



***CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE DOS FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA SPATR DE
Plasmodium vivax EN EL SISTEMA Escherichia coli***

Laura Michell Acosta Muñoz

Lauren Nayarinne Arias García

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO
BOGOTÁ, MARZO DEL 2020.



CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE DOS FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA SPATR DE Plasmodium vivax EN EL SISTEMA Escherichia coli

EDITH DEL CARMEN HERNÁNDEZ ROJAS- MSc

Asesora interna

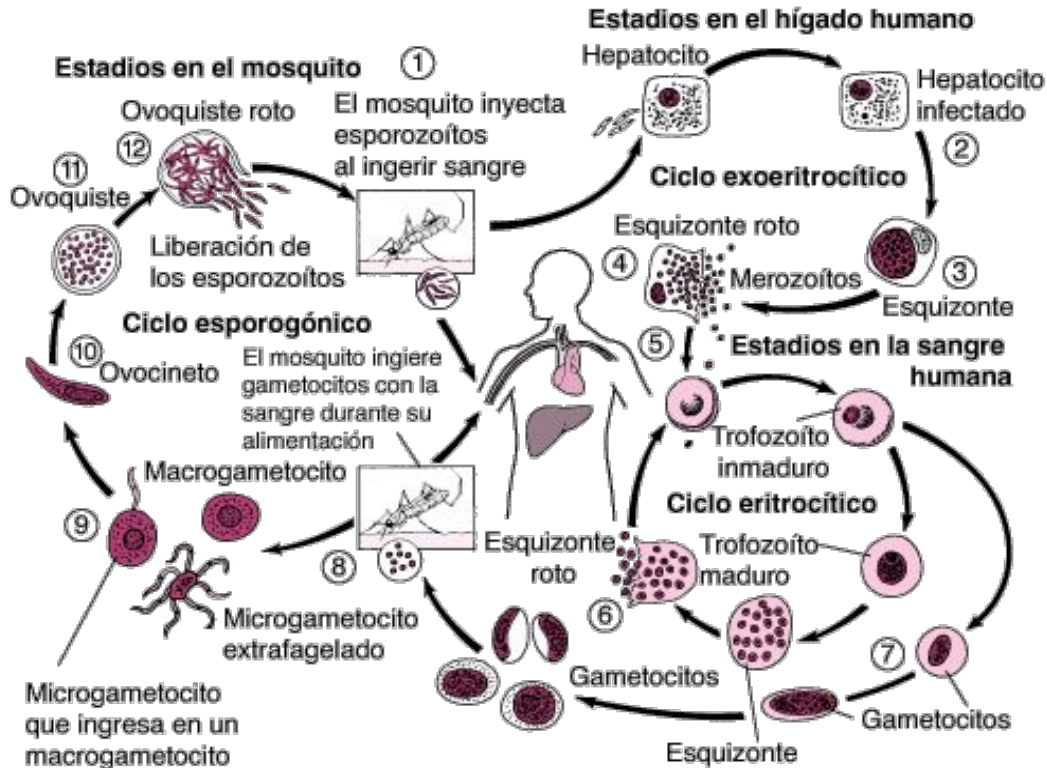
HEIDY DANIELA ORTIZ SUÁREZ-Bsc

Asesora externa

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
TRABAJO DE GRADO

INTRODUCCIÓN

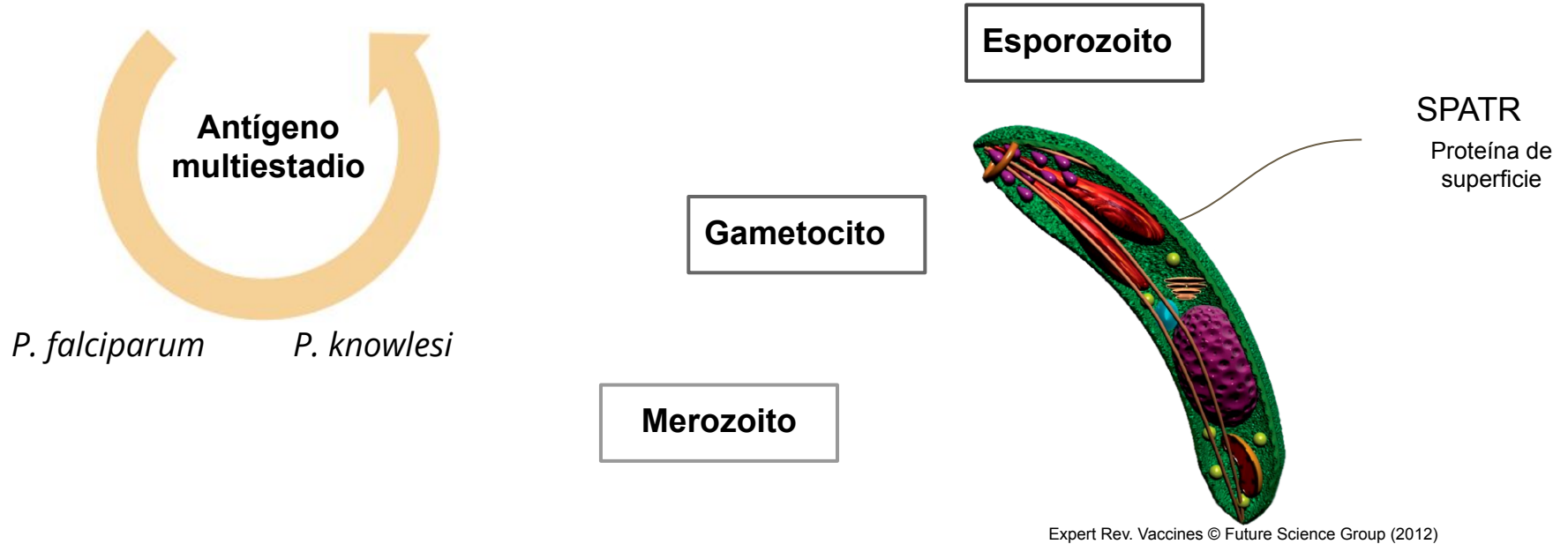
Ciclo de vida Plasmodium sp.



