



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS  
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Unidad Zacatenco

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Aislamiento de una población de aptámeros de RNA para la  
proteína L1 monomérica del virus del papiloma humano tipo  
16”**

Tesis

Que presenta

**Q.F.B. SERGIO ISRAEL RANGEL GUERRERO**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

en la Especialidad de

**Genética y Biología Molecular**

Director de la tesis

Dr. Luis Marat Alvarez Salas

El presente trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Luis Marat Alvarez Salas en el laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

El autor de este trabajo expresa su agradecimiento a los ciudadanos mexicanos que permiten la generación de becas y estímulos a todos aquellos que soñamos con hacer ciencia en nuestro país.

Puntualmente, el autor contó con una beca personal otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONaCyT) con el número de registro 624484.

## **Agradecimientos.**

Al Dr. Alvarez, por permitirme conocer al increíble ser humano detrás del gran científico. Gracias por ser guía, ejemplo e inspiración.

A la Dra. Hess, por su tiempo y enseñanzas. Así como por todos los reactivos y materiales brindados, en especial por la construcción pGST-FSL1a.

A la Dra. Bermúdez y al Dr. Villegas. Gracias por su tiempo y valiosísimos comentarios.

A la Dra. Rocío Thompson y al Dr. Juan Antonio González. Gracias por darme la oportunidad de iniciarme en la ciencia, por confiar en mí.

A mis compañeros del LTG: Vicky, Aida, Naty, Diana, Fer, Giovanni, Alejandro y Rodrigo. Gracias por permitirme ver a través de sus ojos. El laboratorio no sería tan divertido, ni tan intelectualmente rico sin ustedes.

A mis queridos Genómicos: Hayde, Esmeralda, Adalid, Celia, José Luis, Jorge y Manuel. Porque no importaba llegar temprano e irse tarde si ustedes eran la compañía.

A Ana, Marisol, Saraí, Vane, Liz, Mariana, Aldo y Jonathan. Gracias por su amistad incondicional, sin ustedes la vida no sería la misma.

A Diana, por ser mi amor, cómplice y todo...porque contigo ya nada puede salir mal.

A mis tíos: Chupe, Martha y Kiko. Gracias por ser un gran ejemplo de lucha y dedicación, por ser Guerreros.

A todos aquellos que ya no están, gracias por dejar un poco de ustedes en mí.

Y por último a mis papas. Por aguantarme, apoyar mis locuras y haberme enseñado todo lo importante de la vida. Cada logro es y será dedicado a ustedes. Los amo.

**“No leemos a otros, nos leemos en ellos”**

**J.E. Pacheco**

**“Los científicos dicen que estamos hechos de átomos,  
pero a mí un pajarito me contó que estamos hechos de  
historias”**

**E. Galeano**

## Índice

1. Resumen .....	1
2. Abstract .....	3
3. Introducción .....	4
3.1. Aptámeros. ....	4
3.1.1. Tecnología SELEX. ....	5
3.1.2. Modificaciones.....	8
3.1.3. Aplicaciones. ....	9
3.2. Virus del papiloma humano. ....	10
3.2.1. Genoma y replicación de VPH. ....	11
3.2.1. Proteína L1.....	16
3.2.2. Expresión de la proteína L1 en sistemas procariontes.....	21
4. Antecedentes .....	23
5. Justificación.....	25
6. Hipótesis.....	26
7. Objetivos .....	27
7.1. Objetivo General.....	27

7.2. Objetivos particulares.....	27
8. Metodología.....	28
8.1. Transformación bacteriana.....	28
8.2. Inducción de proteínas.....	28
8.3. Lisis bacteriana.....	29
8.4. Purificación de la proteína GST.....	29
8.5. Purificación de la proteína GST-L1.....	30
8.6. SDS-PAGE.....	31
8.7. Western Blot.....	31
8.8. Inmovilización de la proteína GST.....	32
8.9. Tamizaje e inmovilización de la proteína GST-L1.....	32
8.10. PCR convencional.....	33
8.11. PCR en emulsión.....	34
8.12. Transcripción <i>in-vitro</i> .....	36
8.13. Purificación de RNA.....	37
8.14. SELEX.....	38
8.15. RT-PCR.....	38
8.16. Transcripción <i>in-vitro</i> marcada radiactivamente.....	40

8.17. Ensayos de interacción .....	41
9. Resultados .....	43
9.1. Expresión de la proteína de fusión GST-L1 .....	43
9.2. Purificación de la proteína de fusión GST-L1 .....	44
9.3. Generación de una poza de RNA a partir de una poza de DNA.....	48
9.3.1. Amplificación de la poza “30NLib” .....	48
9.3.2. Transcripción de la poza “30NLib” .....	53
9.4. SELEX.....	55
9.5. Ensayos de unión .....	57
10. Discusión.....	60
11. Conclusión.....	64
12. Perspectivas.....	64
13. Referencias .....	65
14. Anexo .....	73

## Lista de Figuras

Figura 1. Procesos básicos del método SELEX.....	7
Figura 2. Modificaciones comunes en aptámeros.....	9
Figura 3. Ciclo replicativo de VPH-16. ....	15
Figura 4. Subunidad del pentámero de L1.....	17
Figura 5. Elementos estructurales de L1 para el ensamble de papilomavirus. .....	18
Figura 6. Modelo del brazo invasor.....	20
Figura 7. Western blot de la proteína GST-L1 producida en las cepas Codon Plus y Rosetta.....	44
Figura 8. Proteína GST-L1 purificada y tratada con ATP y MgCl <sub>2</sub> . ....	45
Figura 9. Patrón de migración de la proteína GST-L1 en condiciones nativas. .....	46
Figura 10. Western blot de la proteína L1 post-tratamiento y purificación. ...	47
Figura 11. Tamizaje e inmovilización de la proteína GST-L1.....	48
Figura 12 Amplificación de la poza 30NLib por PCR convencional. ....	49
Figura 13. Estabilidad de la emulsión a través de ciclos de amplificación. ...	51



Figura 14. Partición de la emulsión.....	52
Figura 15. Amplificación de la poza “30NLib” mediante PCR convencional y PCR en emulsión.....	53
Figura 16. RNA obtenido a partir de PCR en emulsión y PCR convencional. .....	54
Figura 17. Transcripción <i>in- vitro</i> con cantidades crecientes de T7 RNAPol.	55
Figura 18. Productos de RT-PCR de los cinco ciclos SELEX.....	57
Figura 19. Ensayos de interacción entre la proteína L1 y la poza de RNA del quinto ciclo de selección. ....	58
Figura 20. Ensayos de interacción con concentraciones crecientes de NaCl. .....	59

## Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
°C	Grados Celsius.
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP	Uridiltrifosfato marcado con el isotopo 32 de fosforo.
$\mu\text{g}$	Microgramos.
ATP	Adenosin trifosfato.
C+	Control positivo.
C-	Control negativo.
cbp	Cuanto baste para.
Ci	Curies.
cpm	Cuentas por minuto.
cccDNA	Ácido desoxirribonucleico circular covalentemente cerrado.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadena doble
dNTPs	Mezcla de desoxirribonucleótidos.
DTT	Ditiotrietol.
g	Gramos.
HS	Heparan sulfato.
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.
$K_D$	Constante de disociación.
kDa	Kilo Daltones.
L	Litros.
LCR	Región Larga de Control.
$\text{MgCl}_2$	Cloruro de magnesio.

MWM	Marcador de peso molecular.
mL	Mililitros.
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramos.
ORF	Marco abierto de lectura.
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS	Buffer de fosfatos salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PVDF	Fluoruro de polivinilideno.
QC	Química combinatoria.
rAGC	Mezcla de ribo- adenina, guanina y citosina.
RNA	Ácido ribonucleico.
rNTPs	Mezcla de ribonucleótidos.
RCF	Fuerza centrífuga relativa.
RT-PCR	Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa.
SELEX	Evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial.
T7 RNAPol	RNA polimerasa del fago T7.
TIV	Transcripción <i>in-vitro</i> .
TLR9	Receptor tipo Toll 9.
TBE	Buffer de tris, borato y ácido etilendiaminotetraacético.
U	Unidades.
V	Volts.
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana.
VLPs	Partículas tipo virus.
VPH	Virus de papiloma humano.

## 1. Resumen

En los últimos años, la expresión y purificación de la proteína L1 del virus del papiloma humano (VPH) ha tomado un papel relevante en el ámbito científico y comercial, debido a su capacidad natural para formar partículas tipo virus (VLPs), las cuales han sido utilizadas para crear vacunas contra diferentes tipos de VPH. Además de este enfoque, trabajos recientes han descrito nuevas moléculas capaces de unirse a la proteína L1 monomérica e inhibir la formación de la cápside viral, proponiéndose como posibles agentes profilácticos y terapéuticos contra el VPH.

Los aptámeros se definen como oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla, los cuales se unen con gran afinidad y especificidad a una molécula blanco. La obtención de aptámeros se realiza mediante un método iterativo denominado SELEX, el cual simula el proceso evolutivo para obtener los mejores ligandos mediante un proceso de selección *in-vitro*. Durante las últimas décadas, una gran cantidad de aptámeros se han aislado contra diversos blancos, como iones, proteínas, virus, bacterias y células eucariontes; revelando nuevas e interesantes propiedades de los ácidos nucleicos más allá de sus funciones canónicas.

El objetivo de este trabajo fue obtener una población de aptámeros para la proteína L1 monomérica de VPH-16. Para ello, se realizó un método SELEX con una poza combinatoria de RNA con 30 posiciones aleatorizadas y la proteína GST-L1 como molécula blanco. Se realizaron 5 ciclos SELEX, cada uno de ellos compuesto por dos pasos de selección positiva y un paso de selección negativa. La unión entre la proteína GST-L1 y las secuencias

seleccionadas se corroboró mediante ensayos de interacción con la técnica de *Slot Blot*, los cuales demostraron una unión inespecífica entre el RNA seleccionado y la proteína GST-L1. En consecuencia, es necesario plantear nuevas condiciones en el método SELEX con el fin de obtener aptámeros para la proteína L1.

## 2. Abstract

In recent years, production and purification of the Human Papillomavirus (HPV) L1 major capsid protein gained scientific and commercial relevance due to its intrinsic self-assembly into virus-like particles (VLPs), which have been used for the development of vaccines against different HPV types. In addition, recent reports have described two novel inhibitors against L1 monomers that preclude capsid assembly, suggesting a new series of prophylactic and therapeutic agents against HPV.

Aptamers are synthetic single-stranded oligonucleotides, that bind tightly and specifically to target molecules; most aptamers are selected by SELEX, an iterative process that mimics evolution to obtain the best ligands through an *in-vitro* selection process. During the last two decades, a plethora of aptamers have been isolated against a wide range of targets, such as ions, proteins, virus, and eukaryotic cells; revealing new exciting properties beyond the canonical functions of nucleic acids.

The aim of the present work was to isolate an aptamer population against the L1 monomeric protein of HPV-16. Five SELEX rounds were performed using a randomized RNA pool with  $4^{30}$  variants and the GST-L1 fusion protein as target protein; each round was divided in two steps of positive selection and one step of negative selection. Binding analysis were performed by Slot Blot assays, proving unspecific interaction between the RNA isolated from the last selection round and the target. Consequently, new SELEX rounds would have to be modified to improve the probability of isolate aptamers against the monomeric L1 HPV-16 protein.

## 3. Introducción

### 3.1. Aptámeros.

El término aptámero surge en 1990, del latín *aptus* y del griego *meros*, lo cual se traduce como “partícula capaz para”. A partir de ese momento, los aptámeros se definen como oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla altamente estructurados, que se unen con gran afinidad y especificidad a una molécula blanco (1). En años recientes este término se ha extendido para incluir péptidos cortos con las mismas características (2).

Los aptámeros de ácidos nucleicos se obtienen mediante un método iterativo denominado SELEX (acrónimo en inglés para *Systematic Evolution of Ligands by EXponential Enrichment*), partiendo de una poza combinatoria de oligonucleótidos sintéticos. Este método de alto flujo se compone de múltiples rondas de unión a la molécula blanco, separación de los aptámeros unidos de los no unidos, así como su amplificación por PCR y la purificación de aquellos seleccionados (1) (3).

Desde la invención del SELEX, diversos aptámeros se han aislado y caracterizado contra iones, moléculas inorgánicas, proteínas e inclusive células completas (4) (5). Los aptámeros son de particular interés debido a sus propiedades intrínsecas, las cuales los hacen distintos a moléculas análogas tales como los anticuerpos:

- Los aptámeros presentan una gran afinidad por sus blancos moleculares, con constantes de disociación ( $K_D$ ) que en muchos casos

caen en el rango picomolar, inclusive menor que la gran mayoría de anticuerpos. (6)

- Su producción es mediante métodos químicos, en un proceso fácilmente escalable y sin la necesidad de un organismo viviente.
- En su estado nativo, poseen baja inmunogenicidad y baja toxicidad.
- Su tamaño reducido permite una entrada fácil en sistemas biológicos.
- La molécula blanco puede ser intracelular, extracelular o de superficie celular.
- Pueden ser desnaturalizados de manera reversible.
- Diversos grupos funcionales y moléculas reportero pueden ser introducidas durante la síntesis, permitiendo aumentar su tiempo de vida media en biofluidos y su compatibilidad con nuevas tecnologías (microarreglos, microfluídica, plasmón superficial, etc.) (7).

### **3.1.1. Tecnología SELEX.**

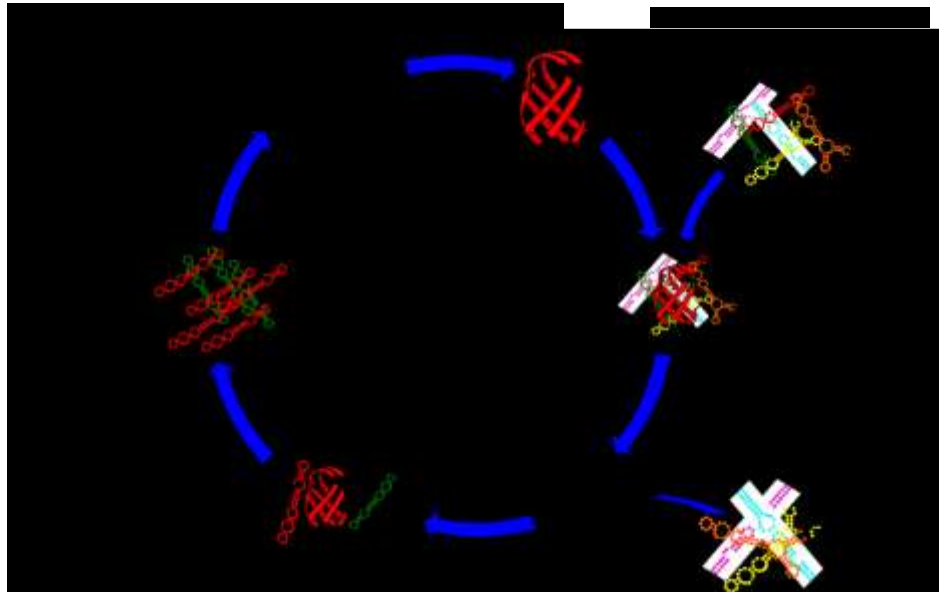
La química combinatoria (QC) es una importante tecnología que se utiliza dentro de la industria biotecnológica y farmacéutica para el descubrimiento de nuevos materiales o moléculas con propiedades deseables, así como nuevos fármacos y catalizadores. La QC se caracteriza por la síntesis y tamizaje simultáneo de grandes pozas de compuestos relacionados, pero estructuralmente distintos, con el fin de identificar y aislar moléculas funcionales. En 1990, Tuerk y Gold así como Ellington y Szostak describen de manera independiente un método basado en pozas combinatorias de RNA para seleccionar aptámeros contra proteínas y colorantes, nombrando a esta variante de QC, SELEX (8).



