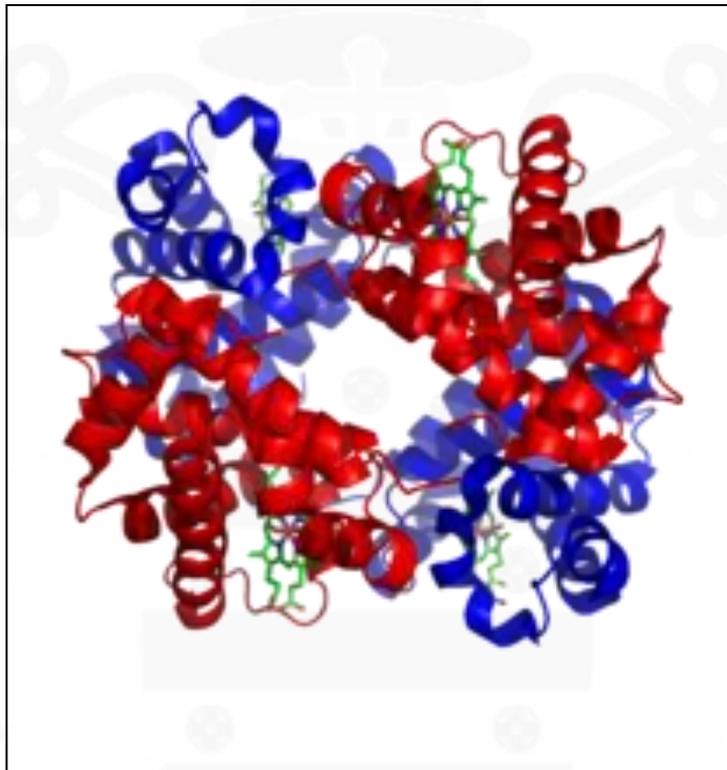


# TRABAJO FIN DE GRADO

## BIOTECNOLOGÍA

Producción de antígenos virales del virus de mixoma en sistemas de expresión heterólogos para el desarrollo de métodos de diagnóstico de tipo ELISA



**Adrián González Fernández**

**Grupo de Virología y Parasitología  
Molecular – Universidad de Oviedo**

07/24



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Adrián González Fernández, estudiante del Grado en Biotecnología de la Universidad de Oviedo, **DECLARO**:

*Que el presente Trabajo Fin de Grado se ha realizado en el laboratorio 3.18 del grupo de investigación VyPMOL del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Oviedo (Edificio Santiago Gascón), dirigido por el Profesor Kevin Paul Dalton y realizado en conjunto con el alumno David García Cuesta, que la memoria se ha realizado de manera individual y tanto el texto, como los datos y las figuras incluidos son obra original mía, salvo aquellos procedentes de otros autores que han sido citados debidamente.*

En Oviedo, a 4 de julio de 2024.

## RESUMEN

La mixomatosis es una enfermedad causada por el *Myxoma virus* (MYXV) que afecta tanto a los conejos silvestres como a los conejos domésticos de las granjas comerciales en Europa, donde aun existiendo vacunas, la enfermedad sigue causando grandes pérdidas económicas. Parte del problema es la dificultad en detectar anticuerpos tras la vacunación. La detección de anticuerpos requiere utilizar el virus completo como antígeno, lo que encarece y dificulta el proceso. La expresión de proteínas del virus en sistemas de expresión heterólogos (bacterias y células de insecto), su posterior purificación en columna de afinidad y el análisis de su capacidad antigénica mediante ensayos serológicos, constituye un campo de investigación de alta importancia para estudiar la respuesta inmune de los conejos tras la vacunación contra el MYXV, pudiendo de esta manera establecer un mejor control sobre su respuesta inmune y desarrollar vacunas más efectivas contra esta grave enfermedad.

## ABSTRACT

Myxomatosis is a disease caused by Myxoma virus (MYXV) that affects both wild rabbits and domestic rabbits on commercial farms in Europe. Part of the problem is the difficulty in detecting antibodies after vaccination. The detection of antibodies requires the use of the whole virus as antigen, which makes the process more expensive and difficult. The expression of virus proteins in heterologous expression systems (bacteria and insect cells), the subsequent purification using affinity column and the analysis of their antigenic capacity using serological tests is a highly important field of research to study the immune response of rabbits after vaccination against MYXV, in this way control the effect of vaccination and possibly in the development of more effective vaccines against this severe disease.



## CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	OBJETIVOS .....	4
3	MATERIAL Y MÉTODOS.....	4
3.1	Amplificación mediante PCR de los genes de interés .....	4
3.2	Purificación de los productos de PCR .....	5
3.3	Digestión de los productos de PCR y el vector de expresión pTriEx-1.1.....	7
3.4	Ligación de los genes de interés con el vector de expresión pTriEx-1.1.....	8
3.5	Transformación de bacterias <i>XL1-Blue</i> de <i>E.coli</i> con el vector recombinante	9
3.6	Purificación del plásmido recombinante .....	9
3.7	Cuantificación del DNA.....	10
3.8	Expresión de los genes de interés en la cepa BL21(DE3) de <i>E.coli</i> .....	11
3.9	Construcción de baculovirus recombinantes para la infección en células de insecto Sf-9 .....	11
3.10	Amplificación del baculovirus recombinante en células de insecto Sf-9.....	12
3.11	Infección de células de insecto Sf-9 para la producción de las proteínas ....	12
3.12	Secuenciación de los plásmidos recombinantes .....	13
3.13	Titulación del stock de virus .....	13
3.14	Infección en condiciones óptimas para la producción de las proteínas .....	14
3.15	Purificación de la proteína en columna.....	14
3.16	Análisis <i>Western Blot</i> (WB) para comprobar la producción de las proteínas de interés y análisis de antigenicidad.....	15
4	RESULTADOS .....	18
4.1	Amplificación por PCR de los genes de interés.....	18
4.2	Digestión con enzimas de restricción de los amplicones .....	19
4.3	Digestión de los <i>minipreps</i> con el fin de observar si contienen los genes de interés.. .....	20



4.4	Análisis WB de la producción de las proteínas de interés .....	20
4.5	Secuenciación de los genes recombinantes de interés .....	22
4.6	Análisis WB del resultado de la purificación de la proteína en columna.....	23
4.7	Análisis de antigenicidad de la proteína de interés .....	24
5	DISCUSIÓN .....	25
6	CONCLUSIÓN.....	27
7	REFERENCIAS .....	28

## 1 INTRODUCCIÓN

El *Myxoma virus* (MYXV) se trata de un virus de la familia *Poxviridae* y el género *Leporipoxvirus* que consta de un genoma de 163 kilobases de DNA bicatenario. El virus se caracteriza por causar una enfermedad conocida como mixomatosis en el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) que provoca hinchazón de la cara y aparición de tumores cutáneos en los conejos que infecta[1].



Figura 1. Conejo infectado con MYXV. Fuente: <https://www.stortvet.com/myxomatosis-myxv/>

En el caso de España, donde el virus fue introducido en la década de 1950[2], la mixomatosis es un problema recurrente tanto para las poblaciones de conejos silvestres como para las granjas comerciales, donde ha provocado importantes pérdidas económicas pese a los esfuerzos de vacunación. La efectividad de las vacunas frente a esta enfermedad ha sido inestable, principalmente en las granjas, ya que la aplicación de la vacuna de manera subcutánea reduce su efectividad frente a la aplicación intradérmica, que es más difícil de administrar[3]. Debido los motivos mencionados, es crucial establecer nuevas estrategias de control más efectivas para la protección de las poblaciones silvestres y las granjas de conejos en el país.

Cabe destacar que los viriones del MYXV pueden presentarse en dos formas diferentes, ambas infecciosas: *Mature Virion* (MV) y *Enveloped Virion* (EV), como se muestra en la Figura 2. La forma MV consiste en la forma madura del virus tras su ensamblaje, de carácter intracelular. La forma EV se trata de una forma extracelular que cuenta con una segunda membrana lipídica proveniente de la membrana de la célula huésped tras su liberación de esta por exocitosis, esta forma además puede contener entre cuatro y seis proteínas virales específicas[4]. Esto complica

enormemente el desarrollo de vacunas efectivas, ya que deben ser capaces de generar protección frente a ambas formas del MYXV. Las vacunas existentes hoy en día consisten en cepas vivas y atenuadas del virus (a las que se les han delecionado factores de virulencia), pero el virus todavía presenta proteínas de las que no se conoce su función inmune y podrían ser clave para el desarrollo de vacunas más efectivas[5].