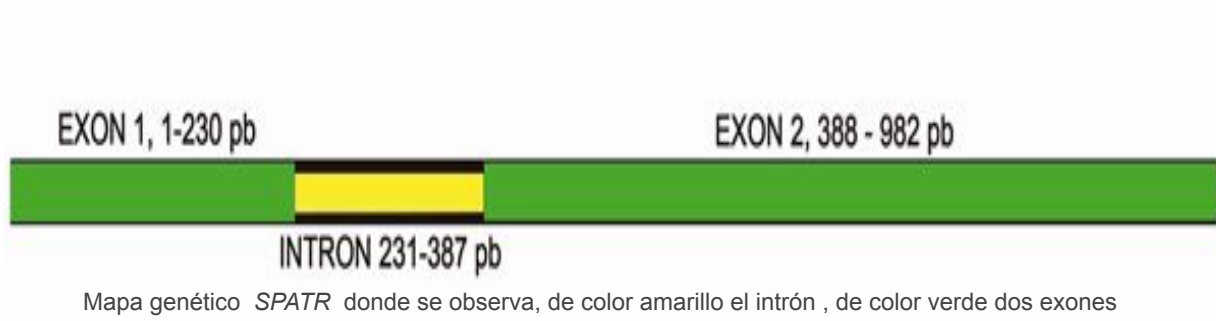
Participación de

Proteínas de interés

PROTEÍNA SPATR



CONFORMACIÓN DEL GEN *spatr*

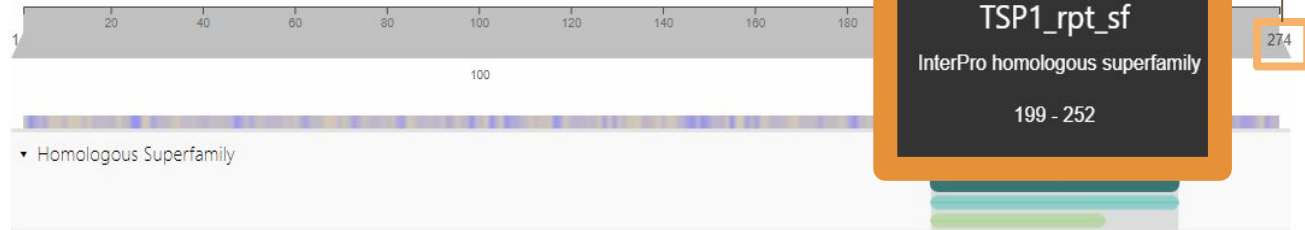


Aminoácidos



Entry matches to this protein

Colour By: Accession



Análisis del dominio de la TSP1, REPEAT, realizado con el programa interproscan

OBJETIVOS

GENERAL

Establecer las condiciones óptimas de clonación y expresión recombinante de fragmentos de la proteína SPATR, en el sistema de expresión procariota *Escherichia coli*.

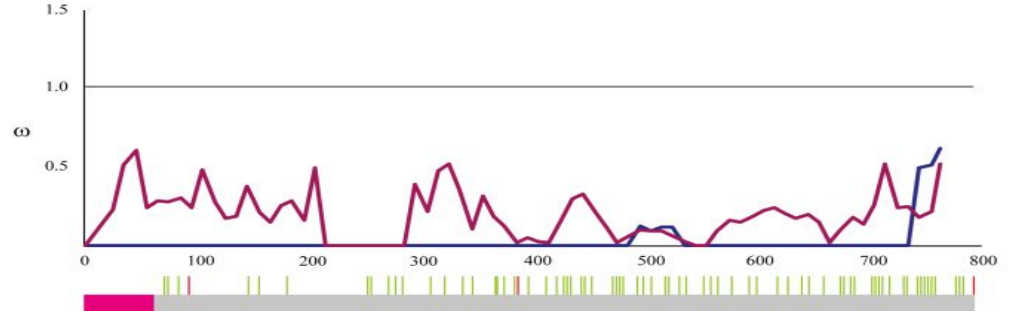
ESPECÍFICOS

- Obtener fragmentos del gen que codifica para la proteína SPATR de *Plasmodium vivax*, a partir de ADN complementario.
- Producir los clones de los fragmentos del gen *spatr*, en el sistema *Escherichia coli*.
- Realizar un acercamiento a la posible estructura de cada uno de los fragmentos de la proteína SPATR obtenidos de forma recombinante.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEBADORES

Regiones conservadas
de la proteína



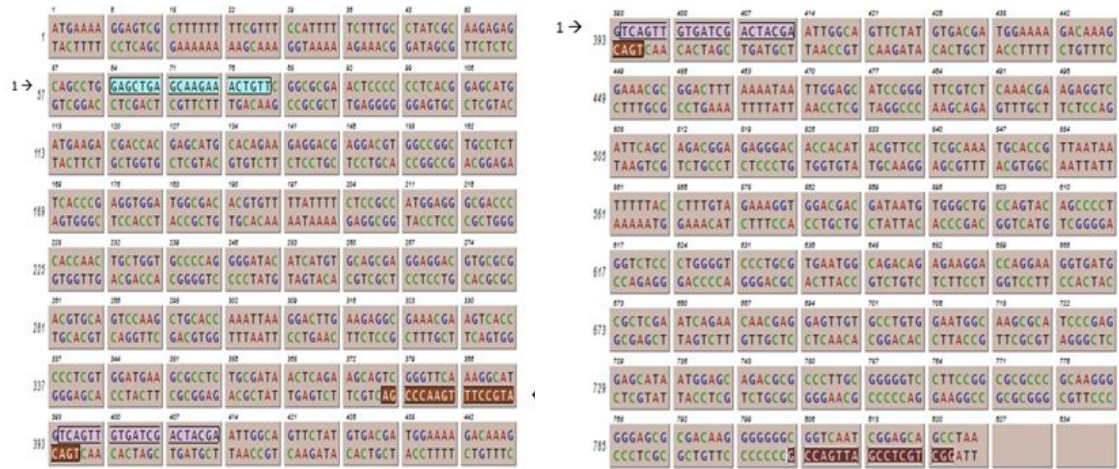
Ventana deslizante de las regiones conservadas de la proteína. Tomada de: Identifying potential *P. vivax* sporozoite stage vaccine candidates: an analysis of genetic diversity and natural selection