El proceso de selección por el método SELEX comienza con una poza de oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla con una longitud definida, conformados por una región central aleatorizada, y regiones fijas que flanquean a la región central. Durante la selección de aptámeros de DNA, esta poza inicial puede usarse directamente. Por otra parte, en la selección de aptámeros de RNA, la región aleatorizada de DNA debe ser transformada en una poza de RNA antes de empezar la primera ronda de selección. En este caso, es necesario un cebador *forward* que contenga una extensión en el extremo 5' con la secuencia de un promotor para alguna RNA polimerasa dependiente de DNA, lo cual permite que la poza de DNA sea transcrita, resultado en una poza aleatorizada de RNA. El proceso de selección inicia con la incubación de la molécula blanco, inmovilizada en una matriz particular, y la poza de oligonucleótidos (8); de los cuales, sólo los oligonucleótidos que son capaces de unirse al blanco son recuperados para continuar con los siguientes pasos de selección. Es importante mencionar que el uso de una matriz o cualquier otro componente en el sistema puede ocasionar una selección inespecífica, por lo cual, rondas de selección negativa, realizadas contra todo el sistema excluyendo el blanco, son usadas para mejorar ampliamente la especificidad durante el proceso de selección (9).

Posteriormente, la pequeña cantidad de moléculas activas que son capaces de unirse al blanco son amplificadas mediante PCR, gracias al uso de cebadores que hibridan con las regiones constantes presentes en los extremos 5' y 3'. Para los aptámeros de RNA, las secuencias seleccionadas tienen que ser amplificadas por RT-PCR, a partir de la cual se genera una nueva poza enriquecida de RNA para continuar con ciclos de selección posteriores. El proceso finaliza con la amplificación de los aptámeros obtenidos en la última ronda, lo cuales son clonados para su caracterización.

Estos ciclos iterativos de selección y amplificación enzimática mimetizan un proceso de selección darwiniano, que distingue motivos estructurales relativamente raros como la solución a un problema, en este caso, la molécula blanco (8). Los procesos básicos de selección se resumen en la figura 1



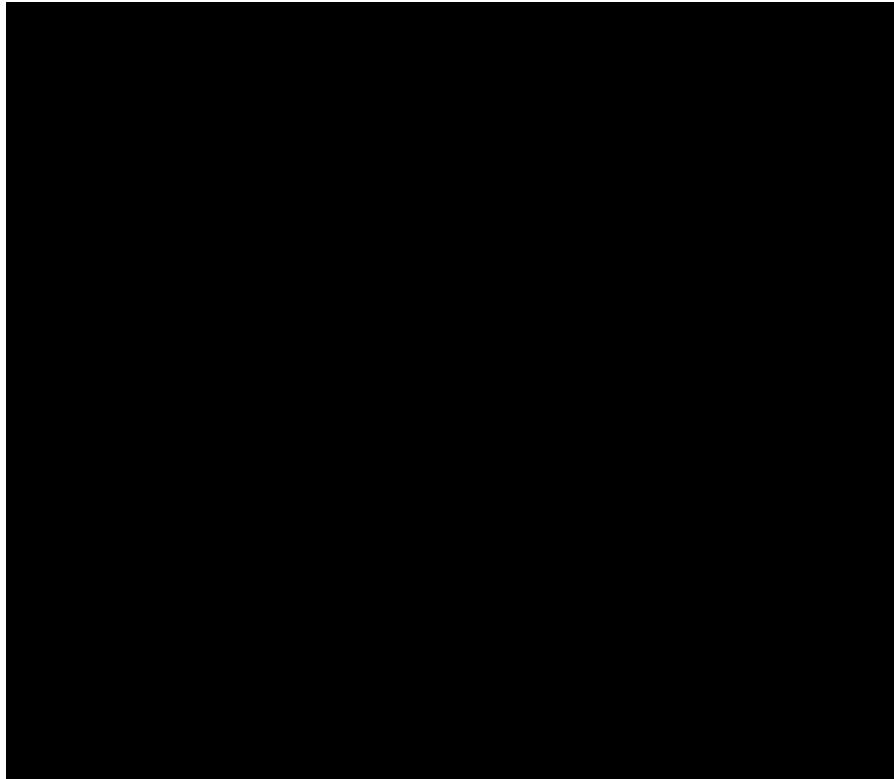
**Figura 1. Procesos básicos del método SELEX**  
(modificado de (10))

A pesar de presentarse como un método rápido y sencillo, seleccionar aptámeros mediante SELEX consume una gran cantidad de tiempo y recursos, lo cual no siempre concluye en un resultado exitoso. Por este motivo, se han utilizado diversas aproximaciones basadas en el uso de emulsiones, electroforesis capilar, microarreglos o resonancia de plasmón superficial con el fin de optimizar la amplificación de la poza o el proceso de selección (10)

(11). Sin embargo, aún no existe un protocolo SELEX infalible para obtener aptámeros que se unan a cualquier blanco.

### 3.1.2. Modificaciones.

En general, las moléculas de RNA son altamente susceptibles a la degradación por nucleasas, por lo que su tiempo de vida media en biofluidos es de segundos o minutos (12). Para contrarrestar este problema, diferentes RNA y DNA polimerasas capaces de incorporar nucleótidos modificados han permitido introducir modificaciones que mejoran la estabilidad de los aptámeros. Estas polimerasas han sido utilizadas para producir aptámeros que son parcial o completamente sustituidos con nucleótidos modificados, incluyendo: 2'-amino pirimidinas, 2'-fluoro pirimidinas, y 2'-O-metil ribosa pirimidinas y purinas; de igual manera los enlaces internucleotídicos pueden ser modificados, por ejemplo, con enlaces fosforotioato (figura. 2). Dichas modificaciones también pueden realizarse post-selección mediante síntesis química, generalmente en los extremos 5' y 3' con el objetivo de disminuir la degradación por exonucleasas. Otras modificaciones importantes incluyen la conjugación de aptámeros con polietilenglicol para disminuir su filtración glomerular; el uso de enantiómeros L de ácidos nucleicos los cuales no pueden ser reconocidos por nucleasas; o la implementación de bases no naturales, como la 7-(2-tienil)imidazo[4,5-b]piridina (Ds) y el 2-nitro-4-propinilpirrol (Px), que expanden el código genético y aumentan la diversidad estructural de los aptámeros (figura. 2) (1) (13). No obstante, la modificación no racional de aptámeros puede repercutir en la capacidad de estructuración y afinidad por su blanco (7) (12).



**Figura 2. Modificaciones comunes en aptámeros.**

A) 2'-deoxy-2'-fluorocitidina, B) 2'-deoxy-2'-aminocitidina, C) Enlace fosforotioato D) 2'-metoxiuridina, F) y G) Enantiómeros D- y L- ribosa respectivamente, H) Ds., I) Px.

### **3.1.3. Aplicaciones.**

Dadas las características y amplias ventajas de los aptámeros, estos son utilizados en diversos campos, dentro de los cuales destacan:

- **Sistemas de detección.** Aptámeros conjugados con diversas moléculas fluorescentes han permitido identificar y cuantificar de forma precisa biomoléculas y múltiples compuestos. Otra aproximación se basa en el uso complementario de aptámeros y nanopartículas de oro, lo cual ha permitido la detección visual y la cuantificación colorimétrica de diversos compuestos. (4) (14).
- **Uso terapéutico.** Una gran cantidad de aptámeros han sido aislados contra proteínas que presentan potencial relevancia para la salud humana, como son:  $\alpha$ -trombina, la reverso transcriptasa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), la integrasa de VIH, P-selectina, proteína C reactiva, el factor nuclear NF- $\kappa$ B, antígeno prostático específico, proteína prion bovina, etc (7).  
De forma interesante, aptámeros contra bacterias y parásitos completos también han sido caracterizados, proponiéndose como posibles agentes antimicrobianos y antiparasitarios (15) (5).

### **3.2. Virus del papiloma humano.**

Los virus del papiloma humano (VPH), que pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, son virus icosaédricos pequeños no envueltos de dsDNA, que infectan epitelio y mucosas. En la actualidad, más de 120 tipos de VPH han sido clasificados, de los cuales, la gran mayoría infectan epitelio cutáneo, causando verrugas simples. De todos los tipos de VPH, sólo 40 infectan mucosas y se subclasifican de acuerdo a su asociación epidemiológica con la generación cáncer cérvico-uterino (CaCu). La infección con tipos no

oncogénicos o de bajo riesgo, como los tipos 6 y 11, pueden causar verrugas genitales, papilomas laríngeos y anormalidades benignas en mucosas. Sin embargo, los tipos de alto riesgo u oncogénicos pueden actuar como carcinógenos en el desarrollo de cáncer cervical y diversos tumores anogenitales. En particular, VPH-16 y VPH-18 pueden causar lesiones cervicales de alto grado, que se categorizan como precursoras de CaCu. A pesar de que la infección por VPH es considerada como una condición necesaria para el desarrollo de cáncer cervical, esta no es suficiente para generarlo; lo cual ha sido evidenciado gracias a mujeres infectadas con VPH que nunca desarrollan una lesión maligna (16).

### 3.2.1. Genoma y replicación de VPH.

El genoma de VPH, de aproximadamente 8,000 pares de bases, contiene 8 marcos abiertos de lectura (ORF por sus siglas en inglés) y se divide en tres regiones principales: la región larga de control (LCR por sus siglas en inglés) involucrada en la regulación transcripcional; la región temprana o “E” que consiste en seis ORFs (*E1*, *E2*, *E4*, *E5*, *E6* y *E7*) los cuales codifican para proteínas no estructurales relacionadas en la replicación viral; y la tercera región, denominada tardía o “L”, que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 de la cápside viral (17) (18).

Las funciones de las proteínas tempranas y tardías se resumen en la siguiente tabla:

<b>Proteína</b>	<b>Funciones</b>
<b>E1</b>	Se une al origen de replicación, evento necesario para la replicación viral. Contiene sitios de unión para E2 y la subunidad $\alpha$ de la DNA polimerasa. Presenta actividad de helicasa.
<b>E2</b>	Controla la replicación de DNA, su transcripción y la segregación del virus a células hijas. Evita la formación de nucleosomas en el origen de replicación viral.
<b>E4</b>	Favorece la amplificación genómica de VPH, así mismo regula la expresión de genes tardíos, controla la maduración del virus y facilita la salida de los viriones.
<b>E5</b>	Intensifica la actividad de E6 y E7; promueve la fusión entre células vecinas y contribuye a la evasión del sistema inmune.
<b>E6</b>	Inhibe a la proteína p53 y bloquea la apoptosis. Permite la expresión de la proteína telomerasa. Inhibe la transcripción de TLR9 y la activación de IRF3. Inhibe vías de reparación del DNA y la adhesión celular; promueve el crecimiento celular.
<b>E7</b>	Promueve la degradación de pRB. Inhibe la actividad de p21 y p27, así como la muerte celular programada tipo anoikis. Altera la transcripción. Promueve la síntesis aberrante de centriolos y el rompimiento de DNA.
<b>L1</b>	Proteína principal de cápside, contiene los determinantes requeridos para la unión a los receptores celulares
<b>L2</b>	Proteína de cápside necesaria para la unión del virión con receptores celulares, la entrada a la célula hospedero y su transporte al núcleo.

**Tabla 1. Funciones de las proteínas de VPH (17) (19) (20).**

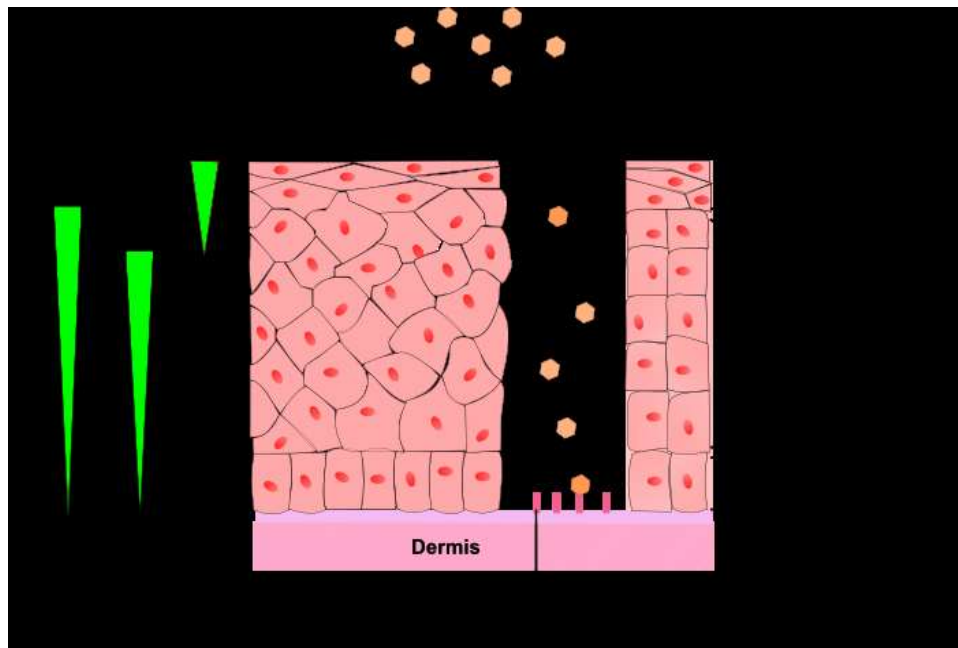
El ciclo replicativo del VPH comienza con el movimiento del virión a la capa basal del epitelio gracias a una abrasión leve o microtrauma de la epidermis. Establecido en esta porción del epitelio, diversas moléculas en la superficie de queratinocitos se han propuesto como receptores necesarios para el proceso de adsorción, como son: integrina  $\alpha$ -6 para VPH-6, y heparán sulfato para VPH-16 y VPH-33; así mismo, la unión puede favorecerse por proteoglicanos o algún otro receptor secundario presente en la célula. Sin embargo, los factores exactos para la entrada del virus aún son desconocidos (21).

Una vez dentro de la célula, el virus pierde la cápside y es transportado al núcleo. En este momento, el virus requiere la expresión de los genes *E1* y *E2* los cuales permiten que el genoma viral sea replicado entre 20 y 100 copias por célula, segregándose a las células hijas por medio de la proteína E2. Se piensa que E1 y E2 son expresadas inicialmente para establecer y mantener un bajo número de copias genómicas; no obstante, las proteínas E6 y E7 también se detectan durante etapas iniciales de la infección. Es importante señalar que los modelos actuales para el estudio de VPH no han permitido seguir el curso infectivo natural, por lo cual, la línea temporal exacta de los eventos infectivos no ha logrado ser evaluada (17).

