



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

Título de la tesis

**Construcción de una cepa bacteriana (*E. coli*) que exporte o
exponga la proteína S de SARS-CoV-2, para usarse como
vacuna oral**

Tesis que presenta

Anuar Jaziel García Ríos

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

con la especialidad de

Biología

Director de la tesis:

Dr. Rodolfo Marsch Moreno

Ciudad de México

Julio, 2023

DEDICATORIA

A quien me enseñó a nunca rendirme, quien con su fortaleza y su voluntad de lucha me llenaba de motivación para lograr mis objetivos, quien siempre cuidó de mí y aconsejó en todo momento, pero sé que ahora serás una estrella que me guiara desde el cielo. A mi padre, te amare una eternidad.

A mi madre que fue mi motivación para continuar preparándome, quien me ha acompañado con sus ánimos, consejos y apoyo incondicional, sin duda alguna nunca podré devolverle todo lo que ha hecho por mí, pero si podré demostrarle que puedo superarme y llegar tan lejos como me lo proponga. Su amor de madre es mi calma y mi fortaleza, te amo.

A mi compañera de vida Larissa Pastrana, quien fue mi apoyo y mi motivación, quien todos los días me ha enseñado a ser una mejor persona, de quien he aprendido mucho, quien no dudo ni un segundo de mí, quien me daba esos ánimos en mis peores momentos y durante esos momentos siempre se ha mantuvo a mi lado, que ni un solo momento ha dejado de mostrarme su amor y sobre todo a quien amo intensamente. A su familia que la quiero como si fuera mía; a sus padres Gustavo Pastrana y Carmen Sánchez, su hermano Gustavo, su esposa Aline y mi Maya, pues también han creído en mí y no han dudado ni un segundo en apoyarme.

A mi hermano Eduardo García, mis sobrinos Lalito y Romina; a mi hermano Raúl García y Luz. Mi familia que la quiero tanto, agradezco su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Rodolfo Marsch Moreno

Por darme la oportunidad de poder estar dentro del equipo de trabajo, por su confianza y apoyo; por su paciencia y dedicación para compartir su conocimiento y ser un guía para poder llevar a cabo el proyecto.

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara y Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Por su gran apoyo, por compartir su conocimiento y darme un amplio panorama de las técnicas de laboratorio y estar siempre pendiente de mí.

Conacyt

Por el apoyo económico brindado para poder desempeñar y desarrollar el proyecto de investigación en mi posgrado de maestría.

Cinvestav

Por su apoyo, equipos y personal que sin duda alguna sin ellos no sería posible llevar a cabo el proyecto.

Compañeros de laboratorio

Quiero agradecerle al equipo de laboratorio y compañeros: Delia, Ulises, Alexis, Jorge, Gustavo, Maestro José Luis Vargas, Anahí, Oscar. Por acompañarme en todo momento, por ser mis amigos y brindar ese apoyo que sin duda alguna hace que uno pueda continuar a pesar de los altibajos.

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1 Covid-19	1
1.1.1 Transmisión	1
1.1.2 Estructura y características del SARS-CoV-2	2
1.1.3 Mecanismo de infección	4
1.2 Proteína S	5
1.3 RBD	7
1.4 Recombinación específica de sitio	10
1.5 Placas de Peyer	12
1.6 Vacunas	15
2. JUSTIFICACIÓN	19
3. OBJETIVOS	20
Objetivo principal.....	20
Objetivos específicos.....	20
4. MATERIALES Y METODOS	21
4.1 MATERIALES	21
4.1.1 REACTIVOS	21
4.1.2 Material Biológico	21
4.1.2.1 Cepas	21
4.1.2.2. ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN	22
4.1.2.3. OLIGONUCLEÓTIDOS	23
4.1.2.4. PLÁSMIDOS	24
4.1.2.4.1. Plásmido pSUP2021	24
4.1.2.4.2. Plásmido pMJAS01	25
4.1.2.4.3. Plásmido pUC57a-PT7-RBD	26
4.1.2.4.4. Plásmido pUC57k-RBD-attP	27
4.2. MÉTODOS	28
4.2.1 Preparación de células competentes	28

4.2.2 Amplificaciones.....	28
4.2.3 Electroforesis.....	29
4.2.4 Purificación de plásmidos.....	30
4.2.5 Purificación de productos de PCR.....	31
4.2.6 Elementos Genéticos.....	31
4.2.6.1 Diseño de la construcción RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-attP.....	31
4.2.6.2 P _{neo} y gen <i>int</i>	32
4.2.6.3 pBTB3.....	34
4.2.6.4 Construcción de T7-PT7-RBD-RBD-attP.....	36
4.2.6.4.1 Restricción parcial de pUC57A-PT7-RBD y pUC57K-RBD-attP.....	39
5. RESULTADOS Y DISCUSION	44
5.1 1 ^{er} elemento genético P _{neo} -gen <i>int</i>	44
5.2 2 ^{do} elemento genético pBTB3	46
5.3 3 ^{er} elemento genético RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-attP	49
5.3.1 RNAPolT7.....	49
5.3.2 PT7-RBD-RBD'-attP.....	52
6. CONCLUSIONES	56
7. PERSPECTIVAS.....	57
8. REFERENCIAS	58
9. ANEXO.....	61
9.1 Preparación de células competentes por CaCl ₂ a 0.1 M y glicerol al 15%	61
9.2 Transformación de células quimiocompetentes con cloruro de calcio.....	61
9.3 Medio LB (Luria-Bertani).....	62
9.4 Medio Terrific Broth (TB).....	62
9.5 Preparación de plásmidos por la técnica modificada de Birnboim y Doly (BD).	63
9.5.1 Preparación de soluciones BD	63
9.5.2 1. Procedimiento para preparación a pequeña escala (miniprep).	64
9.6 Electrotransformación <i>E. coli</i> BL21.....	65
9.6.1 Preparación de células electrocompetentes.....	65

9.6.2 Transformación de células electrocompetentes.....	66
9.7 Técnica para rellenar extremos de DNA	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Genoma del SARS CoV-2.....	2
Figura 2. Estructura del SARS-CoV-2.....	4
Figura 3. Estructura de la proteína S.....	6
Figura 4. Proteína S.....	7
Figura 5. Estructura de la interacción RBD-ACE 2	9
Figura 6. Comparación entre el SARS-CoV y el SARS-CoV-2.....	9
Figura 7 Unión de los sitios attB con el sitio attP por la integrasa Int	11
Figura 8. Recombinación específica de sitio.....	12
Figura 9. Estructura del GALT	13
Figura 10. Plásmido pSUP2021	25
Figura 11. Plásmido pMPJAS01.....	26
Figura 12. Plásmido pUC57a-PT7-RBD.....	27
Figura 13. Plásmido pUC57k-RBD-attP	28
Figura 14. Programación estándar para la Taq DNA Polymerase.....	29
Figura 15. Programación estándar para la Taq DNA Polymerase (PCR Super Mix)	29
Figura 16. GeneRuler 1 kb Plus	Figura 17. DNA Leader 1kb .30
Figura 18. Sustituciones nucleotídicas que cambian la actividad e infectividad del virus SARS-CoV-2	31
Figura 19. Diseño final de la construcción RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-attP	32
Figura 20. Historial de procedimiento para la obtención del P_{neo} y el gen int	33
Figura 21. Historial de procedimiento para la unión del P_{neo} y el gen int	34
Figura 22. Plásmido pMPJAS01 con los sitios HindIII.....	35
Figura 23. Plásmido pBTB3.....	36
Figura 24. Amplicón de la DNA Polimerasa de T7	37
Figura 25. 1.2 pJET 1.2/Blunt	38
Figura 26. T7 en insertada 1.2 pJET Blunt (clonada).....	39
Figura 27. Plásmido pUC57A-PT7-RBD con los sitios BsaI y la enzima EcoRI y XbaI	40
Figura 28. Secuencia de los sitios de reconocimiento y corte de EcoRI y BsaI en pUC57A-PT7-RBD	40

Figura 29. Plásmido pUC57K-RBD-attP con los sitios BsaI y BamHI	41
Figura 30. Secuencia de los sitios de reconocimiento y corte de BamHI y BsaI en pUC57K-RBD-attP	41
Figura 31. Secuencia de los sitios de reconocimiento y corte de las enzimas XbaI y BsaI del plásmido pUC57A-PT7-RBD.	43
Figura 32. Unión de los fragmentos PT7-RBD-RBD'-attP	43
Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de amplificación del P_{neo} de Tn5-pSUP2021	44
Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de amplificación del gen int del fago lambda.	45
Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de amplificación del P_{neo}-gen int	46
Figura 36. Restricción con la enzima HindIII.....	47
Figura 37. Mapa del plásmido pMPJAS01 marcado con sitios donde la enzima hace la restricción para liberar los plásmidos pK18 y pBTB3.....	48
Figura 38. Comprobación de la obtención de pBTB3.....	49
Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de amplificación de RNAPolT7.	50
Figura 40. Mapa del pJET 1.2/Blunt. La parte sombreada corresponde a la RNAPolT7	51
Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la clonación de RNAPolT7 y amplificación de RNAPolT7.	52
Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las restricciones parciales.	53
Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las extracciones.....	54
Figura 44. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las restricciones.....	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las proteínas estructurales.....	3
Tabla 2 Vacunas contra Covid-19.....	18
Tabla 3 Reactivos.....	21
Tabla 4 Cepas Bacterianas	22
Tabla 5 Endonucleasas de restricción.....	23
Tabla 6 Oligonucleotidos que se usaron para la construcción de la cepa BL21-RNApolT7-PT7-RBD-RBD'-attP.....	24
Tabla 7 Concentración de soluciones para la restricción parcial.	42
Tabla 8 Fórmula para preparar medio LB	62
Tabla 9 Fórmula para preparar medio TB	62
Tabla 10 Fórmula para preparar la solución I	63
Tabla 11 Fórmula para preparar la solución II	63
Tabla 12 Fórmula para preparar la solución III.....	64
Tabla 13 Fórmula de solución para rellenar extremos de DNA	66

RESUMEN

El SARS-CoV-2 posee la proteína Spike (S), encargada de unir al virus con la célula hospedera mediante el acople a los receptores ACE 2, para ingresar a la célula y comenzar la replicación, dando como resultado la enfermedad COVID-19. En este estudio se busca obtener una cepa de *E. coli* que contenga un gen que codifique el dominio RBD de la proteína S para ser exportada al colon con fines vacunales. Con este propósito, se llevó a cabo el diseño de una construcción que contiene un RBD con las mutaciones encontradas en variantes del virus y un RBD silvestre, además de varios genes añadidos. Para obtener la cepa vacunal mediante la electrotransformación de *E. coli* BL21 con tres elementos: el elemento que lleva los RBDs que tiene un sitio de integración (*attP*) de Lambda, un amplicón con el gen *int* del bacteriófago Lambda que expresará transitoriamente la recombinasa Int bajo el promotor del gen de la neomicín fosfotransferasa (P_{neo}) (del transposón Tn5) y como marcador de selección el plásmido pBTB3-Cm (Cm^R). De esta manera la cepa vacunal expresará el péptido conformado por los dos RBDs en el colon y estimulará en las placas de Peyer para el desarrollo de una inmunidad en mucosas.

ABSTRACT

SARS-CoV-2 has the Spike (S) binding protein, it is responsible for binding the virus with the host cell by coupling to ACE 2 receptors, to get into the cell and to begin the virus replication, resulting in COVID-19 disease. This research seeks to obtain an *E. coli* strain, containing a gene that encodes the RBD domain of protein S to be exported to the colon for vaccination purposes. For this target, a construction was designed with a RBD which contains mutations found in variants of the virus and a wild-type RBD, including several added genes. Additionally, the vaccine strain could be obtained by electrotransformation of *E. coli* BL21 with three elements: the element that contains the RBDs has a Lambda integration site (*attP*), an amplicon with the Lambda bacteriophage *int* gene that will transiently express Int recombinase under the promoter of the neomycin phosphotransferase gene (P_{neo}) (from transposon Tn5) and as selection marker the plasmid pBTB3-Cm (Cm^R). In this way, the vaccine strain will express the peptide made up of the two RBDs in the colon and will stimulate the development of mucosal immunity through stimulation of Peyer's patches.

1. Introducción

A finales de diciembre del año 2019 en Wuhan, China comienzan a detectarse casos en pacientes con sintomatología irregular, por lo general, iban desde un resfriado común hasta casos con manifestaciones más fuertes que daban como resultado a lo que se conoció como en un principio como neumonía atípica. Posteriormente, con base a estudios realizados en los primeros pacientes se logra detectar el causante de estos brotes. Se observó que era causado por un nuevo virus que tenía rasgos comunes de la familia de los coronavirus a los que pertenece el SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus) y el MERS-CoV (Middle East respiratory síndrome). Con esta nueva característica se dedujo que el virus pudo haberse transmitido mediante el contacto con animales (zoonosis), por lo que se encontró que el transmisor fue el murciélago.

Consecutivamente a inicios del año 2020 por su rápida diseminación a los países aledaños y a los demás continentes es decretada como pandemia por la OMS y nombrada COVID-19 y el virus causante el SARS-CoV-2. Trayendo consigo un suceso histórico por la cantidad de contagios y desafortunadamente los decesos causados, así como, cambios a nivel económico y sociocultural nunca vistos.

1.1 Covid-19

Como se mencionó, la enfermedad es causada por el virus SARS-CoV-2, cuando se es infectado los padecimientos son muy variados, pues dependiendo el organismo, en algunos casos se manifiesta con sintomatología leve como un resfriado común, pero desafortunadamente como en la gran mayoría de casos en un cuadro clínico grave, también se detectó que había una relación muy estrecha con la agresividad de la enfermedad en pacientes que presentan enfermedades crónicas degenerativas, hipertensión, enfermedades respiratorias, etc., (Reina, 2020).