NOMBRE	SECUENCIA 5´ - 3´	LONGITUD (pb)	UBICACIÓN	AMPLÍMERO ESPERADO
F1 Dir	atg GAGCTGAGCAAGAAACTGTT	20 pb	64- 83 pb	333 pb
F1 Rev	TGACATGCCTTTGAACCCGA	20 pb	396 -377 pb	
F2 Dir	atg TCAGTTGTGATCGACTACGA	20 pb	395 - 413 pb	429 pb
F2 Rev	GGCTGCTCCGATTGACCG	18 pb	822-805 pb	

Información de primers para la amplificación de los dos fragmentos de la proteína SPATR. En la secuencia de los cebadores las letras en minúscula indican una metionina

Posición de los cebadores

Programa
Generunner



Ubicación espacial de cebadores directo y reverso



AMPLIFICACIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS

CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

ADNc, VCG-1

|

KAPA HiFi

Nombre	Temperatura	Tiempo
Denaturación inicial	98°C	2 min
Denaturación final	98°C	30 s
Anillamiento	60°C	30 s
Extensión inicial	72°C	45 s
Extensión final	72°C	5 min
Refrigeración	10°C	∞

Información correspondiente a los procedimientos realizados en 35 ciclos de PCR para amplificación de los dos fragmentos de la proteína SPATR.

PURIFICACIÓN

Kit GeneJET (Thermo Scientific™)

ADICIÓN DE ADENINAS Y LIGACIÓN AL VECTOR

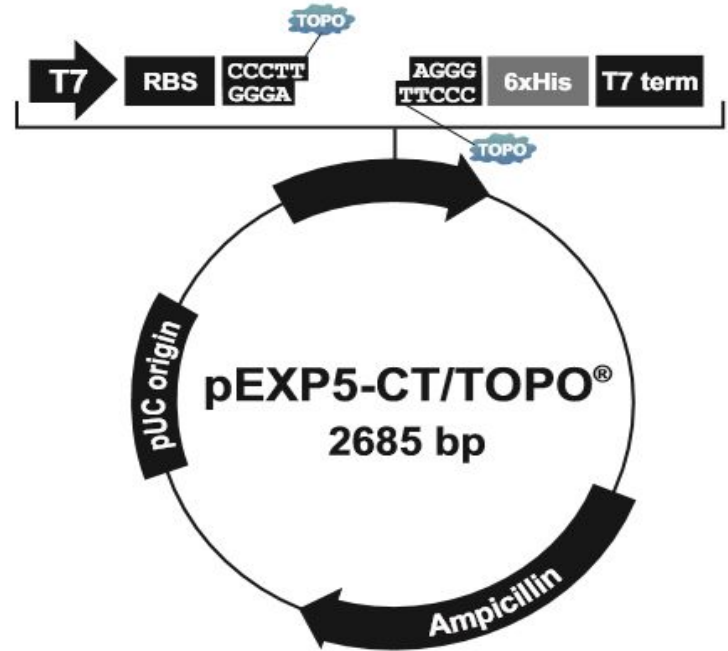
COLA DE ADENINAS

Producto	Cantidad
MangoTaq™ DNA Polymerase	0.4 µL
Agua free	4 µL
Buffer	4 µL
MgCl ₂	0.8 µL
dATPS	0.8 µL
Producto purificado	10 µL

Productos usados en la PCR mix

70°C durante 30 min

LIGACIÓN



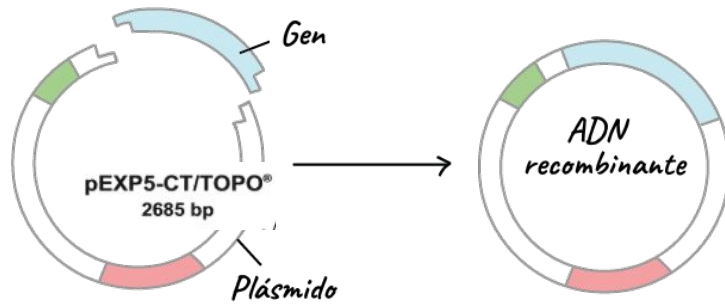
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V96006>

TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS DE CLONACIÓN Y OBTENCIÓN DE RECOMBINANTES

TRANSFORMACIÓN

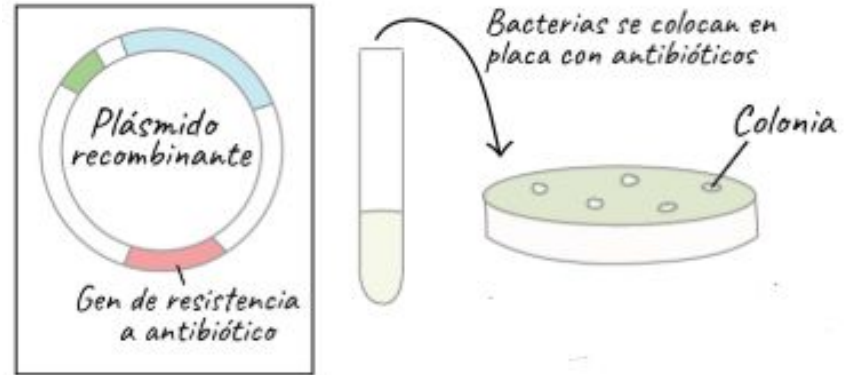
Productos	Cantidades
Células Top 10®	100 µL
Producto de ligación	5 µL
SOC	250 µL

Productos usados en el proceso de transformación



<https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/bacterial>

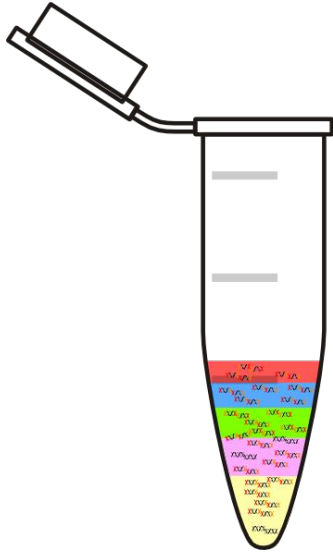
RECOMBINANTES



<https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/bacterial-transformation-sel>

