodies: test evaluation for diagnostic applications on vaccinated and wild rabbit sera. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(3), 240-245.
- Griffiths, G., Roos, N., Schleich, S., & Locker, J. K. (2001). Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: thin-section analyses. *Journal of Virology*, 75(22), 11056-11070.
- Gurri, A. (1996). Mixomatosis y enfermedad vírica hemorrágica: una revisión del tema. *Cunicultura*, 21(120), 0068-82.
- Herrero García, S. (2016). Poxvirus: características y enfermedades producidas. Importancia en el desarrollo de vacunas. Facultad de Biología. Universidad de Salamanca.
- Hosamani, M., Mondal, B., Tembhurne, P. A., Bandyopadhyay, S. K., Singh, R. K., & Rasool, T. J. (2004). Differentiation of sheep pox and goat poxviruses by sequence analysis and PCR-RFLP of P32 gene. *Virus genes*, 29(1), 73-80.



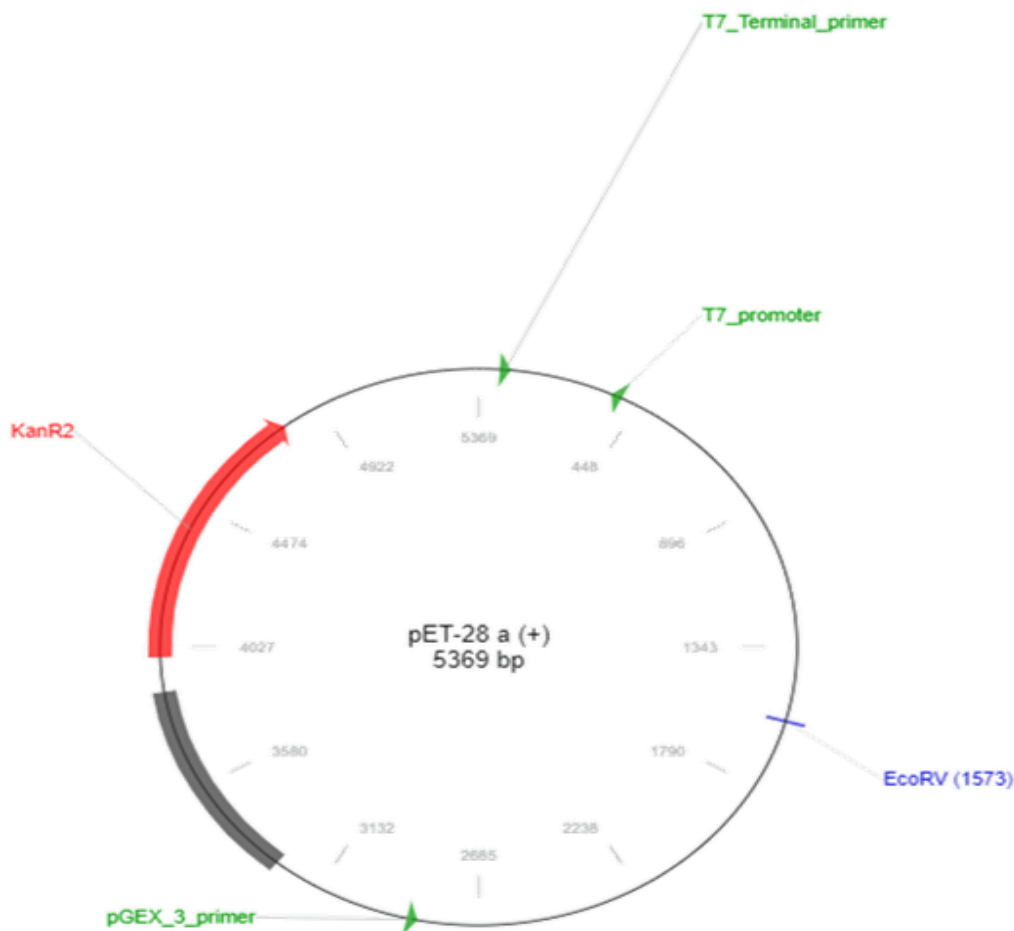
- Jiménez Rubio, P. (2016). Influencia de la mixomatosis y la hemorragia vírica en las poblaciones de conejos silvestre en España. Escuela politécnica superior y facultad de ciencias experimentales, Universidad de Almería.
- Kerr, P. J., Rogers, M. B., Fitch, A., DePasse, J. V., Cattadori, I. M., Twaddle, A. C., ... & Ghedin, E. (2013). Genome scale evolution of myxoma virus reveals host-pathogen adaptation and rapid geographic spread. *Journal of virology*, 87(23), 12900-12915.
- Kerr, P. J., & Donnelly, T. M. (2013). Viral infections of rabbits. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 16(2), 437-468.
- Kumar, A., Venkatesan, G., Kushwaha, A., Kumar, P. S., Ramakrishnan, M. A., & Dhar, P. (2019). Expression and purification of recombinant immunogenic proteins of goat poxvirus in prokaryotic system. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 8(1), 1984-1990.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunalp, P. V., & Clark, D. P. (2009). Brock. *Biología de los microorganismos* 12 ed.
- Marlier, D. (2010). Vaccination strategies against myxomavirus infections: are we really doing the best? *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 135(5), 194-198.
- Martín Carrillo, N. (2018). Estudio de patógenos, virus de la mixomatosis, RHDV y coccidios, que afectan al conejo, *Oryctolagus cuniculus*, en Tenerife.
- Middelberg, A. P. (2002). Preparative protein refolding. *TRENDS in Biotechnology*, 20(10), 437-443.