1.1.1 Transmisión

Con la llegada del virus era indispensable conocer la forma de propagación y cómo las personas se contagiaban del virus, por lo que a principios de la pandemia se informaba que los transmisores eran personas sintomáticas, es decir, aquellas que tenían fiebre, tos, cansancio y pérdida del gusto o del olfato, por decir algunos síntomas más frecuentes. Pero tiempo después, se observó que los casos aumentaban a pesar de que las personas con

síntomas permanecieran en cuarentena y se dedujo que había la posibilidad de una transmisión por personas asintomáticas (que no presentan síntomas frecuentes) haciendo difícil la contención del virus. Por lo que la principal acción que la mayoría de los países optó fue el aislamiento hacia toda la población para disminuir los casos de contagios (Santos & Salas, 2020).

1.1.2 Estructura y características del SARS-CoV-2

El SARS-CoV-2 pertenece a la subfamilia de Orthocoronavirinae y al subgénero *Sarbecovirus* (beta-coronavirus, beta-2b) e íntimamente relacionado al clado o linaje 2.

El genoma del virus conformado por un RNA de una sola cadena, con un número cercano a los 30,000 nucleótidos, seis ORFs (open reading frames, fases de lectura abierta) (Figura 1; Fernández, 2020) y varios genes adicionales. (Reina, 2020).

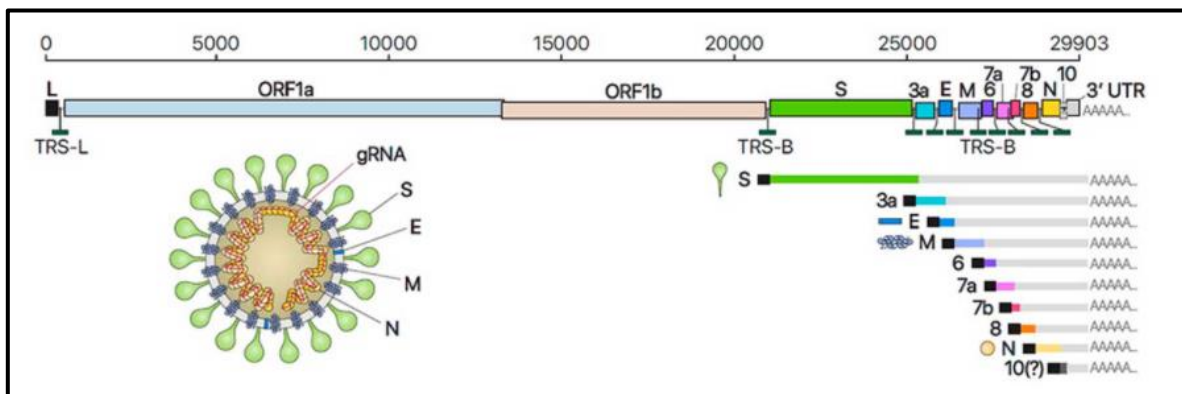


Figura 1. Genoma del SARS CoV-2.

Tabla 1. Características de las proteínas estructurales

Estructura	Función	Tamaño (kDa)	Descripción
Spike (S)	Indispensable para la identificación de los receptores, también permite que el virus se internalice en el citoplasma de la célula huésped.	150	Ubicada en la membrana. Cuenta con el dominio S1 fundamental para el reconocimiento-uniión con el receptor, contiene dos subdominios: N-terminal (NTD) y C-terminal (CTD). El dominio S2 permite la fusión con la célula huésped gracias a la maquinaria que contiene
Membrana (M)	Indispensable en el ensamblaje y en la relación que existe con su morfología y su tamaño.	25 a 30	En la envoltura viral es la proteína más abundante y cuenta con tres dominios transmembrana.
Envoltura (E)	Permite el ensamblaje y la liberación del virus.	8 a 12	En la envoltura viral es la proteína menos abundante, además, es una proteína transmembrana.
Proteína N (N)	Participa en la transcripción, replicación y empaquetamiento del genoma viral, y entorpece el ciclo replicativo de la célula huésped.	50	Es la única presente en la nucleocápside y la proteína más abundante en todo el virus y Contiene dos dominios, NTD y CTD (Santos & Salas, 2020).

Así mismo, cuenta con cuatro proteínas estructurales (Figura 2; Thomas, 2020) lo que le confiere características propias (Tabla 1) como la intervención en el mecanismo de infección con la proteína S. La proteína N está en el interior del virión asociado con el RNA viral y las proteínas E y M están relacionadas con la envoltura viral y (Saltigeral & León-Lara, 2020).

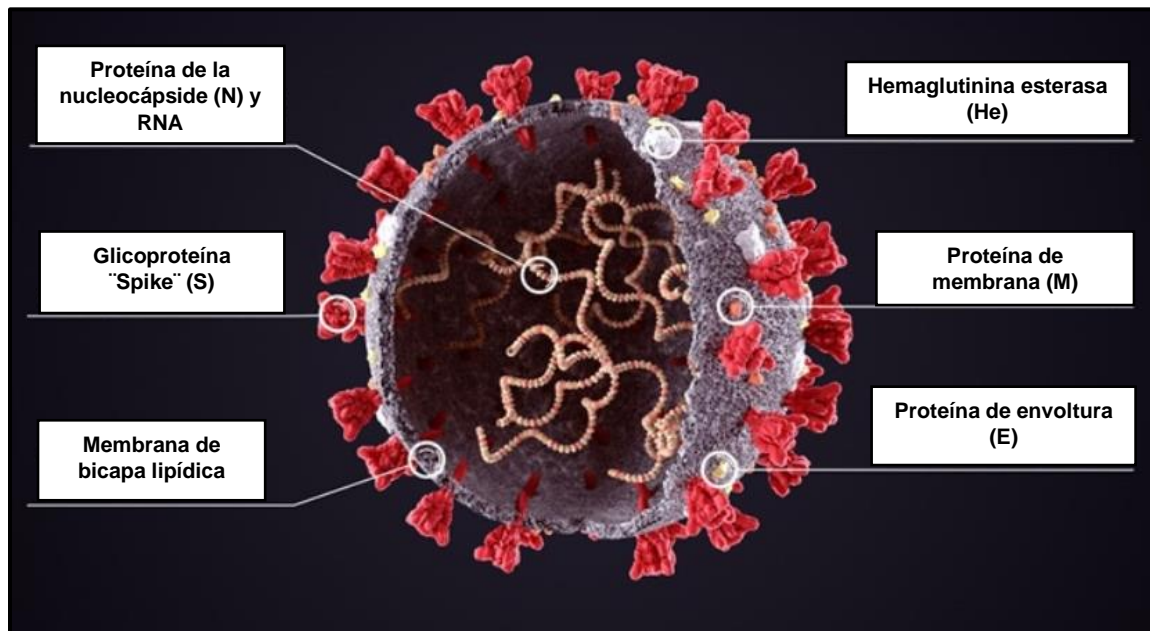


Figura 2. Estructura del SARS-CoV-2.

1.1.3 Mecanismo de infección

El mecanismo de infección tiene mucha semejanza con la mayoría de los virus, cuyo objetivo es entrar al organismo mediante vías de infección como superficies, mucosas, aerosoles, en contacto directo, etc.

En este sentido el SARS-CoV-2 busca como entrar al organismo, la acción es mediante la unión y reconocimiento de la proteína S (Spike) del virus y el receptor ACE 2 (enzima convertidora de angiotensina 2) de las células huésped. (Hoffmann *et al.* 2020).

El ACE 2 es una aminopeptidasa con acción reguladora negativa del sistema renina-angiotensina (RAS), funciona en el mantenimiento de la homeostasis del sistema (Pastrian, 2020). También, participa en la regulación de procesos como la presión sanguínea o la inflamación y por lo general su objetivo es regular la actividad de la angiotensina 2 para frenar los efectos dañinos que pueda ocasionar (Tolosa, 2020).

En cuanto a la proteína S, cuenta con tres unidades similares entre sí, organizadas en forma de cilíndrica que se unen al receptor ACE 2 y regulan la fusión de la cubierta membranosa del virus con la membrana de la célula que será infectada.

Esta unión y reconocimiento son mediadas por la proteasa celular TMPRSS2, ya que crea un corte en dos diferentes posiciones del dominio S2, dando como resultado, una separación del dominio RBD y posteriormente la fusión de ambas membranas (Pastrian, 2020).

Posteriormente, una vez el SARS-Cov-2 entra a la célula huésped se traducirá directamente a poliproteínas, ya que cuenta con un RNA de sentido positivo. Las poliproteínas serán utilizadas para la replicación y transcripción.

De modo que se producen RNAs que se traducen en proteínas estructurales y también, se generan RNAs genómicos que serán integrados en los nuevos viriones que se generan.

Finalmente, los viriones generados son liberados al exterior de la célula y comenzarán con el proceso de infección en otras células huésped generando como consecuencia la enfermedad COVID-19 (Tolosa, 2020).

1.2 Proteína S

La proteína S (Spike, por su sigla en inglés) es una proteína integral de membrana homotrimérica que atraviesa la membrana del virus (Figura 3; Service UCLA, 2022). Y para que la proteína S pueda ejercer su función debe ser hidrolizada por las proteasas pulmonares.

Está organizada en tres dominios: un dominio externo, un dominio de anclaje transmembranal y un dominio tipo cola interno.

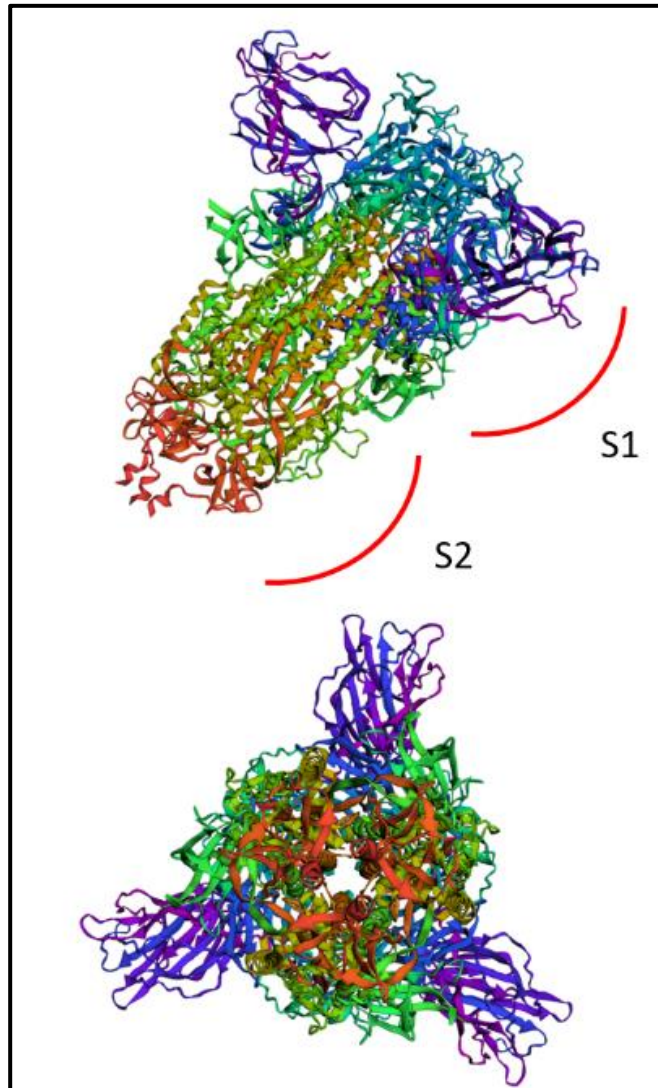


Figura 3. Estructura de la proteína S.

En el dominio externo es donde se encuentran dos subdominios. El S1 N-terminal (~700 aminoácidos) responsable de la unión con el receptor de la célula huésped y contiene dos dominios estructuralmente independientes, el dominio N-terminal (NTD) y el dominio C-terminal (dominio C) que usa para unirse a sus receptores. La subunidad S2 C-terminal (~600 aminoácidos) contiene un péptido de fusión hidrofóbico y dos regiones repetidas de heptada, responsable de la fusión del virus con las membranas celulares (Figura 4; Díaz *et al.*, 2021).

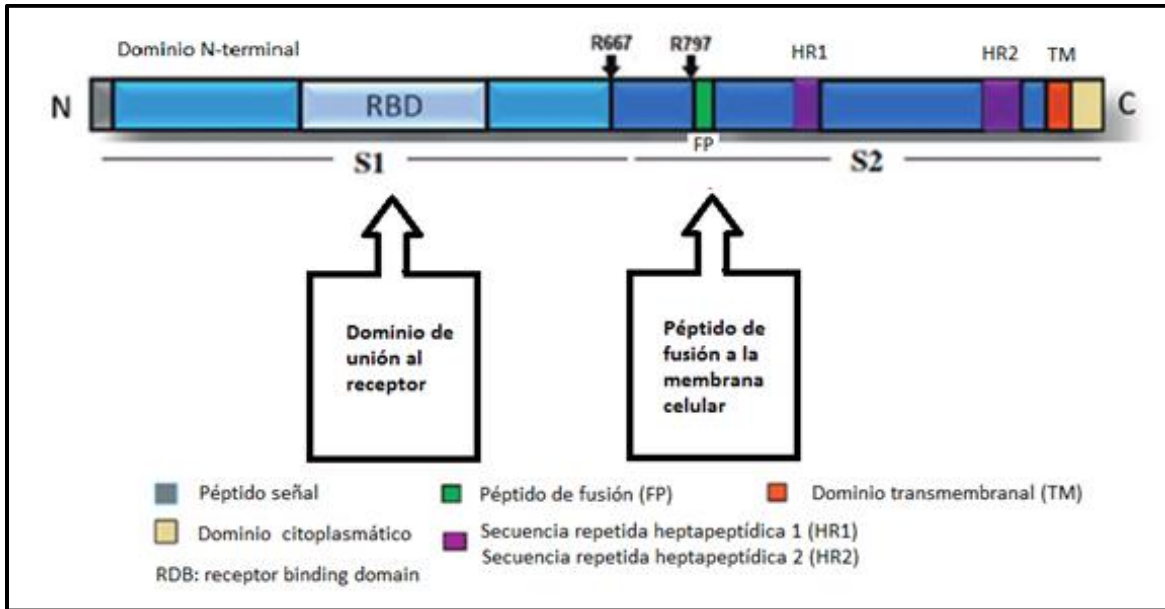


Figura 4. Proteína S.