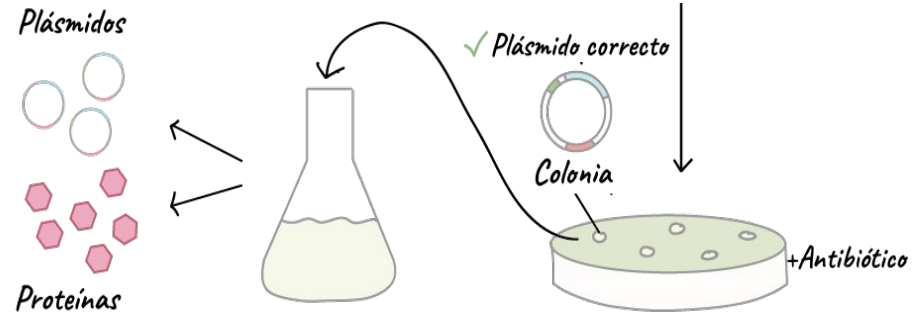
PCR CONFIRMACIÓN DEL INSERTO Y TRANSFORMACIÓN EN CÉLULAS DE EXPRESIÓN

PCR



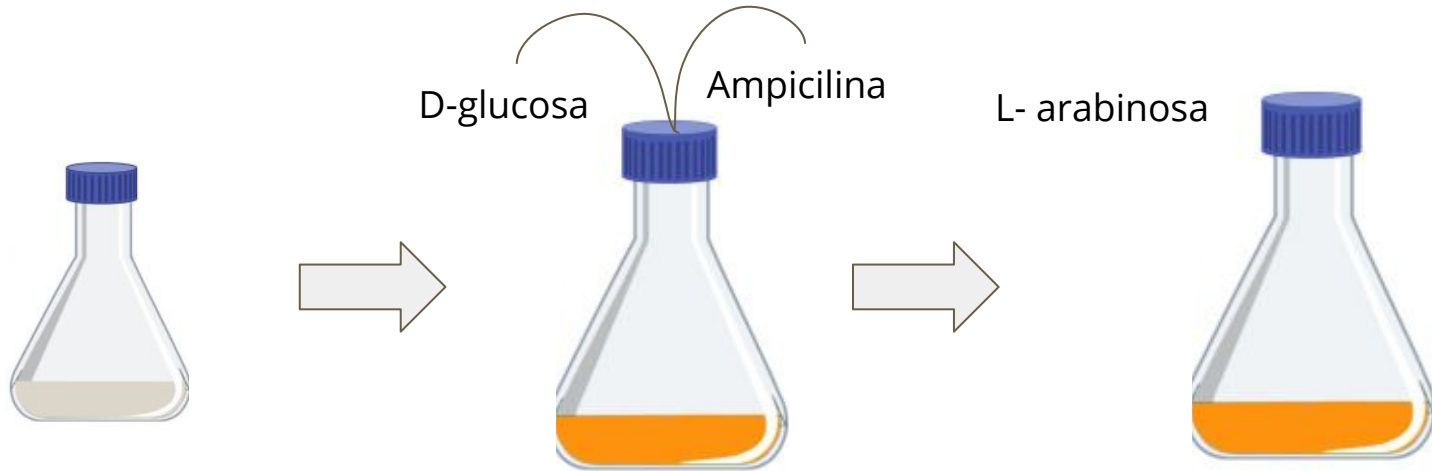
<https://images.app.goo.gl/JrcQ7QNLvohzPqsK9>

TRANSFORMACIÓN



<https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-cloning-tutorial/a/bacterial-trans>

EXPRESIÓN DE LOS FRAGMENTOS TRANSFORMADOS



Buffer de extracción **denaturante**

+

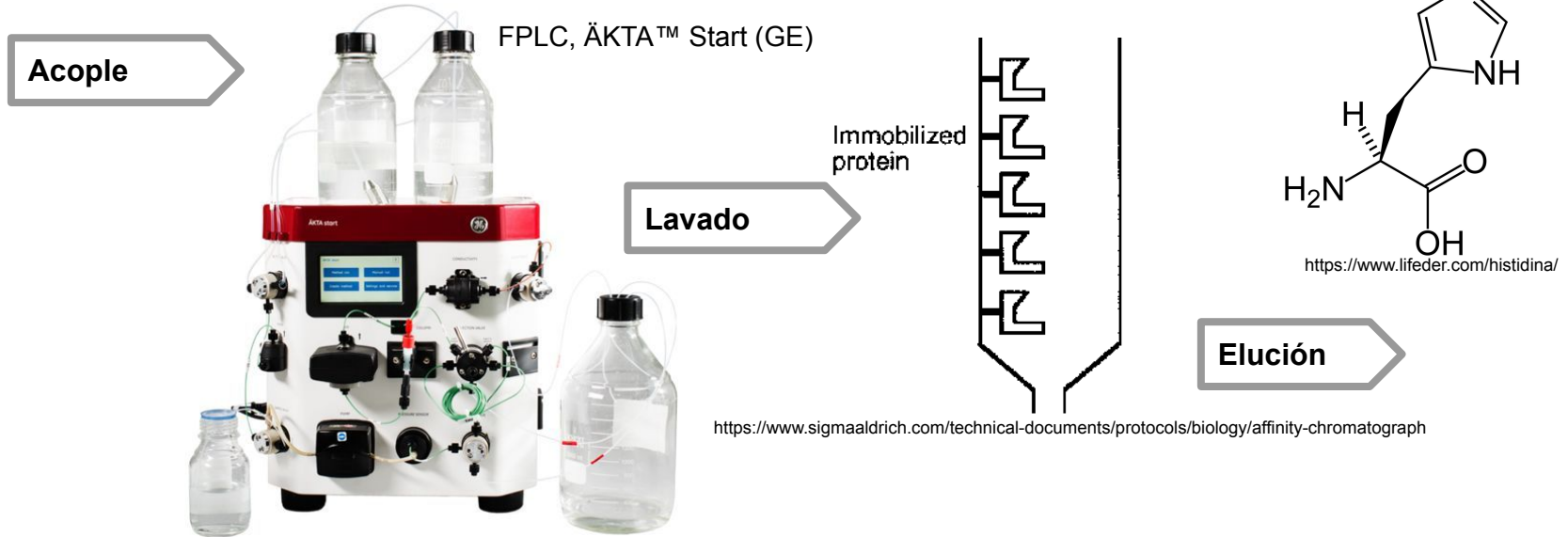
Inhibidores

+

Lisozima

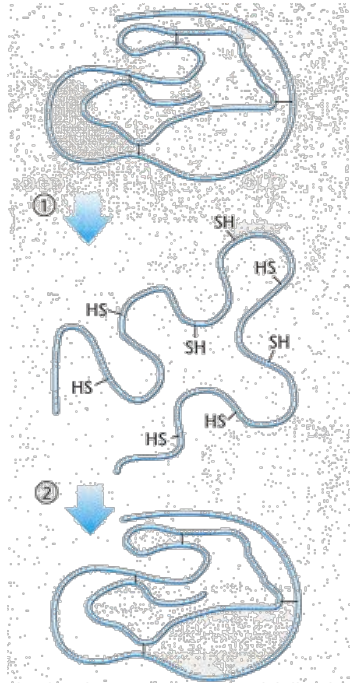
Buffer de extracción **soluble**

PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD



<https://www.analytica-world.com/en/products/1128708/akta-go-fplc-made-compact.html>