Tras la entrada del virus, las células troncales de la capa basal y sus células hijas presentan una infección persistente por VPH durante un largo periodo de tiempo, inclusive años. Eventualmente, algunas células amplificadoras transitorias se generan a partir de la división de células troncales, las cuales tienen la capacidad de diferenciarse en capas epiteliales superiores. En un tejido sin infección, las células detienen su replicación y comienzan una diferenciación terminal. De manera importante, las células infectadas con VPH reactivan la división celular, inhiben la apoptosis y abolen la diferenciación



mediante las oncoproteínas E6 y E7. Esta división descontrolada en las capas epiteliales diferenciadas da lugar a las manifestaciones físicas de una infección: las verrugas. De forma importante, el número de copias del genoma viral aumenta durante la reactivación de la división hasta generar miles de copias por célula. Eventualmente, la expresión de la proteína E2 inhibe la expresión de las proteínas E6 y E7, permitiendo la diferenciación de la célula hospedero. Las proteínas tardías L1 y L2 se expresan tras la diferenciación en la zona superficial y promueven la encapsidación del genoma viral (17) (22). Finalmente, los nuevos viriones necesitan algún evento de ruptura mecánica que permita su salida a través de las células desprendidas de la última capa del epitelio (23). El ciclo de replicación de VPH-16 se ilustra en la figura 3.



**Figura 3. Ciclo replicativo de VPH-16.**

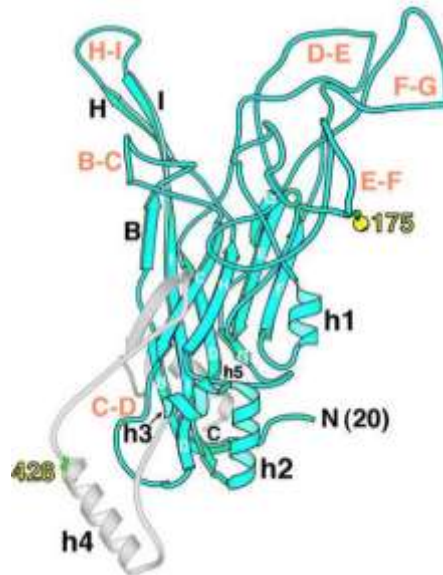
El ciclo replicativo de VPH-16 está estrictamente ligado a las etapas de diferenciación de los queratinocitos infectados, comenzando la infección en la membrana basal mediante su interacción con el proteoglicano de heparán sulfato. Las proteínas tempranas E1 y E2 mantienen la replicación viral en un bajo número de copias. Tras la replicación, células hijas son desplazadas a estratos superiores y comienza la diferenciación. Posteriormente, las proteínas E6 y E7 estimulan el crecimiento celular, así como un incremento en la expresión de los genes tempranos. Los altos niveles de E2, eventualmente, inhiben la expresión de E6 y E7, permitiendo a la célula diferenciarse y entrar a la etapa proliferativa en el ciclo de VPH; la alta expresión de E4 es característica de esta fase. Finalmente, las proteínas tardías son expresadas y el ensamble de los nuevos viriones se da en los últimos estratos del epitelio (64).

Infecciones persistentes de VPH por largos periodos han correlacionado con una mayor probabilidad de desarrollar de CaCu, lo cual se acompaña de una integración del DNA viral dentro del genoma de la célula hospedera (24).

Aunque no existen puntos de ruptura preferentes del genoma de VPH, los ORFs de *E1* y *E2* son interrumpidos frecuentemente, lo cual evita el control de *E2* a las oncoproteínas *E6* y *E7*. A pesar que la coexistencia del genoma de VPH en forma episomal e integrada es posible en una sola célula, la expresión continua de los genes *E6* y *E7* provee una ventaja de proliferativa a la célula infectada, promoviendo que episomas restantes sean perdidos. En resumen, la integración del genoma de VPH resulta en una aumentada y desregulada expresión de los oncogenes *E6* y *E7*, los cuales son responsables de la transformación celular. Así mismo, se cree que la integración de VPH interrumpe genes celulares críticos, lo cual podría contribuir a la formación de una lesión neoplásica (25).

### 3.2.1. Proteína L1.

La cápside viral del VPH, compuesta por las proteínas L1 y L2, consta de 72 pentámeros (capsómeros) de la proteína L1 en asociación con 12 o más unidades de la proteína L2. La proteína L1 (figura 4) es una proteína de aproximadamente 55 kDa con un plegamiento de tipo remolino barril beta, también referido como tipo plasmín, constituido por cuatro pares de láminas beta antiparalelas (cadenas B-I) y cinco alfa-hélices (h1 a la h5). La proteína L1 presenta la capacidad natural de unirse en pentámeros y auto-ensamblarse espontáneamente en “partículas tipo virus” o VLPs, que son indistinguibles inmunológicamente a los viriones nativos. En años recientes, la proteína de fusión GST-L1 ha permitido la obtención de monómeros artificiales de L1, los cuales han sido utilizados para el estudio y ensamble de L1 a gran escala (26) (27) (28).

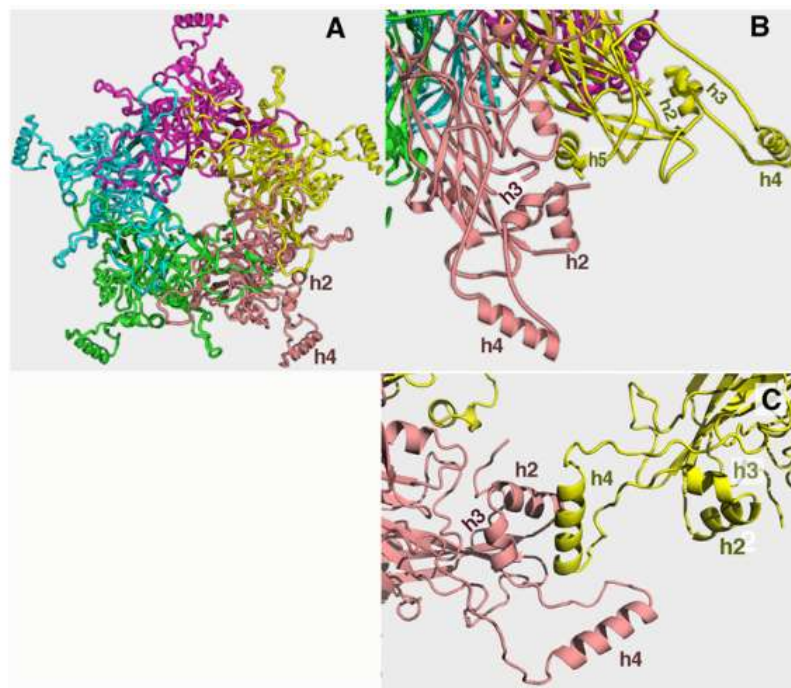


**Figura 4. Subunidad del pentámero de L1.**

Caricatura de la proteína L1 en el contexto de un pentámero. Las estructuras secundarias están marcadas con letras B-I para las láminas  $\beta$  y h1-h5 para las cinco  $\alpha$ -hélices. Los extremos N- y C- terminal están marcados como N (20) y C respectivamente. Los bucles entre cada cadena se marcan como B-C, C-D, etcétera (modificado de (29)).

La estructura cristalográfica de la partícula T=1 o VLP pequeña, compuesta por 12 pentámeros, ha permitido conocer las interacciones pentámero-pentámero en la cápside viral. Cada pentámero contiene 5 proyecciones laterales compuestas por la hélice 4 anclada al centro de la estructura mediante las hélices h2 y h3. Estas uniones se rigen por interacciones hidrofóbicas entre la hélice 4 de un pentámero y las hélices h2 y h3 del capsómero adyacente. El resto del extremo C-terminal regresa al centro de la proteína L1 formando una hélice extra, h5 (figura 5). Esta última porción

contiene una señal de localización nuclear rica en residuos básicos, los cuales podrían interactuar con el DNA viral para su encapsidación (30). Cabe señalar que el DNA de VPH no cuenta con una señal de encapsidación, por lo que cualquier DNA circular covalentemente cerrado (cccDNA) de un tamaño menor a 8 kb puede ser introducido en la cápside viral.

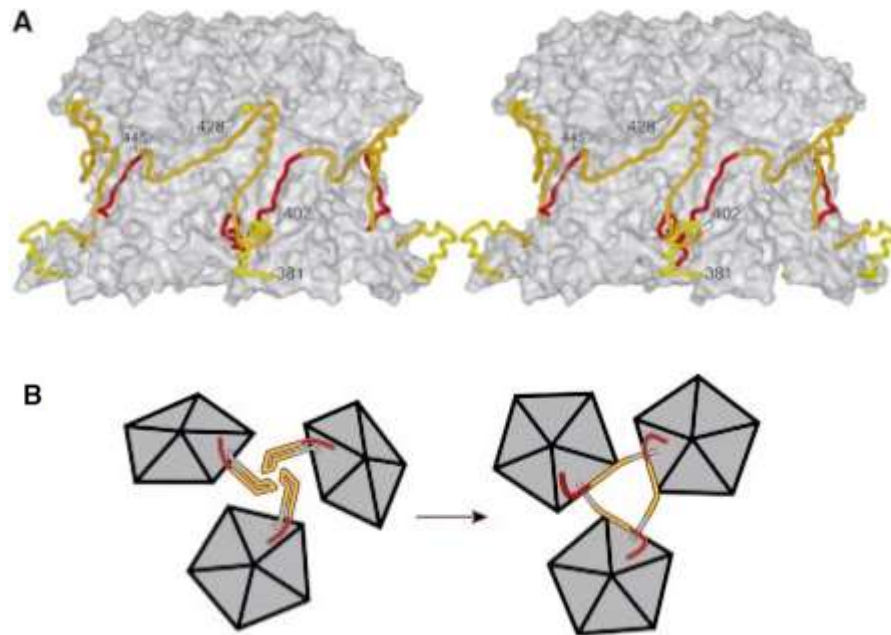


**Figura 5. Elementos estructurales de L1 para el ensamble de papilomavirus.**

A) Vista superior del pentámero L1, mostrando las proyecciones laterales de cada monómero (cada uno en diferente color). B) Acercamiento de las proyecciones laterales de dos monómeros, mostrando las posiciones de h2, h3, h4, y h5. C) Interacciones interpentaméricas entre dos pentámeros de la partícula T=1. La hélice h4 de un pentámero (amarillo) interacciona con las h2 y h3 de otro pentámero (en rosa) (30).

En las VLPs pequeñas no se forma algún puente disulfuro entre pentámeros, lo cual contradice evidencia experimental obtenida de VLPs completas.

Basado en esto, un modelo atómico construido a partir de la estructura del virión del papilomavirus bovino y las VLPs pequeñas se ha propuesto para explicar la formación del virión. En el modelo del “brazo invasor”, los extremos C-terminales forman los contactos interpentaméricos, mediante su extensión fuera de cada subunidad, invadiendo la subunidad de un pentámero adyacente. Cada pentámero recibe cinco brazos, uno de cada pentámero vecino, y dona cinco brazos a los pentámeros adyacentes; la hélice 4, del brazo invasor, se inserta en el espacio entre los bucles B-C y E-F, que conectan las estructuras secundarias intermonoméricas (figura 4). Los residuos 430-446 se extienden alrededor del pentámero blanco, conectando la hélice h4 con el segmento C-terminal, mientras que los residuos 447-474 son desplazados del pentámero (en la VLP pequeña) a una posición equivalente en el pentámero adyacente (en el virión), formando la hélice 5 (figura 6). En este modelo la cisteína 428 del C-terminal y la cisteína 175 de la subunidad invadida se encuentran en una posición capaz de formar un puente disulfuro, el cual se ha comprobado que es necesario para la maduración del virión. En este modelo se considera que el extremo N-terminal podría llenar los huecos existentes en la superficie viral (29) (31).



**Figura 6. Modelo del brazo invasor.**

A) Visión estereoscópica del pentámero de VPH-16 con extremos C-terminales rodeando los pentámeros vecinos. El extremo C-terminal en color naranja representa la porción modelada, mientras que la porción roja indica la misma conformación que en las VLPs pequeñas. B) Representación esquemática del rearrreglo requerido para el cambio conformacional de VLPs pequeñas a VLPs completas y viriones (modificado de (29))

La interacción inicial de la cápside de VPH con la célula hospedero es altamente atribuida a las interacciones de L1 con los residuos de heparán sulfato (HS) que son expuestos en los proteoglicanos de la membrana. Dicha interacción resulta en un cambio conformacional que expone la porción amino terminal de la proteína L2, la cual es escindida por la proteasa Furina. Dicho corte favorece un segundo cambio conformacional que disminuye la afinidad de L1 por el HS y permite una probable interacción con un posible receptor secundario (27). Tras el proceso de entrada, dependiente de clatrina y

claveolina (32), el bajo pH dentro de los compartimentos endosomales en coordinación con ciclofilina B (33) permite la completa exposición del DNA viral. La contribución de la proteína L1 en el ciclo del virus finaliza en el tráfico del virión a través de los compartimentos endosomales (27).

El estudio de la proteína L1 y la generación de VLPs purificadas a partir de cultivos celulares han permitido generar vacunas contra los tipos 6, 11, 16,18, 31, 33, 45, 52 y 58 de VPH; sin embargo, su eficacia, seguridad y protección han sido ampliamente cuestionadas. Aunado a esto, el alto precio de las vacunas es el principal factor que ha detenido su adherencia a esquemas de vacunación pública. (34) (35).

Por otra parte, la búsqueda de L1 en lesiones cervicales ha sido importante para detectar y pronosticar los efectos de la infección por VPH. En este sentido, se ha demostrado que lesiones displásicas en las cuales no se detecta a la proteína L1 tienen una mayor probabilidad de progresión, debido a que la integración del genoma de VPH al hospedero también puede eliminar la expresión de L1 (36) (37) (38).

### **3.2.2. Expresión de la proteína L1 en sistemas procariontes.**

El gran valor comercial de la proteína L1, dada su capacidad de generar VLPs altamente inmunogénicas (39), ha propiciado su expresión en distintos tipos de bacterias (40), lo cual prometía disminuir el tiempo de producción y reducir los altos costos derivados del uso de cultivos celulares eucariontes (41) (42) (43). A pesar de los esfuerzos realizados, la cantidad de proteína L1 generada es pobre debido a diversos factores, dentro de los que destacan: formación de



péptidos incompletos, alta degradación, baja solubilidad de la proteína y la formación de cuerpos de inclusión. Además de estos inconvenientes, la proteína L1 copurifica con una proteína llamada GroEl (44), una chaperona altamente conservada en distintas especies que ayuda al plegamiento de proteínas relacionadas con la replicación celular de *E. coli*. Se sabe que GroEl es una proteína totalmente necesaria para el plegamiento correcto de L1; sin embargo, el complejo formado por L1 y GroEl no se desensambla eficientemente, por lo cual es necesario la adición de ATP y MgCl<sub>2</sub> para purificar totalmente la proteína L1 (44) (45). A pesar de la amplia investigación, expresar y purificar la proteína L1 a gran escala es un reto biotecnológico sin solución.

## 4. Antecedentes

Diversos aptámeros se han caracterizados contra proteínas importantes de VPH, siendo de especial interés las proteínas E6 y E7 de VPH-16 debido a sus efectos oncogénicos y por su relevancia como posibles biomarcadores (46) (47) (48). Además de este enfoque, en el grupo de trabajo del Dr. Luis Marat Alvarez Salas, la Dra. Leija Montoya aisló y caracterizó el aptámero Sc5-c3, el cual es capaz de unirse con gran afinidad y especificidad a VLPs de L1 de VPH-16. De forma particular, el aptámero Sc5-c3, presenta una  $K_D \sim 0.05\mu\text{M}$  y la capacidad de reconocer partículas virales aún en mezclas complejas de proteínas. Dada su alta afinidad, mayor que la reportada entre VPH-33 y la superficie celular, el aptámero Sc5-c3 se ha propuesto como un posible competidor capaz de bloquear la infección por VPH-16 (49).