El S1 cuenta con dos dominios independientes:

- S1-NTD (Dominio N-terminal)
- RBD (Dominio de unión al receptor)

Éste último, tiene una de las funciones más importante e indispensables para la unión y reconocimiento.

1.3 RBD

El dominio RBD (por las siglas en inglés de *Receptor Binding Domain*) adquirió gran importancia por cómo es que la célula huésped es infectada.

Éste se encuentra dentro de la subunidad S1, dentro de la secuencia de la proteína S se ubica entre los aminoácidos 333 y 527. También, este dominio tiene mayor afinidad por la célula huésped, ya que se une fuertemente a los receptores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE 2). Es decir, dirige al virus hacia la célula huésped para comenzar con el mecanismo de infección.

De acuerdo con los análisis estructurales (Lan *et al.*, 2020), se encontró que en el RBD existe un sitio (motif) denominado RBM (Receptor binding motif, por sus siglas en inglés), este

receptor es el que interactúa directamente con el ACE 2. El mismo análisis indica que el RBD (Figura 5; Lan *et al.*, 2020) está formado por una hoja β antiparalela retorcida de cinco hebras ($\beta 1 \rightarrow \beta 4$ y $\beta 7$) con hélices de conexión cortas y bucles que estarán formando el núcleo. Cabe mencionar, que entre las cadenas $\beta 4$ y $\beta 7$ en su núcleo hay una inserción prolongada que contiene las cadenas cortas $\beta 5$ y $\beta 6$, además de las hélices $\alpha 4$ y $\alpha 5$. Esta inserción prolongada corresponde al RBM (438-506 aa).

Otros autores (Dominguez & Amador, 2020) indican que con el análisis estructural de la proteína S se pudo reconocer que existen seis aminoácidos en el dominio RBD (Figura 6; Dominguez & Amador, 2020) que cambiaron con respecto a la versión pasada del virus (SARS-CoV) y son los encargados de existir de la unión con los receptores: estos aminoácidos son L455, F486, Q493, S494, N501 y Y505. Y con ello se puede comprobar que efectivamente esos cambios están en la región RBM, afirmando que este RBM es el encargado de la interacción virus-célula.

Además de que, en este dominio, es donde se encuentra el mayor número de mutaciones, con lo que trajo consigo las nuevas variantes del virus que fueron surgiendo con el paso de los meses.

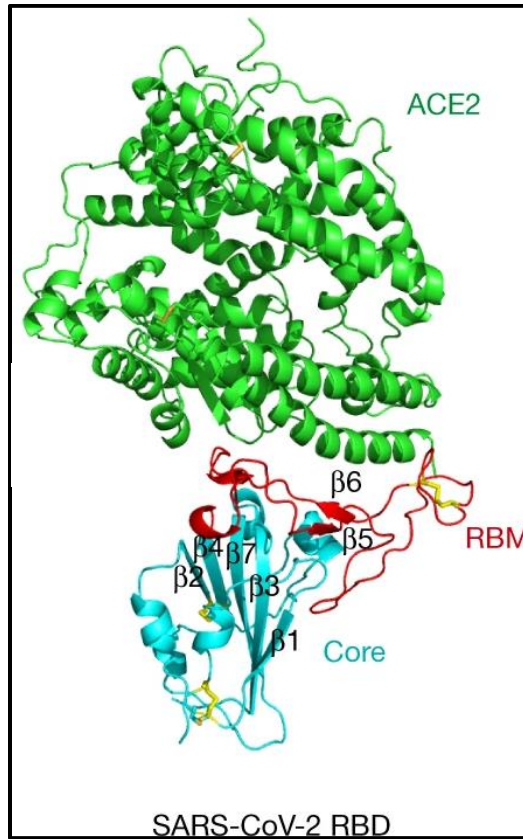


Figura 5. Estructura de la interacción RBD-ACE 2. De color verde el ACE 2, de color rojo RBM y azul el RBD.

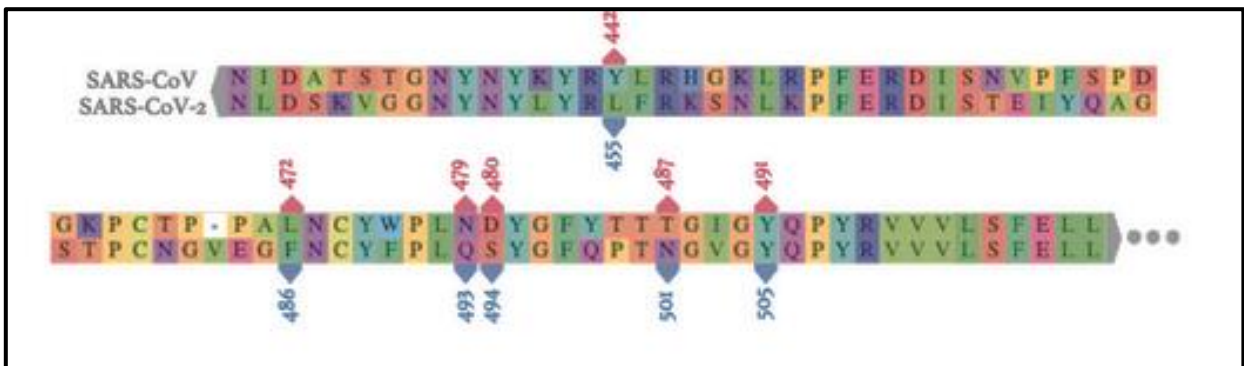


Figura 6. Comparación entre el SARS-CoV y el SARS-CoV-2.

1.4 Recombinación específica de sitio

La recombinación es un proceso mediante el cual regiones limitadas y específicas de genoma son recombinadas por unas enzimas llamadas recombinasas que van a reconocer secuencias cortas (20-200 pb) en los dos sitios a recombinar. Cuando la recombinasa interacciona en ambos sitios en donde ocurre la recombinación en las moléculas de DNA se producirá la inserción de DNA (Lewin *et al.* 1993).

Pero en un caso particular de integración es con los llamados fagos temperados (fago λ de *E. coli*) en el cromosoma receptor del hospedador (Figura 8).

Esta recombinación se lleva a cabo por los sitios de enganche *att* (de attachment). Para el sitio de enganche de la bacteria *E. coli* se le conoce como *attB*, una secuencia corta de 20 nucleótidos también llamado elementos BOB'. Y para el sitio de enganche del fago se le conoce como *attP*, una secuencia de 230 pb o conocida como elementos POP'. Para la recombinación es necesario un alineamiento del fago λ con el cromosoma de *E. coli* de manera específica. Cabe aclarar que el DNA del fago es circular y durante el proceso de recombinación quedará en el cromosoma de la bacteria como una secuencia lineal (Lewin, 1993).

Para que se dé esta orientación específica es necesario la intervención de una recombinasa llamada integrasa (Int) que junto con una proteína conocida como factor de integración del hospedador (IHF) que se encuentra en la bacteria, servirán para la integración.

La integrasa unirá el sitio *attB* con el sitio *attP*. La integrasa Int tiene como objetivo generar un alineamiento preciso del DNA (Figura 7), lo que sobrepone las secuencias específicas de nucleótidos para que posteriormente se puedan dar las reacciones de empalme.

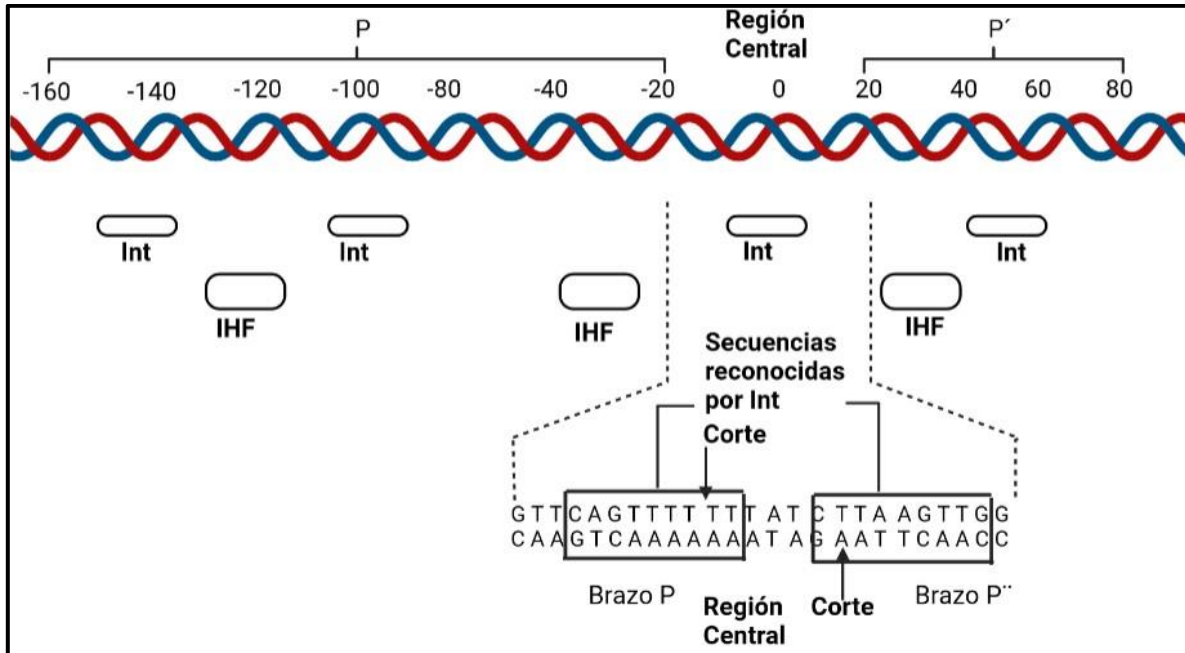


Figura 7. Unión de los sitios *attB* con el sitio *attP* por la integrasa Int. (Pierce, 2009).

Una función adicional de Int, es servir como topoisomerasas, por lo que desenrolla la región *attP* y forma una nucleoproteína Int-*attP*. En el sitio *attB* se forma su correspondiente nucleoproteína haciendo que exista la unión entre ambos sitios.

Por otra parte, Int generará un corte de manera escalonada y separada por siete bases dentro de la secuencia de 15 bases que está en ambos sitios y cataliza el intercambio de hebras a nivel del corte para formar un intermediario de Holliday (modelo que propone que debe de haber rotura monocatenaria en cada uno de los DNA, pero considerando que estos cortes se deben producir en cadenas de igual polaridad. Posteriormente los extremos rotos invaden la doble cadena contraria recíprocamente) (Devlin, 2000).

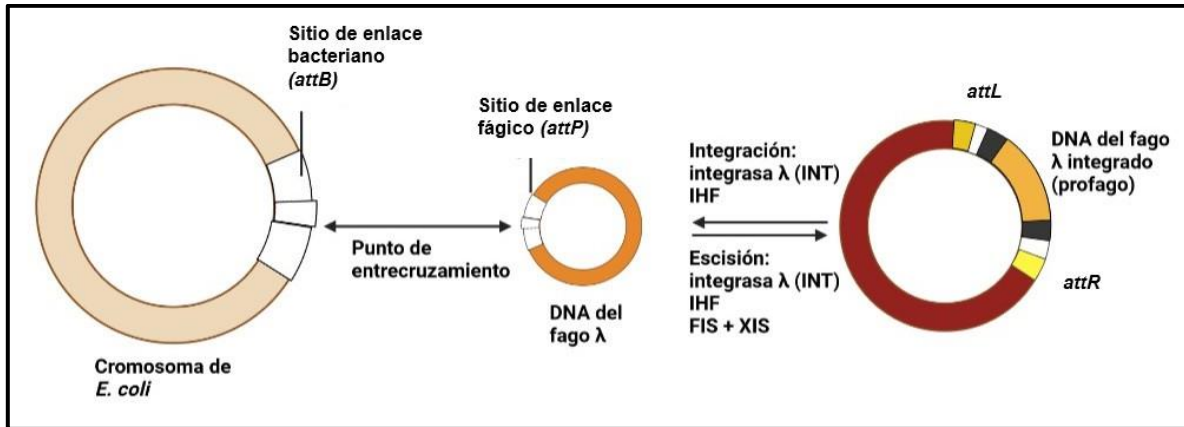


Figura 8. Recombinación específica de sitio. (Devlin, 2000).

1.5 Placas de Peyer

La protección del sistema inmune está conformada por una extensa red de mecanismos de defensa ante los agentes externos en los cuales estamos inmersos día con día, ante ello el ser humano evolucionó de tal forma para crear reacciones físicas o químicas y frenar la entrada de microorganismos, virus y toxinas que pudieran generar un daño a corto o largo plazo al organismo. En esta reacción de defensa ante los antígenos es estimulada por diversas células presentadoras de antígenos, encargadas de activar la respuesta inmune.

El objetivo para que el sistema inmune funcione eficazmente es por la discriminación a escala molecular entre lo que pertenece al organismo y lo que viene del exterior y que podría ser un agente infeccioso.

Esta selección minuciosa es hecha por el colon que es la mayor superficie expuesta a patógenos muchas veces procedente de la dieta y de las bacterias (Flores *et al.*, 2020). Por lo que existe una barrera de defensa conformada de tejido linfoide asociado al intestino o por sus siglas en inglés Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT).