- OIE Technical Disease Card for RHD (2018) http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/RHD.pdf (Última consulta: 03/09/2020)
- Rodríguez, G. F. (2006). Enfermedades víricas de los conejos: mixomatosis y enfermedad vírica hemorrágica. *Boletín de cunicultura lagomorpha*, (148), 6-18.
- Ryder, A. B., Buonocore, L., Vogel, L., Nachbagauer, R., Krammer, F., & Rose, J. K. (2015). A viable recombinant rhabdovirus lacking its glycoprotein gene and expressing influenza virus hemagglutinin and neuraminidase is a potent influenza vaccine. *Journal of Virology*, 89(5), 2820-2830.
- Silvers, L., Inglis, B., Labudovic, A., Janssens, P. A., Van Leeuwen, B. H., & Kerr, P. J. (2006). Virulence and pathogenesis of the MSW and MSD strains of Californian myxoma virus in European rabbits with genetic resistance to myxomatosis compared to rabbits with no genetic resistance. *Virology*, 348(1), 72-83.
- Sobey, W. R., & Conolly, D. (1975). Myxomatosis: passive immunity in the offspring of immune rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) infested with fleas (*Spilopsyllus cuniculi* Dale) and exposed to myxoma virus. *Epidemiology & Infection*, 74(1), 43-55.
- Spiesschaert, B., McFadden, G., Hermans, K., Nauwynck, H., & Van de Walle, G. R. (2011). The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion. *Veterinary research*, 42(1), 76.
- Taylakova, E. T., & Chervyakova, O. V. (2016). BACTERIAL GENE EXPRESSION OF SHEEP POX VIRUS ENCODING ANTIGENIC PROTEINS OF SPPV095 AND SPPV141 FOR THE DEVELOPMENT OF NEW GENERATION SPECIFIC PROPHYLAXIS. *Биотехнология. Теория и практика*, (2), 81-87

ANEXOS

Anexo I: materiales y metodología.

1. Plásmido pET 28(a)+

La figura representa el plásmido pET 28(a)+ (modificado de Vector Database, Addgene) con una longitud de 5369 pares de bases. Se muestran señalados los factores más importantes. Las flechas en rojo indican la posición del gen KanR2, implicado en la resistencia al antibiótico kanamicina. La flecha azul hace referencia a la endonucleasa de restricción EcoRV de E.coli. Por último, las flechas verdes señalan los primers y promotores, destacando el T7, que permite la expresión de genes tras inducción por IPTG.





Anexo II: resultados.

1. Análisis bioinformático.

1.1. Mutaciones de los genes candidatos.

Se muestra la posición de los genes candidatos y de las mutaciones que presentan dichas posiciones en la cepa vacunal de *Myxoma virus*.