En la actualidad, pocos trabajos se han enfocado en impedir la formación de la cápside viral mediante el uso de antagonistas capaces de inhibir la estructura cuaternaria de la proteína L1. En 2014, Dong-Dong y colaboradores, utilizaron derivados de carboxipilareno y p-sulfoncalixareno capaces de interactuar con residuos de arginina y lisina en la interface del monómero de L1 e inhibir la formación de capsómeros de VPH-16 (50). Aunado a esto, Ding-Yi Fu en 2015, describió un péptido de 14 aminoácidos dirigido contra el monómero de L1, el cual está esencialmente constituido por la hélice 5 de la proteína L1 de VPH-16. El péptido “pep15”, compite con el resto de los monómeros de L1, inhibiendo la formación espontánea de los capsómeros lo cual evita la formación de VLPs tanto de VPH-16 como de VPH-58 (51). Ambos trabajos presentan un nuevo paradigma en el cual inhibidores del ensamble

de capsómeros pueden ser usados como agentes profilácticos o terapéuticos dirigidos contra la formación de la cápside de VPH.

## **5. Justificación**

En México, durante el año 2013, la tasa de morbilidad por CaCu fue de 23.3 casos por cada 100,000 mujeres, con una mortalidad del 50%, lo cual se traduce en 12 muertes cada 24 horas. Aunado a esto, estudios recientes han estimado que cerca del 50% de los hombres y mujeres sexualmente activos son portadores de VPH. En este sentido, el uso de moléculas capaces de unirse específicamente a las proteínas de cápside y que impidan la formación de su estructura cuaternaria destacan por su posible capacidad para inhibir al VPH.

## **6. Hipótesis**

Es posible obtener una población de aptámeros que interactúen con la proteína L1 monomérica de VPH-16 utilizando un diseño adecuado del método SELEX, en conjunto con pozas aleatorizadas de oligonucleótidos sintéticos de cadena sencilla.

## **7. Objetivos**

### **7.1. Objetivo General**

Aislar una población de aptámeros de RNA para la proteína L1 monomérica de VPH-16.

### **7.2. Objetivos particulares.**

- Expresar y purificar la proteína de fusión GST-L1 de VPH-16.
- Generar una poza de RNA a partir de una poza de DNA.
- Realizar el método SELEX para la proteína L1 monomérica de VPH-16.
- Verificar la unión de las secuencias seleccionadas con la proteína L1 monomérica de VPH-16.

## 8. Metodología

### 8.1. Transformación bacteriana

Aproximadamente, 200 ng de DNA plasmídico de las construcciones pGST y pGST-FSL1a (ver Anexo) se mezcló con 50  $\mu$ L de bacterias *Escherichia coli* químicamente competentes de la cepa Codon Plus [ $F^{-}$ ompT hsdS( $r_B^{-}$ m $B^{-}$ ) dcm<sup>+</sup>Tet<sup>R</sup>gal $\lambda$ (DE3) endA Hte [argU proLCam $\square$ ] [argU ileY leuW Strep/Specr<sup>R</sup>] ] o la cepa Rosetta<sup>TM</sup> [ $F^{-}$ ompT hsdS<sub>B</sub>( $r_B^{-}$ m $B^{-}$ ) gal dcm pRARE)<sup>2</sup>(Cam<sup>R</sup>)] las cuales se incubaron por 30 minutos a 4°C. Tras la incubación, la mezcla se sometió a un choque térmico a 42°C por 2 minutos e inmediatamente fueron trasladadas a 4°C por tres minutos. Posteriormente, se adicionó 1 mL de medio SOC (ver Anexo) y se incubaron a 37°C por 2 horas. Al término de la incubación, la mezcla se centrifugó a 15,900 RCF por 1 minuto. El exceso de medio se eliminó y el botón de células se resuspendió en un volumen aproximado de 100  $\mu$ L. Las células recuperadas fueron propagadas en cajas Petri con agar LB (ver Anexo) con 200  $\mu$ g/mL de ampicilina y 50  $\mu$ g/mL de cloranfenicol. Finalmente, las cajas se incubaron a 37 °C por 18 horas.

### 8.2. Inducción de proteínas

Una colonia de bacterias transformadas se inoculó en medio LB líquido (ver Anexo) suplementado con 200  $\mu$ g/mL de ampicilina y 50 $\mu$ g/mL de cloranfenicol. El pie de cultivo se diluyó en una proporción 1:10 en medio LB

adicionado con 50 µg/mL de ampicilina y 15 µg/mL de cloranfenicol, el cual se incubó por 2 horas a 30° C. Posteriormente, se añadió IPTG a una concentración final de 1mM y se incubó a 30°C por dos horas. Sucesivamente, las bacterias se recuperaron en tubos de 50mL, se centrifugaron a 380 RCF durante 15 minutos y fueron resuspendidas en 300 µL de “buffer de lisis bacteriana” (ver Anexo).

### **8.3. Lisis bacteriana**

Con el fin de recuperar la proteína producida, las bacterias fueron lisadas mediante sonicación con el equipo Cole-Parmer® Ultrasonic Processor, cinco veces durante 30 segundos a 80% de amplitud. Tras la lisis, el extracto celular se centrifugó a 15,900 RCF durante 3 minutos; la fracción soluble se recuperó y almacenó a 4°C hasta su uso.

### **8.4. Purificación de la proteína GST**

La fracción soluble previamente obtenida se incubó con perlas de glutatión agarosa (Sigma-Aldrich®) en una proporción 1:5 durante 1 hora a 4°C en agitación constante. Al finalizar la incubación, la mezcla se centrifugó a 15,900 RCF durante un minuto y el sobrenadante se eliminó. Las perlas se lavaron cinco veces con 500 µL de PBS con el fin de eliminar cualquier interacción inespecífica (ver Anexo). Enseguida, las perlas se trataron con 300 µL de “buffer de glutatión” (ver Anexo) con el cual se incubaron 5 minutos a



temperatura ambiente en agitación constante. Enseguida, la mezcla se centrifugó a 15,900 RCF durante un minuto para recuperar la proteína GST purificada, la cual se dializó contra PBS para eliminar el exceso de glutatión. Finalmente, la proteína GST se almacenó a 4°C hasta su inmovilización.

### **8.5. Purificación de la proteína GST-L1**

La fracción soluble que se obtuvo tras la lisis celular se adicionó con ATP y MgCl<sub>2</sub>, a una concentración final de 2mM y 5mM respectivamente. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación constante. A continuación, se añadieron perlas de glutatión agarosa en una proporción 3:1; la mezcla se incubó durante 1 hora a 4°C en agitación constante. Al finalizar, se centrifugó a 15,900 RCF durante un minuto y el sobrenadante fue eliminado; las perlas recuperadas se lavaron cinco veces con 500 µL de PBS. Enseguida, las perlas se trataron con 300 µL de “buffer de glutatión” con el cual se realizó una incubación por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación constante; la mezcla se centrifugó a 15,900 RCF durante un minuto para recuperar la proteína GST purificada, la cual se dializó contra PBS para eliminar el exceso de glutatión. Finalmente, la proteína GST se almacenó a 4°C hasta su inmovilización

## 8.6. SDS-PAGE

La proteína GST y GST-L1 se evaluó a partir de 1 µg de la fracción soluble o a partir de 200 ng de proteína purificada; la cual se mezcló con un volumen de “Buffer Laemmli” 2X (ver Anexo). La mezcla se incubó a ebullición durante 5 minutos, y la proteína desnaturizada se resolvió en geles desnaturizantes para proteínas (ver Anexo) por 90 minutos a 100 V. Finalmente, los geles obtenidos se tiñeron con Azul de Coomasie.

## 8.7. Western Blot

Posterior a la electroforesis, los geles se incubaron en “buffer de transferencia” (ver Anexo) durante 10 minutos. Tras la incubación, las proteínas se inmovilizaron en membranas de PVDF (Millipore®) con el equipo TransBlot Turbo®, utilizando tres veces la programación “Turbo protocol”. Al finalizar la transferencia, las membranas se incubaron a temperatura ambiente hasta deshidratarse completamente, se reactivaron con metanol y se incubaron en “solución de bloqueo” (ver Anexo) durante 2 horas en agitación constante. Al terminar, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con 3 mL del anticuerpo primario correspondiente (ver Anexo).

Terminada la incubación, se realizaron 3 lavados con 25 mL de “solución de lavado” (ver Anexo) y se incubó con 3 mL de anticuerpo secundario (ver Anexo), por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó 3 veces con 25 mL de “solución de lavado”.

Las membranas hidratadas se incubaron con “solución de revelado” (ver Anexo) por 2 minutos a temperatura ambiente y se leyó en el equipo cDiGit® con ayuda del software Image Studio Digits Ver 4.0, en la programación “High”.

### **8.8. Inmovilización de la proteína GST**

La proteína GST purificada se resolvió en geles nativos para proteínas (ver Anexo) durante 2 horas a 120V. Al concluir la electroforesis, los geles se incubaron en “buffer de glicina” (ver Anexo) por 10 minutos. Finalizada la incubación, las proteínas se inmovilizaron en una membrana de PVDF con el equipo TransBlot Turbo®, utilizando tres veces la programación “Turbo protocol”. Por último, las membranas se lavaron con 25mL de PBS, se recortó la porción que contenía a la proteína GST y se almacenó en PBS a 4°C hasta su uso.

### **8.9. Tamizaje e inmovilización de la proteína GST-L1**

La proteína GST-L1 purificada se resolvió en geles nativos para proteínas durante 2.5 horas a 120V. Al concluir la electroforesis, los geles se incubaron en “buffer de glicina” (ver Anexo) por 10 minutos. Finalizada la incubación, la proteína se inmovilizó en membranas de PVDF (Millipore®) con el equipo TransBlot Turbo® utilizando tres veces la programación “Turbo protocol”. Al terminar, las membranas se lavaron con 25mL de PBS, la porción de

membrana que contenía a la proteína GST-L1 se recortó y se almacenó en PBS a 4°C.

### 8.10. PCR convencional

La PCR de la poza “30NLib” (ver Anexo) se realizó con las siguientes condiciones.

Reactivo	Cantidad
Agua libre de nucleasas	12.2 µL
Buffer de reacción 10X	2 µL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1.2 µL
dNTPs 2.5mM	1 µL
Cebador Fwd7 9.3 µM	0.7 µL
Cebador Rev6 16.1 µM	0.7 µL
dNTPs 2.5 mM	1 µL
Taq Pol 5U/µL	0.5 µL
Poza “30NLib” 24mM	0.7 µL

## Programa de termociclado

95°C	5 minutos	
95°C	30 segundos	7 ciclos
65°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	3 minutos	

**8.11. PCR en emulsión**

La fase acuosa de la PCR en emulsión se realizó con los mismos componentes y concentraciones previamente descritas. La fase oleosa de la PCR en emulsión se generó de la siguiente manera:

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Span 80	2.25 mL
Tween 80	200 $\mu$ L
Triton X-100	25 $\mu$ L
Aceite Mineral	cbp. 50 mL

Una alícuota de 200  $\mu$ L de la reacción de PCR se goteó en un lapso de 5 minutos a 400  $\mu$ L de fase oleosa, en un microtubo de 2 mL, en agitación constante. Formada la emulsión, esta se dividió en 6 tubos de PCR a los cuales se les agregó 30  $\mu$ L de aceite mineral en la superficie de la mezcla.

La reacción de PCR se realizó con el siguiente protocolo de termociclado:

95°C	5 minutos	
95°C	30 segundos	35 ciclos
65°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	3 minutos	

Tras la amplificación, las reacciones se recolectaron en un microtubo de 1.5 mL y se centrifugaron a 15,900 RCF por 5 minutos. El sobrenadante se recuperó en un nuevo tubo de 1.5 mL al cual se añadió 500  $\mu$ L de diclorometano, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 15,900 RCF por 5 minutos. La fase acuosa se recuperó y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### 8.12. Transcripción *in-vitro*

La poza de RNA se obtuvo mediante transcripción *in-vitro* a partir de la PCR convencional, la PCR en emulsión, o el producto de RT-PCR con el siguiente protocolo.

Reactivo	Volumen
Agua libre de nucleasas	15 $\mu$ L
Buffer de transcripción 10X	6 $\mu$ L
rNTPs 2.5 mM	12 $\mu$ L
DTT 10mM	5 $\mu$ L
Ribolock 4 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
T7 RNA Pol 20 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
Producto de PCR	40 $\mu$ L

La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se agregó 5 unidades de RQ1-DNAse y se incubó a 37°C durante 1 hora con el fin de eliminar el molde de DNA.

### **8.13. Purificación de RNA**

El producto de transcripción se cargó en un gel desnaturalizante para ácidos nucleicos (ver Anexo) durante 30 minutos a 120 V. La banda correspondiente al producto completo se recortó del gel, se trituró con ayuda de una jeringa y se incubó en una proporción 1:1 con “buffer de elución” (ver Anexo) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, la mezcla se separó mediante filtración, recuperado sólo la fase acuosa. Al volumen recuperado se añadió TriZol® en una proporción 1:1 y cloroformo en una proporción 1:5, se agitó hasta formar una mezcla homogénea y se centrifugó a 14,700 RCF por 15 minutos. La fase acuosa se recuperó y se añadió 1mL de isopropanol para precipitar el RNA; inmediatamente se centrifugó a 14,700 RCF por 2 horas. El botón obtenido se lavó con 1 mL de etanol al 85% y se centrifugó a 14,700 RCF por 5 minutos. Finalmente, el botón se resuspendió en, 30 µL de agua libre de nucleasas y se cuantificó con un equipo NanoDrop 2000™.



### 8.14. SELEX

Partiendo de 10µg de la poza de RNA se inició cada ciclo SELEX, el cual se dividió en tres pasos de selección secuenciales. Los pasos realizados se resumen en la siguiente tabla:

Paso	Tipo de selección	Proteína blanco	Condiciones interacción	Lavados	Secuencias Recuperadas*
1	Positiva	GST-L1	37 °C 1 hora PBS Agitación	5 con PBS 1X	Unidas**
2	Negativa	GST		Ninguno	No unidas
3	Positiva	GST-L1		5 con PBS 1X	Unidas**

\* Las secuencias recuperadas se utilizaron para iniciar el siguiente paso de selección. \*\* Las secuencias unidas se recuperaron calentando la membrana en PBS a 65°C por 5 minutos.

El RNA recuperado después del tercer paso de selección se concentró a un volumen final de 10 µL para realizar la RT-PCR.