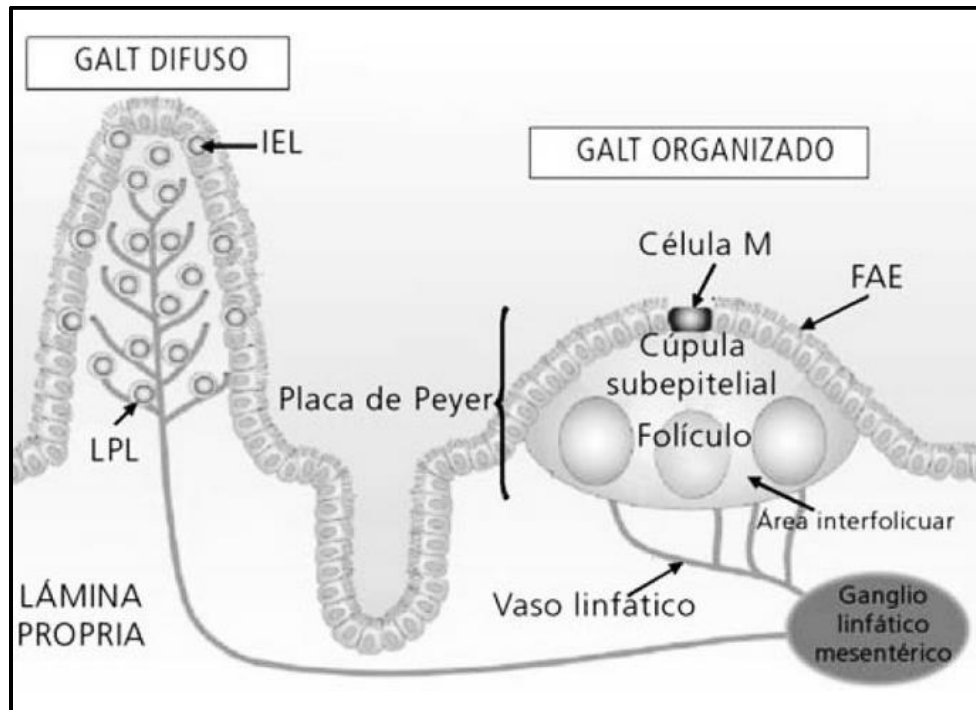


Figura 9. Estructura del GALT (Ramiro *et al.*, 2008).

De este modo, estructuralmente el GALT (Figura 8) se divide en dos regiones:

- Región 1: llamada GALT *organizado*, este induce la respuesta inmune intestinal, conformado por:
 - Folículos linfoides aislados
 - **Placas de Peyer** o folículos linfoides asociados
 - Ganglios linfáticos mesentéricos
- Región 2: llamada GALT *difuso*, éste efectúa la respuesta inmune. Está conformado por regiones de linfocitos dispersas en la *lamina propria* intestinal LPL (*lamina propria lymphocytes*) o en el entramado epitelial IEL (*intraepithelial lymphocytes*).

Básicamente las placas de Peyer son un grupo de células linfoides grandes (macroscópicas) ubicados en la cara opuesta a la zona mesentérica de la mucosa intestinal. Se parecen a los ganglios linfáticos, pero no están tan organizados como éstos. Las placas de Peyer son separadas del lumen intestinal por una monocapa de células EAF (epitelio asociado al folículo) que está integrad por células M, epiteliales columnares, IEL y algunas células caliciformes encargadas de la secreción de mucosa. Las células M son enterocitos cuya

función principal es la recolección de antígenos lumbinales. Y en la zona inferior del EAF se ubica una región difusa denominada domo subepitelial. Dentro de las placas de Peyer se encuentran folículos integrados por linfocitos B IgM+ de memoria, precursores de células plasmáticas productoras de anticuerpos IgM y en los centros germinales de estos folículos se generan linfocitos B IgA+ de memoria precursores de células plasmáticas productoras de anticuerpos IgA (Ramiro *et al.*, 2008).

Inmunización a través de las placas de Peyer

Cuando los antígenos lumbinales ingresan en la mucosa intestinal y llegan al GALT por la vía más conocida a través de las células M, éstas recogen y transportan los antígenos lumbinales con dirección a las células presentadoras de antígenos (CPA) situadas en el domo de las placas de Peyer. Las CPA ingresan los antígenos y los procesan hasta péptidos antigénicos que se presentan en la membrana plasmática asociados a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) para ser identificados por el receptor de células T (RCT). Las CPA activadas interactúan con los linfocitos T en las regiones interfoliculares de la placa de Peyer, o en otros casos, migran hacia los ganglios linfáticos mesentéricos mediante vasos linfáticos. Cuando se activan, los linfocitos Th (mayoritariamente del tipo colaborador o helper) se diferencian en dos subpoblaciones efectoras denominadas Th1 y Th2, con diferentes funciones según en el perfil de citocinas que secretan. Además, ciertas citocinas como IL-4, IL-5 y TGF- β inducen la síntesis de IgA en linfocitos B de los folículos de las placas de Peyer. Estos últimos son precursores de células plasmáticas que migraran hacia los ganglios linfáticos mesentéricos donde ocurre la expansión clonal y la maduración.

Existe una variedad de factores que influye en esta migración, como las señales hormonales, inervación, los fenómenos de irrigación tisular e inflamación. Factores específicos como las señales estromales, producción de quimiocinas por parte del endotelio, antígenos, citocinas y la expresión de moléculas de adhesión de linfocitos.

Los linfocitos que llegan a la lámina del intestino se dispersan por los diferentes compartimentos. Las células plasmáticas se mantienen en la lámina donde alcanzan la maduración para dar paso a células secretoras de IgA. Los linfocitos Th también mantienen posición en la lámina y se reparten equitativamente por los compartimentos y vellosidades,

a la vez que los linfocitos Tc migran al epitelio, transformándose en IEL. Ambos tipos linfocitarios activados se mantienen latentes como células memoria y, una vez interactúan con el antígeno, comienzan a efectuar las funciones efectoras para las que fueron programados (Ramiro *et al.*, 2008).

1.6 Vacunas

Antes de dar una definición acerca de las vacunas es necesario comprender como trabaja el sistema inmune. El sistema abarca una compleja red de tejidos, órganos y células, que de manera coordinada cumplen con la función de combatir infecciones y otras enfermedades, es decir, cuando un agente patógeno (bacterias o virus) ingresan al organismo y comienzan a "atacarlo", es el sistema inmunitario el responsable de combatir dicha amenaza. Y todo comienza con la primera barrera que es la piel. La piel forma una barrera impenetrable protegida por mantos queratinizados que la única manera que pueda ingresar algún patógeno es mediante algún daño físico como corte, quemaduras o daño quirúrgico.

Como segunda barrera son las mucosas y llevan este nombre porque secretan constantemente un moco conformado por enzimas, proteoglicanos y glucoproteínas que ejercen una función de protección para las células epiteliales, y así, ayudan a combatir la infección. Todas estas mucosas tapizan los tractos gastrointestinales, urogenital y respiratorio.

Si bien, la manera en la que los patógenos pueden ingresar al organismo con cortes, mordeduras y heridas en la piel, y con la acción de frotar, tocar, tallar el ojo y hurgar en la nariz o introducir el dedo o algún objeto sucio, respirar aire contaminado o consumir alimentos en mal estado y por supuesto estar en contacto con alguna persona que pasa por alguna infección, son vías por las que un organismo patógeno puede estar en contacto con el organismo, entonces estas barreras protectoras intervienen, pero cuando estas dos barreras se ven superadas en número y los patógenos ingresan en los tejidos blandos se activa la siguiente barrera que son las defensas fijas del sistema inmunitario innato, llamado así porque son mecanismos que están totalmente determinados por los genes que uno hereda de los padres (Parham & Giovanniello, 2006).

La respuesta consiste en dos mecanismos en el que, como primer paso, es el reconocimiento de que hay un agente extraño dentro. La acción consiste en la participación de receptores de

la superficie celular y proteínas solubles que ligan al patógeno junto con sus productos, o también, a las células humanas y las proteínas séricas modificadas por las presencias del patógeno.

Posteriormente como segundo mecanismo es la respuesta en la que se activan los mecanismos para atacar y eliminar al patógeno. Este mecanismo está representado por células efectoras que destruyen células infectadas por virus, fagocitan bacterias o incluso atacan protozoarios, también tiene la capacidad junto con un conglomerado de proteínas séricas llamado complemento, que ayuda a las células efectoras a marcar a los patógenos con señales moleculares.

Si bien la respuesta innata crea una gran defensa ante la cantidad de patógenos e infecciones que el ser humano enfrenta día con día, también ocurre el caso en el que las infecciones superan la respuesta innata, debido a una carga de estrés, desequilibrio nutricional, carga viral por contacto, etc. Y es entonces, cuando la respuesta innata trabaja al doble para tratar de minorizar este desequilibrio por lo que manda señales a los linfocitos (leucocitos) para que dirijan los esfuerzos de la respuesta inmunológica. Este proceso se conoce como respuesta adaptativa ya que se genera una respuesta ante una infección y se adapta a las características del patógeno que está ocasionando la infección.

Cabe mencionar que los linfocitos que intervienen en la respuesta adaptativa son los encargados de generar una memoria inmunológica contra el patógeno infeccioso, es decir, en futuras infecciones causadas por el mismo tipo de patógeno que hizo la primera infección. Para la nueva infección, los linfocitos producirán una respuesta adaptativa más rápida, especializada y con mayor resistencia para eliminar la infección y con un mínimo de sintomatología

En ocasiones cuando se tiene un patógeno "complejo" y que logra mantenerse en el organismo sin que las dos respuestas puedan intervenir para estabilizar al organismo y crear defensas, se encontró una manera de ayudar al sistema inmunológico con las vacunas.

Las vacunas tienen un objetivo que es de "enseñarle al organismo como defenderse ante futuras amenazas", básicamente ésa es la definición más coloquial de las vacunas, pero su significado va más allá de esta simple definición. Las vacunas son una compleja invención

que proporciona una defensa, básicamente es un preparado obtenido de un antígeno que se usa para la vacunación y proporciona inmunidad protectora contra la infección ocasionada por un patógeno (Parham & Giovaniello, 2006).

Con la especialización de vacunas y la creación de ramas de la ciencia médica como la vacunología, que es una rama multidisciplinaria que tiene como objetivo el estudio de las vacunas de manera especializada desde sus componentes antigénicos hasta de qué manera repercuten en la población (González & Picazo, 2015).

Y con ello fueron creados nuevos tipos de vacunas de acuerdo con sus componentes con las que fueron hechas como:

- Las vacunas de virus atenuados.
- Las vacunas de subunidades, recombinantes, polisacáridas y combinadas.
- Vacunas toxoides.
- Las vacunas de mRNA.
- Las vacunas de vectores virales.

En este sentido, con las nuevas tecnologías y avances para crear una vacuna contra el virus SARS-Cov-2, fueron lanzadas a distribución diversas vacunas (Tabla 2) para frenar el avance del virus y crear una mayor protección para la población a nivel mundial.

Tabla 2 Vacunas contra Covid-19

Nombre de vacuna	Tipo de vacuna	País de origen	Vía de administración	Dosis	Intervalo de dosis	Eficacia en fase 3 (%)	Eficacia con contra enfermedad (%)	Efectos adversos	Conservación	Aprobada en México
Pfizer-BioNTech (BNT162b2)	ARN mensajero	EUA-Alemania	Intramuscular	2	21	95	97	Dolor, hinchazón y enrojecimiento en la zona inyectada; escalofríos, cansancio y dolor de cabeza.	Ultracongelación (-80 grados). En congelación normal su vida útil es de 5 días	Sí
Moderna (ARNm-1273)	ARN mensajero	EUA	Intramuscular	2	28	94.1	100	Dolor, hinchazón y enrojecimiento en la zona inyectada; escalofríos, cansancio y dolor de cabeza	Ultracongelación de -20 grados. En congelación normal su vida útil es hasta 30 días	No
AstraZeneca - Oxford (AZD1222)	Adenovirus o vector adenoviral	Reino Unido	Intramuscular	2	28	70.4	100	Dolor, hinchazón y enrojecimiento en la zona inyectada; escalofríos, cansancio y dolor de cabeza	2-8 grados con vida útil de hasta por 6 meses	Sí
Centro Gamaleya (Sputnik V)	Adenovirus o vector adenoviral	Rusia	Intramuscular	2	21	91.6	100	Dolor, hinchazón y enrojecimiento en la zona inyectada; escalofríos, cansancio y dolor de cabeza	2-8 grados	Sí
CanSinoBIO (Ad5nCoV Covidc19)	Adenovirus o vector adenoviral	China	Intramuscular	1	-	65.28 %	90.07 %	Dolor, hinchazón y enrojecimiento en la zona inyectada; escalofríos, cansancio y dolor de cabeza	2-8 grados	Sí
Janssen - Johnson & Johnson (Ad26.COV2-S)	Adenovirus o vector adenoviral	EUA	Intramuscular	1	-	66.9	85.4	Dolor, hinchazón y enrojecimiento en la zona inyectada; escalofríos, cansancio y dolor de cabeza	2-8 grados	Sí
Sinovac (CoronoVac)	Virus atenuados	China	Intramuscular	2	14	65.9	87.5%	Dolor, hinchazón y enrojecimiento en la zona inyectada; escalofríos, cansancio y dolor de cabeza	2-8 grados	Sí
Laboratorio Bharat Biotech (Covaxin)	Virus atenuados	India	Intramuscular	2	28	78	100	Dolor en la zona inyectada; cansancio y dolor de cabeza; en menor grado, fiebre y náuseas.	2-8 grados	Sí
Novavax (NVX-CoV2373)	Subunidades de proteína	EUA	Intramuscular	2	21	89.3	100	Dolor, hinchazón y enrojecimiento en la zona inyectada; escalofríos, cansancio y dolor de cabeza	2-8 grados	Sí
Avimex (Patria)	Adenovirus o vector adenoviral	México	Intramuscular	-	-	-	-	-	-	Patria ha superado ensayos preclínicos, y clínicos de fase 1 y 2 con éxito.

Fuente: Redacción Nacional CONECTA, 2021.

2. JUSTIFICACIÓN

El brote de la pandemia de COVID-19 ocasionada por el virus SARS-Cov-2 tomó a la humanidad por sorpresa, teniendo un alto impacto al sector de salud pública y en sus picos altos viéndose limitadas las vías de acción para confrontar al virus. La manera viable para combatir al virus fue el trabajo en conjunto de la comunidad científica para la creación de vacunas que fuesen efectivas para inmunizar y frenar la tasa de contagios y decesos. Esto trajo consigo diversos tipos de vacunas con vías de acción diferentes como la de RNA y virus atenuados, entre otras.

Por esto, se propone la utilización de una cepa bacteriana de *E.coli* (BL21) que contendrá un gen codificante del dominio RBD de la proteína Spike (S), que será liberada por vías de secreción de la bacteria en el colon; y al integrarse el gen con el promotor de T7 en el cromosoma de *E. coli* haremos que la proteína se produzca en el epitelio del colon y al exponerse de manera directa se pondrá en contacto las placas de Peyer, en donde las células dendríticas la recibirán y procesarán para presentarla a los linfocitos B y T, que iniciarán el proceso de producción de anticuerpos y linfocitos T para lograr la inmunización. Es por ello, que este proyecto permite obtener una proteína recombinante y ser una opción más accesible hacia la creación de una posible vacuna con lo que podría ser un apoyo al control de contagios por el virus.