RENATURALIZACIÓN DE RECOMBINANTES



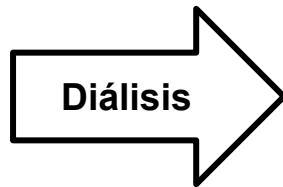
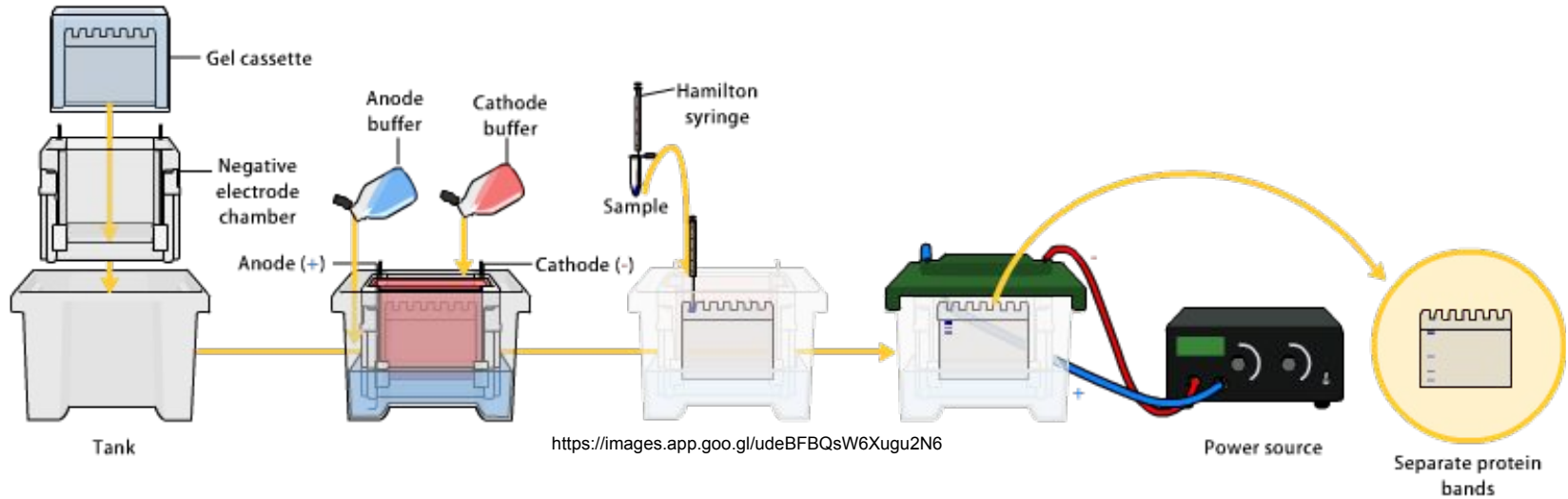
<https://www.um.es/molecula/prot06.htm>

Buffer úrea

Buffer de elución
(imidazol)

Glutation oxidado y
reducido

WESTERN BLOT Y DIÁLISIS



Concentración

<https://www.thomassci.com/scientific-supplies/Amicon-Ultra-100>

CUANTIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA

MÉTODO BCA

<i>Concentración de BSA en $\mu\text{g/ml}$ – Diluido en PBS 1X Ph 7,4</i>
0,5 $\mu\text{g*ml}$
1 $\mu\text{g*ml}$
2,5 $\mu\text{g*ml}$
5 $\mu\text{g*ml}$
10 $\mu\text{g*ml}$
25 $\mu\text{g*ml}$
50 $\mu\text{g*ml}$
100 $\mu\text{g*ml}$

Concentraciones de BSA con las que se realizó la curva de albúmina de suero bovino

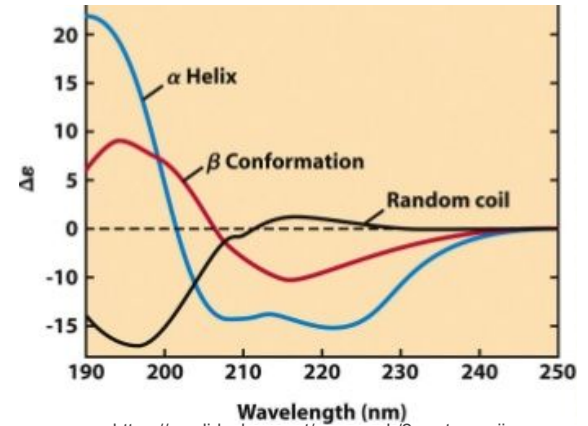
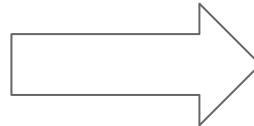
MÉTODO BRADFORD

<i>Concentración de BSA en $\mu\text{g/ml}$ – Diluido en PBS 1X Ph 7,4</i>
1,25 $\mu\text{g/ml}$
2.5 $\mu\text{g/ml}$
5 $\mu\text{g/ml}$
10 $\mu\text{g/ml}$
15 $\mu\text{g/ml}$
20 $\mu\text{g/ml}$
25 $\mu\text{g/ml}$

Concentraciones de BSA con las que se realizó la curva de albúmina de suero bovino

DICROISMO CIRCULAR

Espectropolarímetro



<http://www.interempresas.net/Laboratorios/FeriaVirtual/Producto-Espectropolarimetros-de-dicroismo-circular-Jasco-J-815-85877.html>