### 8.15. RT-PCR

Las secuencias de RNA concentradas tras cada ciclo SELEX se utilizaron como molde para la reacción de RT-PCR:

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Agua libre de nucleasas	1.6 $\mu$ L
Buffer de reacción 2X	15 $\mu$ L
Cebador Fwd7 9.3 $\mu$ M	0.7 $\mu$ L
Cebador Rev6 16.1 $\mu$ M	0.7 $\mu$ L
RNA concentrado	10 $\mu$ L
SuperScript III® 200U / $\mu$ L	0.5 $\mu$ L

La reacción se llevó a cabo con el siguiente protocolo de termociclado:

50°C	30 minutos	
94°C	5 minutos	
94°C	30 segundos	15 ciclos
65°C	30 segundos	
68°C	30 segundos	
68°C	3 minutos	

El DNA generado se utilizó como molde para producir una nueva poza de RNA enriquecido e iniciar otro ciclo SELEX

### 8.16. Transcripción *in-vitro* marcada radiactivamente

A partir de DNA de doble cadena procedente del quinto ciclo de selección o de la poza inicial “30NLib”, se sintetizó RNA marcado con [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP (3000 Ci/mmol) con el siguiente protocolo:

Reactivo	Volumen
Buffer RNAPol 10X	2 $\mu\text{L}$
rAGC 25mM	1 $\mu\text{L}$
DTT 100mM	3 $\mu\text{L}$
Ribolock 8 U/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
T7 RNAPol 20 U/ $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$
Producto de PCR	11 $\mu\text{L}$
$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$

La reacción se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se agregó 5 unidades de RQ1-DNAse y se incubó a 37°C durante 1 hora con el fin de eliminar el molde de DNA.

El RNA producido se purificó de acuerdo con el protocolo previamente descrito.

### **8.17. Ensayos de interacción**

Para conocer la interacción entre las secuencias seleccionadas y la proteína GST-L1, 2µg de proteína se incubaron con 300 cpm de RNA marcado con [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP (3000Ci/mmol), durante 1 hora a temperatura ambiente. Dicha incubación se realizó de forma independiente entre las secuencias seleccionadas después del quinto ciclo y con la poza inicial de RNA. Como control se realizaron ensayos comparativos con la proteína GST para evaluar la especificidad de la interacción con la proteína L1.

Durante la incubación se ensambló el Hoefer Scientific® Slot Blot Blotting Manifold con una membrana de nitrocelulosa y una membrana de nylon, las membranas se hidrataron con PBS y cada mezcla de interacción se pasó por el equipo para su tamizaje. Tras el paso de la mezcla, a cada pozo se agregó 1 mL de PBS con el fin de eliminar cualquier interacción espuria. Al finalizar, las membranas se recuperaron e incubaron a temperatura ambiente hasta su deshidratación. A continuación, las membranas se expusieron 30 minutos en una placa fluorográfica, la cual se reveló con un equipo Thymoo TRIO® a una

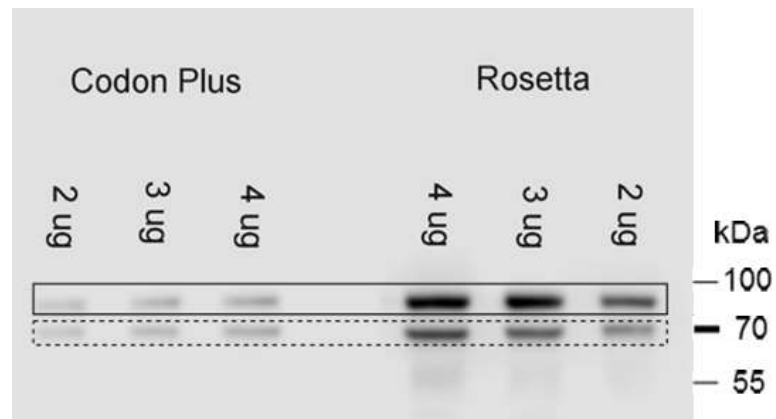
resolución de 200 micrones. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el software ImageQuant v5.2.

## 9. Resultados

### 9.1. Expresión de la proteína de fusión GST-L1

Las cepas de *E. coli* Codon Plus y Rosetta se transformaron con la construcción pGST-FSL1a, y se realizó la inducción de la proteína de fusión GST-L1. La producción de la proteína obtenida se comparó en ambas cepas, analizando la misma cantidad de proteína total en ensayos de western blot, utilizando un anticuerpo específico para la proteína L1 de VPH-16. Se observó una banda de tamaño esperado, correspondiente al peso de la proteína de fusión GST-L1 (85 kDa); y una banda extra de aproximadamente 75 kDa, posiblemente de un producto incompleto de la proteína GST-L1. Así mismo, se observó hasta cinco veces más proteína GST-L1 producida a partir de la cepa Rosetta en comparación con la cepa Codon Plus (figura 7).

El aumento en la producción de la proteína pudo deberse a que la cepa Rosetta contiene un tRNA extra que codifica para el aminoácido glicina a partir del codón GGA. La secuencia de la proteína GST-L1 utilizada en este trabajo contiene dos codones GGA cercanos al extremo 5', lo cual se asocia con la generación de productos incompletos y baja expresión (52). Debido al resultado obtenido se procedió a realizar la purificación de la proteína a partir de la cepa Rosetta.



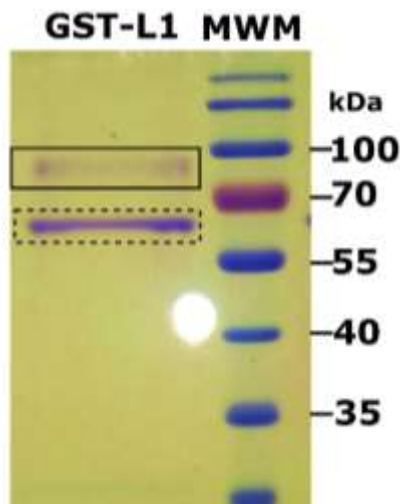
**Figura 7. Western blot de la proteína GST-L1 producida en las cepas Codon Plus y Rosetta.**

Membrana de PVDF transferida con cantidades crecientes de la proteína GST-L1 producida a partir de la cepa Rosetta (derecha) y la cepa Codon Plus (izquierda). Se observó una banda correspondiente al peso esperado de la proteína de la proteína GST-L1 (cuadro continuo) así como una banda correspondiente a un posible producto incompleto (cuadro punteado).

## 9.2. Purificación de la proteína de fusión GST-L1

Tras la inducción, la proteína GST-L1 debe de ser liberada de la chaperona GroEl para su completa purificación; por este motivo, el extracto proteico soluble se sometió a un tratamiento con ATP 2mM y MgCl<sub>2</sub> 5mM, concentraciones previamente reportadas para desensamblar el complejo multiproteico (44). Posterior al tratamiento, la proteína GST-L1 se purificó con perlas de glutatión-agarosa y se verificó en un gel desnaturizante para proteínas. En la figura 8 se muestra la fracción purificada de la proteína GST-L1; en la cual se observó una banda menor a los 100 kDa correspondiente a la proteína de fusión GST-L1 y una proteína menor a los 70 kDa

correspondiente al peso de GroEl, lo cual sugería la presencia del complejo multiproteico GroEL-GST-L1 a pesar del tratamiento de ATP y MgCl<sub>2</sub>.

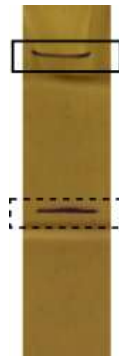


**Figura 8. Proteína GST-L1 purificada y tratada con ATP y MgCl<sub>2</sub>.**

Gel desnaturalizante para proteínas con la fracción purificada de la proteína GST-L1. Se observó la proteína GST-L1 en un peso esperado (cuadro continuo) y la chaperona GroEl en un peso inferior a los 70 kDa (recuadro punteado). MWM: marcador de peso molecular.

Con este resultado, se hipotetizó que la proteína GST-L1 podría permanecer unida a GroEl, lo cual se observaría en condiciones nativas como un complejo de alto peso molecular que presentaría señal para L1. Con el fin de corroborar esta hipótesis, se realizó un gel nativo para proteínas con la proteína GST-L1 previamente purificada. Como se muestra en la figura 9, la proteína “purificada” presentó dos bandas: una de alto peso molecular (cuadro continuo) y una de bajo peso molecular (cuadro punteado). Este patrón sugería la presencia de una fracción de GST-L1 que permanecía unida con GroEl, formando un complejo multiproteico de alto peso molecular; además de una fracción de bajo peso molecular, la cual correspondería a la proteína GST-L1 que se libera completamente de GroEl.



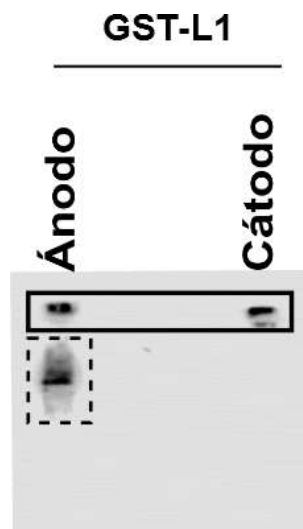
**GST-L1**

**Figura 9. Patrón de migración de la proteína GST-L1 en condiciones nativas.**

Gel nativo para proteínas con proteína GST-L1 tratada con ATP 2mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM y purificada con perlas de glutatión agarosa. Se observó una banda de alto peso molecular (cuadro continuo) posiblemente del complejo formado por GST-L1 y GroEl; además de una banda de bajo peso molecular (cuadro punteado) posiblemente de la proteína GST-L1 liberada.

Para verificar la presencia de la proteína L1 en ambas bandas, se realizó un western blot en condiciones nativas a partir de las fracciones purificadas. Como se muestra en la figura 10, se observó señal para la proteína L1 a partir de la banda de alto peso molecular, la cual tuvo la capacidad de migrar hacia el ánodo como hacia el cátodo. La banda de bajo peso molecular también presentó señal para L1, pero sólo tuvo la capacidad de migrar hacia el ánodo. Con esta evidencia se propone que existe una parte de GST-L1 liberada completamente de GroEl tras el tratamiento con ATP y MgCl<sub>2</sub>, la cual se observó como una de banda de bajo peso molecular (cuadro punteado); además de una fracción de GST-L1 que permaneció unida a GroEl, observándose como una banda de alto peso molecular (recuadro continuo). La migración de la banda de alto peso molecular se explicaría por la presencia

de un número variable de unidades de GroEl unidas a L1, lo que permitiría la migración del complejo hacía ambos electrodos al aplicar una diferencia de potencial.

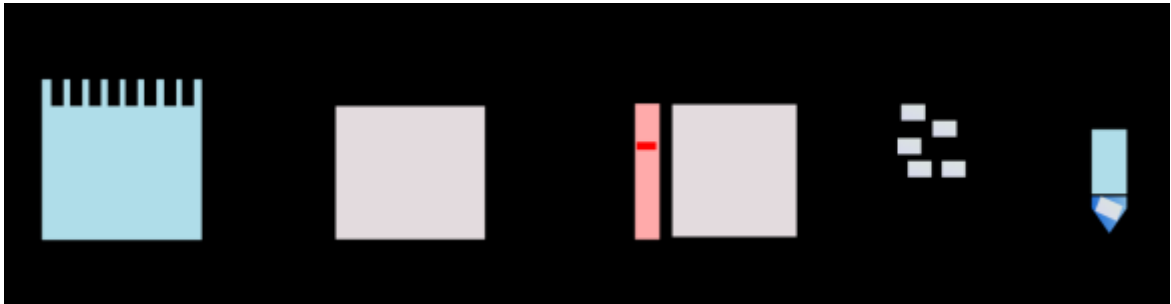


**Figura 10. Western blot de la proteína L1 post-tratamiento y purificación.**

Membrana de PVDF transferida con proteína GST-L1 “purificada” y tratada con ATP y  $MgCl_2$ . Se observó señal de L1 en el complejo de alto peso molecular el cual fue capaz de migrar hacia el ánodo como hacia el cátodo. La banda de bajo peso molecular presentó señal para L1, la cual solamente migró hacia el ánodo.

Los resultados anteriores presentaron un gran reto ya que la proteína GST-L1, a pesar del tratamiento y la purificación, no se encontró en un estado totalmente puro; esto involucraba que, si realizaba el método SELEX con esta proteína, se podrían seleccionar aptámeros indeseados contra la chaperona GroEl. En consecuencia, se propuso realizar un tamizaje extra entre el complejo multiproteico y la proteína GST-L1 mediante electroforesis en condiciones nativas. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana

de PVDF para su inmovilización y se recortó la fracción de que contenía a la proteína GST-L1. (figura 11).



**Figura 11. Tamizaje e inmovilización de la proteína GST-L1.**

La proteína GST-L1 parcialmente purificada se resolvió en un gel nativo para proteínas (1), y se inmovilizó en una membrana de PVDF mediante electrotransferencia (2). Posteriormente, un carril se recortó y tiñó con rojo de Ponceau (3), el cual sirvió como guía para separar sólo la porción de membrana que contenía a GST-L1 (4). Finalmente, la membrana se almacenó a 4 C en PBS (5).

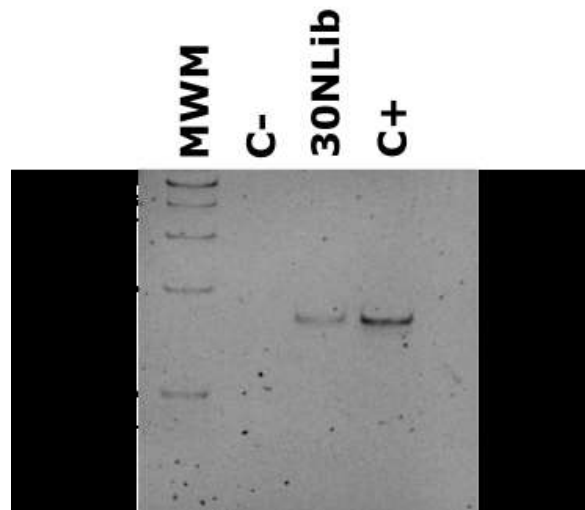
Este mismo procedimiento se realizó para la proteína GST.

### **9.3. Generación de una poza de RNA a partir de una poza de DNA.**

#### **9.3.1. Amplificación de la poza “30NLib”.**

Para generar la poza de RNA que sería utilizada en los ciclos de selección, se utilizó una poza de DNA de cadena sencilla, denominada “30NLib”, la cual contiene 30 nucleótidos aleatorizados y un tamaño total de 81 nucleótidos. La poza de DNA se amplificó mediante PCR hasta 7 ciclos debido a que

experimentos previos (53) demostraron que, al aumentar el número de ciclos, se generaban una gran cantidad y diversidad de subproductos (figura 12). La amplificación de pozas aleatorizadas a un bajo número de ciclos es un problema común, que tiene como consecuencia dos inconvenientes: primero, múltiples PCRs deben ser realizadas con el fin obtener el material necesario para generar la poza de RNA; segundo, que cada secuencia única dentro de la poza se encuentra en un bajo número de copias, lo cual disminuye la probabilidad de recuperar la secuencia capaz de unirse a la proteína blanco.



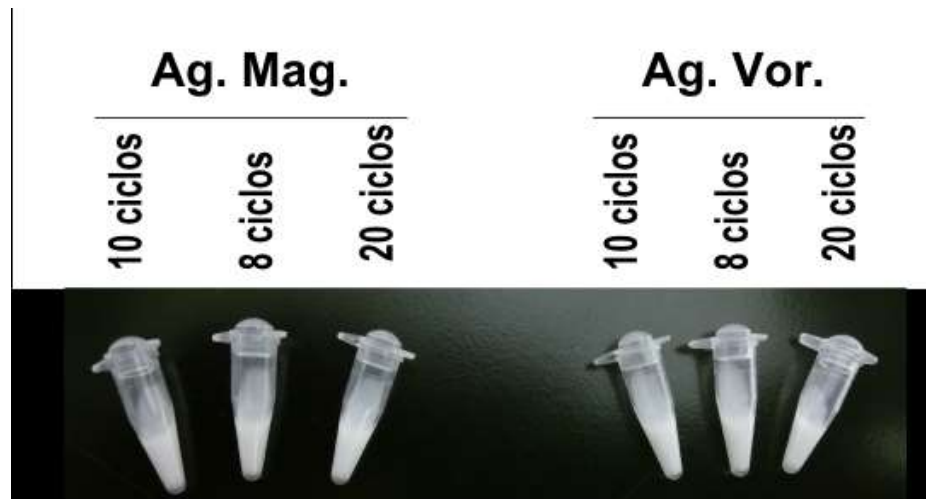
**Figura 12 Amplificación de la poza 30NLib por PCR convencional.**

Gel nativo para ácidos nucleicos con el producto de PCR de la poza “30NLib” amplificado por 7 ciclos. Se observó el producto esperado con un peso aproximado a las 80 pb (flecha blanca). C+, control positivo; MWM, marcador de peso molecular.