3. OBJETIVOS

Objetivo principal

- Crear una cepa de *E. coli* que tenga un gen que codifique una proteína con dos dominios RBD (RBD con las mutaciones encontradas en variantes del virus y RBD silvestre) de unión de la proteína S de SARS CoV-2 que pueda ser exportada al colon con fines vacunales.

Objetivos específicos

- Diseñar la construcción de RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-*attP*.
- Construir la RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-*attP*.
- Construir la cepa de *E.coli* con RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-*attP* integrado en el cromosoma.
- Demostrar que se tiene la cepa que sintetiza RBD-RBD' y que lo exporta.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 REACTIVOS

Tabla 3 Reactivos

Reactivos	Descripción
Medios de cultivo	Para la preparación de medios de cultivo se utilizaron aquellos de la marca Sigma, B. D., y J. T. Baker
Para todo lo relacionado a Biología Molecular y agua destilada grado inyectable	Se utilizaron productos de la marca Invitrogen, New England Biolabs y para el agua destilada grado inyectable la marca Pisa
Antibióticos	Los antibióticos que se utilizaron provenían de marcas farmacéuticas con concentraciones de Kanamicina (50 µg/ml, Km ₅₀ , Kantrex), Cloranfenicol (50 µg/ml, Cm ₅₀ , Chloromycetin) y Ampicilina (50 µg/ml, Amp ₁₀₀)

4.1.2 Material Biológico

4.1.2.1 Cepas

Para la producción de células químicamente competentes y para la transformación con la RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-attP, fueron empleadas diferentes tipos de cepas bacterianas de *E. coli* (Tabla 4), cada una de estas cepas fueron usadas de formada distinta de acuerdo con el uso que se les iba a dar.

Tabla 4 Cepas Bacterianas

Nombre de la bacteria	Cepa Bacteriana	Genotipo
<i>E. coli</i>	DH5 α	F ⁻ ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ : <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>E. coli</i>	TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG</i> <i>recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1</i> λ :
<i>E. coli</i>	HB101	F ⁻ <i>mcrB mrr hsdS20</i> (rB ⁻ mB ⁻) <i>recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20(SmR) glnV44</i> λ :
<i>E. coli</i>	BL21	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) [<i>malB</i> ⁺]K-12(λ S)
<i>E. coli</i>	BL21 (D3) pLysS	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻) λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB</i> ⁺]K-12(λ S) pLysS[T7p20 <i>orip15A</i>](Cm ^R)

4.1.2.2. ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas de restricción (enzimas de restricción) de las marcas Invitrogen, New England Biolabs y ThermoFisher fueron utilizadas siguiendo los protocolos de los fabricantes. En la Tabla 5 se muestran las endonucleasas de restricción que se utilizaron para la construcción de la cepa BL21::*RNApolT7-PT7-RBD-RBD'*-*attP*.

Tabla 5 Endonucleasas de restricción

Enzima	Sitio de reconocimiento	Tipo de corte
HindIII	5' AAGCTT 3' TTCGAA	CORTE COHESIVO 5'---A↓AGCTT---3' 3'---TTCGA↑A---5'
BglII	5' AGATCT 3' TCTAGA	CORTE COHESIVO 5'---A↓GATCT---3' 3'---TCTAG↑A---5'
EcoRI	5' GAATTC 3' CTTAAG	CORTE COHESIVO 5'---G↓AATTC---3' 3'---CTTAA↑G---5'
BsaI	5' GGTCTC 3' CCAGAG	CORTE COHESIVO 5'---GGTCTCN↓NNNNN---3' 3'---CCAGAGNNNN↑N---5'
AflII	5' CTTAAG 3' GAATTC	CORTE COHESIVO 5'---C↓TTAAG---3' 3'---GAATT↑C---5'

4.1.2.3. OLIGONUCLEÓTIDOS

Para los oligonucleótidos de 5'→3' utilizados, en la Tabla 5 se muestran aquellos que fueron empleados para la construcción de la cepa BL21::RNApolT7-PT7-RBD-RBD'-attP.

Tabla 6 Oligonucleotidos que se usaron para la construcción de la cepa BL21-RNapolT7-PT7-RBD-RBD'-attP.

Nombre del oligo	F/R	Secuencia 5'→3'	Largo (pb)	Sitio de restricción
AJ01-F	F	CGCGAATTCATGGGAAGAAGGCGAAGTCAT	30	EcoRI
AJ02-R	R	AAATAAAACTGACTATCACTGGA	23	NO
AJ03-F	F	GGTAGCTTGCAGTGGGCTT	19	NO
AJ04-R	R	CGGGAATTCCATCCTGTCTCTTGATCAGAT	30	EcoRI
AJ05-F	F	GGCGGTCTCCCTAGCGCAGTGAGCGCAACGC AAT	34	BsaI
AJ06-R	R	GCCGGTCTCGGATCCGGAGTCGTATTGAT	29	BsaI
AJ07-F	F	CGCGGTCTCGGATCCGCAT	19	BsaI
AJ08-R	R	GCCGGTCTCTTAGGACTGCT	20	BsaI
AJ09-F	F	CGCGGTCTCTCCTAGCCCA	19	BsaI
AJ10-R	R	GCCGGTCTCTCTAGAGCA	18	BsaI

4.1.2.4. PLÁSMIDOS

4.1.2.4.1. Plásmido pSUP2021

El plásmido pSUP2021 (Simon *et al.*, 1983), contiene el Tn5 con el cual nos permite mediante una amplificación de PCR extraer el promotor de *neo* (P_{neo}) que nos servirá para el trabajo en conjunto con el gen *int* para la recombinación específica en sitio (Figura 10).

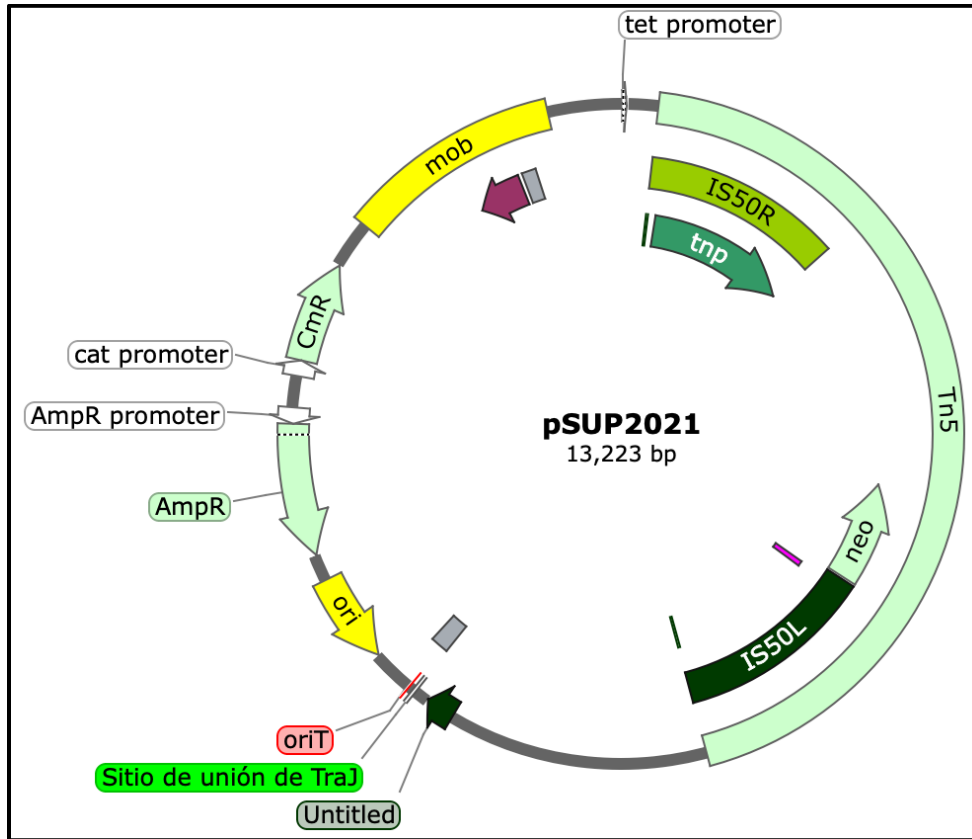


Figura 10. Plásmido pSUP2021

4.1.2.4.2. Plásmido pMJAS01

El plásmido pMJAS01 de 6,247 pb (Figura 11), cuenta con resistencia a kanamicina y cloranfenicol ya que es la unión de dos plásmidos (pK18 y pBTB3). Fue empleado para poder obtener el pBTB3, ya que éste al ser transformado en la cepa BL21 junto a RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-attP nos permitirá detectar qué colonias han incorporado el DNA por electrotransformación y en dónde es probable que se haya hecho la inserción de manera correcta, ya que funciona como un marcador de selección por su resistencia a cloranfenicol y es fácil de eliminar, pues es de bajo número de copias y sin sistema de partición.

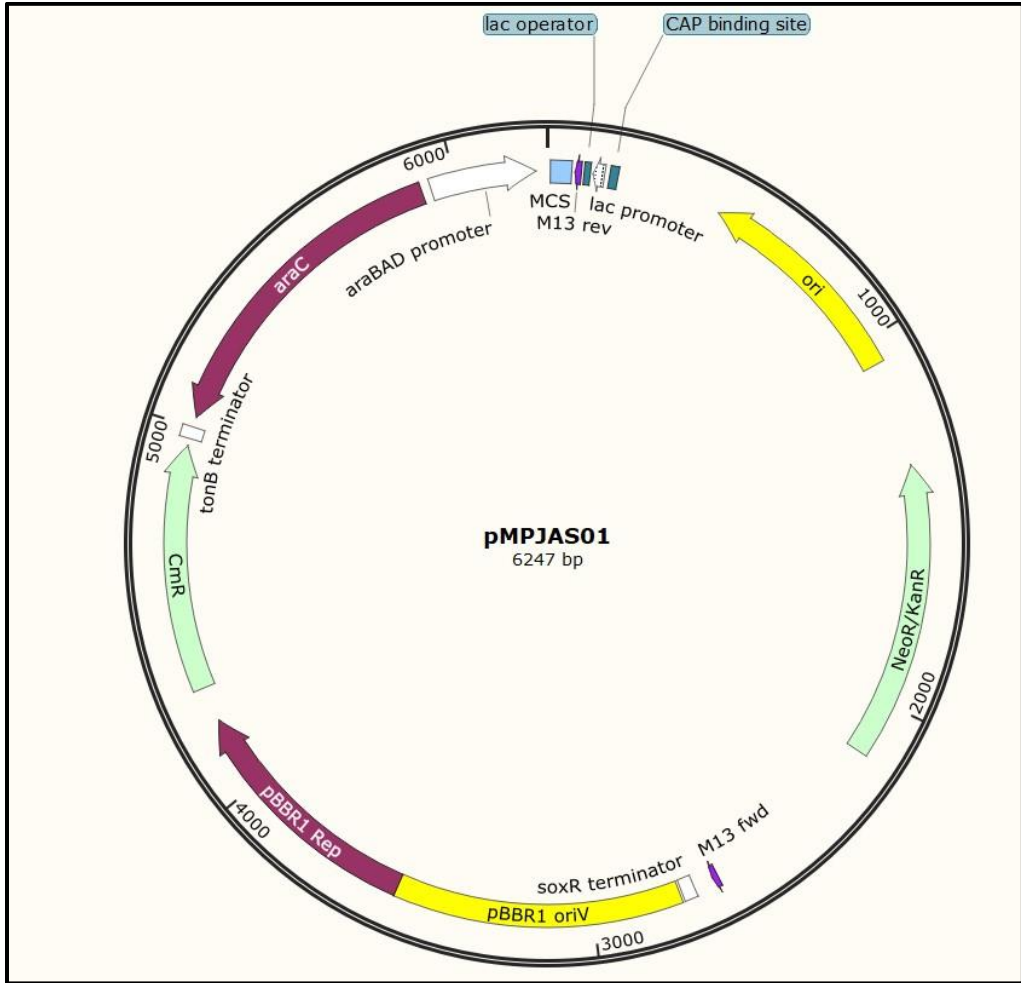


Figura 11. Plásmido pMPJAS01.

4.1.2.4.3. Plásmido pUC57a-PT7-RBD.

El plásmido pUC57a-PT7-RBD (Figura 12) de 3,843 pb, es uno de los dos plásmidos que contiene el material genético (dominio RBD silvestre), además, cuenta varios elementos genéticos adicionales como el promotor T7 (P_{T7}), RBS, péptido señal y el péptido de unión, de manera adicional este plásmido confiere resistencia a ampicilina.