Mutaciones en la cepa vacunal				
Gen candidato	Posición	Posición de la mutación	Secuencia en la cepa de referencia	Secuencia en la cepa vacunal
M029L	29307-28960	-	-	-
M071L	68179-67205	-	-	-
M083L	82636-81776	82418	C	CC
M115L	113289-112723	-	-	-
M141R	137069-137725	137225	AAA	AA

1.2. Mutación de M083L

Tabla resumen de la mutación del gen candidato M083L:

M083L				
Cepa	Codón afectado	Aminoácido 73	Número de aminoácidos	Peso de la proteína (kDa)
Referencia	GAA	Ácido glutámico	284	32,26
Vacunal	CGA	Arginina	84	9,54

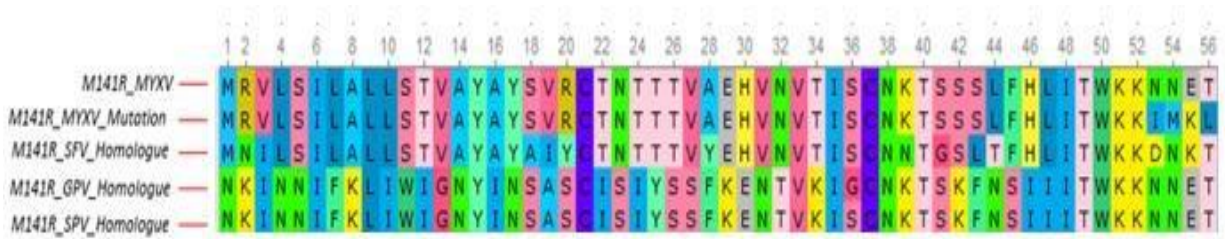
1.3. Mutación de M141R

Tabla resumen de la mutación del gen candidato M141R:

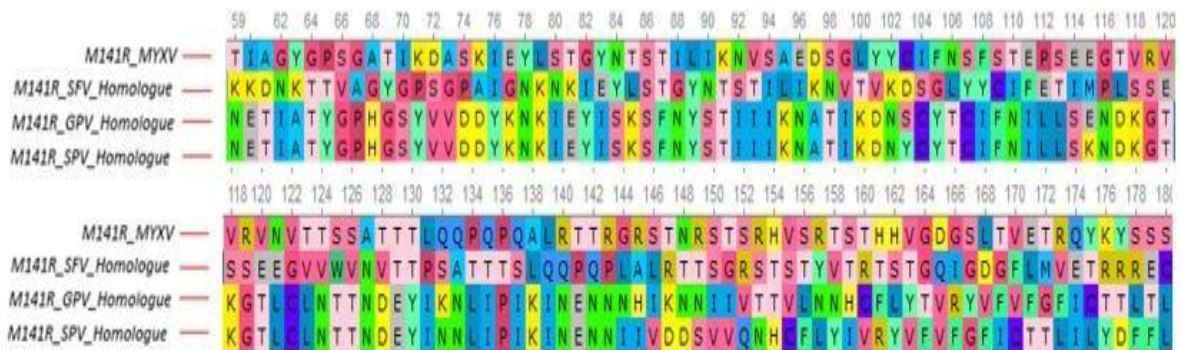
M141R				
Cepa	Codón afectado	Aminoácido 53	Número de aminoácidos	Peso de la proteína (kDa)
Referencia	AAT	Asparagina	219	23,7
Vacunal	ATA	Isoleucina	57	6,59

1.4. Alineamientos.

— Comparativa de MYXV (cepa vacunal y cepa de referencia) con SFV, GPV y SPV (posiciones 1-56)



— Comparativa de MYXV (cepa de referencia) con SFV, GPV y SPV (posiciones 56-180)



1.5. Regiones antigénicas.

1.5.1. Regiones antigénicas de M029L

Regiones antigénicas M029L			
Puntuación	Secuencia	Posición	Aminoácido más antigénico
1227	MDVILKHVV	104-112	109 (K)
1160	SPTFAVVTVSGYSFK	70-85	76 (V)
1121	NPCTVLNEYCQIT	42-54	49 (E)
1080	YEKIVSW	32-38	33 (E)