La generación de subproductos al amplificar pozas aleatorizadas fue ampliamente descrito por Tolle en 2014 (54). El mecanismo por el cual se generan estos subproductos se explica por la hibridación de una región aleatorizada con una región no aleatorizada de dos secuencias

independientes, lo cual permite que una molécula funcione como cebador de otra y se obtengan amplicones de alto peso molecular. Una metodología propuesta para corregir esta amplificación aberrante es el uso de PCR en emulsión. Este tipo de PCR genera un sistema cerrado, en el cual cada micela contiene una única molécula de la poza, lo cual previene su hibridación con otras moléculas y, en consecuencia, la generación de subproductos. Por este motivo, se decidió estandarizar las condiciones de amplificación para la poza “30NLib” mediante PCR en emulsión, siguiendo como guía el protocolo publicado por Williams en 2001 (55).

La estandarización comenzó con la generación de emulsiones mediante dos sistemas de agitación diferentes: un agitador magnético y un agitador de vórtice; probando su estabilidad durante un número creciente de ciclos de amplificación. Estabilidad, en el contexto de una emulsión, se describe como la resistencia de las micelas a la coalescencia, lo cual se observa macroscópicamente como una mezcla homogénea, sin flotación o sedimentación de sus componentes. En la figura 13 se muestra que la emulsión permaneció estable, sin importar el método de agitación, durante 20 ciclos de amplificación (figura 13). Por consiguiente, se decidió generar las emulsiones siguientes con un agitador magnético debido a que la velocidad de agitación podía ser controlada de una forma más fina por este método.



**Figura 13. Estabilidad de la emulsión a través de ciclos de amplificación.**

Se generaron emulsiones siguiendo el protocolo descrito por Williams (45) mediante agitador magnético (Ag. Mag) y agitador de vórtice (Ag. Vor.). La emulsión se mantuvo homogénea y estable durante 20 ciclos de amplificación indistintamente del método de agitación.

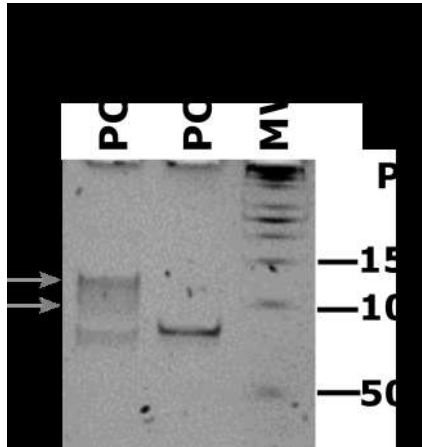
Posterior a la amplificación, las emulsiones generadas deben pasar por un proceso de partición con el fin de restablecer las dos fases que la constituyen y recuperar el amplicón presente en la fase acuosa. Para romper la emulsión se probó una batería de solventes orgánicos, conformada por: cloroformo, diclorometano e isobutanol. La partición realizada con diclorometano resultó en dos fases homogéneas, mientras que las particiones realizadas con cloroformo e isobutanol presentaron un sobrenadante blanco, lo cual indicaba una separación fallida (figura 14). Por ese motivo, se decidió usar diclorometano para romper la emulsión en experimentos subsecuentes.



**Figura 14. Partición de la emulsión.**

Batería de solventes (cloroformo, diclorometano e isobutanol) utilizados para romper la emulsión generada. La emulsión tratada con diclorometano presentó dos fases homogéneas, en comparación con la emulsión tratada con cloroformo o isobutanol las cuales presentaron un sobrenadante blanco (flechas rojas). EM: emulsión; CL: cloroformo; DiCl: diclorometano; IBut: isobutanol.

Finalmente, se realizó la PCR en emulsión, llevando a cabo el paso de amplificación por 35 ciclos, y su separación con diclorometano. La amplificación mediante PCR en emulsión generó solamente un producto de longitud esperada, mientras que la amplificación mediante PCR convencional generó una gran cantidad y variedad de subproductos (figura 15).



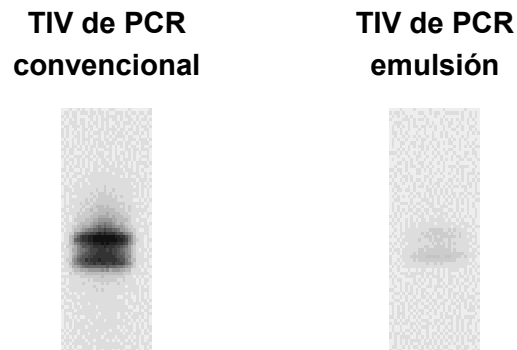
**Figura 15. Amplificación de la poza “30NLib” mediante PCR convencional y PCR en emulsión.**

Gel nativo para ácidos nucleicos con el producto de PCR de la poza “30NLib” proveniente de la PCR convencional (PCRc) y la PCR en emulsión (PCRem). Después de 35 ciclos de amplificación se observó una gran diversidad de productos generados a partir de la PCR convencional (flechas grises); en la PCR en emulsión se observó un único producto de amplificación (flecha negra). MWM: marcador de peso molecular.

### 9.3.2. Transcripción de la poza “30NLib”.

A partir de la PCR en emulsión y la PCR convencional se generaron dos pozas de RNA aleatorizado mediante transcripción *in-vitro* (TIV), con el fin de comparar el rendimiento a partir de cada reacción. En la figura 16 se muestra un gel desnaturizante con el RNA generado; en ambos casos se observaron dos bandas, debido a la capacidad de la T7 RNAPol de agregar bases en los extremos 5' y 3' sin la necesidad de un molde. En contra de lo esperado, la cantidad de RNA generado a partir de la PCR en emulsión fue inferior al generado a partir de la PCR convencional; dicho fenómeno se repitió a pesar de realizar múltiples extracciones fenólicas (datos no mostrados).

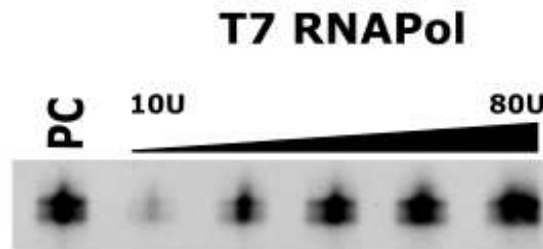




**Figura 16. RNA obtenido a partir de PCR en emulsión y PCR convencional.**

Gel desnaturalizante para ácidos nucleicos con RNA generado utilizando como molde la PCR en emulsión (derecha) y la PCR convencional (izquierda). La cantidad de RNA generado a partir de la PCR en emulsión fue menor al generado a partir de la PCR convencional.

Con el fin de entender este fenómeno, se realizaron transcripciones *in-vitro* a partir de la PCR en emulsión en las cuales se añadió 10, 20, 40, 60 y 80 unidades de T7 RNAPol. En la figura 17 se observa que el RNA generado con 60 unidades de T7 RNAPol a partir de la PCR en emulsión fue comparable con el RNA generado con 10 unidades de T7 RNAPol a partir de la PCR convencional. Este resultado sugiere una inhibición de la T7 RNAPol por algún componente de la emulsión, el cual no puede ser eliminado al realizar la partición con diclorometano, ni con extracciones fenólicas.



**Figura 17. Transcripción *in-vitro* con cantidades crecientes de T7 RNAPol.**

Gel desnaturalizante para ácidos nucleicos con RNA generado por 10, 20, 40, 60 y 80 Unidades de T7 RNAPol a partir de PCR en emulsión. La cantidad de RNA producido aumentó proporcionalmente a la cantidad de T7 RNAPol agregada, lo que sugiere una inhibición competitiva. PC: RNA generado a partir de PCR convencional con 10U de T7 RNAPol.

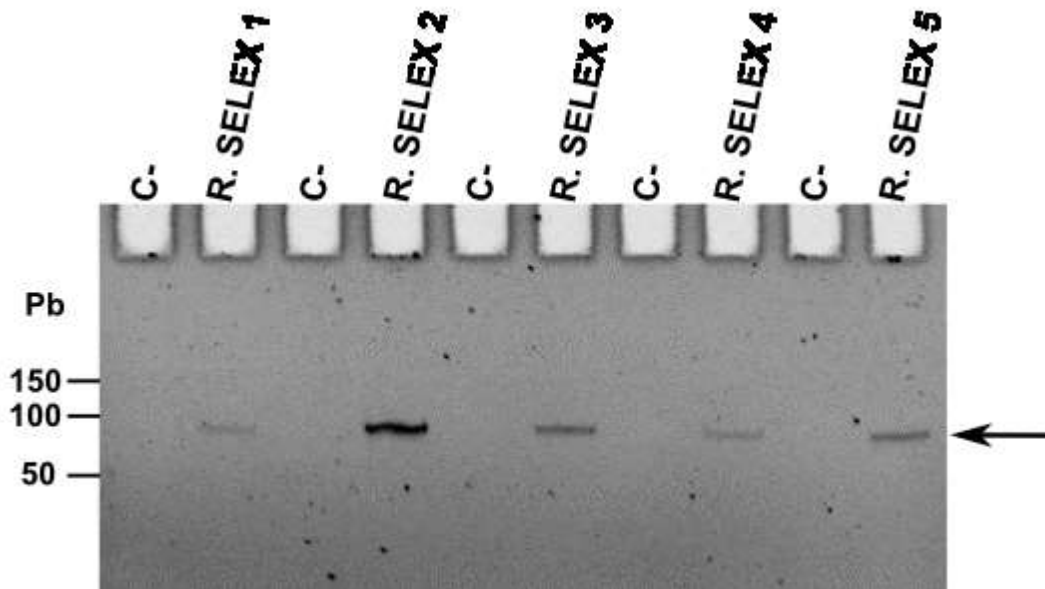
El resultado anterior demostró que utilizar el producto de PCR en emulsión como molde para generar la poza de RNA no permite obtener mayor cantidad ni, en consecuencia, mayor variedad de moléculas; ambas características necesarias para realizar el método SELEX en condiciones óptimas. Por este motivo se decidió utilizar la poza de RNA generada a partir de la PCR convencional para iniciar los pasos de selección

#### 9.4. SELEX

El método SELEX utilizado en este trabajo se basó en el protocolo publicado por Szeto en 2013 (56). Dicho protocolo presenta la ventaja de realizar múltiples pasos de selección sin la necesidad de amplificaciones intermedias, lo que permite ahorrar tiempo y recursos en cada ciclo SELEX. La poza aleatorizada de RNA previamente generada, se incubó con la proteína GST-L1 inmovilizada en membranas de PVDF; tras la incubación los oligonucleótidos unidos fueron recuperados e incubados con la proteína GST.

Esta segunda incubación se conoce como selección negativa, la cual permite eliminar todos aquellos oligonucleótidos que se unen al sistema de selección y a la porción de GST que se fusionó a la proteína L1. Después de la selección negativa, los oligonucleótidos no unidos al sistema ni a la proteína GST fueron recuperados y se incubaron con la proteína GST-L1 para finalizar los tres pasos de selección.

Los oligonucleótidos recuperados se amplificaron mediante RT-PCR y se transcribieron *in-vitro* para generar una nueva poza enriquecida de RNA que se utilizó para comenzar un nuevo ciclo SELEX. Los resultados de cada ciclo SELEX se muestran en la figura 18 en la cual se observan los amplicones obtenidos después de cada ciclo de selección, pero no en el control negativo, demostrando que se logró recuperar y amplificar secuencias después de cada ciclo SELEX. Es importante señalar que la figura 18 se generó al final de los cinco ciclos por lo que cada una de las reacciones aumentó su concentración debido a la evaporación de agua durante el tiempo de almacenaje. Por este motivo, las cantidades observadas no son iguales en cada carril a pesar de haber cargado volúmenes iguales.



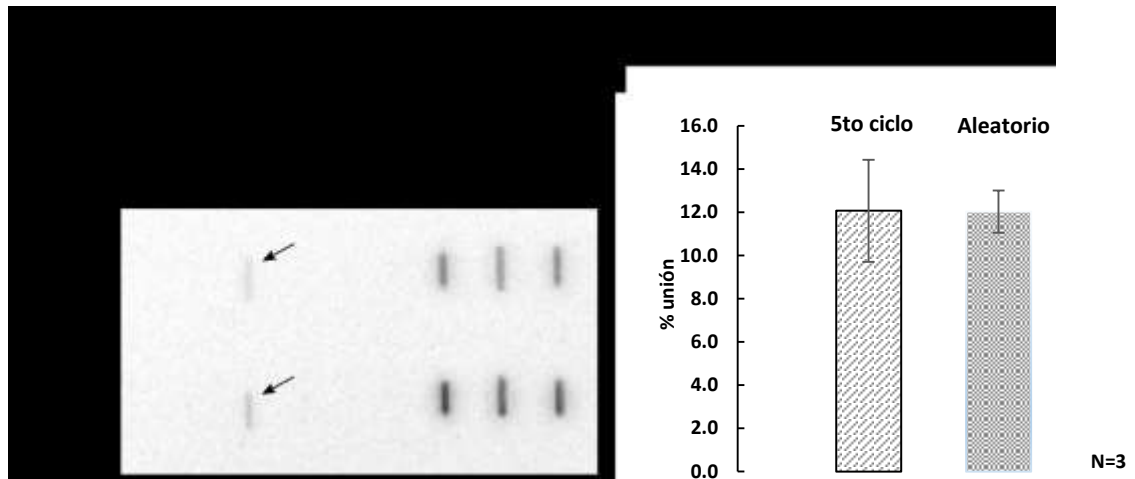
**Figura 18. Productos de RT-PCR de los cinco ciclos SELEX.**

Electroforesis en gel nativo para ácidos nucleicos con los productos de amplificación de los ciclos SELEX. Se observó el producto de RT-PCR a partir del RNA obtenido después de cada ciclo SELEX (flecha blanca). C-, Control negativo.

### 9.5. Ensayos de unión

La poza aleatorizada “30NLib” y el producto de RT-PCR obtenido del último ciclo de selección se utilizaron para generar dos nuevas pozas de RNA, las cuales se marcaron con  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{-UTP}$  mediante transcripción *in-vitro*. El RNA marcado se incubó con la proteína GST-L1 y la proteína GST para evaluar si las secuencias seleccionadas interactuaban específicamente con la proteína L1. Como se observa en la figura 19, la poza de RNA aleatorizado y la poza proveniente del quinto ciclo de selección se unieron en promedio un 12% a la proteína GST-L1, pero no a la proteína GST. Este resultado sugería

una interacción inespecífica entre las secuencias seleccionadas y la proteína L1.