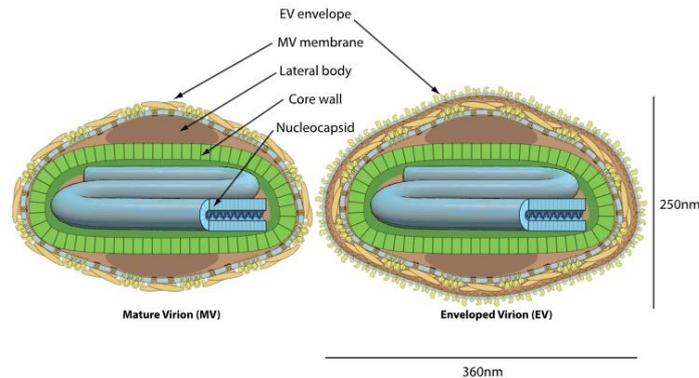


Figura 2. Estructura y tamaño de las dos posibles formas del MYXV, Mature Virion (MV) y Enveloped Virion (EV). Fuente: <https://viralzone.expasy.org/174>

Para tratar de identificar proteínas antigénicas del MYXV se escogieron en este trabajo varios genes para su expresión y purificación de sus proteínas correspondientes, concretamente fueron elegidos los genes *M083*, *M121* y *M122*. La localización de sus proteínas se muestra en la Figura 3, basándose en sus proteínas homólogas de *Vaccinia virus* (VACV), también de la familia *Poxviridae* y utilizado como referencia para este tipo de virus al ser con diferencia el más estudiado y, su vacuna, la más administrada en la historia de la humanidad[6]. El gen *M083* codifica para una proteína presente en la membrana del MV relacionada con la modulación de la respuesta inmune del huésped y que permite la propagación del virus[7]. Los genes *M121* y *M122* codifican para proteínas exclusivas de la forma EV y se cree que pueden estar implicadas en la inhibición de la citotoxicidad mediada por células (por su homología con la familia de proteínas receptoras de células *natural killer*), y también en la propagación del virus (por su homología con las proteínas A33R y A34R de VACV, que cumplen esa función)[8].

### Myxoma virus (Lausanne strain) ORFs with homology to Vaccinia ORFs

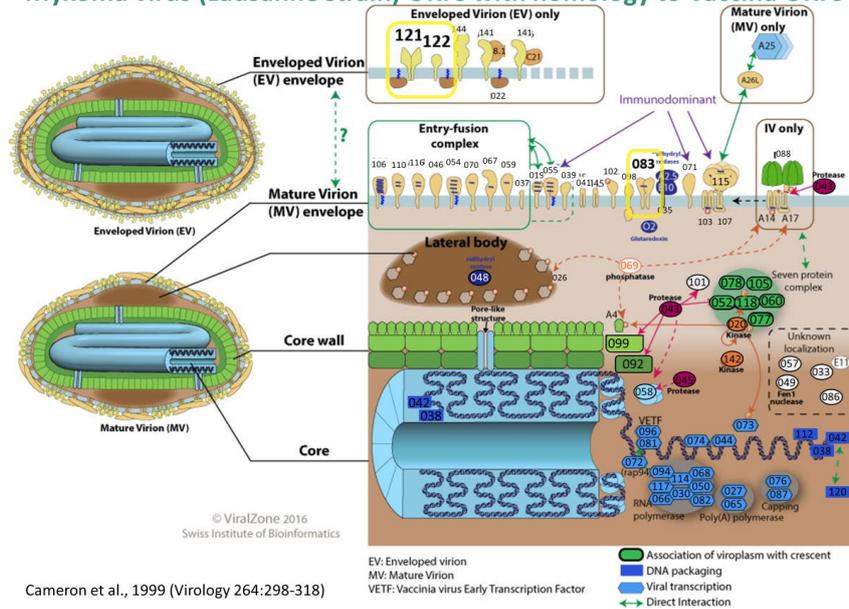


Figura 3. Estructura de las dos formas del virión del MYXV (EV y MV), donde se observa la localización de sus proteínas. Las proteínas de interés se encuentran resaltadas con un cuadro amarillo. Fuente:

<https://viralzone.expasy.org/4400>

Es de vital importancia desarrollar métodos de diagnóstico efectivos que ayuden a combatir el MYXV. Por ello, los ensayos inmunoenzimáticos del tipo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) constituyen una herramienta esencial en el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas, como es el caso de la mixomatosis[9], gracias a presentar una alta sensibilidad y especificidad[10]. La principal dificultad de estos ensayos radica en la producción de antígenos virales, especialmente en sistemas de expresión homólogos[11]. Para el caso del MYXV, los ensayos ELISA se realizan tapizando las placas con el virus completo[12], lo que requiere su cultivo en grandes cantidades y sus correspondientes problemas de bioseguridad. Además, debido al desconocimiento de la función inmune de muchas proteínas del virus como se mencionó anteriormente, no se puede conocer con exactitud cuáles son las proteínas responsables de la respuesta observada en estos ensayos.

El presente trabajo va a desarrollar la producción de antígenos virales utilizando sistemas de expresión heterólogos: expresión en *E.coli* y expresión en células de insecto Sf-9. El uso de estos sistemas permite la producción de proteínas concretas del MYXV que podrían utilizarse para realizar ensayos ELISA en vez de utilizar el virus completo, pudiendo obtener así resultados mucho más específicos.

## 2 OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo consiste en investigar la producción de antígenos virales del MYXV en sistemas de expresión heterólogos para su aplicación en métodos de diagnóstico de tipo ELISA con el fin de medir la respuesta inmune generada por los conejos tras la vacunación.

## 3 MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 AMPLIFICACIÓN MEDIANTE PCR DE LOS GENES DE INTERÉS

Se amplificaron los genes de interés por medio de una PCR utilizando el kit *TaKaRa LA Taq® DNA Polymerase*, para facilitar la posterior clonación de los genes los cebadores contienen las secuencias necesarias para ser reconocidas por las enzimas de restricción.

Se comenzó preparando una *Master Mix* (MM) para la PCR, cuyos componentes para cada tubo fueron:

- 33,5 µL de agua ultrapura.
- µL de tampón (10X) con Mg<sup>2+</sup>.
- 8 µL de dNTPs (2,5 mM).
- 0,5 µL del enzima Taq Polimerasa (5U/µL).
- 1 µL de muestra (DNA de *Myxoma Virus*, cepa: *Lausanne*, 0,25 µg/µL).

Cada tubo se preparó con la MM previamente mencionada y 1 µL a 10 µM de cada cebador (*forward* y *reverse*) específico para cada gen, con las siguientes secuencias:

- Gen *M083*:
  - o ExM083L (*forward*) gtactgactgctcgaggctaccatagtagatgcgac (sitio de corte para *Xho*I, indicado en fuente cursiva y subrayada, aquí y para todos los enzimas de restricción).
  - o ExM083LRC (*reverse*) cagtcagtcaccactgccagtcatgagttctcgtcaggaatcgcc (sitio de corte para *Aa*I).
- Gen *M121*:

- ExM121R (*forward*) cagtcagtcagggtctcccatgctggttacacgcccaacg (sitio de corte para Bsal).
- ExM121RRC (*reverse*) tgactgactgctcgagtaaagtaaagattttacg (sitio de corte para XhoI).
- Gen M122:
  - ExM122R (*forward*) cagtcagtcagggtctcccatgaaaacgtaaacagac (sitio de corte para Bsal).
  - ExM122RRC (*reverse*) catgactgactgctcgagttatagaatctttcctac (sitio de corte para XhoI).

También se preparó un tubo control con 2 µL de agua ultrapura en lugar de los cebadores.

La PCR se llevó a cabo en el termociclador *C1000 Touch Thermal Cycler* de *Bio-Rad* bajo el siguiente programa:

- Desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos.
- Desnaturalización a 94°C durante 30 segundos.
- Anillamiento a 55°C durante 30 segundos.
- Extensión a 68°C, temperatura óptima de trabajo de la Taq Polimerasa.
- Extensión final a 68°C durante 5 minutos.
- Almacenamiento a 4°C.
- Los pasos 2, 3 y 4 se repitieron un total de 30 veces antes de pasar al paso 5.

### 3.2 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR

La purificación de los productos de PCR se llevó a cabo utilizando el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* de *Promega*, mediante el siguiente protocolo:

- Añadir 50 µL de *Membrane Binding Solution* a cada producto de PCR.
- Mezclar y transferir la mezcla a una *SV Minicolumn* dentro de un tubo colector.
- Centrifugar a 16.000 g durante un minuto y descartar el sobrenadante.

- Añadir a cada columna 700  $\mu$ L de *Membrane Washing Solution* (con etanol), centrifugar a 16.000 g por un minuto y descartar el sobrenadante.
- Añadir otros 500  $\mu$ L de la solución de lavado y volver a centrifugar a 16.000 g, esta vez durante 5 minutos, volver a descartar el sobrenadante.
- Centrifugar una vez más a 16.000 g durante otro minuto para eliminar posible etanol residual.
- Transferir la columna a un tubo limpio de 1,5 mL.
- Añadir 40  $\mu$ L de *Nuclease-Free Water* a la columna para eluir el DNA purificado, incubar un minuto a temperatura ambiente, y centrifugar nuevamente a 16.000 g durante otro minuto.
- Descartar la columna y guardar el DNA purificado a 4°C si se va a utilizar, o en su defecto a -20°C para su almacenamiento largo plazo.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% TAE 1X (0,04M Tris-acetato y 0,001M EDTA), el protocolo para la preparación de este fue el siguiente:

- Se calentó en el microondas hasta que la agarosa estaba correctamente fundida.
- Se añadieron 5  $\mu$ L de *SafeView™* de *Applied Biological Materials (abm) Inc.* una vez había enfriado ligeramente la mezcla.
- Una vez preparado, se vierte el volumen en un molde con un peine para que solidifique y dé lugar a los pocillos donde cargar las muestras.

Se añadieron 5  $\mu$ L de marcador *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* de *ThermoFisher Scientific* a la primera calle y luego se fueron añadiendo 6  $\mu$ L de muestra a cada una de las calles sucesivas (5  $\mu$ L de producto de PCR y 1  $\mu$ L de *DNA Gel Loading Dye* (6X) de *ThermoFisher Scientific*, que contiene glicerol, azul de bromofenol y xileno cianol FF, permitiendo así observar el avance de la electroforesis). Se dejó el gen corriendo durante 1 hora y 30 minutos a una intensidad de 90 voltios para su posterior revelación.