1.5.2. Regiones antigénicas de M071L

Regiones antigénicas M071L			
Puntuación	Secuencia	Posición	Aminoácido más antigénico
1218	NIAYFLSHPVVSFFGLFDITILGVSIVLFI	106-135	135 (I)
1115	LNEASAYVQHNTLYVSNK	66-83	72 (V)
1115	DFLSAYIIKISAATRIVEEI	18-38	23 (A)

1.5.3. Regiones antigénicas de M083L

Regiones antigénicas M083L			
Puntuación	Secuencia	Posición	Aminoácido más antigénico
1309	AEGCYDKHVYKNPFIELYVIIAVVVCVTIILSVMA SILY	232-270	255(V)
1244	KDGVVILAVFLKAG	107-120	113 (L)
1186	FNPVSLLPKCLDYW	148-161	154 (L)
1157	TLKVLFNVAIPST	41-53	47 (N)
1131	KSKYVLSEL	60-68	66 (S)
1125	EHSVNGAYYVGEVQMVHWNL	76-95	85 (V)
1118	ELITSQVHNIVQKN	127-140	135 (N)
1109	GKPVTYIYN	204-212	208 (T)
1106	TWIVFKDPIPIISAG	177-190	179 (I)
1094	FVALARRIY	275-283	279 (L)
1091	PIDLKIYSTPVEEYPLDVN	8-27	23 (P)
1078	TQPVKEYNVKAS	217-228	222 (E)
1056	TVAPIDK	168-174	169 (V)



1.5.4. Regiones antigénicas de M115L.

Regiones antigénicas M115L			
Puntuación	Secuencia	Posición	Aminoácido más antigénico
1152	KDIIIRLMVLEKLVQLTIK	133-151	144 (K)
1145	EKAVLITNV	41-49	43 (A)
1093	LKAIRVEIKKLIAEK	91-105	99 (K)
1092	EVSVRLG	72-78	76 (R)
1086	NKCVGGK	20-26	25 (G)
1065	SDILKDSFIHK	117-127	122 (D)

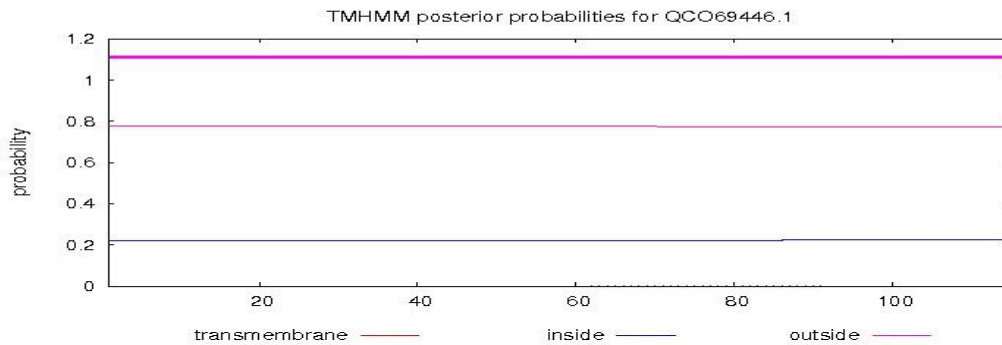
1.5.5. Regiones antigénicas de M141R.

Regiones antigénicas M141R			
Puntuación	Secuencia	Posición	Aminoácido más antigénico
1194	LSILALLSTVAYAYSVRCT	4-22	6 (I)
1164	VPSLFKLIFVIKMIFYIPN	197-215	203 (L)
1157	SGLYYCIFNS	98-107	102 (Y)
1147	VAEHVNVTISCNKT	27-40	34 (T)
1125	SSSLFHLIT	43-51	47 (F)
1094	STILIKNV	86-93	91 (K)
1088	TVRVNVVTS	117-125	120 (V)
1070	TTTLQQPQPQAL	128-139	136 (P)
1060	KIEYLST	75-81	76 (I)
1052	THHVGDGSLTVETR	160-173	165 (G)
1044	SRHVSRT	152-158	153 (R)
1043	YKYSSSSSSS	175-184	177 (Y)