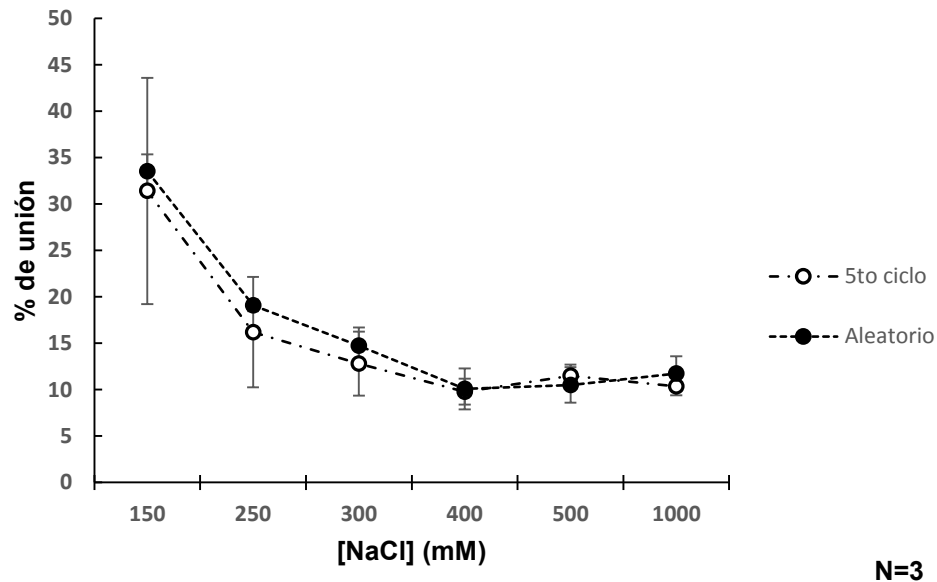


**Figura 19. Ensayos de interacción entre la proteína L1 y la poza de RNA del quinto ciclo de selección.**

A) Ensayo de interacción mediante Slot Blot de una poza de RNA aleatorizado y la poza de RNA proveniente del quinto ciclo de selección, con las proteínas GST y GST-L1. Ambas pozas interactuaron con la proteína GST-L1, pero no con la proteína GST. B) Cuantificación del RNA unido a la proteína GST-L1. En promedio, un 12% de la poza aleatorizada y la poza del quinto ciclo se unió a la proteína GST-L1, lo cual sugirió una unión inespecífica.

Con el fin de verificar que la interacción entre la proteína GST-L1 y la población del quinto ciclo era inespecífica, se realizaron ensayos de unión agregando cantidades crecientes de NaCl desde 150 mM hasta 1000mM. Como se observa en la figura 20, el aumento en la concentración de NaCl inhibió la unión de la población del 5to ciclo y el RNA aleatorizado de manera uniforme. Con este resultado se confirmó que la interacción entre el RNA seleccionado y la proteína GST-L1 era inespecífica. Además, debido a que la carga positiva del ion sodio puede neutralizar las cargas negativas de los grupos fosfatos

presentes en el RNA, es posible que la unión inespecífica del RNA con la proteína GST-L1 esté basada en interacciones electrostáticas



**Figura 20. Ensayos de interacción con concentraciones crecientes de NaCl.**

Ensayos de interacción realizados con cantidades crecientes de NaCl (150, 250, 300, 400, 500 y 1000 mM). La interacción entre la población del quinto ciclo o un RNA aleatorizado con la proteína L1 se redujo de manera uniforme al aumentar la cantidad de NaCl, demostrando una interacción inespecífica entre el RNA seleccionado y la proteína L1

## 10. Discusión

La expresión de la proteína L1 de VPH en bacterias ha resultado compleja, ya que presenta poca solubilidad, se generan péptidos incompletos y cuerpos de inclusión, además de ser altamente susceptible a degradación (44). Por ello, múltiples trabajos se han enfocado en mejorar la expresión de la proteína L1 mediante la modificación de su secuencia, el uso de diferentes cepas de *E. coli*, la co-transfromación con la secuencia que codifican para la chaperona GroEL o la fusión de diferentes *tags* a L1 (57) (45).

En este trabajo se utilizaron las cepas *E. coli* Codon Plus y Rosetta, ambas derivadas de la cepa BL21-DE3 (fhuA2 [lon] ompT gal ( $\lambda$  DE3) [dcm]  $\Delta$ hdsS), evidenciando una mayor producción de la proteína GST-L1 a partir de la cepa Rosetta (figura 7). No obstante, en el trabajo de Bang de 2016 (57) se comparan 8 cepas distintas de *E. coli*, cada una con características diferentes, concluyendo que la cepa óptima para producir GST-L1 es BL21-DE3; mientras que la cepa Rosetta presenta el menor rendimiento. Estas conclusiones contrastan fuertemente con resultados previos de nuestro grupo (58) y con el presente trabajo. Sin embargo, Bang no menciona el uso de cloranfenicol en su medio de cultivo, antibiótico totalmente necesario para mantener la presión selectiva hacia el plásmido pRARE, el cual le permite a la cepa Rosetta transcribir tRNAs que no son comunes en *E. coli* y sintetizar de manera óptima proteínas recombinantes con secuencias complejas. Cabe resaltar que la cantidad y calidad de la proteína GST-L1 son factores clave para sus aplicaciones, no sólo en la generación de VLPs, también para el método SELEX. Cantidades subóptimas de la proteína, productos incompletos, o la co-purificación de otras proteínas disminuye la probabilidad de obtener un aptámero contra la proteína L1.

Por otra parte, el uso de emulsiones en biología molecular ha sido ampliamente diversificado dada la facilidad que proveen para crear sistemas compartimentalizados, lo cual ha permitido el estudio y amplificación de moléculas individuales (59) (60) (61). Específicamente, la PCR en emulsión ha permitido la amplificación de pozas complejas y ha demostrado su eficacia para inhibir la generación de subproductos al amplificar pozas aleatorizadas. Dadas estas características, la PCR en emulsión ha sido propuesta como una metodología capaz de mejorar la eficiencia del método SELEX (55) (10) (53). A pesar de que la PCR en emulsión generó un sólo amplicón (figura 15), lo resultados obtenidos señalan que alguno de sus componentes inhibió a la T7 RNA polimerasa (figura 16). Es importante señalar que hasta la fecha no existe algún reporte que describa la inhibición de la T7 RNA polimerasa por alguno de los emulsificantes utilizados. En este sentido, la PCR en emulsión debería ser evitada si se requiere generar RNA mediante transcripción *in-vitro*. Sin embargo, conocer el emulsificante que inhibe la RNA polimerasa, o utilizar otros disolventes a los estudiados en este trabajo, podría eliminar al inhibidor (62); lo cual, permitiría optimizar la producción de RNA a partir del producto de la PCR en emulsión.

Las variables más importantes en la selección de aptámeros han sido parcialmente descritas, tomando en cuenta los resultados experimentales obtenidos durante los últimos 23 años, dentro de las cuales resaltan: la naturaleza del blanco, el número de ciclos de selección, la temperatura de incubación, así como el buffer y la concentración de los iones presentes durante cada paso (63). Como se muestra en las figuras 19 y 20, la interacción entre la población del quinto ciclo y la proteína L1 fue inespecífica, sugiriendo que la astringencia en los ciclos de selección no fue la adecuada para obtener algún aptámero. A partir de estos resultados, se hipotetiza que ciclos de selección realizados a una concentración de NaCl aproximada a los 250mM,



podrían eliminar las interacciones inespecíficas observadas entre la poza inicial de RNA y la proteína L1, favoreciendo la unión de oligonucleótidos específicos. Dicha hipótesis tendrá que ser comprobada realizando nuevos ciclos de selección utilizando este nuevo parámetro.

Cabe resaltar que el método SELEX se ha marcado como el gran cuello de botella para la obtención de aptámeros, siendo descrito como “una caja negra que se mantiene cerrada hasta el último ciclo de selección, la cual será abierta para probar cada secuencia única, con el riesgo inherente de encontrar sólo secuencias inespecíficas” (64). Teniendo en cuenta lo anterior, resulta necesario realizar un mayor número de ciclos de selección, evaluando después de cada ciclo la unión entre la proteína L1 y la poza enriquecida. Esto permitiría conocer si la selección se da de forma dirigida o si sólo se acarrean moléculas de RNA de forma estocástica. Aunado a esto, utilizar un blanco de mayor tamaño permite aumentar la superficie de contacto y por ende aumentar la probabilidad para obtener un aptámero (65). En particular, utilizar pentámeros en lugar del monómero de L1 resulta una opción atractiva ya que los capsómeros se unen de manera precisa y controlada; proceso que podría ser interrumpido, debido a un efecto estérico, por la presencia de un aptámero.

Además de este enfoque, el uso de tecnologías basadas en microfluidos y emulsiones han permitido mejorar la selección de aptámeros. Trabajos recientes han reportado que la compartimentalización de RNA en conjunto con su sustrato permite seleccionar ribozimas con gran actividad catalítica (60) (66). Es importante señalar que, la generación de sistemas cerrados no tan solo permite aproximar los componentes y aumentar la probabilidad de interacción; también, permite el análisis de cada micela de forma individual. Gracias a este análisis fino, es posible reconocer interacciones entre oligonucleótidos y su blanco, recuperando sólo aquellos que presenten la función deseada.

Aunado a esto, es posible que existan blancos que sean refractarios a los ácidos nucleicos debido a sus características fisicoquímicas. Esta idea se apoya en la revisión realizada por Hasegawa (67) en la que se remarca la naturaleza hidrofílica de los ácidos nucleicos, y su limitación en posibles interacciones hidrofóbicas entre aptámeros y sus blancos. En este sentido, la baja solubilidad de la proteína L1 en su forma monomérica podría ser otro factor clave para obtener un aptámero contra este blanco. Una aproximación para aumentar la naturaleza hidrofóbica de los ácidos nucleicos se basa en la incorporación de diversas modificaciones, como el uso de las bases Px y Ds o la adición de un grupo metilo al esqueleto de fosfatos; sin embargo, la incorporación de cualquier nucleótido modificado es limitado por los pasos enzimáticos necesarios para el método SELEX (67). En consecuencia, la obtención de aptámeros mediante un solo ciclo de selección, evitando así las reacciones de amplificación, sigue siendo un reto tecnológico; el cual podría resolverse mediante condiciones más astringentes de selección o mediante el uso de nuevos métodos de amplificación.

## **11. Conclusión**

No se logró obtener una población de aptámeros contra la proteína L1 monomérica de VPH-16. A pesar del resultado negativo, los experimentos realizados sugieren que el empleo de nuevas condiciones de interacción usando pentámeros de la proteína L1 y aumentando la concentración de NaCl, así como un uso racional de nuevas tecnologías, podrían mejorar el método SELEX para obtener aptámeros contra la proteína blanco.

## **12. Perspectivas**

- Mejorar la cantidad y calidad de la proteína GST-L1 mediante el uso de diferentes medios y nuevas condiciones de inducción.
- Evaluar otros emulsificantes para generar la PCR en emulsión.
- Obtener aptámeros específicos para la proteína L1 monomérica realizando un numero mayo de ciclos de selección.
- Evaluar condiciones más astringentes para el método SELEX utilizado concentraciones mayores de NaCl.
- Realizar el método SELEX para pentámeros de la proteína L1.

### 13. Referencias

1. *Therapeutic applications of DNA and RNA aptamers*. **Thiel, KW y Giangrande, PH**. 3, Sep de 2009, *Oligonucleotides*, Vol. 19, págs. 209-22.
2. *Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2*. **Colas, P, y otros**. 6574, Apr de 1996, *Nature*, Vol. 380, págs. 548-50.
3. *Optimization of SELEX: comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers*. **Mencin, N, y otros**. Mar de 2014, *J Pharm Biomed Anal*, Vol. 91, págs. 151-9.
4. *Visual cocaine detection with gold nanoparticles and rationally engineered aptamer structures*. **Zhang, J, y otros**. 8, Aug de 2008, *Small*, Vol. 4, págs. 1196-200.
5. *Comparison of Whole-Cell SELEX Methods for the Identification of Staphylococcus Aureus-Specific DNA Aptamers*. **Moon, J, y otros**. 4, Apr de 2015, *Sensors*, Vol. 15, págs. 8884-97.
6. *Limits for antibody affinity*. **Poulsen, TR, y otros**. 8, Oct de 2011, *J Immunol*, Vol. 187, págs. 4229-35.
7. *Aptamers as therapeutics*. **Keefe, AD, Pai, S y Ellington, A**. 7, Jul de 2010, *Nat Rev Drug Discov*, Vol. 9, págs. 537-50. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Aug;9(8):660.
8. *SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands*. **Stoltenburg, R, Reinemann, C y Strehlitz, B**. 4, 2007, *Biomol Eng*, Vol. 24, págs. 381-403.

9. *RNA aptamer evolution: two decades of SELECTION*. **Aquino-Jarquín, G y Toscano-Garibay, JD.** 12, 2011, Int J Mol Sci, Vol. 12, págs. 9155-71.
10. *Emulsion PCR: a high efficient way of PCR amplification of random DNA libraries in aptamer selection*. **Shao, K, y otros.** 9, 2011, PLoS One, Vol. 6, pág. e24910.
11. *Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology*. **Darmostuk, M, y otros.** 6, 1 de Nov de 2015, Biotechnol Adv., Vol. 33, págs. 1141-61.
12. *Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation*. **Shidar, S, y otros.** 10, 13 de Oct de 2013, Sensors, Vol. 13, págs. 13624-37.
13. *Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet*. **Kimoto, M, y otros.** 5, May de 2013, Nat Biotechnol, Vol. 31, págs. 453-7.
14. *Aptamers: molecular tools for analytical applications*. **Mairal, T, y otros.** 4, Feb de 2008, Anal Bioanal Chem, Vol. 390, págs. 989-1007.
15. *Post-SELEX chemical optimization of a trypanosome-specific RNA aptamer*. **Adler, A, y otros.** 1, Jan de 2008, Comb Chem High Throughput Screen, Vol. 11, págs. 16-23.
16. **Centers for Disease Control and Prevention.** Human Papillomavirus. [En línea] Apr de 2015. [Citado el: 08 de Jun de 2015.] <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/downloads/hpv.pdf>.
17. *Biology and natural history of human papillomavirus infection*. **Fernandes, J, Araújo, J y Fernandes, T.** 2013, Open Access Journal of Clinical Trials, Vol. 5, págs. 1-12.