Se tomaron imágenes de todos los geles de agarosa a través del escáner *Gel Logic 212 PRO* de *Carestream* mediante luz UV, generando así fluorescencia en el *SafeView™* una vez está unido al DNA.

### 3.3 DIGESTIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR Y EL VECTOR DE EXPRESIÓN pTriEx-1.1

Los genes objeto de estudio se clonaron en el vector de expresión *pTriEx-1.1*, que permite su expresión en diferentes sistemas de hospedador gracias a que contiene los siguientes elementos: promotor de expresión en bacterias (*T7lac*), promotor de expresión en células de insecto (p10), numerosos sitios de corte de enzimas de restricción, un gen de resistencia a ampicilina y una cola de seis histidinas en el sitio de unión de los genes de interés.

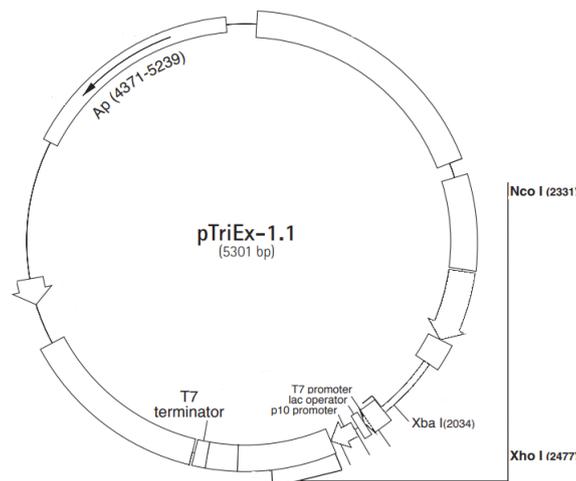


Figura 4. Vector de expresión pTriEx-1.1. Secuencias de interés: Ap – gen de resistencia a ampicilina; promotor T7 – promotor de expresión en bacterias, regulado por el operón *lac*; promotor p10 – promotor de expresión en células de insecto; *NcoI*, *XhoI* y *XbaI* - sitios de corte de enzimas de restricción.

Se comenzó preparando una digestión del plásmido vector de la siguiente manera:

- 4  $\mu$ L de vector (200 ng/ $\mu$ L).
- 1  $\mu$ L de enzima *FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* de *ThermoFisher Scientific* (1 U/ $\mu$ L).
- 2  $\mu$ L de tampón *FastDigest Green Buffer* (10X) de *ThermoFisher Scientific*.
- 1  $\mu$ L de enzima de restricción *XhoI* 10U/ $\mu$ L de *ThermoFisher Scientific*.

- 1  $\mu\text{L}$  de enzima de restricción *NcoI* 10U/ $\mu\text{L}$  de *ThermoFisher Scientific*.
- 11  $\mu\text{L}$  de agua para un volumen final de 20  $\mu\text{L}$ .

Una vez digerido el vector, este se purificó en columna utilizando nuevamente el kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* para tratar de eliminar el fragmento digerido y evitar de esta forma que volviese a ligar con el vector.

En el caso de la digestión de los genes, se realizó de la siguiente manera:

- 16  $\mu\text{L}$  del producto de PCR de cada gen (aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  de DNA).
- 2  $\mu\text{L}$  de *FastDigest Green Buffer*.
- 1  $\mu\text{L}$  de cada uno de los enzimas de restricción correspondientes a cada gen:
  - o *M083: AarI* (2U/ $\mu\text{L}$ ) de *ThermoFisher Scientific* y *XhoI*.
  - o *M121* y *M122: BsaI* (10U/ $\mu\text{L}$ ) de *ThermoFisher Scientific* y *XhoI*.

Se preparó un nuevo gel de agarosa al que se cargó los productos de la digestión siguiendo el mismo protocolo mencionado anteriormente.

### 3.4 LIGACIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS CON EL VECTOR DE EXPRESIÓN PTriEX-1.1

Para la ligación del vector con los respectivos genes se utilizó el kit *T4 DNA Ligase* de *ThermoFisher Scientific*, se prepararon tubos de PCR de la siguiente manera:

- 200 ng de vector digerido.
- 2  $\mu\text{L}$  de tampón *T4 DNA Ligase Buffer* (10X).
- 1  $\mu\text{L}$  de enzima ligasa 5U/ $\mu\text{L}$ .
- Producto de digestión relación 1:1 en masa con el vector
  - o 34 ng *M083*.
  - o 21 ng *M121*.
  - o 20 ng *M122*.
- Agua hasta 20  $\mu\text{L}$ .

- Dejar incubando a 22°C durante 1h.

### 3.5 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS *XL1-BLUE* DE *E.COLI* CON EL VECTOR RECOMBINANTE

Se procedió a la transformación de la cepa de células competentes *XL1-Blue* de *E.coli* con los vectores recombinantes. Para la transformación se añadieron 5 µL (5-8 ng de DNA) de cada construcción a 45 µL de células competentes en tubos de 1,5 mL, además se preparó un tubo control con 5 µL de vector digerido (linearizado) y 45 µL de células como control negativo, y un tubo adicional con 1 µL plásmido control y 20 µL de células utilizado como control positivo de la transformación. Se dejaron incubando 30 minutos en hielo, pasado ese tiempo se les aplicó un shock térmico al introducir los tubos durante 45 segundos en un baño caliente a 42°C y dejarlos después 2 minutos en hielo.

Se prepararon placas con medio LB-Ampicilina (100 µg de ampicilina por mL de medio de cultivo) y se sembraron con las células transformadas. Se dejaron incubando a 37°C hasta el día siguiente. Los plásmidos recombinantes deberán crecer y formar colonias gracias al gen de resistencia a ampicilina.

### 3.6 PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE

Para la purificación del plásmido recombinante se procedió a picar diferentes colonias individuales de las placas obtenidas en la transformación, se transfirieron a tubos de ensayo de 15 mL con 2 mL de LB-Ampicilina (100 µg de ampicilina por mL de medio de cultivo) y se dejaron crecer en agitación a 37°C durante 3 horas.

Cuando ha transcurrido el tiempo y han crecido lo suficiente (han alcanzado una densidad óptica de 0.6-0.8), se transfieren 1,5 mL de cada cultivo a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, y se centrifugan durante 5 minutos a 6.000 g, conservando el *pellet* de células.

Una vez se tienen los *pellets* de células que se quieren purificar, este proceso se realiza utilizando el kit *PureLink Quick Plasmid Miniprep* de *ThermoFisher Scientific* mediante el siguiente protocolo:

- Se resuspende cada *pellet* en 250  $\mu$ L de *Resuspension Buffer* (R3) con RNasa A.
- Una vez resuspendido se añade 250  $\mu$ L de *Lysis Buffer* (L7) y se mezcla por inversión hasta que quede homogéneo, después se incuba a temperatura ambiente 5 minutos.
- Se añaden 350  $\mu$ L de *Precipitation Buffer* (N4) y se mezcla por inversión.
- Se centrifuga el lisado a 12.000 g durante 10 minutos.
- Tras la centrifugación, se carga el sobrenadante en una columna dentro de un tubo de 2 mL, se centrifuga a 12.000 g durante un minuto y se descarta el sobrenadante.
- Con el DNA ya unido a la columna, se añaden 700  $\mu$ L de *Wash Buffer* (W9) con etanol, se incuba un minuto a temperatura ambiente y se centrifuga a 12.000 g durante un minuto, se descarta nuevamente el sobrenadante
- Se centrifuga una vez más a 12.000 g durante otro minuto para eliminar posibles restos de etanol en la membrana.
- Por último, la columna se transfiere a un tubo limpio de 1,5 mL y se le añade 75  $\mu$ L de *TE Buffer* (TE) previamente calentado a 60 grados.
- Se centrifuga una última vez a 12.000 g durante 2 minutos y se descarta la columna. El tubo que contiene el DNA purificado se puede conservar a 4°C para su uso o a -20°C para su almacenamiento.

Se tomó una alícuota de 16  $\mu$ L de cada construcción del plásmido recombinante purificado (*miniprep*) y se digirieron con los enzimas *XbaI* (10U/ $\mu$ L) de *ThermoFisher Scientific* y *XhoI* (10U/ $\mu$ L) siguiendo el mismo protocolo de la primera digestión.

### 3.7 CUANTIFICACIÓN DEL DNA

Se cuantificó la cantidad de DNA presente en los *minipreps* mediante el fluorímetro *Invitrogen Qubit 4* y el kit *Qubit 1X dsDNA HS Assay* de *ThermoFisher Scientific*.

- Se generó una recta patrón a partir de los estándares del kit.
- Se preparó una dilución 1:50 de cada *miniprep* con la solución de trabajo (volumen final: 200  $\mu$ L).

- Se introdujeron las muestras preparadas en el fluorímetro para su cuantificación.

### 3.8 EXPRESIÓN DE LOS GENES DE INTERÉS EN LA CEPA BL21(DE3) DE *E. COLI*

Se optó por tratar de expresar los genes de interés en bacterias, en la cepa quimiocompetente BL21(DE3) de *E. coli*, siguiendo el mismo protocolo que en la primera transformación realizada, pero esta vez utilizando los *minipreps* que contenían el vector recombinante purificado en vez del producto de ligación.