1.6. Regiones transmembrana.

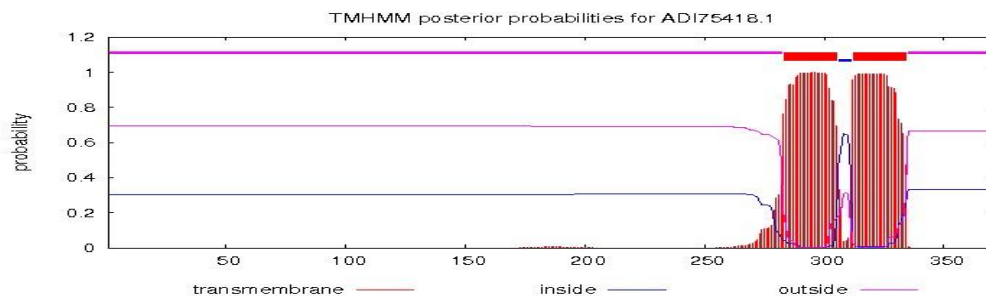
1.6.1. Regiones transmembrana de M029L

```
# QCO69446.1 Length: 115
# QCO69446.1 Number of predicted TMHs: 0
# QCO69446.1 Exp number of AAs in TMHs: 0.00379
# QCO69446.1 Exp number, first 60 AAs: 0.00054
# QCO69446.1 Total prob of N-in: 0.22210
QCO69446.1 TMHMM2.0 outside 1 115
```



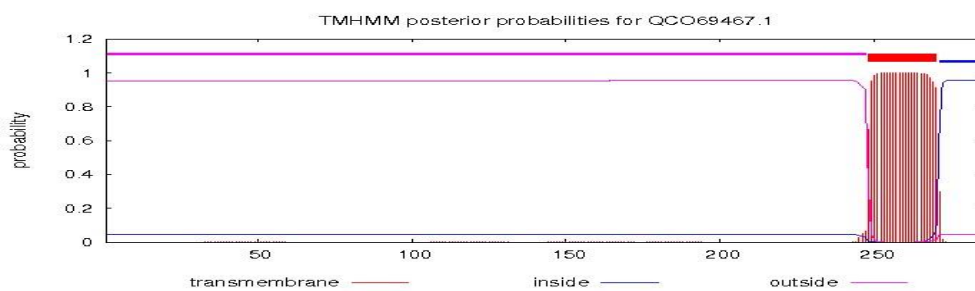
1.6.2. Regiones transmembrana de M071L

```
# ADI75418.1 Length: 372
# ADI75418.1 Number of predicted TMHs: 2
# ADI75418.1 Exp number of AAs in TMHs: 45.93215
# ADI75418.1 Exp number, first 60 AAs: 0.00079
# ADI75418.1 Total prob of N-in: 0.30373
ADI75418.1 TMHMM2.0 outside 1 282
ADI75418.1 TMHMM2.0 TMhelix 283 305
ADI75418.1 TMHMM2.0 inside 306 311
ADI75418.1 TMHMM2.0 TMhelix 312 334
ADI75418.1 TMHMM2.0 outside 335 372
```



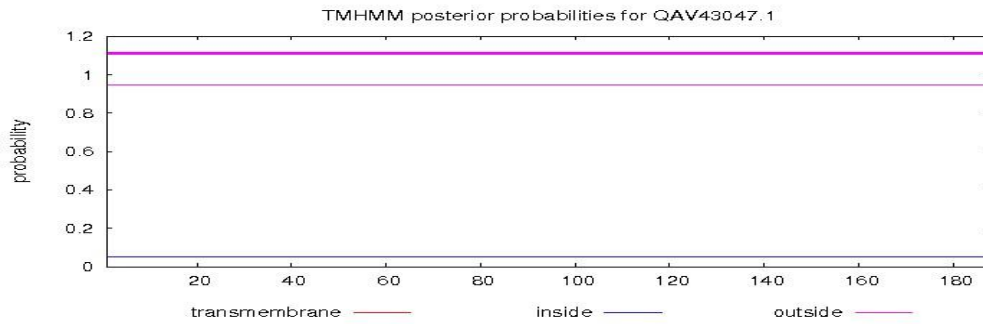
1.6.3. Regiones transmembrana de M083L

```
# QCO69467.1 Length: 286
# QCO69467.1 Number of predicted TMHs: 1
# QCO69467.1 Exp number of AAs in TMHs: 22.95922
# QCO69467.1 Exp number, first 60 AAs: 0.04113
# QCO69467.1 Total prob of N-in: 0.04854
QCO69467.1 TMHMM2.0 outside 1 247
QCO69467.1 TMHMM2.0 TMhelix 248 270
QCO69467.1 TMHMM2.0 inside 271 286
```