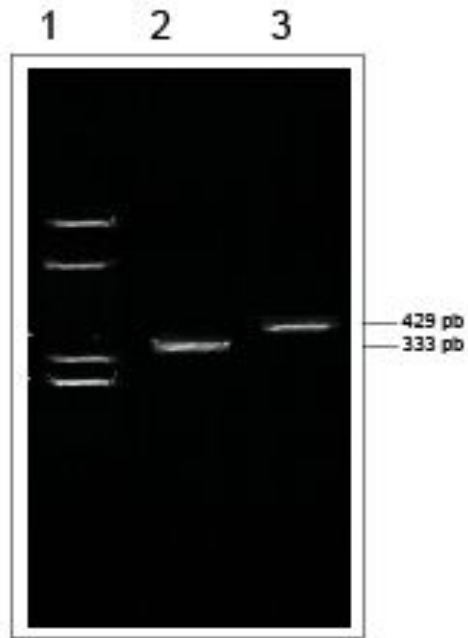
<https://es.slideshare.net/romypech/2-protenas-ii>

RESULTADOS

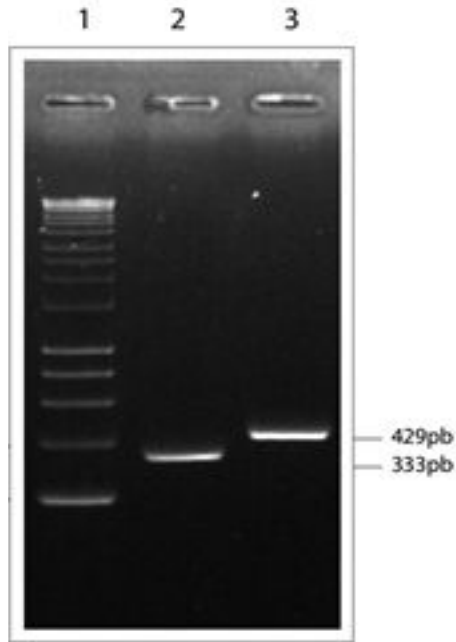
Y

DISCUSIÓN

PRODUCTO AMPLIFICADO Y PURIFICADO



Amplificación para PvSPATR. 1: marcador HyP II. 2: fragmento 1. 3: fragmento 2

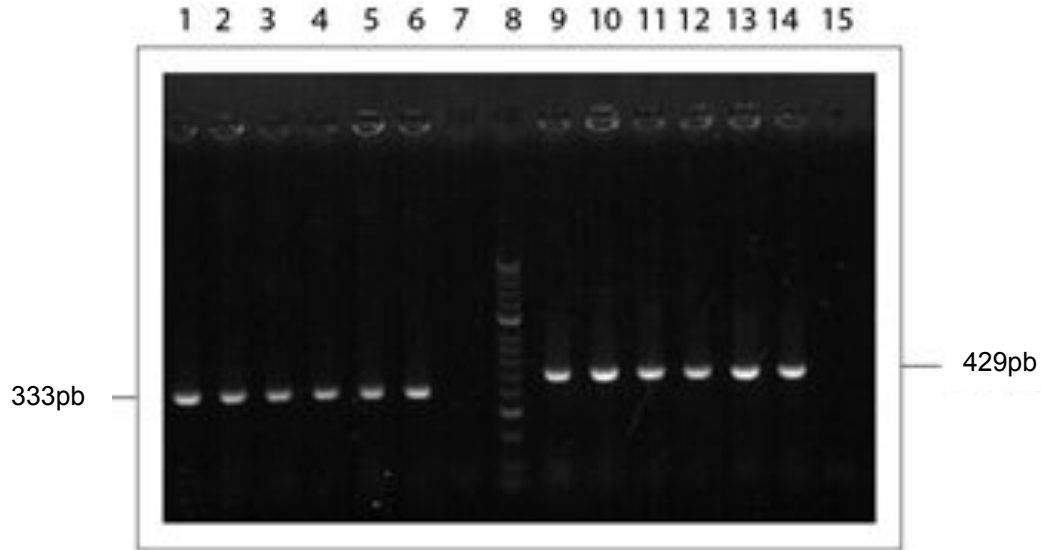


Purificación para PvSPATR. 1: marcador HyP II. 2: fragmento 1. 3: fragmento 2

Mahajan y
cols.2005, EE.UU

P. knowlesi

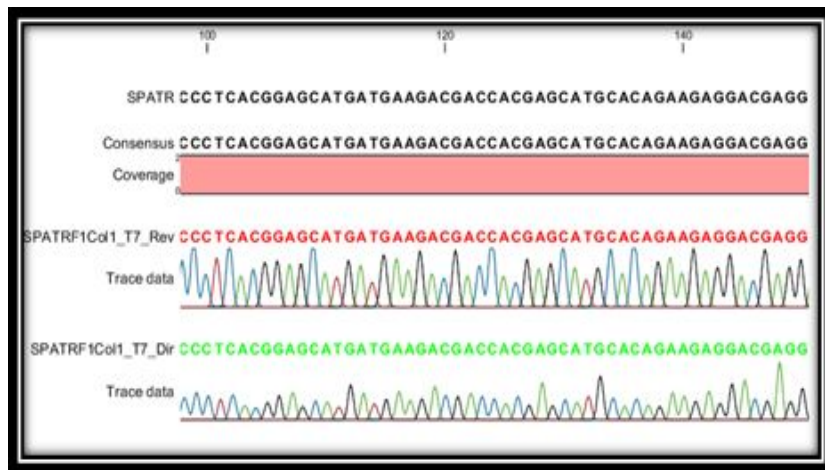
AMPLÍMEROS DE COLONIAS RECOMBINANTES



PCR de recombinante, colonias 1-6 : fragmento 1 ;7: control negativo,
8: marcador Hyp II de 1 Kb; colonias 9-14: fragmento 2; 15: control
negativo