- Cuando las colonias ya habían crecido en agitación (habían alcanzado una densidad óptica de 0,6-0,8), se transfirió 1 mL de cada tubo a otro diferente, al que se le añadió 5  $\mu$ L de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM, y se dejaron nuevamente en agitación a 37°C durante 2 horas.
- Una vez transcurrido el tiempo se transfirió el volumen de cada tubo a un tubo limpio de 1,5 mL y se centrifugaron a 6.000 g durante 5 minutos, descartando el sobrenadante y almacenando el *pellet* a -20°C para su uso.

### 3.9 CONSTRUCCIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES PARA LA INFECCIÓN EN CÉLULAS DE INSECTO Sf-9

Se prepararon tres construcciones de baculovirus recombinantes, una por cada plásmido recombinante generado, siguiendo el protocolo a continuación:

- o 8  $\mu$ L *Cellfectin™ II Reagent* de *ThermoFisher Scientific*.
- o 4  $\mu$ L de báculo digerido (linearizado) de tal forma que se encuentra inactivado un gen esencial para la virulencia, pudiendo volver a ser activado únicamente tras recombinación con un vector de transferencia[13].
- o 0,5  $\mu$ g de plásmido recombinante.
- o Medio de cultivo *Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium* de *ThermoFisher Scientific* hasta un volumen final de 25  $\mu$ L.
- En una placa P6 se siembran  $1 \times 10^6$  células de insecto Sf-9 y se espera a que se adhieran a la placa, observándolo al microscopio.

- Una vez adheridas las células, se retira el medio y se añade 1 mL de medio de cultivo sin suero bovino fetal (FBS).
- Se siembra cada construcción en un pocillo de la placa, a uno de los pocillos no se le añadió nada (control celular) y a otro se le añadió una construcción sin DNA (*miniprep*) como control de la transfección.
- Se incuba durante 1h a 28°C para que se produzca la transfección.
- Transcurrido este tiempo, se retira el medio sin suero y se añade medio al 10% de FBS.
- Se vuelve a incubar a 28°C durante 72h.

### **3.10 AMPLIFICACIÓN DEL BACULOVIRUS RECOMBINANTE EN CÉLULAS DE INSECTO Sf-9**

Se realiza un pase de la construcción inicial:

- Se recoge el medio de cada pocillo donde se encuentra la construcción inicial de los baculovirus y el control de transfección.
- Se prepara una nueva placa P6 con 1 millón de células Sf-9/pocillo.
- Se añaden a cada pocillo 1,5 mL de medio al 5% de FBS y 500 µL de la construcción inicial de cada baculovirus, mientras que a uno de los pocillos se le añadieron 500 µL del control de la transfección.
- Se deja incubando a 28°C durante 48h.

### **3.11 INFECCIÓN DE CÉLULAS DE INSECTO Sf-9 PARA LA PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS**

Una vez se obtiene el pase del stock de virus (se recoge el medio de los pocillos), se procede a realizar una nueva infección de la siguiente manera:

- A partir de un stock de células de insecto Sf-9 se siembra un frasco T75 al 60% de confluencia (aproximadamente 11 millones de células) para cada construcción viral y un control de infección y se llevan hasta 10 mL con medio de cultivo.
- Se incuban durante 1h hasta que se observen adheridas a la superficie del frasco.
- Se retiran 7 mL de medio.

- Por último, se añade a cada frasco 1 mL de cada construcción de baculovirus y a uno de ellos 1 mL de medio control.
- Se deja 72h en incubación a 28°C.
- Una vez transcurrido el tiempo, se resuspenden las células de los frascos y se pasa el volumen en su totalidad a tubos cónicos de 15 mL.
- Se centrifugan a 100-200 g durante 5-10 minutos a 4°C.
- Se separa el medio con la construcción de virus de cada *pellet* de células.
- El medio con virus puede almacenarse a 4°C, mientras que el *pellet* se conserva a -20°C.

### 3.12 SECUENCIACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANTES

Se enviaron las siguientes mezclas a los servicios científicos técnicos de la Universidad de Oviedo (Edificio Severa Ochoa) para secuenciación:

- 5 µL de cada plásmido recombinante con 5 µM de cebador *pTriEx Up* o *pTriEx Down* (Novagen).

### 3.13 TITULACIÓN DEL STOCK DE VIRUS

Se procedió a realizar una titulación del stock de virus del gen *M083* de la siguiente manera:

- Se utilizan células Sf-9 crecidas en adherencia en medio al 10% de FBS y confluentes para sembrar una placa P6,  $1 \times 10^6$  de células en cada pocillo.
- Se espera 1h a que adhieran a la placa.
- Se elimina el medio al 10% y se añade a cada pocillo 500 µL de una dilución seriada en base 10 en medio sin suero del *stock* de virus recogido de la anterior infección (tratándose este de un segundo pase del mismo), y se deja infectando durante 1h.
- Tras la infección, se retira el medio con los virus y se añade una mezcla 1:1 de medio de cultivo y una disolución de agarosa al 2%.
- Se deja incubando durante una semana a 28°C.
- Tras este tiempo, se añaden 500 µL de rojo neutro a cada pocillo.

- Se deja incubando 24-48h en oscuridad a temperatura ambiente.
- Se cuentan las placas formadas y se calcula las unidades formadoras de placas (UFP) por mL con la fórmula:
  - o  $UFP/mL = n^{\circ} \text{ de placas observadas} / (\text{factor de dilución} * \text{volumen sembrado})$ .

### 3.14 INFECCIÓN EN CONDICIONES ÓPTIMAS PARA LA PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Se procedió a realizar una infección en condiciones óptimas una vez conocida la concentración del *stock* de virus:

- Se repitió el protocolo de la primera infección, pero infectando a una MOI (multiplicidad de infección) de 3, para ello se infectó con 500  $\mu$ L del *stock* de virus (segundo pase).

### 3.15 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA EN COLUMNA

Para la columna se prepararon con antelación los siguientes tampones:

- *Binding Buffer*: 20 mM  $H_2PO_4$ , 500 mM NaCl y 40 mM Imidazol.
- *Elution Buffers*: 20 mM  $H_2PO_4$ , 500 mM NaCl y 200-350-500 mM Imidazol, respectivamente.

Una vez preparados los tampones, se procede de la siguiente manera:

- Se resuspenden los *pellets* de células previamente descongelados en 2 mL de *Binding Buffer*. Se pasan 20  $\mu$ L de las células (C) a un tubo de 1,5 mL para guardar esta muestra.
- Las células son sometidas a una rotura por sonicación durante 2 minutos (pulsos de 5s con 10% de amplitud, 10s de descanso). Se pasan nuevamente 20  $\mu$ L de estas células rotas (CR) a un tubo de 1,5 mL
- Centrifugar las CR a 18.000 g durante 40 minutos para obtener el extracto libre de células.
- Separar sobrenadante (SB) y *pellet* (P).
- Pasar 20  $\mu$ L de SB a un tubo de 1,5 mL, resuspender el *pellet* en 2 mL de agua destilada y proceder de la misma manera.

- Preparar dos columnas con 500  $\mu$ L de sefarosa y esperar a que empaquete.
- Preparar una disolución de níquel 300 mM para cargar la columna (el níquel se une a las histidinas y retiene las proteínas). Añadir 2 mL de la disolución a cada columna y esperar que eluya.
- Cargar en una columna el SB varias veces, en la otra columna cargar el medio de cultivo (M) en el que se infectaron las células.
- Pasar 20  $\mu$ L del eluido del SB y del medio a tubos de 1,5 mL, que contienen lo no pegado (NP) en la columna.
- Remover la matriz de sefarosa de la columna del SB y pasar 10  $\mu$ L (Ma1) a un tubo de 1,5 mL, esperar nuevamente a que empaquete.
- Eluir con 300  $\mu$ L de cada tampón de elución (por duplicado) en cada columna, removiendo la matriz y esperando a que empaquete cada vez que se aumente la concentración de imidazol (200, 350 y 500 mM).
- Remover y pasar 10  $\mu$ L de la matriz de sefarosa de la columna del SB después de las eluciones (Ma2).

### 3.16 ANÁLISIS *WESTERN BLOT* (WB) PARA COMPROBAR LA PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE INTERÉS Y ANÁLISIS DE ANTIGENICIDAD

Se realizaron varios análisis mediante WB durante el trabajo (tras los apartados 3.8, 3.11 y dos tras el 3.15), todos a través del siguiente protocolo:

- En el caso de los *pellets* de células obtenidos tanto de bacterias (apartado 3.8) como en células de insecto (apartado 3.11), se resuspendieron en 75  $\mu$ L de agua destilada.
- A todas las muestras se le añadió tampón de disociación (TD) 4X (Tris-HCl 250 mM, SDS 8%,  $\beta$ -Mercaptoetanol 25%, glicerol 35%, azul de bromofenol) en relación 1:3 respecto al volumen de cada muestra.
- Se calentaron en un baño a 95°C durante 5 minutos.
- Se centrifugaron a 16.000 g durante un minuto.