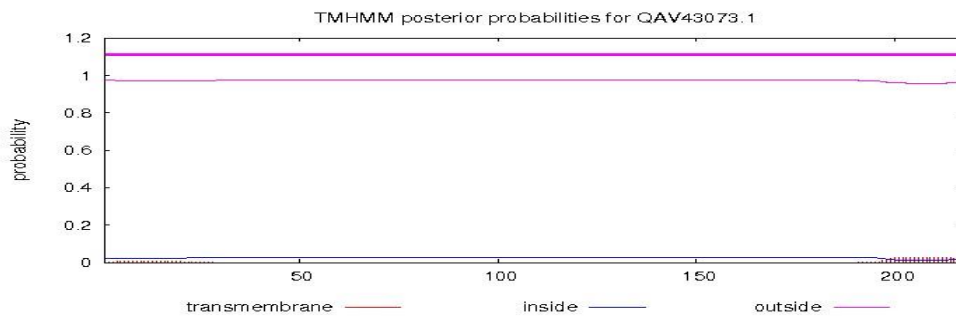
1.6.4. Regiones transmembrana de M115L

```
# QAV43047.1 Length: 188
# QAV43047.1 Number of predicted TMHs: 0
# QAV43047.1 Exp number of AAs in TMHs: 0.00185
# QAV43047.1 Exp number, first 60 AAs: 0
# QAV43047.1 Total prob of N-in: 0.05080
QAV43047.1 TMHMM2.0 outside 1 188
```



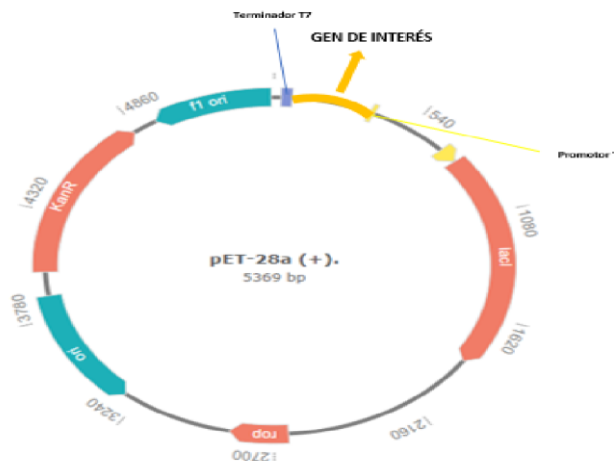
1.6.5. Regiones transmembrana de M141R

```
# QAV43073.1 Length: 218
# QAV43073.1 Number of predicted TMHs: 0
# QAV43073.1 Exp number of AAs in TMHs: 0.67428
# QAV43073.1 Exp number, first 60 AAs: 0.15436
# QAV43073.1 Total prob of N-in: 0.02317
QAV43073.1 TMHMM2.0 outside 1 218
```



2. Inducción y sobreexpresión de proteínas candidatas.

2.1. Plásmido pET-28a (+) modificado.





2.2. Peso teórico de las proteínas candidatas.

Peso de las proteínas	
Proteína	Peso (KDa)
M029L	12,81
M071L	36,85
M083L	32,26
M115L	21,59
M141R	23,7