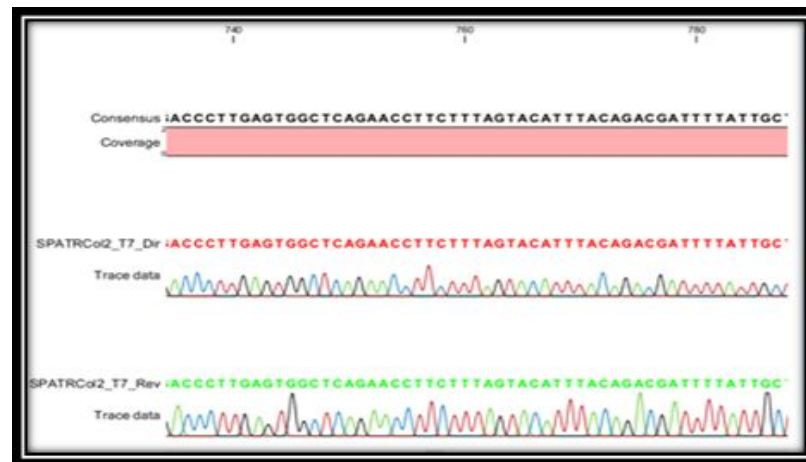
CONFIRMACIÓN COLONIAS RECOMBINANTES

Fragmento 1



Electroferograma para la secuencia colonia 1

Fragmento 2

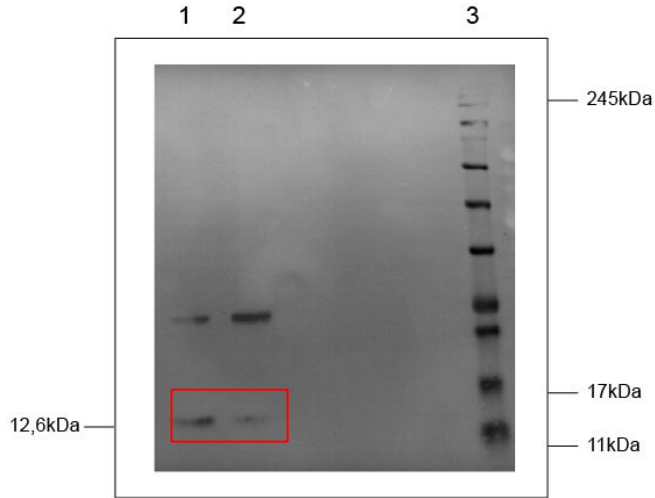


Electroferograma para la secuencia colonia 2

(Sal-I)

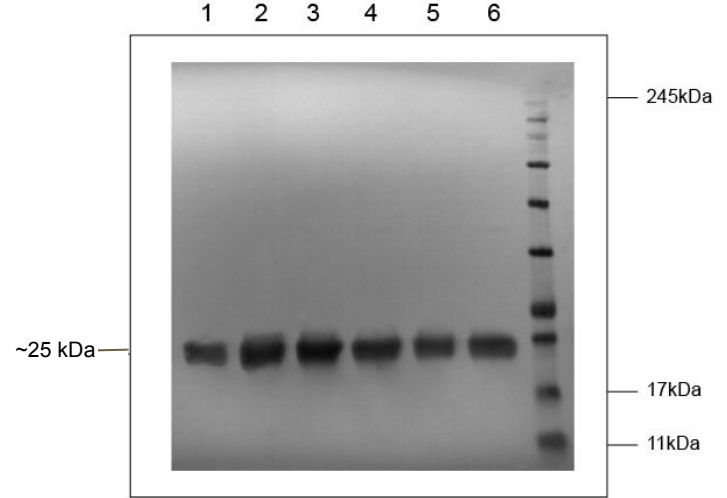
CLC Workbench

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE F1 Y F2, DENATURANTES



Purificación de expresión de PvSPATR; 1-2: fragmento 1;
3: marcador O.P

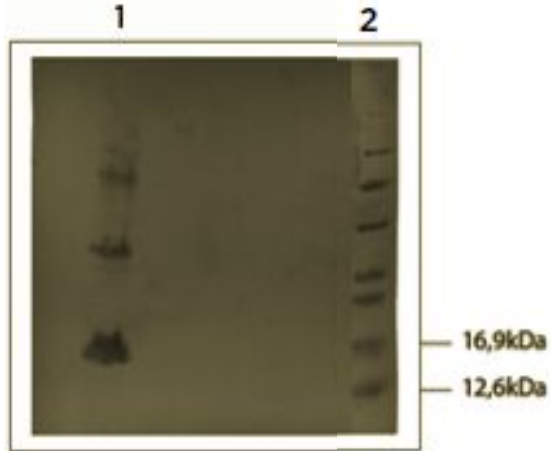
Palaeya y cols.
2013, Malasia



Purificación de expresión de PvSPATR; 1-6: fragmento 2;
7: marcador O.P

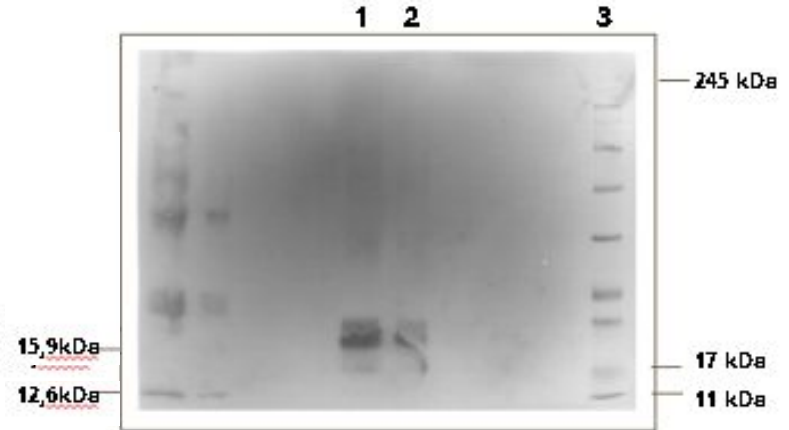
Murphy y
cols.2011, Inglaterra

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE F1 Y F2



Expresión soluble de PvSPATR; 1:fragmento 2; 2: marcador O.P

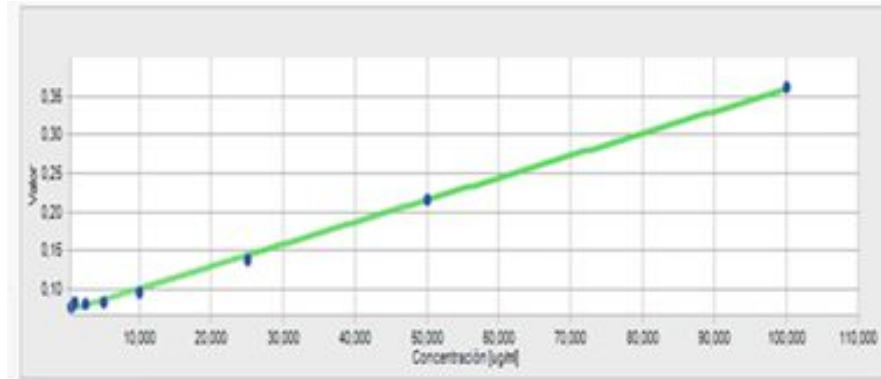
Palaeya y cols.
2013, Malasia



Expresión soluble de PvSPATR; 1:fragmento 1 AI; 2: fragmento 2 DE3; 3: marcador OP

Yamaguchi y cols.
2014, Kumamoto

CONCENTRACIÓN DE PvSPATR



Gráfica obtenida de cuantificación por método BSA con la curva donde se observa en el eje Y el valor de las absorbancias dadas y en el eje X las concentraciones de los diferentes analitos.