El gel de corrido de las muestras se preparó al 10% de acrilamida y 1 mm de grosor, y encima de este se preparó un gel de empaquetamiento en el que se iban a cargar las muestras inicialmente, con los siguientes elementos:

- Gel de corrido:
  - o Agua destilada: 2,3 mL.
  - o Tampón Tris-HCl pH 8,8: 1,25 mL.
  - o SDS 10%: 50  $\mu$ L.
  - o Acrilamida 40%: 1,3 mL.
  - o Temed: 10  $\mu$ L.
  - o PSA 10%: 50  $\mu$ L.
- Una vez añadido el gel de corrido se añade por encima butanol saturado en agua. Una vez polimeriza, se retira el butanol antes de añadir el gel de empaquetamiento.
- Gel de empaquetamiento:
  - o Agua destilada: 3,15 mL.
  - o Tampón Tris-HCl pH 6,8: 1,25 mL.
  - o SDS 10%: 50  $\mu$ L.
  - o Acrilamida 40%: 0,45 mL.
  - o Temed: 10  $\mu$ L.
  - o PSA 10%: 50  $\mu$ L.
- Se añade por encima del gel de corrido y coloca el peine correspondiente. Una vez polimerizado se retira el peine y ya se pueden cargar las muestras en los pocillos:
  - o Se cargaron 2  $\mu$ L del marcador proteico *NIR PageRuler™* de *ThermoFisher Scientific*.
  - o De cada muestra se cargó 20  $\mu$ L en pocillos sucesivos, empezando por la muestra control.
- El gel se corre en una cubeta con tampón de corrido 1X (25 mM Tris, 192 mM glicina, 1% SDS), durante 1h a 150 V.

Una vez terminado de correr el gel, se transfiere este a una membrana de nitrocelulosa mediante *electroblotting*:

- Se colocaron tres papeles de filtro en la parte inferior, la membrana de nitrocelulosa, el gel, y por último otros dos papeles de filtro en la parte superior, todo ello embebido en tampón de transferencia 1X (25 mM Tris, 192 mM glicina, pH 8,8).
- Se transfirió durante 30 min a 100 mA.
- Una vez transferido el gel, la membrana se dejó hasta el día siguiente bloqueando en una disolución de PBS (NaCl 0,14 M, HCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, pH 7,5) con leche al 5%.

Tras finalizar el bloqueo, se procedió a la incubación de la membrana con anticuerpos para poder observar la producción de las proteínas:

- Primeramente, se lava la membrana con PBS con Tween 20 al 0.1% (PBST).
- Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo *Monoclonal Anti-6X His Tag* de *Sigma-Aldrich* en relación de 1:5000 en una disolución PBST-leche al 0,5%, excepto en el análisis WB de antigenicidad, donde se utilizaron diferentes sueros de conejo vacunados frente al MYXV con diferentes perfiles inmunológicos como anticuerpos primarios:
  - o Suero S2-139: 15 µL en 2 mL de PBST-leche al 0,5%.
  - o Suero S1-126: 25 µL en 3 mL de PBST-leche al 0,5%.
  - o Suero S1-77: 25 µL en 3 mL de PBST-leche al 0,5%.
- Se incuba la membrana en agitación durante 1h para la unión del anticuerpo primario a las proteínas de interés.
- Tras la incubación con el anticuerpo primario, se volvió a lavar con PBST para eliminar los restos de la disolución.
- Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo *anti-mouse* conjugado a *IRDye®* de *LI-COR*, en relación de 1:20000 en una disolución PBST-leche al 0,5%, en el caso del análisis WB de antigenicidad se procedió de igual manera pero con un anticuerpo *anti-rabbit* conjugado a *IRDye®* de *LI-COR*.
- Se incuba la membrana en agitación durante 1h en oscuridad para la unión del anticuerpo secundario.

Todas las membranas se revelaron en el escáner *Odyssey* de *LI-COR*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR DE LOS GENES DE INTERÉS

Se amplificó por PCR del genoma del MYXV para obtener los genes de interés utilizando los cebadores indicados en el apartado 3.1, el producto de la PCR se observa mediante electroforesis en gel de agarosa, como se muestra en la Figura 5:

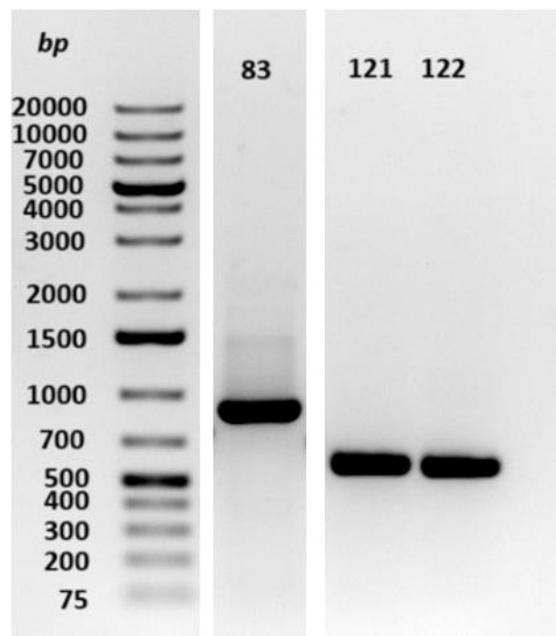


Figura 5. Gel de agarosa al 1% teñido con *SafeView™* con los productos de la PCR.

Se puede observar en la Figura 5 el tamaño aproximado de los genes amplificados, siendo unas 850 *bp* para el gen *M083*, y unas 550 *bp* para los genes *M121* y *M122*, coincidiendo con sus tamaños esperados (860, 530 y 518 *bp* respectivamente).

## 4.2 DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DE LOS AMPLICONES

Como paso previo a la construcción del plásmido recombinante, se realizó una digestión tanto del vector *pTriEx-1.1* (VD) como de los genes amplificados por PCR utilizando los siguientes enzimas de restricción: *NcoI* y *XhoI* para el vector, *AarI* y *XhoI* para el gen *M083*, *BsaI* y *XhoI* para los genes *M121* y *M122*. Los cebadores utilizados en la PCR contenían los sitios de restricción de los enzimas utilizados para la digestión de los genes.

El producto de digestión se observó nuevamente mediante electroforesis en gel de agarosa:

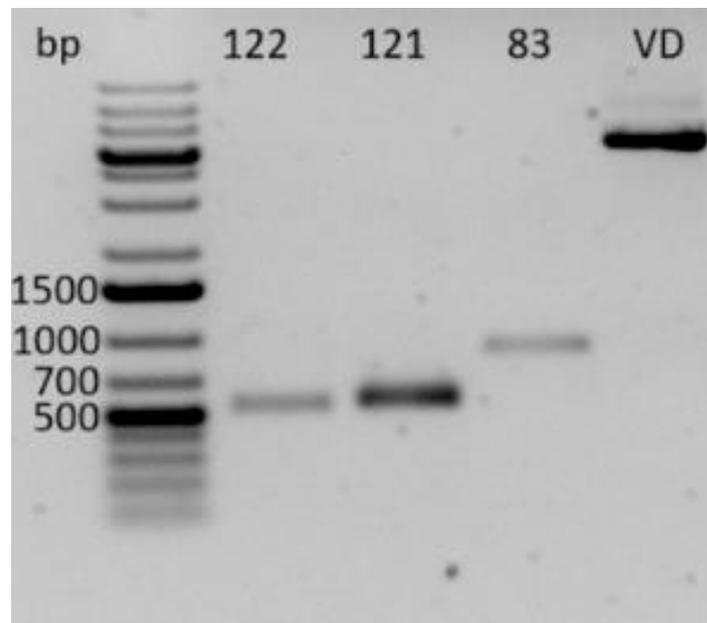


Figura 6. Gel de agarosa al 1% teñido con *SafeView™* con los productos de digestión. VD: Vector Digerido.

A partir de la Figura 6 se pueden observar nuevamente los tamaños de los genes de interés, que resultan similares a los obtenidos en la PCR ya que la digestión no corta un número de *bp* significativo para poder observar diferencias mediante electroforesis en gel de agarosa. También, es posible cuantificar de manera aproximada la cantidad de DNA presente en los productos de digestión comparando la intensidad de las bandas obtenidas con la intensidad de las bandas del marcador. A partir de este análisis se utilizaron 4  $\mu$ L del amplicón del gen *M083*, 1  $\mu$ L del gen *M121* y 1,6  $\mu$ L del gen *M122* para obtener una relación 1:1 en masa con el plásmido vector para preparar la ligación.

#### 4.3 DIGESTIÓN DE LOS *MINIPREPS* CON EL FIN DE OBSERVAR SI CONTIENEN LOS GENES DE INTERÉS

Los *minipreps* fueron sometidos a una digestión (*Xba*I y *Xho*I) para comprobar si el proceso de ligación había generado los plásmidos recombinantes de interés y descartar los *minipreps* de los que se obtuviese un resultado negativo:

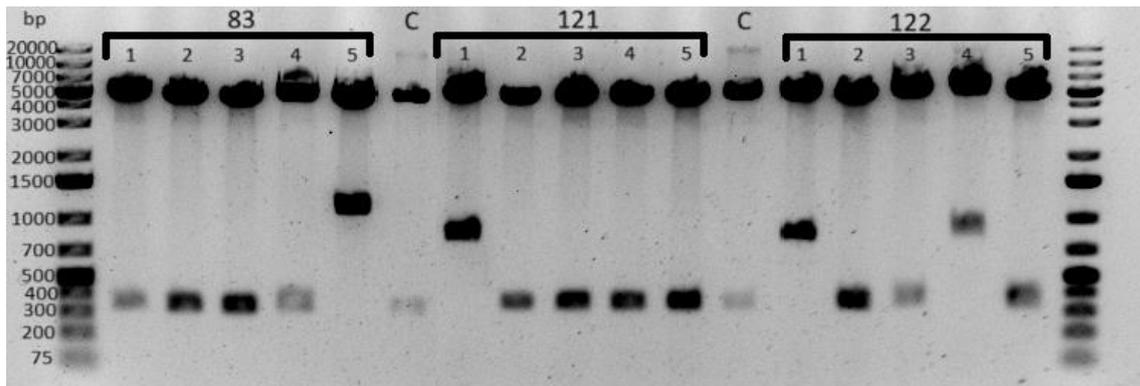


Figura 7. Gel de agarosa al 1% teñido con *SafeView*<sup>TM</sup> con los *minipreps* digeridos. C: Control (vector pTriEx-1.1 sin inserto). 1-5: Corresponden a un *miniprep* de cada gen, proveniente cada uno de una única colonia.