3. Purificación y cuantificación de las proteínas candidatas.

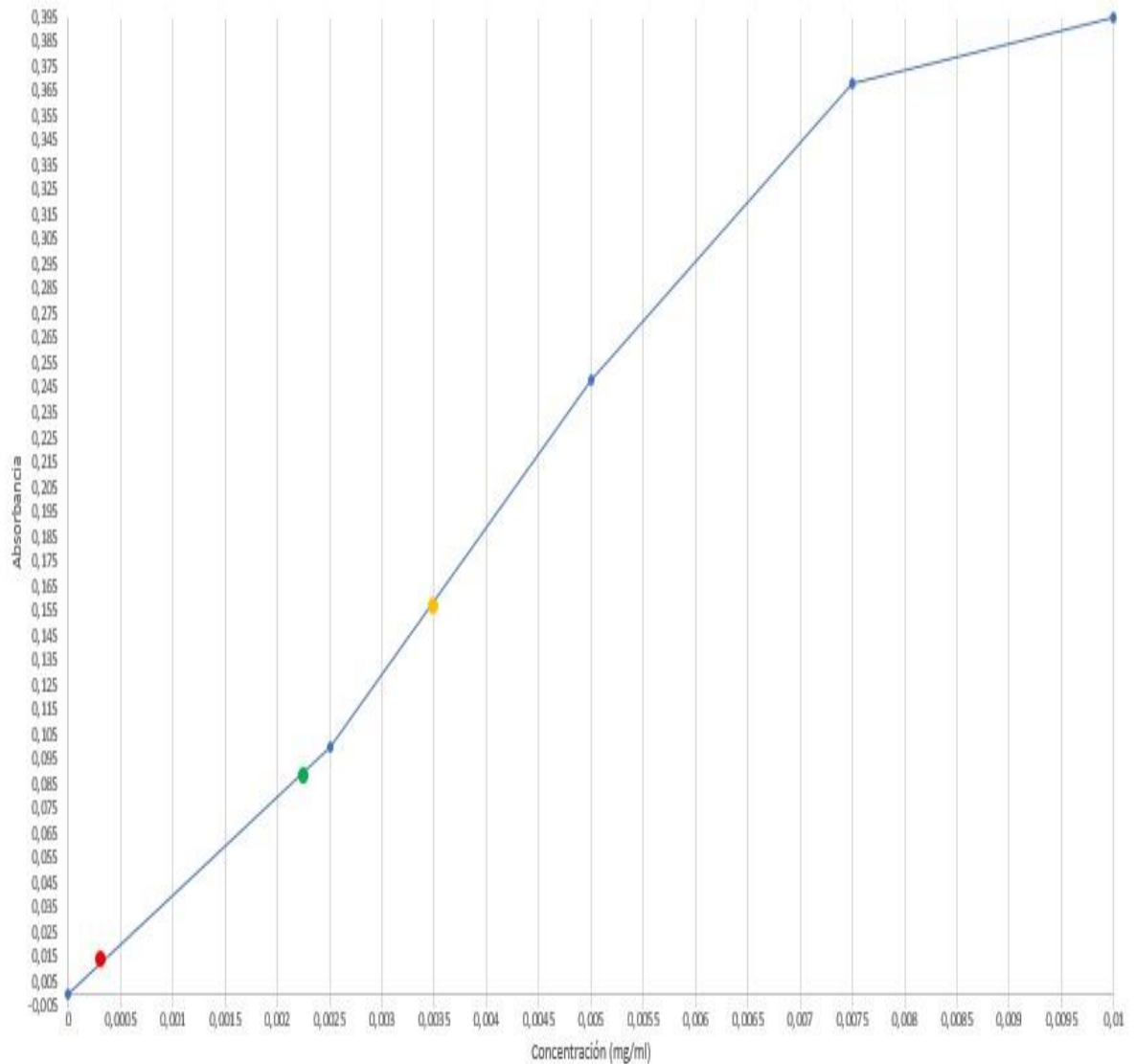
3.1. Valores de la curva de calibración del método de Bradford.

Se muestran los valores de absorbancia y concentración de las muestras de la recta patrón.