Crowley y cols.
2013, EE.UU

Método Bradford

Método BCA

Fragmento 1 renaturado **2,5 mg/ml**

Fragmento 2 renaturado **3,5 mg/ml**

Resultados obtenidos de cuantificación de proteína

Método Bradford

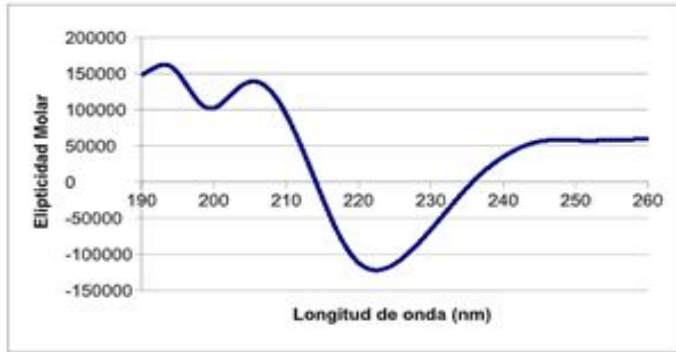
Fragmento 1 soluble **0,2 mg/ml**

Fragmento 2 soluble **1,3 mg/ml**

Resultados obtenidos de cuantificación de proteína

ESTRUCTURA DE LOS FRAGMENTOS DE PROTEÍNA, OBTENIDAS POR DICROISMO CIRCULAR

Fragmento 1 renaturalizado

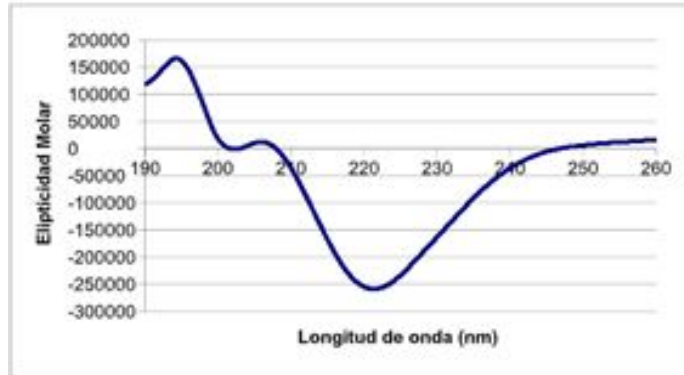


Curtidor y cols.
2013, Colombia

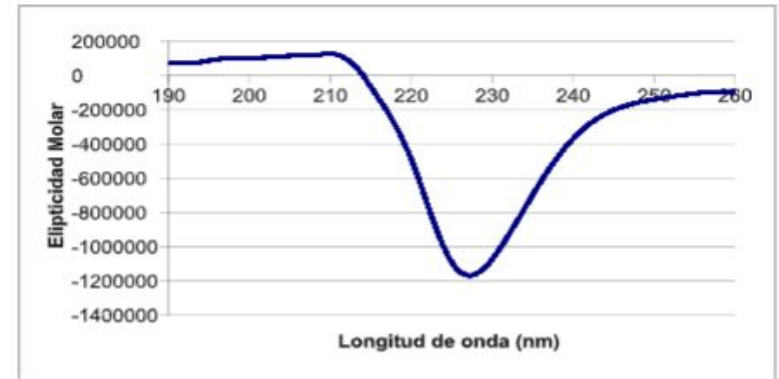
González y
cols.2018, España

Berkmen, 2011,
EE.UU

Fragmento 2 renaturalizado



Fragmento 2 soluble



CONCLUSIONES

- Por **primera vez** se logró la **amplificación** de **fragmentos de PvSPATR** a partir de ADN complementario, lo cual permitirá determinar si esta proteína cumple funciones similares a su homólogo *P.falciparum*, involucrado en la unión a células de hepatoma y aparición multiestadio dentro del ciclo infeccioso.
- Se obtuvieron dos fragmentos recombinantes de *PvSPATR* a partir del **vector pEXP5-CT/TOPO**, los cuales se pueden utilizar en posteriores ensayos antigénicos (ELISA) y ensayos de unión que permitan establecer la funcionalidad de estos fragmentos.
- A partir de los fragmentos recombinantes obtenidos, se pueden diseñar péptidos que permitan determinar las regiones específicas, involucradas en mediar la invasión a la célula blanco.
- El difracción circular no permitió obtener posibles estructuras secundarias claramente definidas en los fragmentos analizados, sin embargo se logró evidenciar su cambio conformacional respecto a la forma de obtención implementada.

EXPECTATIVAS



Utilizar otro sistema de expresión , para validar el correcto plegamiento de la molécula y realizar un **análisis especializado**, para determinar la conformación estructural secundaria a través de espectroscopia por resonancia magnética nuclear o criomicroscopía electrónica con el fin de conocer exactamente su estructura tridimensional y las regiones involucradas en esta.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por permitirnos concluir este proyecto.
- A nuestro padres por su amor, esmero y acompañamiento en todo nuestro proceso académico.
- A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por formarnos íntegramente.
- A FIDIC, lugar en el que se hizo posible el desarrollo de este proyecto.
- A los doctores Manuel Elkin Patarroyo Murillo y Manuel Alfonso Patarroyo Gutiérrez, por ser pilares de la investigación científica y permitirnos realizar nuestra investigación.
- A la profesora Edith del Carmen Hernández Rojas por su inmensa guía y acompañamiento en este proceso.
- A nuestra tutora externa Heidy Daniela Ortiz Suárez por su gran colaboración, dirección e incondicional apoyo durante todo el proceso investigativo