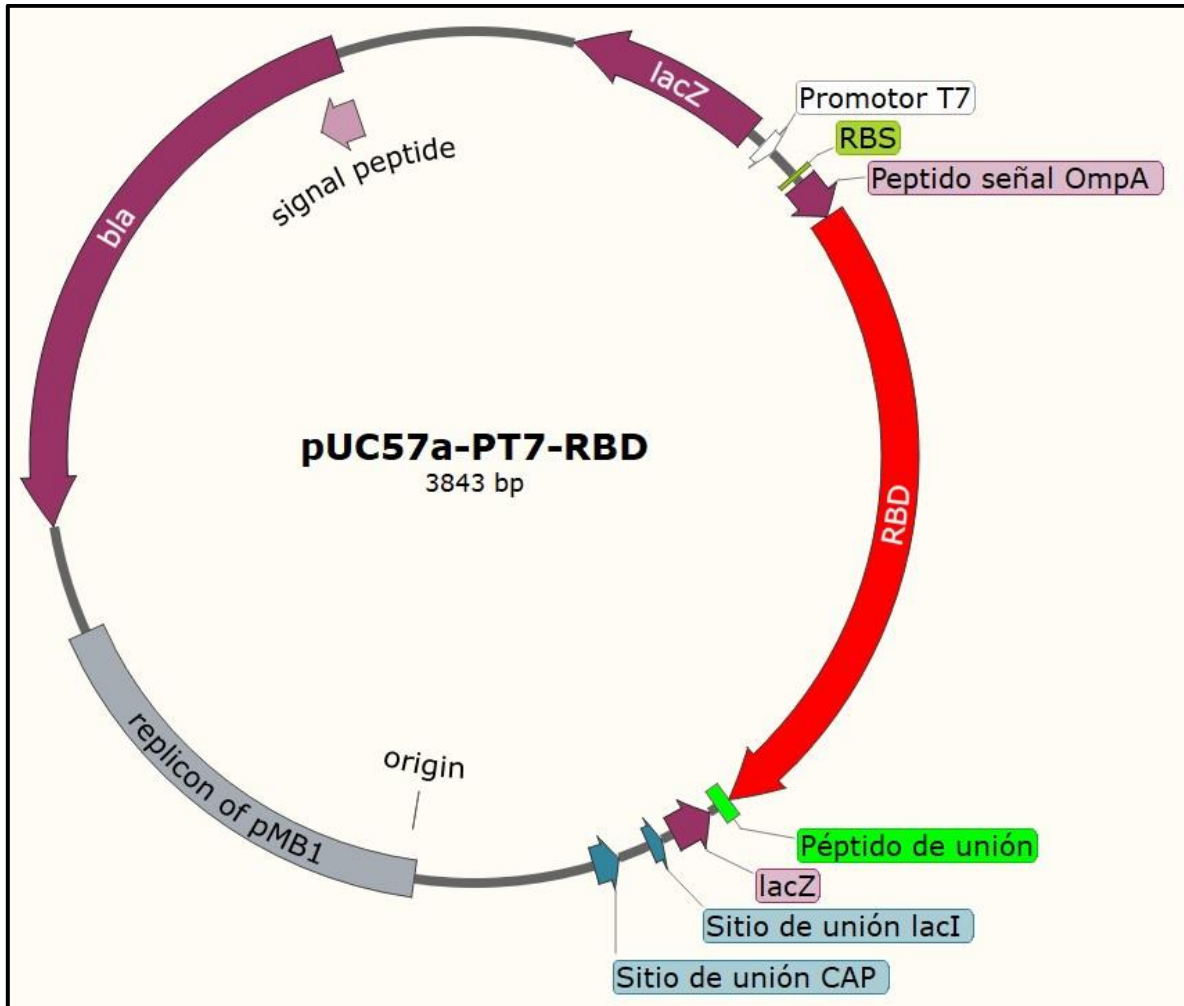


Figura 12. Plásmido pUC57a-PT7-RBD.

4.1.2.4.4. Plásmido pUC57k-RBD-attP

El plásmido pUC57k-RBD-attP (Figura 13) de 3,843 pb, es el segundo de los dos plásmidos que contiene el material genético, en él se encuentra el dominio RBD con las mutaciones encontradas en variantes del virus y cuenta con varios elementos genéticos adicionales: péptido de unión, etiqueta de histidinas (6xhis) y el sitio attP.

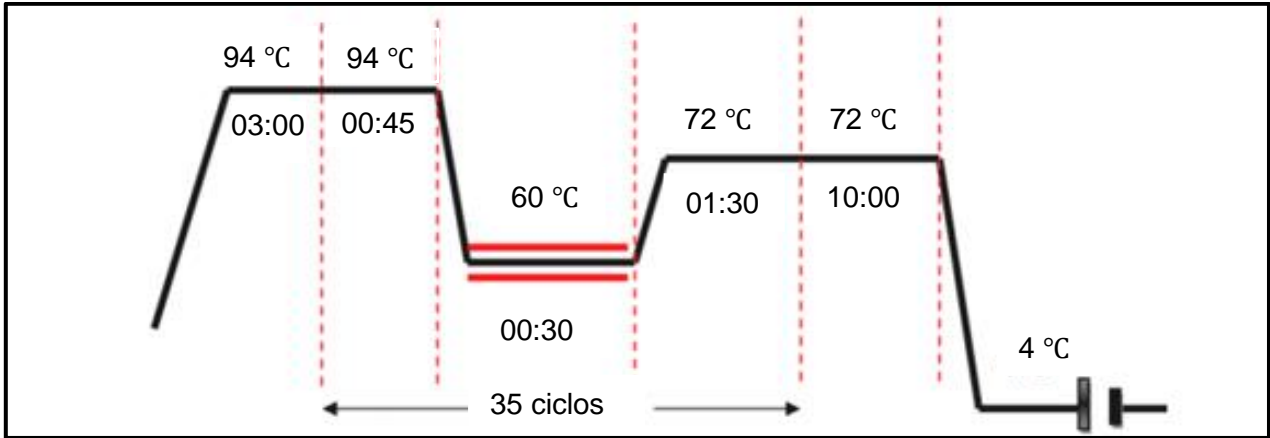


Figura 14. Programación estándar para la Taq DNA Polymerase.

Ya con la estandarización posteriormente se utilizó una Taq de alta especificidad, Taq DNA Polymerase (PCR Super Mix) del proveedor ThermoFisher (Figura 15), que cuenta con una tasa menor de errores para la obtención de los productos de PCR.

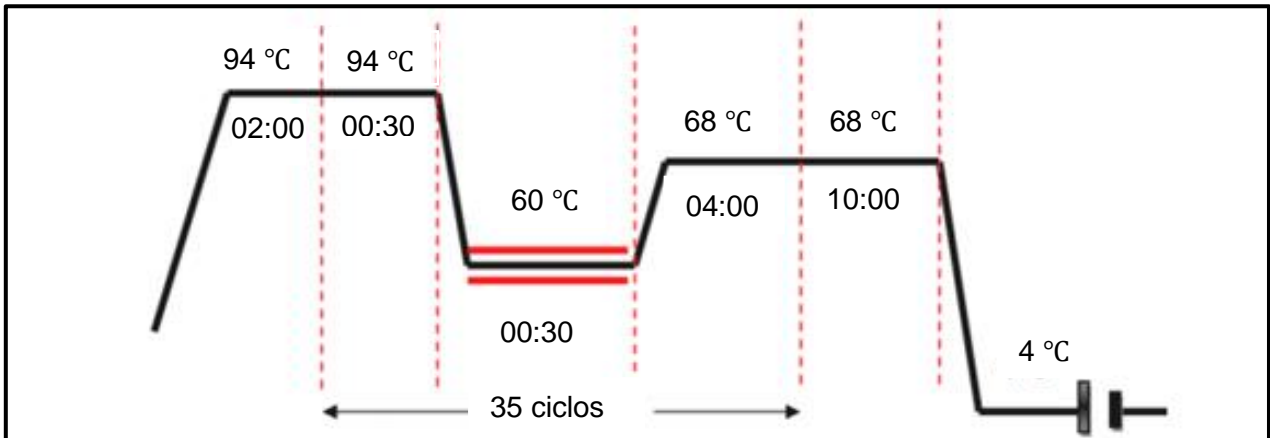


Figura 15. Programación estándar para la Taq DNA Polymerase (PCR Super Mix), amplifica una 1 kb por cada minuto.

4.2.3 Electroforesis

Se utilizó la técnica de separación de moléculas (DNA o RNA) por electroforesis en función de su carga y tamaño con el uso de una carga eléctrica para el análisis y verificación de productos de PCR, ligaciones, restricciones, plásmidos, etc. Y así, hacerlas pasar por una placa de gel de agarosa al 0.8%, la placa se coloca en una cámara de electroforesis sumergida en un regulador hecho con TAE al 1%. El tiempo necesario es proporcional al voltaje

empleado, es decir, 120 V por 40 min (Sambrook & Russell, 2001). Es necesario mencionar que en el gel se hacen pocillos con peines de plásticos, en los cuales se coloca preferentemente en el primer carril el marcador de tamaño molecular comercial GeneRuler 1 kb Plus de ThermoFisher (Figura 16) y el DNA Leader 1 kb de New England Biolabs (Figura 17).

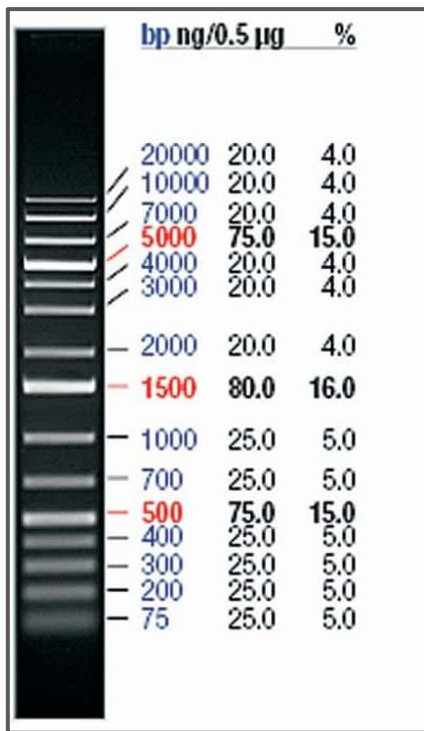


Figura 16. GeneRuler 1 kb Plus.

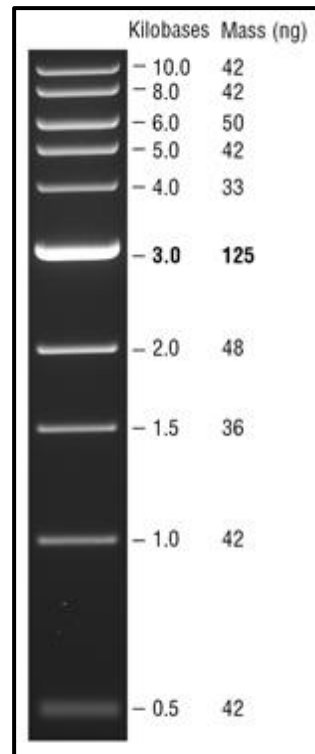


Figura 17. DNA Leader 1kb.

Y en los carriles posteriores hacer mezclas de soluciones de carga hechos con Naranja G, glicerol y EDTA con el DNA problema.

Para el revelado se sumerge en bromuro de etidio con una concentración de 0.025 mg/ml y dejarlo por 10 o 15 min, después se enjuaga con agua corriente y por último, se analiza en el fotodocumentador GEL DOC 2000 de la marca Bio-Rad (Hercules, CA, EUA).

4.2.4 Purificación de plásmidos

Para la preparación de DNA plasmídico por lisis alcalina ya sea a pequeña (miniprep) o mediana (midiprep) escala, se utilizó una técnica modificada de la descrita por Sambrook & Russell, 2001.

4.2.5 Purificación de productos de PCR

Los procedimientos en donde se implica utilizar un producto de PCR con la menor carga de impurezas posibles fue necesario utilizar el Kit DNA Clean & Concentrator, Zymo Research.

4.2.6 Elementos Genéticos

4.2.6.1 Diseño de la construcción RNApolT7-PT7-RBD-RBD'-attP

Para el diseño se basó en la secuencia obtenida a través de la plataforma de NCBI (Wu *et al.*, 2008), en donde se encontraba la secuencia de todo el genoma del virus SARS-CoV-2, por lo que sólo seleccionamos la secuencia de la proteína S para después trabajar únicamente con la secuencia del dominio RBD (silvestre). Además, como se buscó una mayor selección, también se contempló trabajar con secuencias del dominio RBD (modificado) en que obtuviéramos regiones que produjeran una mayor infectividad y también disminución de la sensibilidad a la neutralización por anticuerpos monoclonales (mAbs) (Figura 18), de esta forma se le hicieron las sustituciones nucleotídicas correspondientes para obtener estas dos características a la secuencia del dominio RBD silvestre.

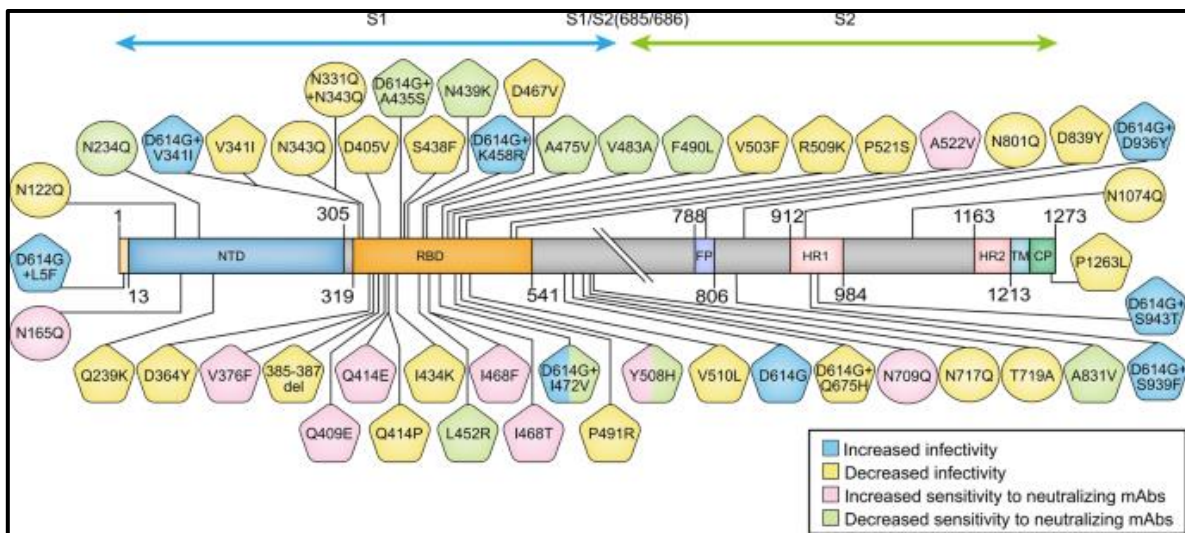


Figura 18. Sustituciones nucleotídicas que cambian la actividad e infectividad del virus SARS-CoV-2. (Wang *et al.*, 2020).