Muestra	Absorbancia (595nm)	Concentración (mg/ml)
Blanco	0	0
BSA	0,1	0,0025
	0,249	0,005
	0,368	0,0075
	0,395	0,01

3.2. Curva de calibración.

Recta patrón con las absorbancias y las concentraciones obtenidas a partir de la cuantificación de las muestras de las proteínas por el método de Bradford. Los puntos corresponden a las ubicaciones de las absorbancias de las proteínas problema M029L (rojo), M083L (verde) y M115L (amarillo).



3.3. Análisis de las proteínas a concentraciones igualadas (2,1 µg/mL).

3.3.1. Tinción con azul de Coomassie.

Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el experimento: (I: PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: M029L; III: M083L IV: M115L).



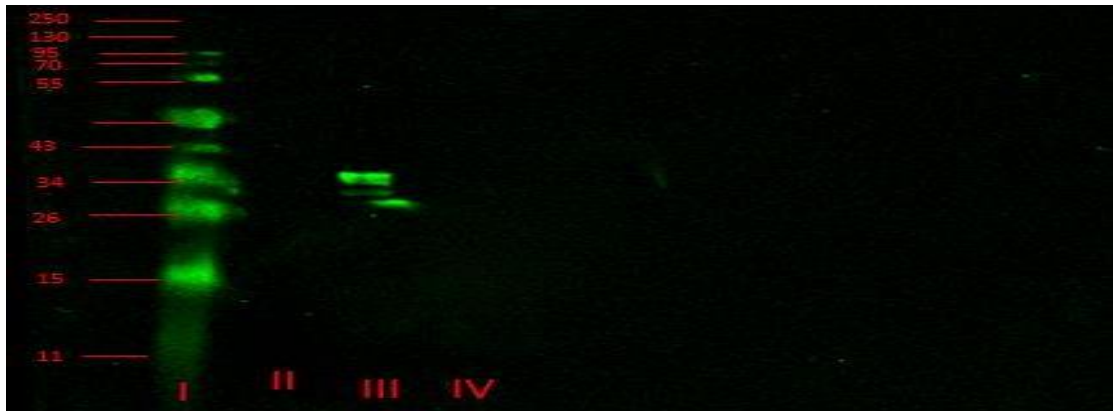
3.3.2. Western-blot con Pool Anti-Myxo + IRDDye 800 CW anti-rabbit.

Los números corresponden a cada una de las calles del gel a partir del cual fue elaborado el experimento: (I: PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II: M029L; III: M083L IV: M115L).



3.3.3. Western-blot con Monoclonal Anti-6X His tag antibody + IRDDye 800 CW anti-mouse.

Los números corresponden a cada una de las calles del gel (I: Marcador PageRuler Prestained NIR Protein Ladder; II:M029L, III: M083L , IV: M115L).



4. Ensayo ELISA

4.1. Distribución de las muestras de las proteínas candidatas en la placa ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C	50	50	50	150	150	150	150	150	150	150	150	150
D	100	100	100	200	200	200	200	200	200	200	200	200
E	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
F	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G	PBS	PBS	PBS	150	150	150	150	150	150	150	150	150
H	PBS	PBS	PBS	200	200	200	200	200	200	200	200	200

4.2. Valores de absorbancia de los pocillos de la placa ELISA.

	1	2	3	4	5	6
A	1,746	1,231	1,710	0,607	0,917	1,899
B	1,879	2,513	0,597	0,610	0,745	1,816
C	0,985	1,393	0,498	2,663	0,973	1,371
D	1,020	1,617	2,515	2,753	1,479	2,312
E	0,427	0,724	0,354	5,324	4,567	5,023
F	0,478	0,931	0,558	5,766	5,072	4,965
G	0,041	0,044	0,045	5,624	5,660	5,284
H	0,041	0,048	0,040	5,129	4,921	4,993

	7	8	9	10	11	12
A	0,185	0,327	0,304	0,784	0,172	0,262
B	0,675	1,290	2,100	0,527	0,388	0,457
C	2,001	2,637	2,436	0,484	0,868	2,115
D	1,613	1,448	2,858	0,392	0,584	1,188
E	0,320	0,288	0,302	1,162	0,709	0,990
F	0,616	0,305	0,671	0,625	1,658	1,172
G	0,860	0,794	0,703	1,822	1,154	1,258
H	0,722	0,848	0,987	1,151	1,434	1,193