En la Figura 7 se puede observar que la digestión ha generado 2 fragmentos por calle, uno de aproximadamente 5000 *bp* correspondiente al vector digerido (tamaño teórico: 4858 *bp*), y un segundo fragmento que varía en función del *miniprep*: de unas 350 *bp* en el caso de los vectores que no han ligado correctamente el inserto, que corresponde al fragmento de vector comprendido entre los dos enzimas de restricción (tamaño teórico, 443 *bp*). Aquellos vectores que sí han ligado correctamente el inserto presentan en esta banda el fragmento de vector anteriormente mencionado y el correspondiente gen: un fragmento de aproximadamente 1250 *bp* para el *miniprep* 5 del gen *M083* (tamaño teórico: 1293 *bp*), un fragmento de unas 950 *bp* para el *miniprep* 1 gen *M121* (tamaño teórico: 973 *bp*) y un fragmento también de aproximadamente 950 *bp* para los *minipreps* 1 y 4 del gen *M122* (tamaño teórico: 961 *bp*).

#### 4.4 ANÁLISIS WB DE LA PRODUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE INTERÉS

Tras comprobar que se han obtenido los vectores recombinantes (vectores con el gen de interés y los promotores de expresión), el siguiente paso trataba de conseguir producir la proteína de interés. Para ello se llevó a cabo la transformación de los

plásmidos recombinantes en la cepa BL21(DE3) de *E.coli*, donde los resultados de la expresión proteica no fueron los deseados: las células que contenían el gen *M083* no crecían en suspensión, y en las que contenían los genes *M121* y *M122* no se observó producción de sus respectivas proteínas mediante análisis WB, utilizando tanto un anticuerpo monoclonal *anti-His Tag* como un anticuerpo policlonal de conejo *anti-MYXV* (datos no mostrados).

El siguiente paso fue comprobar la expresión de las proteínas utilizando otro sistema heterólogo. Se generó baculovirus recombinantes para cada uno de los genes de interés según está descrito en el apartado 3.9. Tras una infección de células Sf-9 con los baculovirus recombinantes durante 72h, se analizó mediante WB la producción de las proteínas, obteniéndose los siguientes resultados:

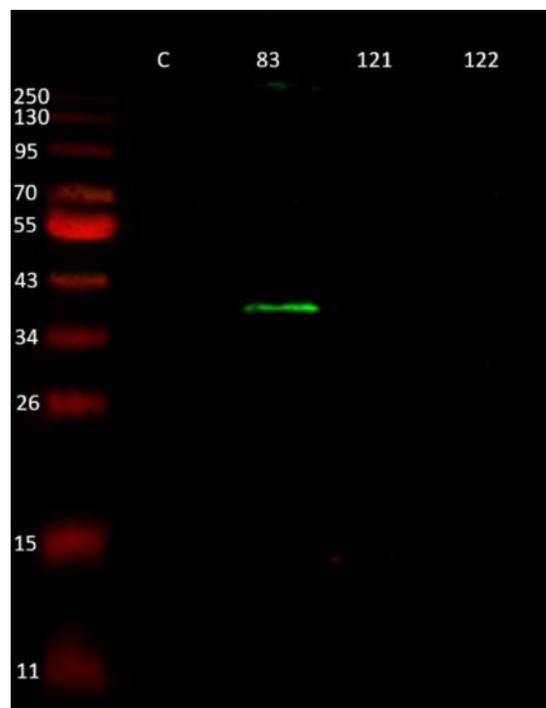


Figura 8. WB tras la infección de células Sf-9 con baculovirus recombinantes (72h). C: Control.

Como se muestra en la Figura 8, en los genes *M0121* y *M0122* no se observa producción de su correspondiente proteína, al igual que ocurría en bacterias, en el caso del gen *M083*, se observa producción de la proteína de interés a un tamaño aproximado de 40 kDa, ligeramente más grande con respecto al tamaño teórico (32,4 kDa). Esta discrepancia en el tamaño es relativamente común, ya que factores como la unión del SDS a la proteína de interés y la hidrofobicidad de la misma pueden alterar su migración en el gel[14][15].

#### 4.5 SECUENCIACIÓN DE LOS GENES RECOMBINANTES DE INTERÉS

Tras los análisis WB realizados, se decidió secuenciar los *minipreps* que contenían los genes recombinantes de interés para observar posibles alteraciones en su secuencia de DNA:

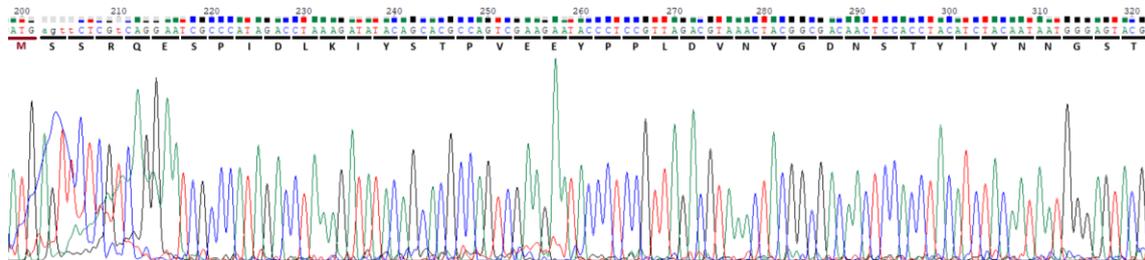


Figura 9. Cromatograma de la secuencia del gen *M083* y su pauta de lectura desde el codón de inicio.

En base al cromatograma representado en la Figura 9, se pudo comprobar que la secuencia del gen *M083* era idéntica a su secuencia teórica, resultado lógico teniendo en cuenta el análisis WB que se muestra en la Figura 8, donde se observa la proteína de interés. El resultado de la secuenciación con el cebador *reverse* dio una señal demasiado baja como para poder observar la secuencia.

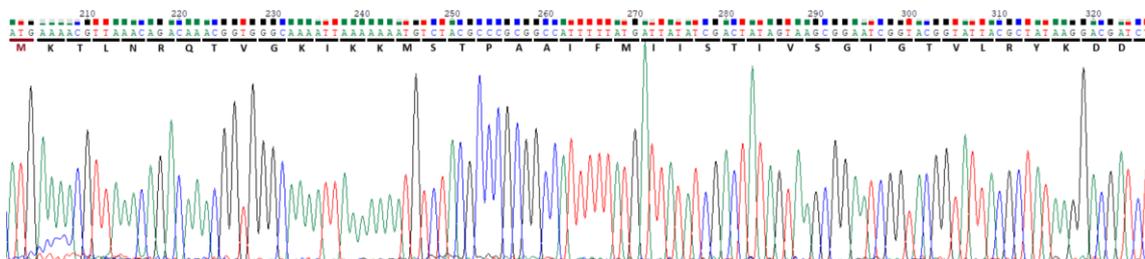


Figura 10. Cromatograma de la secuencia del gen *M122* y su pauta de lectura desde el codón de inicio.

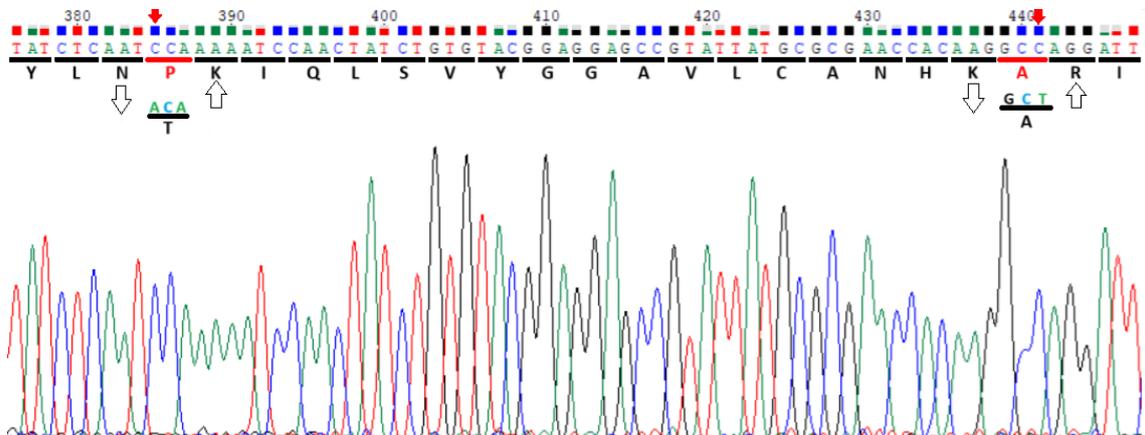


Figura 11. Cromatograma de la secuencia del gen *M122* y su pauta de lectura, donde se encuentran las mutaciones producidas señaladas en rojo, y debajo su secuencia teórica correcta.