18. **O'Connor, M, S.Y., Chan y H.-U., Bernard.** Transcription Factor Binding Sites in the long control region of genital HPVs. [En línea] 1995. [Citado el: 10 de Jun de 2015.] <http://pave.niaid.nih.gov/lanl-archives/compendium/95PDF/3/oconnor.pdf>.
19. *Papillomavirus E6 proteins.* **Howie, HL, Katzenellenbogen, RA y Galloway, DA.** 2, 20 de Feb de 2009, *Virology*, Vol. 384, págs. 324-34.
20. *The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein.* **McLughlin-Drubin, ME y Münger, K.** 2, 2009, *Virology*, Vol. 384, págs. 335-344.
21. *Human Papillomavirus and Cervical Cancer.* **Burd, EM.** 1, 2003, *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 16, págs. 1-17.
22. *Association of the human papillomavirus type 11 E1 protein with histone H1.* **Swindle, CS y Engler, JA.** 3, Mar de 1998, *J Virol*, Vol. 72, págs. 1994-2001.
23. *Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies.* **Graham, SV.** Oct de 2010, *Future Microbiol*, págs. 1493–1506.
24. *Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer.* **Banks, L, Pim, D y Thomas, M.** 12, Dec de 2012, *Nat Rev Cancer*, Vol. 12, págs. 877-86.
25. *HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress.* **Williams, VM, y otros.** 1, 2011, *Future Virol*, Vol. 6, págs. 45-57.
26. *Crystal structures of four types of human papillomavirus L1 capsid proteins: understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies.*

- Bishop, B, y otros.** 43, 26 de Oct de 2007, J Biol Chem, Vol. 282, págs. 31803-11.
27. *The papillomavirus major capsid L1.* **Buck, CB, Day, PM y Trus, BL.** 1-2, 22 de Jan de 2013, Virology, Vol. 445.
28. *In vitro monitoring of the formation of pentamers from the monomer of GST fused HPV 16 L1.* **Zheng, DD, y otros.** 76, 4 de Oct de 2013, Chem Commun, Vol. 49, págs. 8546-8.
29. *Atomic model of the papillomavirus capsid.* **Modis , Y, Trus, BL y Harrison, SC.** 18, 16 de Sep de 2002, EMBO J, Vol. 21, págs. 4754-62.
30. *Structure-based engineering of papillomavirus major capsid I1: controlling particle assembly.* **Bishop, B, Dasgupta , J y Chen, XS.** 3, Jan de 2007, Virol J, Vol. 4.
31. *Maturation of the human papillomavirus 16 capsid.* **Cardone, G, y otros.** 4, 5 de Aug de 2014, MBio, Vol. 5, págs. e01104-14.
32. *Mechanisms regulating expression of the HPV 31 L1 and L2 capsid.* **Hindmarsh, PL y Laiminis, LA.** 19, 6 de Feb de 2007, Virol J, Vol. 4.
33. *Cyclophilins Facilitate Dissociation of the Human Papillomavirus Type 16 Capsid Protein L1 from the L2/DNA Complex following Virus Entry.* **Bienkowska-Haba, M, y otros.** 18, 3 de Jul de 2012, J Virol, Vol. 86, págs. 9875-87.
34. *Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16.* **Chen , XS, y otros.** 3, Mar de 2000, Mol Cell, Vol. 5, págs. 557-67.
35. *Amino acid sequence diversity of the major human papillomavirus capsid protein: implications for current and next generation vaccines.* **Ahmed, AI,**

- Bisset, SL y Beddows, S.** Aug de 2013, *Infect Genet Evol*, Vol. 18, págs. 151-9.
36. *HPV L1 capsid protein expression in squamous intraepithelial lesions of cervix uteri and its relevance to disease outcome.* **Sarmadi, S, y otros.** 3, Mar de 2012, *Arch Gynecol Obstet*, Vol. 285, págs. 779-84.
37. *Cervical cancer screening: which HPV test should be used—L1 or E6/E7?* **Tjalma, WA y Depuydt, CE.** 1, Sep de 2013, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, Vol. 170, págs. 45-6.
38. *Too fast or not too fast: the FDA's approval of Merck's HPV vaccine Gardasil.* **Tomljenovic, L y Shaw, CA.** 3, 2012, *J Law Med Ethics*, Vol. 40, págs. 673-81.
39. *Human papillomavirus L1 protein expressed in Escherichia coli self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic.* **Chen, Y, y otros.** 220, 20 de Apr de 2016, *Virus Res*, págs. 97-103.
40. *Salmonella enterica serovar Typhi Ty21a expressing human papillomavirus type 16 L1 as a potential live vaccine against cervical cancer and typhoid fever.* **Frailery, D, y otros.** 10, Oct de 2007, *Clin Vaccine Immunol*, Vol. 14, págs. 1285-94.
41. *Cloning and Expression of L1 Protein Human Papillomavirus Type 31 Isolated from Iranian Patients in Escherichia coli.* **Hajmohammadi, S y Rassi, H.** 31 de May de 2016, *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.*
42. *Analysis of modified human papillomavirus type 16 L1 capsomeres: the ability to assemble into larger particles correlates with higher immunogenicity.* **Schädlich, L, y otros.** 15, Aug de 2009, *J Virol*, Vol. 83, págs. 7690-705.



43. *Refining HPV 16 L1 purification from E. coli: reducing endotoxin contaminations and their impact on purification from E. coli.* **Schädlich, L, y otros.** 10, 4 de Mar de 2009, *Vaccine*, Vol. 27, págs. 1511-22.
44. *Papillomavirus capsid protein expression in Escherichia coli: purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1.* **Chen, XS, y otros.** 1, 16 de Mar de 2001, *J Mol Biol*, Vol. 307, págs. 173-82.
45. *Enhanced expression of soluble human papillomavirus L1 through coexpression of molecular chaperonin in Escherichia coli.* **Pan, D, y otros.** 120, Apr de 2016, *Protein Expr Purif*, págs. 92-8.
46. *An RNA aptamer provides a novel approach for the induction of apoptosis by targeting the HPV16 E7 oncoprotein.* **Nicol, C, y otros.** 5, 30 de may de 2013, *PLoS One*, Vol. 8.
47. *An RNA Aptamer Targets the PDZ-Binding Motif of the HPV16 E6 Oncoprotein.* **Belyaeva, TA, y otros.** 3, 24 de Jul de 2014, *Cancers (Basel)*, Vol. 6, págs. 1553-69.
48. *Isolation and characterization of an RNA aptamer for the HPV-16 E7 oncoprotein.* **Toscano-Garibay, JD, Benítez-Hess, ML y Alvarez-Salas, LM.** 2, Feb de 2011, *Arch Med Res*, Vol. 42.
49. *Characterization of an RNA aptamer against HPV-16 L1 virus-like particles.* **Leija-Montoya, AG, y otros.** 5, *Nucleic Acid Ther*, Vol. 24, págs. 344-55.
50. *Efficient inhibition of human papillomavirus 16 L1 pentamer formation by a carboxylatopillarene and a p-sulfonatocalixarene.* **Zheng, DD, y otros.** 24, 25 de Mar de 2014, *Chem Commun*, Vol. 50, págs. 3201-3.

51. *Peptidic inhibitors for in vitro pentamer formation of human papillomavirus capsid protein I1*. **Fu, DY, y otros**. 4, 25 de Feb de 2015, ACS Med Chem Lett, Vol. 6.
52. **EMBL**. Protein Expression - E.coli - Optimisation of Expression Level. [En línea] [Citado el: 26 de Jul de 2017.]  
[https://www.embl.de/pepcore/pepcore\\_services/protein\\_expression/ecoli/optimisation\\_expression\\_levels/](https://www.embl.de/pepcore/pepcore_services/protein_expression/ecoli/optimisation_expression_levels/).
53. **Valencia-Reséndiz, D**. Aislamiento de una población de aptámeros de ARN específicos para el dominio amino terminal de la proteína E2 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH 16). *Tesis de maestría*. 2013.
54. *By-Product Formation in Repetitive PCR Amplification of DNA Libraries during SELEX*. **Tolle, F, y otros**. 12, 2014, PLoS ONE, Vol. 9.
55. *Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR*. **Williams, R, y otros**. 7, Jul de 2006, Nat Methods, Vol. 3, págs. 545-50.
56. *RAPID-SELEX for RNA Aptamers*. **Szeto, K, y otros**. 12, 20 de dec de 2013, PLoS ONE, Vol. 8.
57. *High-Level Production of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 L1 in Escherichia coli*. **Bang, HB, y otros**. 2, 28 de Feb de 2016, J Microbiol Biotechnol., Vol. 26, págs. 356-63.
58. **Palomino-Vizcaino, G**. Generación de una biblioteca de aptazimas para la proteína L1 del virus de papiloma humano tipo 16 (VPH-16). *Tesis de Maestría*. 2013.
59. *The encapsulation of ribozymes in biodegradable polymeric matrices*. **Jackson, JK, y otros**. 1-2, 28 de Aug de 2002, Int J Pharm, Vol. 243, págs. 43-55.

60. *Using droplet-based microfluidics to improve the catalytic properties of RNA under multiple-turnover conditions.* **Rychelynck, M, y otros.** 3, 21 de Mar de 2015, RNA, Vol. 21, págs. 458-69.
61. *Digital PCR hits its stride.* **Baker, M.** 6, Jun de 2012, Nat Meth, Vol. 9, págs. 541-44.
62. **Hawkings, G.** Liquid-Liquid Extraction: Basic Principles. [En línea] [Citado el: 19 de Jul de 2016.] [http://www.academia.edu/3641270/Liquid-Liquid\\_Extraction\\_Basic\\_Principles](http://www.academia.edu/3641270/Liquid-Liquid_Extraction_Basic_Principles).
63. *Analysis of In Vitro Aptamer Selection Parameters.* **McKeague, M, y otros.** 5-6, Dec de 2015, J Mol Evol, Vol. 81, págs. 151-61.
64. *Probing the SELEX process with next-generation sequencing.* **Schütze, T, y otros.** 12, 2011, PLoS One, Vol. 6, pág. e29604.
65. *Let's get specific: the relationship between specificity and affinity.* **Eaton, BE; Gold, L; Zichi, DA;** 10, Oct de 1995, Chem Biol, Vol. 2, págs. 633-8.
66. *Emulsion PCR Significantly Improves Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures-Based Aptamer Selection: Allowing for Efficient and Rapid Selection of Aptamer to Unmodified ABH2 Protein.* **Yufa, R, y otros.** 2, 2015, Anal Chem, Vol. 87, págs. 1411-19.
67. *Methods for Improving Aptamer Binding Affinity.* **Hasegawa, H, y otros.** 4, 28 de Mar de 2016, Molecules, Vol. 21.

## 14. Anexo

### I. Buffers

TBE 1X                      pH=8.3

Componente	Concentración
Tris	17.8 mM
Ácido Bórico	17.8 mM
EDTA	0.4 mM

PBS 1X                      pH=7.4

Componente	Concentración
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8mM

Tris Glicina 1X

Componente	Concentración
Tris	25 mM
Glicina	192 mM

Transferencia

Componente	Concentración
Tris	25mM
Glicina	192 mM
Metanol	25%

Tris Glicina SDS

Componente	Concentración
Tris	25mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1% mM

Stacking 4X                      pH=6.8

Componente	Concentración
Tris	0.5 M
SDS	0.4%

## Resolving 4X pH=8.8

Componente	Concentración
Tris	0.5 M
SDS	0.4% mM

## Elución de ácidos nucleicos

Componente	Concentración
NH <sub>4</sub> OOCH <sub>3</sub>	0.5M
EDTA	1mM
SDS	0.1% mM

## Stacking 4X Nativo pH=6.8

Componente	Concentración
Tris	2.5 M

## Resolving 4X Nativo pH=8.8

Componente	Concentración
Tris	1.5 M

## Lisis Bacteriana

Componente	Concentración
NaCl	100 mM
Tris	20 mM
EDTA	1mM
IGEPAL	0.5%
AEBSF	0.5 mM
Aforar a 200 mL y agregar una pastilla del inhibidor COMPLET. Almacenar a 4°C.	

## Laemmli 2x pH 6.8

Componente	Concentración
SDS	4%
Glicerol	20%
β-mercaptoetanol	10%
Azul de Bromofenol	0.004%
Tris	125 mM

## Glutación pH=9

Componente	Concentración
Tris	50 mM
Glutación reducido	10 mM

## II. Soluciones

### Solución de Bloqueo

Componente	Concentración
PBS	1X
Tween-20	0.01%
Leche descremada	10 %

### Solución de lavado

Componente	Concentración
PBS	1X
Tween-20	0.01%

### Solución de Revelado

Componente	Concentración
Tris-HCl	0.1M
Luminol	4.4 mM
Umbeliferona	4.3 mM
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.2 µL/mL

## III. Biblioteca y Primers

Biblioteca "30NLib"

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGC(N<sub>30</sub>)CCCTTTAGTGAAGCTT  
TTGTT

Primer For7

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGC

Primer Rev 6

AACAAAAGCTTCAACTAAAGG

**IV. Medios de cultivo**

Componente	LB Líquido	LB Sólido	
Triptona	1 g	1 g	Aforar a 100 mL
Extracto de levadura	1 g	1 g	
NaCl	0.5 g	0.5 g	
Agar	----	0.5 g	

Componente	SOB	SOC	
Triptona	1 g	1 g	Aforar a 100 mL
Extracto de levadura	0.5 g	0.5 g	
NaCl	0.05 g	0.05 g	
Mg <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g	0.5 g	
Glucosa	----	2 mM	

**V. Geles**

## Nativo ácidos nucleicos

Componente	Concentración
Acrilamida-Bisacrilamida (19:1)	8%
TBE	1X

## Desnaturalizante ácidos nucleicos

Componente	Concentración
Acrilamida-Bisacrilamida (19:1)	8%
Urea	7 M
TBE	1X

## Nativo para proteínas

Fracción	Componente	Concentración
Stacking	Acrilamida-Bisacrilamida (29:1)	8%
	Buffer Stacking Nativo	1 X
Resolving	Acrilamida-Bisacrilamida (19:1)	4%
	Buffer Resolving Nativo	1 X

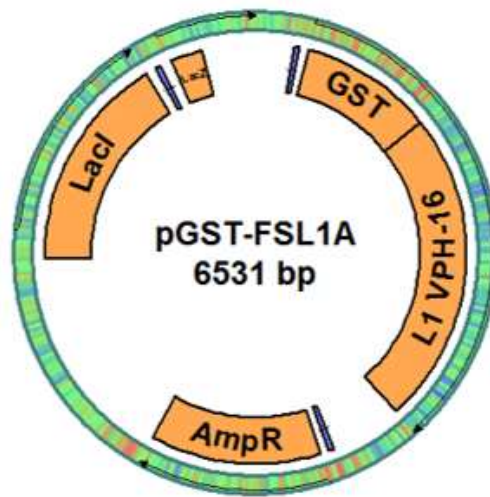
## Desnaturalizante proteínas

Fracción	Componente	Concentración
Stacking	Acrilamida-Bisacrilamida (29:1)	8 %
	Buffer Stacking	1 X
Resolving	Acrilamida-Bisacrilamida (19:1)	4%
	Buffer Resolving	1 X



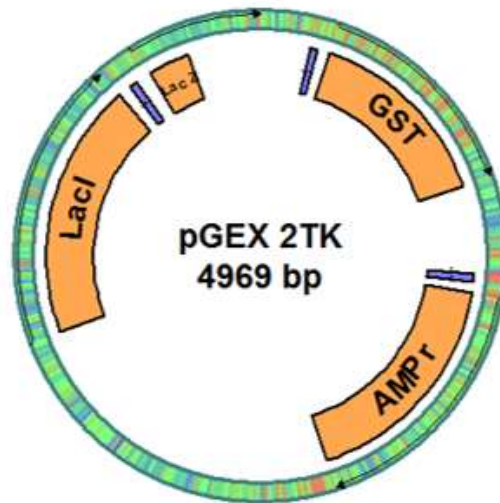
## VI. Construcciones

pGST-FSL1a



Construcción generada por la Dra. María Luisa Benitez Hess

pGST-2TK



Diseñado y patentado por Millipore Corp.

## VII. Anticuerpos

Tipo	Nombre comercial	Concentración
Primario	GST Antibody (B-14): sc-138	200 ng/mL
Primario	HPV16 L1 Antibody (289-16981): sc-57834	200 ng/mL
Secundario	Donkey anti-mouse IgG- HRP: sc-2314	66 ng/mL