El diseño también contempla las siguientes características:

- **Promotor de T7:** se utiliza para que exista una mayor expresión de la proteína.
- **RBS (sitio de unión al ribosoma):** es la responsable del reclutamiento de un ribosoma durante el inicio de la traducción.
- **Péptido señal OmpA:** es el encargado de la secreción del antígeno en el intestino (donde están las placas de Peyer).
- **Péptido de unión:** secuencia corta de nucleótidos encargado de unir los fragmentos (PT7-RBD-RBD'attP).
- **6xHis:** etiqueta de histidinas para una posible purificación.
- **attP:** sitio para recombinación específica en sitio (*attB-attP*) en el cromosoma de la cepa de la bacteria de *E.coli* BL21.

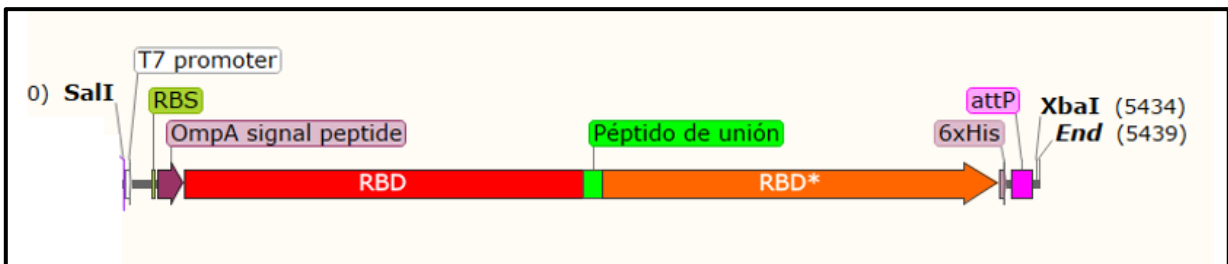


Figura 19. Diseño final de la construcción RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-attP.

4.2.6.2 P_{neo} y gen *int*

Este elemento genético es la unión de dos fragmentos para la expresión transitoria del gen *int* en *E. coli* (Figura 20):

- P_{neo} : para obtener este fragmento partimos de una amplificación por PCR utilizando los iniciadores AJ03-F y AJ04-R en el plásmido pSUP2021, el cual contiene el trasposón Tn5 (5,818 pb) en donde podemos encontrar este promotor (199 pb).
- Gen *int*: se obtuvo de una amplificación por PCR (1,160 pb) del gen que contiene el bacteriófago λ (New England Biolabs) de 48,502 pb utilizando los iniciadores AJ01-F y AJ02-R.

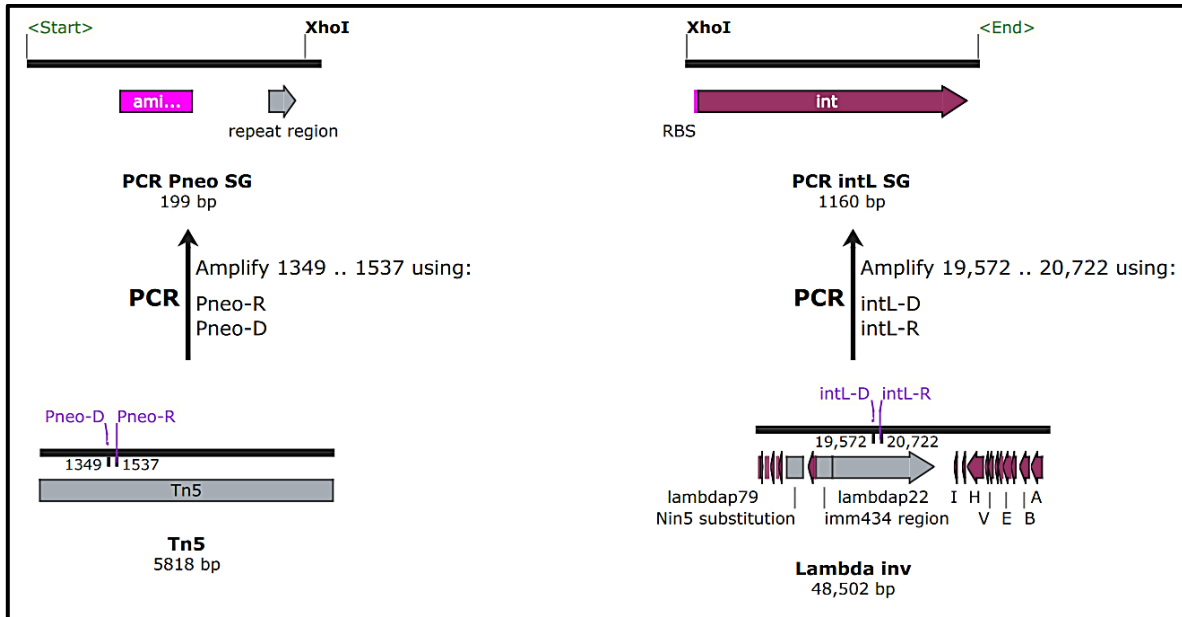


Figura 20. Historial de procedimiento para la obtención del *Pneo* y el gen *int*.

Posteriormente se dirigieron los fragmentos con *EcoRI* y se ligaron para después con una reamplificación utilizando los iniciadores AJ03-F y AJ02R para obtener un amplicón de 1,345 pb que es la unión de los dos fragmentos (Figura 21).

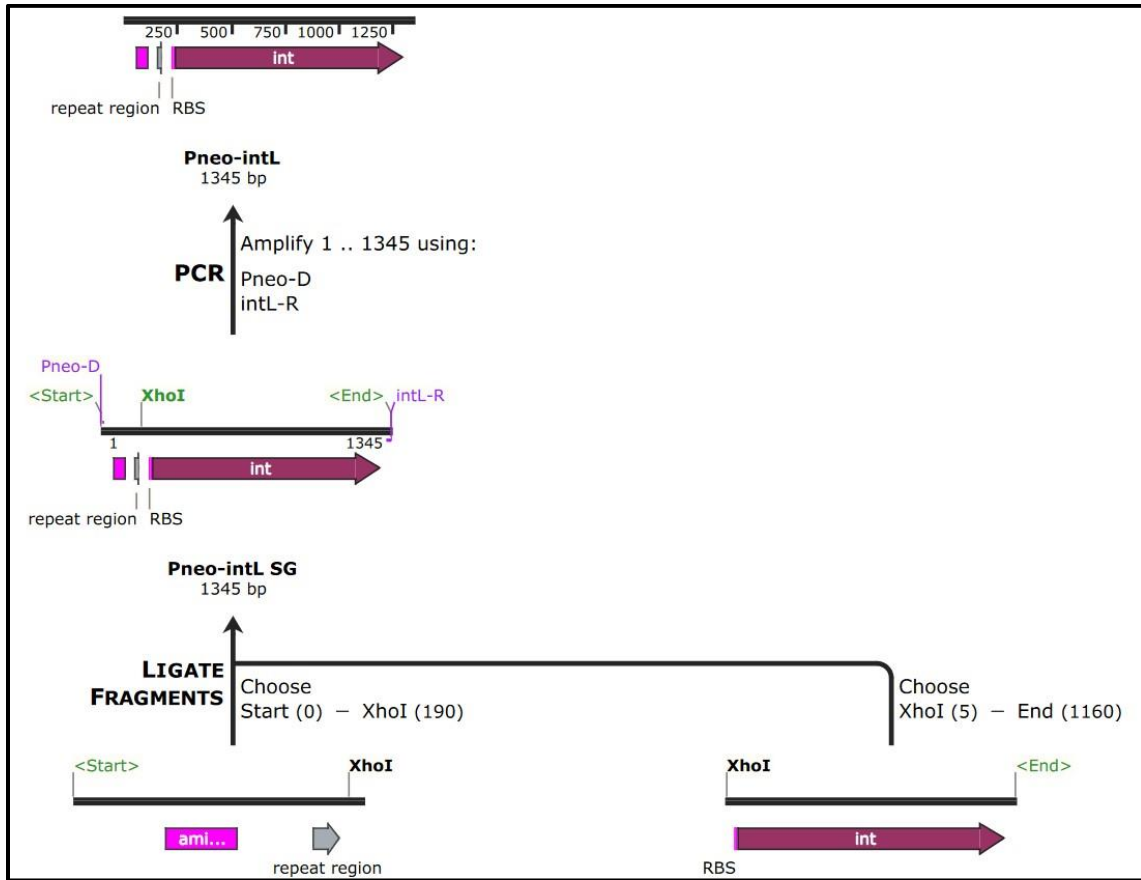


Figura 21. Historial de procedimiento para la unión del P_{neo} y el gen.

4.2.6.3 pBTB3

El plásmido se obtuvo del plásmido pMJAS01 (Figura 22) de 6,247 pb, éste es un plásmido cuya formación se basa con la unión de dos plásmidos (pK18 de 2,661 pb y pBTB3 de 3,586 pb) por lo que la estrategia para poder obtener sólo el pBTB3 fue el restringir al pMJAS01 con HindIII, ya que es una enzima que corta en dos sitios diferentes:

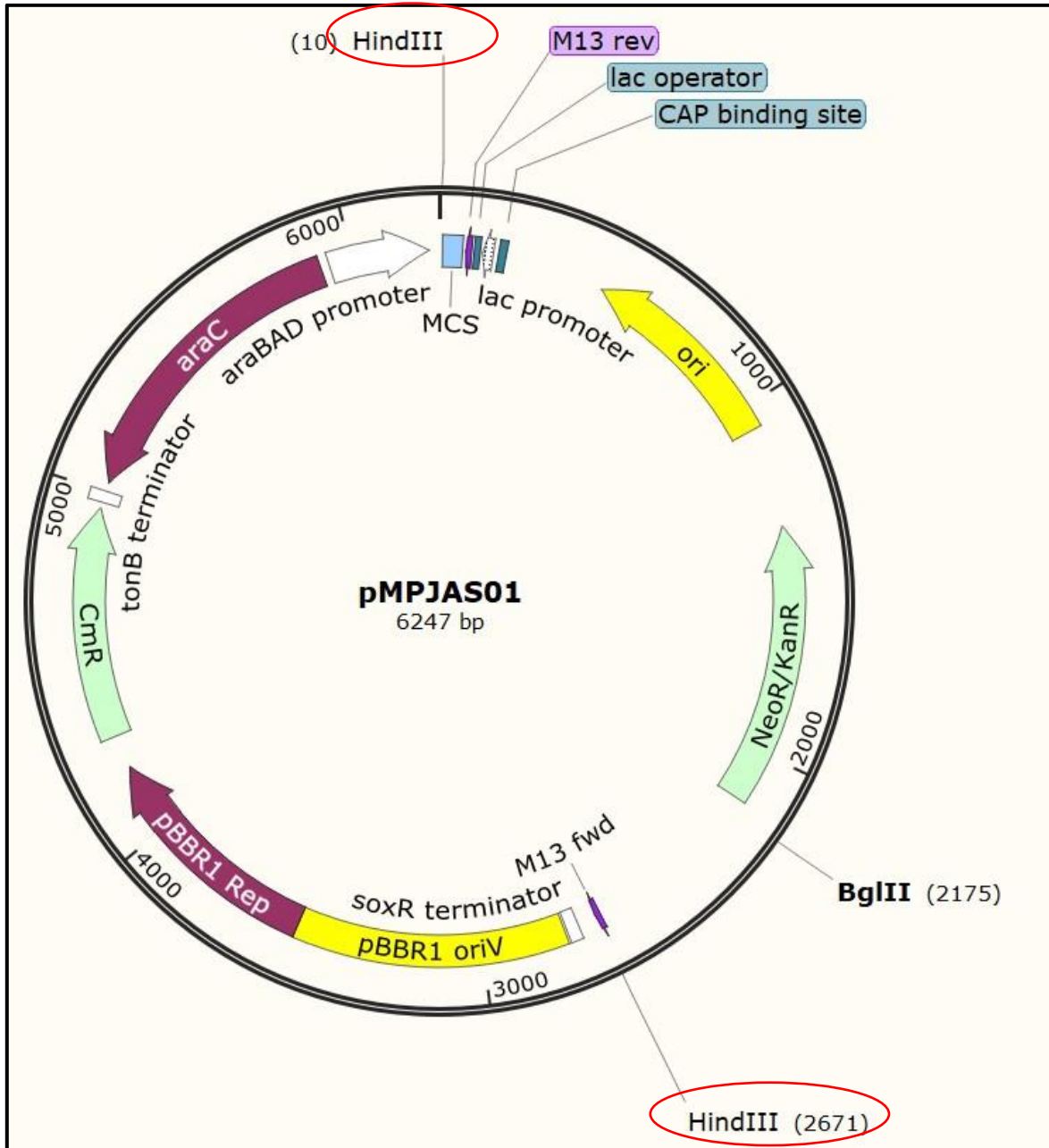


Figura 22. Plásmido pMPJAS01 con los sitios HindIII

Esta restricción permite liberar (linealizar) los dos plásmidos, después, se hizo una ligación que dentro de las múltiples ligaciones se pudieran circularizar los plásmidos por separados. Después, con una segunda restricción ahora con la enzima BglII se restringe sólo el plásmido pK18 para que éste quedara abierto y después por una transformación en *E. coli*, sólo el pBTB3 (Figura 23) puede ser replicado en la bacteria transformada porque se encuentra

cerrado. Para corroborar se siembra en medio selectivo con cloranfenicol ya que sólo el pBTB3 cuenta con resistencia a este medio.