En el caso del gen *M122*, el inicio de su secuencia puede observarse en la Figura 10. Tal y como se observa en la Figura 11, hay 2 mutaciones del gen recombinante con respecto a su secuencia teórica: un cambio de A por C en la posición 184 que provoca que ese codón codifique para un residuo de prolina (P) en vez de treonina (T), y un cambio de T por C en la posición 240 pero que no provoca cambios en la traducción, ya que sigue codificando para un residuo de alanina (A). La secuencia con el cebador *reverse* volvió a dar una señal muy baja como para realizar un análisis.

Por último, al analizar la secuencia del gen *M121* se observó que coincidía exactamente con la secuencia de gen *M122* (incluyendo las mutaciones), por lo que, debido a un error experimental, no existe plásmido recombinante con la secuencia del gen *M121*.

#### 4.6 ANÁLISIS WB DEL RESULTADO DE LA PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA EN COLUMNA

Dado que el gen M083 se expresa correctamente, se procedió a intentar purificar la proteína en columna de afinidad (*His-tag*). Se infectaron células de insecto a una MOI de 3 y después de 72h se recogió las células, se rompieron por sonicación y se separó la fracción soluble de la insoluble como esta descrito en el apartado 3.15, realizándose un análisis WB tras este proceso:

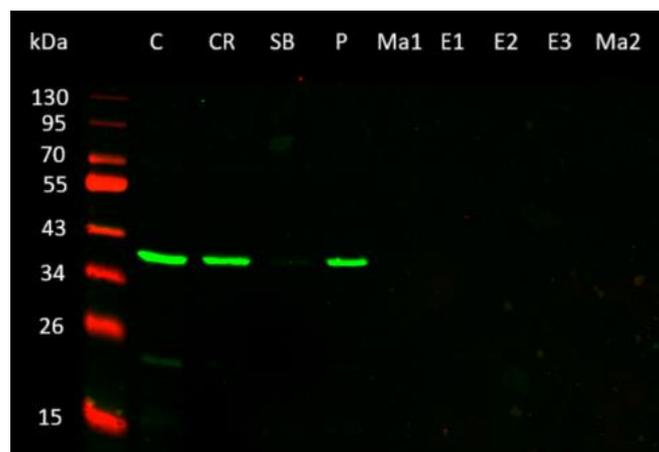


Figura 12. WB realizado a partir de muestras de las células Sf-9 infectadas durante 72h tomadas durante el proceso de purificación de la proteína del gen M083 en columna. C: Células; CR: Células Rotas; SB: Sobrenadante del extracto libre de células; P: *Pellet*; Ma1: Matriz antes de las eluciones; E1-3: Eluidos; Ma2: Matriz tras las eluciones.

En la Figura 12 se muestra el análisis de la purificación de la proteína a partir de las células de insecto, mientras que en la Figura 13 se muestra el proceso de purificación de la proteína a partir del medio de cultivo. Se observa en la Figura 12 cómo casi la totalidad de la proteína se encuentra no soluble (en el *pellet* del extracto libre de células), la concentración de la proteína en el SB (que fue lo que se pasó por la columna) es prácticamente indetectable, por lo que en las muestras de matriz y en las eluciones, no se observa presencia de la proteína.

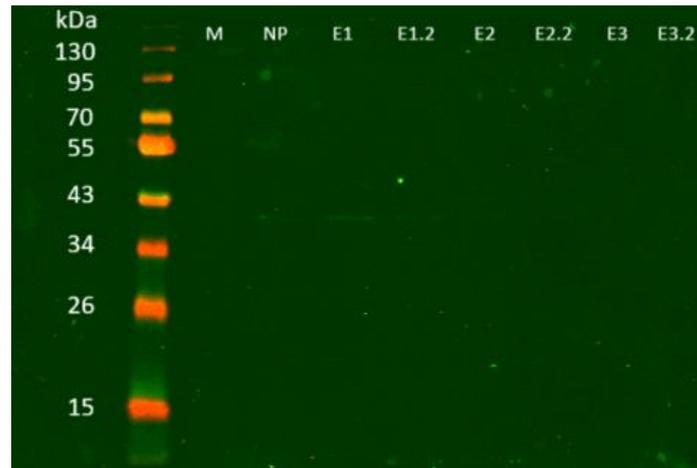


Figura 13. WB realizado a partir de muestras del medio de cultivo tomadas durante el proceso de purificación de la proteína del gen M083 en columna. M: Medio; NP: No pegado (en la matriz de la columna); E1-3: Eluidos y sus duplicados.

Como se puede observar en la Figura 13, el primer eluido (a 250 mM de imidazol) presenta una tenue banda, correspondiente a la proteína de interés, y soluble.

#### 4.7 ANÁLISIS DE ANTIGENICIDAD DE LA PROTEÍNA DE INTERÉS

Por último, se realizó un análisis WB con el primer eluido (250 mM imidazol) obtenido a partir de la purificación del medio de cultivo en columna, esta vez con diferentes sueros de conejo como anticuerpo primario para observar si había respuesta inmunitaria:

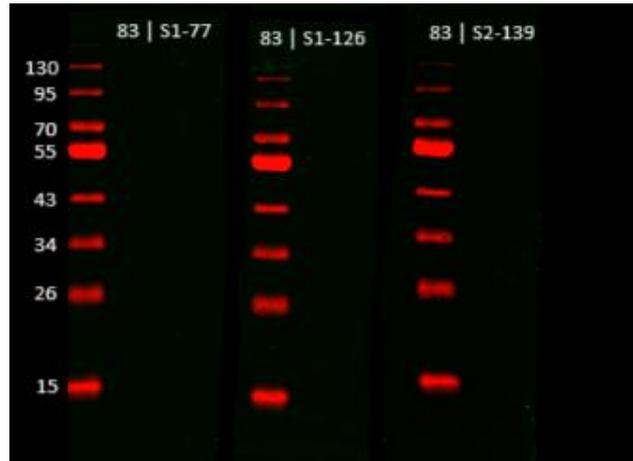


Figura 14. Análisis de antigenicidad de la proteína del gen *M083* mediante WB, utilizando la muestra de eluido a 250 mM de imidazol obtenida del medio de cultivo, y diferentes sueros de conejo como anticuerpos primarios (S1-77, S1-126 y S2-139).

No se observa en la Figura 14 respuesta antigénica de estos sueros de conejo a la proteína estudiada.

## 5 DISCUSIÓN

La mixomatosis es una enfermedad grave que genera un gran impacto no solo en los conejos silvestres, sino también a nivel económico en las granjas comerciales. Por ello, es esencial realizar este tipo de investigaciones con el fin de conocer la función inmune de las proteínas del MYXV y encontrar proteínas antigénicas que permitan desarrollar vacunas más efectivas que ayuden a combatir la enfermedad. La producción de antígenos virales de la familia *Poxviridae* en métodos de expresión heterólogos para realizar métodos de diagnóstico es un campo cada vez más investigado y parece ser el método más efectivo para estudiar las respuestas inmunes a este tipo de virus[16][17].

Una vez transformada la cepa quimiocompetente BL21(DE3) de *E.coli* con los vectores recombinantes, se indujo su expresión génica mediante IPTG (a través del promotor *lacUV5* y la expresión del gen de la ARN polimerasa T7). Hay que destacar que las células transformadas con el vector recombinante que contenía el gen *M083* no crecían en suspensión, incluso cuando no se inducía la expresión con IPTG, por lo que simplemente la producción basal de su proteína correspondiente estaba impidiendo el crecimiento celular. Es interesante remarcarlo ya que, al tratarse de una

proteína de la envuelta vírica, es posible que esta se estuviese incorporando a la membrana de las células y provocando su muerte, por lo que esta proteína podría ser objeto de estudio como un posible péptido antimicrobiano (al menos, contra bacterias gram-negativas)[18][19].

Tras probar la expresión tanto en bacterias como en células de insecto y solo obtener la expresión de uno de los genes (*M083*, véase en la Figura 8), mediante secuenciación se comprobó que por un error experimental (seguramente a la hora de picar colonias para su crecimiento en suspensión) se picaron por error únicamente colonias del gen M122 en detrimento del gen M121, por lo que quedó descartado ese gen para el resto del proyecto. Además, la secuencia analizada del gen M122 dio como resultado una mutación que provocaba el cambio de un residuo de treonina por uno de prolina, motivo por el que podría no producirse correctamente la proteína, aunque es poco probable que una única mutación provoque la nula expresión de la misma, por lo que un error experimental a la hora de la construcción del baculovirus recombinante es la explicación más probable a este hecho. Dichas mutaciones no debieron ocurrir durante la PCR, ya que el kit utilizado incluía una polimerasa con capacidad de corrección de errores, por lo que las mutaciones debieron ocurrir durante la propagación del plásmido recombinante en *E.coli*. Como método alternativo podría haberse utilizado el sistema de expresión Bac-to-Bac™ de *ThermoFisher Scientific*, clonando los genes en un plásmido diferente (como por ejemplo *pFastBac*) y realizando la transformación en una cepa de células como DH10Bac que permitiese la obtención directa del bácmido recombinante, este método ha mostrado resultados positivos en otras investigaciones relacionadas con la producción de proteínas en la familia de virus *Poxviridae*[20]. También se podría haber generado el plásmido recombinante de interés mediante recombinación homóloga, transfectando células infectadas con MYXV con un plásmido conteniendo el gen de interés unido a marcadores genéticos que permitan su posterior purificación, todo ello flanqueado por secuencias virales para dirigir la inserción del DNA en el virus y generar virus recombinantes[21], pero esto tiene dificultades como la baja eficiencia de recombinación y la necesidad de trabajar con el virus completo, con los riesgos de seguridad (y costes) que eso conlleva.

A la hora de hablar de la purificación de la proteína por columna de afinidad, el principal motivo de discusión es la producción de la proteína en las células de manera

insoluble (Figura 12), para evitar esto y conseguir observar la proteína soluble y, por ende, purificada en los eluidos, se podría repetir el proceso de purificación en condiciones desnaturizantes (por ejemplo, añadiendo a los diferentes tampones utilizados urea en una concentración 8M). En el caso de querer conseguir la proteína en mayor cantidad en el medio de cultivo (véase la Figura 13, donde se puede observar que se encuentra la proteína soluble), una opción sería repetir la infección a una MOI mayor y/o aumentar el tiempo de infección, para producir una mayor lisis celular y que la proteína se libere al medio de cultivo. Cabe destacar que ante esta dificultad, lo más correcto sería seguir utilizando un sistema de expresión en células de insecto con baculovirus recombinantes en detrimento de la expresión en *E.coli*, aun tratándose este último de un sistema de expresión altamente eficiente y de bajo coste, puede generar problemas en el plegamiento de las proteínas que dificulten aún más su solubilización[22], por lo que se debería centrar los esfuerzos en obtener la proteína soluble mediante expresión en células de insecto, que garantiza una correcta modificación post-traducciona al realizarse en un entorno eucariota, facilitando el proceso[23].

Por último, a través del análisis de antigenicidad no se observó respuesta de los diferentes sueros utilizados a la proteína purificada (véase la Figura 14), resultado que difiere al esperado ya que su proteína homóloga en *Vaccinia virus*, D8, sí es antigénica[24]. Este análisis fue demasiado breve y sería interesante probar con una variedad mayor de sueros de conejo para observar si alguno genera respuesta, como también sería necesario probar con otro tipo de inmunoensayos que permitan detectar epítomos conformacionales (como, por ejemplo, el método ELISA), ya que el análisis WB requiere una desnaturización de las proteínas y, por tanto, solo pueden detectarse epítomos lineales. El estudio en profundidad de la capacidad antigénica de esta proteína es interesante debido a su presencia en la membrana del MYXV en su forma madura (MV), siendo por tanto una candidata a ser responsable de la respuesta inmune de los conejos tras la vacunación.

## 6 CONCLUSIÓN

Un mayor número de análisis son necesarios para determinar si la proteína del gen *M083* es causante de respuesta inmune, así como también es necesario analizar en profundidad un mayor número de genes del MYXV. Sin embargo, se puede afirmar en

base a este trabajo y a la bibliografía recogida en el mismo que la expresión de proteínas de diferentes poxvirus (y en concreto, del MYXV) en sistemas de expresión heterólogos es el camino a seguir para su estudio y poder así erradicar enfermedades como la mixomatosis.

## 7 REFERENCIAS

- [1] P. J. Kerr y S. M. Best, «Myxoma virus in rabbits», *Rev Sci Tech*, vol. 17, n.º 1, pp. 256-268, abr. 1998, doi: 10.20506/rst.17.1.1081.
- [2] J. M. Rosell *et al.*, «Myxomatosis and Rabbit Haemorrhagic Disease: A 30-Year Study of the Occurrence on Commercial Farms in Spain», *Animals*, vol. 9, n.º 10, Art. n.º 10, oct. 2019, doi: 10.3390/ani9100780.
- [3] K. P. Dalton *et al.*, «Vaccine breaks: Outbreaks of myxomatosis on Spanish commercial rabbit farms», *Veterinary Microbiology*, vol. 178, n.º 3, pp. 208-216, ago. 2015, doi: 10.1016/j.vetmic.2015.05.008.
- [4] D. J. Pickup, «Extracellular Virions: The Advance Guard of Poxvirus Infections», *PLoS Pathog*, vol. 11, n.º 7, p. e1004904, jul. 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004904.
- [5] B. Spiesschaert, G. McFadden, K. Hermans, H. Nauwynck, y G. R. Van de Walle, «The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion», *Veterinary Research*, vol. 42, n.º 1, p. 76, jun. 2011, doi: 10.1186/1297-9716-42-76.
- [6] B. L. Jacobs *et al.*, «Vaccinia virus vaccines: Past, present and future», *Antiviral Research*, vol. 84, n.º 1, pp. 1-13, oct. 2009, doi: 10.1016/j.antiviral.2009.06.006.
- [7] A. M. Wolfe, K. M. Dunlap, A. C. Smith, M. Y. Bartee, y E. Bartee, «Myxoma Virus M083 Is a Virulence Factor Which Mediates Systemic Dissemination», *Journal of Virology*, vol. 92, n.º 7, p. 10.1128/jvi.02186-17, mar. 2018, doi: 10.1128/jvi.02186-17.
- [8] C. Cameron *et al.*, «The Complete DNA Sequence of Myxoma Virus», *Virology*, vol. 264, n.º 2, pp. 298-318, nov. 1999, doi: 10.1006/viro.1999.0001.
- [9] J. Gelfi, J. Chantal, T. T. Phong, R. Py, y C. Boucraut-Baralon, «Development of an ELISA for Detection of Myxoma Virus-Specific Rabbit Antibodies: Test Evaluation for Diagnostic Applications on Vaccinated and Wild Rabbit Sera», *J VET Diagn Invest*, vol. 11, n.º 3, pp. 240-245, may 1999, doi: 10.1177/104063879901100306.
- [10] M. S. Tabatabaei y M. Ahmed, «Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)», *Methods Mol Biol*, vol. 2508, pp. 115-134, 2022, doi: 10.1007/978-1-0716-2376-3\_10.
- [11] P. Saccardo, J. L. Corchero, y N. Ferrer-Miralles, «Tools to cope with difficult-to-express proteins», *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 100, n.º 10, pp. 4347-4355, may 2016, doi: 10.1007/s00253-016-7514-8.

- [12] «World Organization for Animal Health, WOAH (2021) Terrestrial Manual, Chapter 3.7.1. Myxomatosis.», [En línea]. Disponible en: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>
- [13] Y. Zhao, D. A. G. Chapman, y I. M. Jones, «Improving baculovirus recombination», *Nucleic Acids Research*, vol. 31, n.º 2, p. e6, ene. 2003, doi: 10.1093/nar/gng006.
- [14] A. Rath, M. Glibowicka, V. G. Nadeau, G. Chen, y C. M. Deber, «Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106, n.º 6, pp. 1760-1765, feb. 2009, doi: 10.1073/pnas.0813167106.
- [15] A. Shirai *et al.*, «Global Analysis of Gel Mobility of Proteins and Its Use in Target Identification \*», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, n.º 16, pp. 10745-10752, abr. 2008, doi: 10.1074/jbc.M709211200.
- [16] M. Dashprakash *et al.*, «Prokaryotic expression, purification and evaluation of goatpox virus ORF117 protein as a diagnostic antigen in indirect ELISA to detect goatpox», *Arch Virol*, vol. 164, n.º 4, pp. 1049-1058, abr. 2019, doi: 10.1007/s00705-019-04170-8.
- [17] T. R. Bowden *et al.*, «Detection of antibodies specific for sheeppox and goatpox viruses using recombinant capripoxvirus antigens in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay», *Journal of Virological Methods*, vol. 161, n.º 1, pp. 19-29, oct. 2009, doi: 10.1016/j.jviromet.2009.04.031.
- [18] Y. Huan, Q. Kong, H. Mou, y H. Yi, «Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields», *Front Microbiol*, vol. 11, p. 582779, oct. 2020, doi: 10.3389/fmicb.2020.582779.
- [19] A. Barreto-Santamaría, G. Arévalo-Pinzón, M. A. Patarroyo, y M. E. Patarroyo, «How to Combat Gram-Negative Bacteria Using Antimicrobial Peptides: A Challenge or an Unattainable Goal?», *Antibiotics (Basel)*, vol. 10, n.º 12, p. 1499, dic. 2021, doi: 10.3390/antibiotics10121499.
- [20] H. Jiang, J. Li, Y. Jian, T. Yang, J. Zhang, y J. Li, «Expression, purification, and crystal structure of mpox virus A41 protein», *Protein Expression and Purification*, vol. 219, p. 106480, jul. 2024, doi: 10.1016/j.pep.2024.106480.
- [21] J. Bartuli, I. Lorenzi, S. Backes, C. Grimm, y U. Fischer, «A generic protocol for the affinity-purification of native macromolecular complexes from poxvirus-infected cells», *STAR Protocols*, vol. 3, n.º 1, p. 101116, mar. 2022, doi: 10.1016/j.xpro.2021.101116.
- [22] R. Gl y C. Ea, «Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges», *Frontiers in microbiology*, vol. 5, abr. 2014, doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
- [23] F. Liu, X. Wu, L. Li, Z. Liu, y Z. Wang, «Use of baculovirus expression system for generation of virus-like particles: Successes and challenges», *Protein Expression and Purification*, vol. 90, n.º 2, pp. 104-116, ago. 2013, doi: 10.1016/j.pep.2013.05.009.

- [24]M. H. Matho *et al.*, «Murine Anti-vaccinia Virus D8 Antibodies Target Different Epitopes and Differ in Their Ability to Block D8 Binding to CS-E», *PLoS Pathog*, vol. 10, n.º 12, p. e1004495, dic. 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004495.