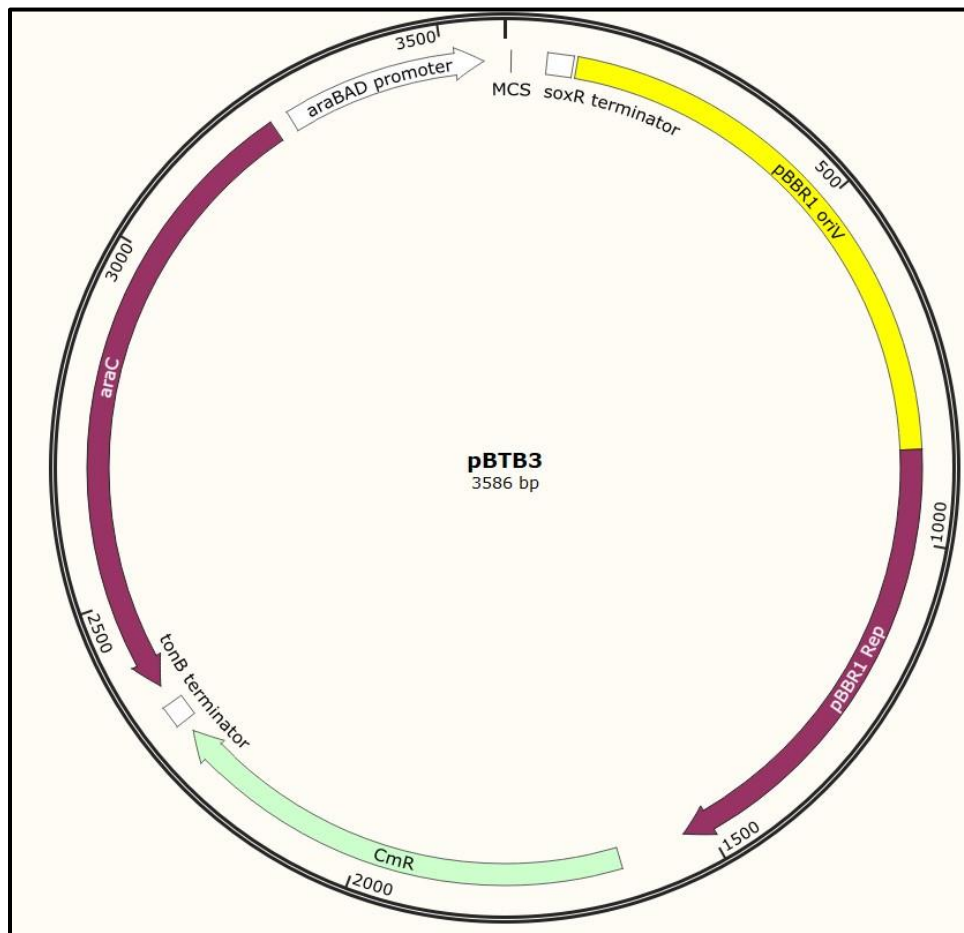


Figura 23. Plásmido pBTB3.

4.2.6.4 Construcción de T7-PT7-RBD-RBD-attP

Esta construcción es la unión de tres fragmentos que consisten en PT7-RBD que se encontraba en el plásmido pUC57A-PT7-RBD, el RBD-attP que está en el plásmido pUC57K-RBD'-attP y, por último, la RNA Polimerasa de T7 (T7).

Para poder obtener la DNA Polimerasa T7 se amplificó con los iniciadores AJ05-F y AJ06-R para obtener un amplicón de 3,313 pb (Figura 24). Este amplicón será utilizado para expresar el fragmento de la proteína S a partir del promotor de T7 que se encuentra en la construcción de PT7-RBD-RBD'-attP.

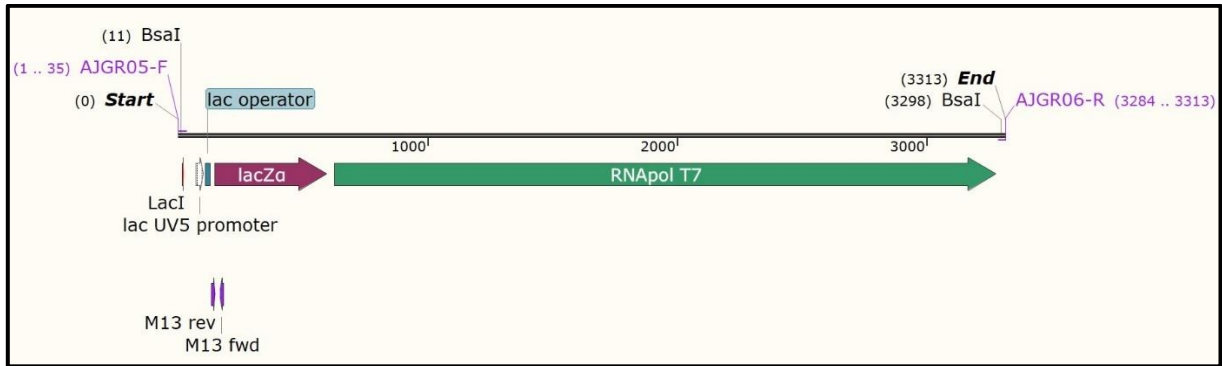


Figura 24. Ampliación de la DNA Polimerasa de T7.

Ya amplificado el fragmento de la T7, se clonó con la ayuda del kit de clonación de Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning (Figura 25), ya que su alta eficiencia para la clonación de productos de PCR que se hayan generado con cualquier Taq o DNA polimerasa termoestable hace que sea un buen sistema para la selección y clonación y obtener una cantidad de DNA (T7) para poder continuar con las siguientes etapas. Después de utilizar el kit, se hizo una extracción de plásmido en miniprep para obtener el plásmido (clonado) con la inserción de la DNA Polimerasa de T7 (Figura 26).

En el diseño de los fragmentos se contempló que para poder unir cada uno de estos fuese mediante la técnica de Golden Gate, que permite el ensamble de los fragmentos usando la enzima de restricción tipo IIS BsaI y la DNA ligasa de T4 simultáneamente, pero después de múltiples intentos por unir los fragmentos con este enfoque no se obtuvo ningún resultado. Por lo que se optó por una ruta con el sitio de reconocimiento de la enzima BsaI para unirlos, pero el inconveniente que se podría tener al momento de unir los fragmentos de los RBD es que cuentan con dos sitios BsaI en los extremos de los fragmentos, por lo que al momento de querer unir dichos fragmentos podríamos tener muchas conformaciones de las uniones lo que podrían hacer difícil la selección y comprobación de que se hayan unido correctamente. Por esta razón se planteó comenzar con restricciones parciales para eliminar un sitio de reconocimiento de BsaI.

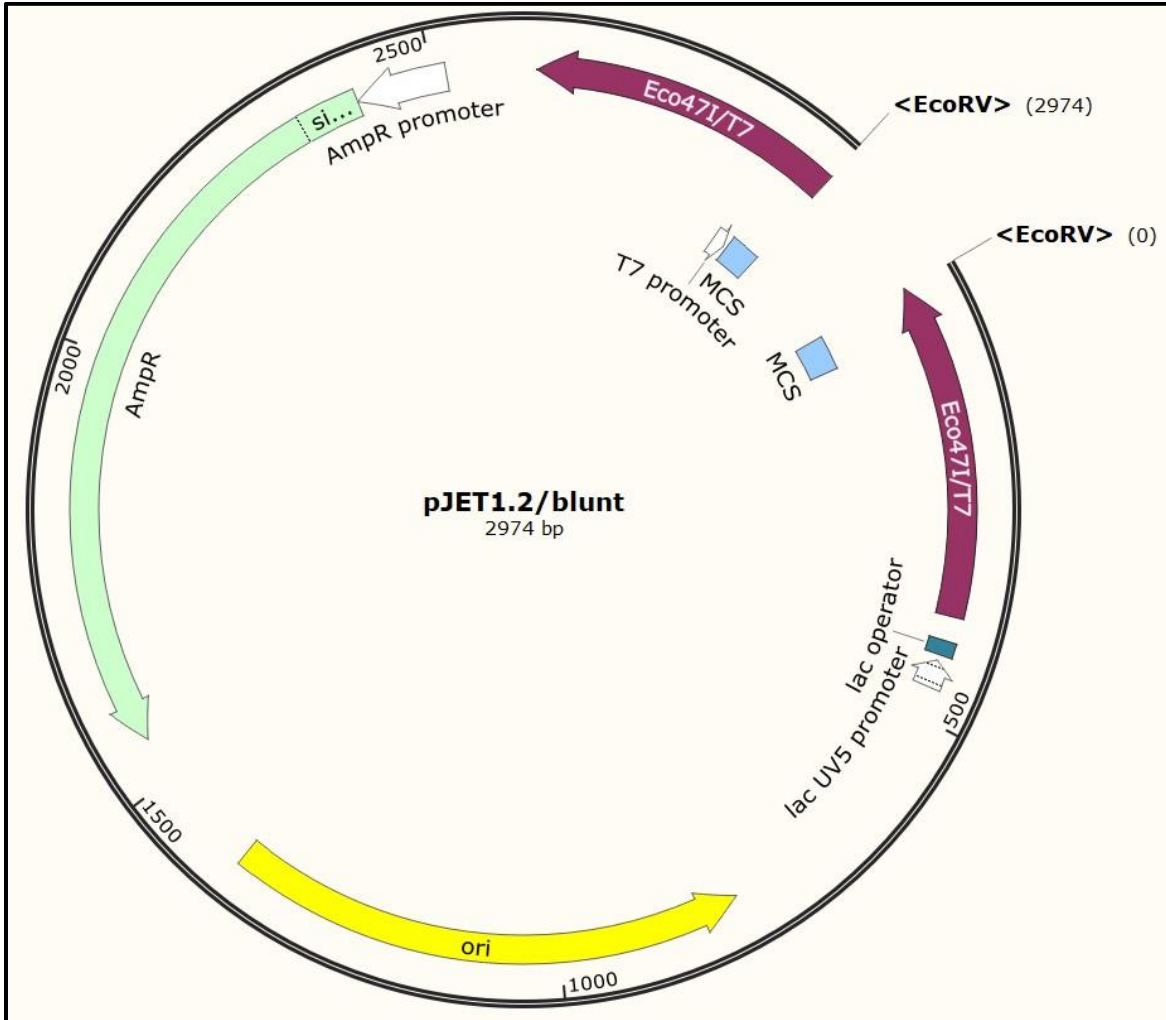


Figura 25. 1.2 pJET 1.2/Blunt.

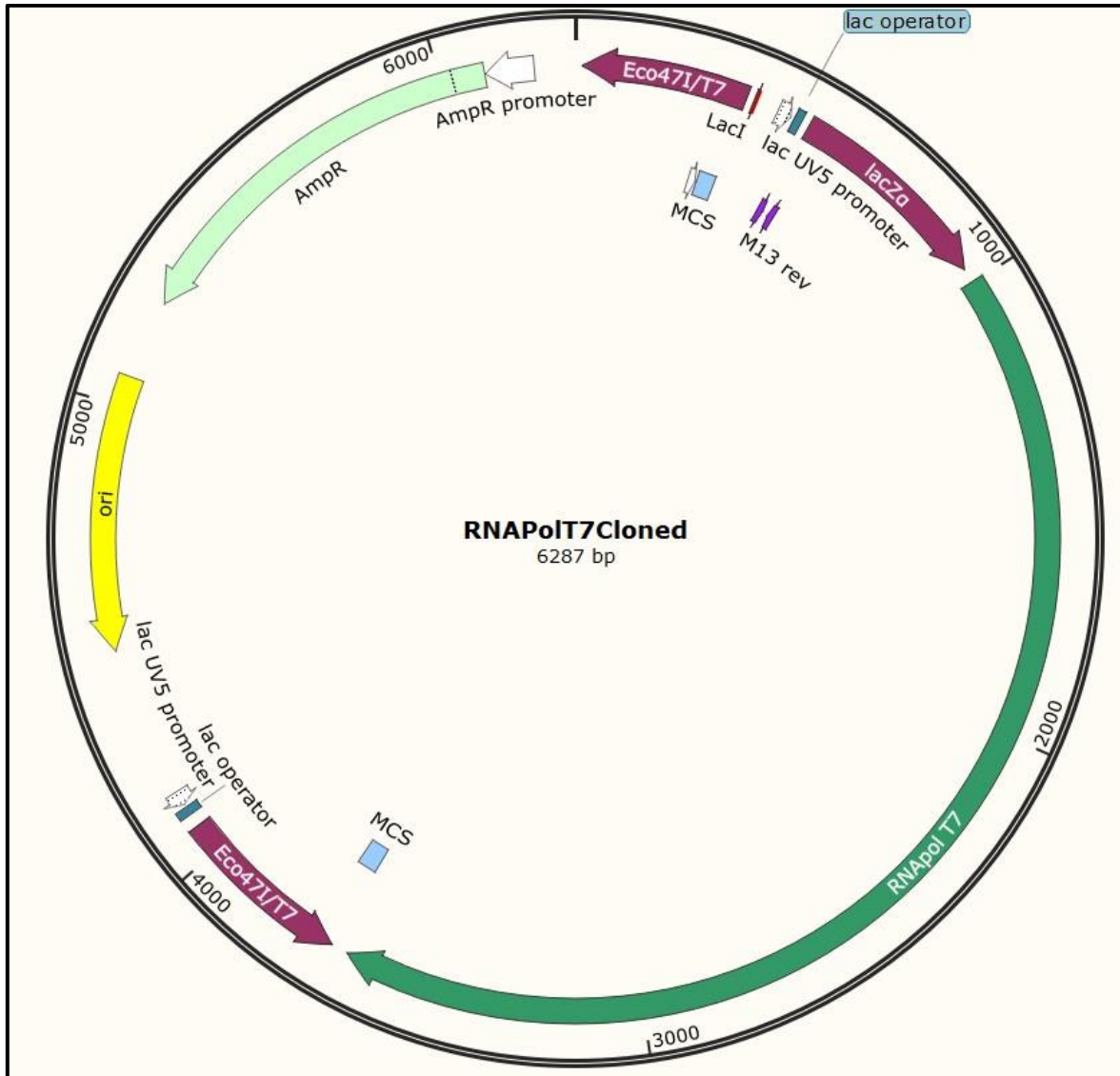


Figura 26. T7 en insertada 1.2 pJET Blunt (clonada).

4.2.6.4.1 Restricción parcial de pUC57A-PT7-RBD y pUC57K-RBD-attP

Para eliminar el sitio de reconocimiento de BsaI en cada plásmido, estos se restringieron de forma independiente con la enzima, lo primero que se hizo fue ubicar los sitios BsaI y que enzima nos ayudaría mediante la restricción a eliminar el sitio.

-pUC57A-PT7-RBD: este plásmido (Figura 27) consta de tres sitios BsaI, dos flanqueando al fragmento de la RBD y uno que se ubica en el gen de la resistencia a ampicilina. La enzima (Figura 28) que nos permite eliminar el sitio es EcoRI de Thermo Fisher (óvalo magenta).

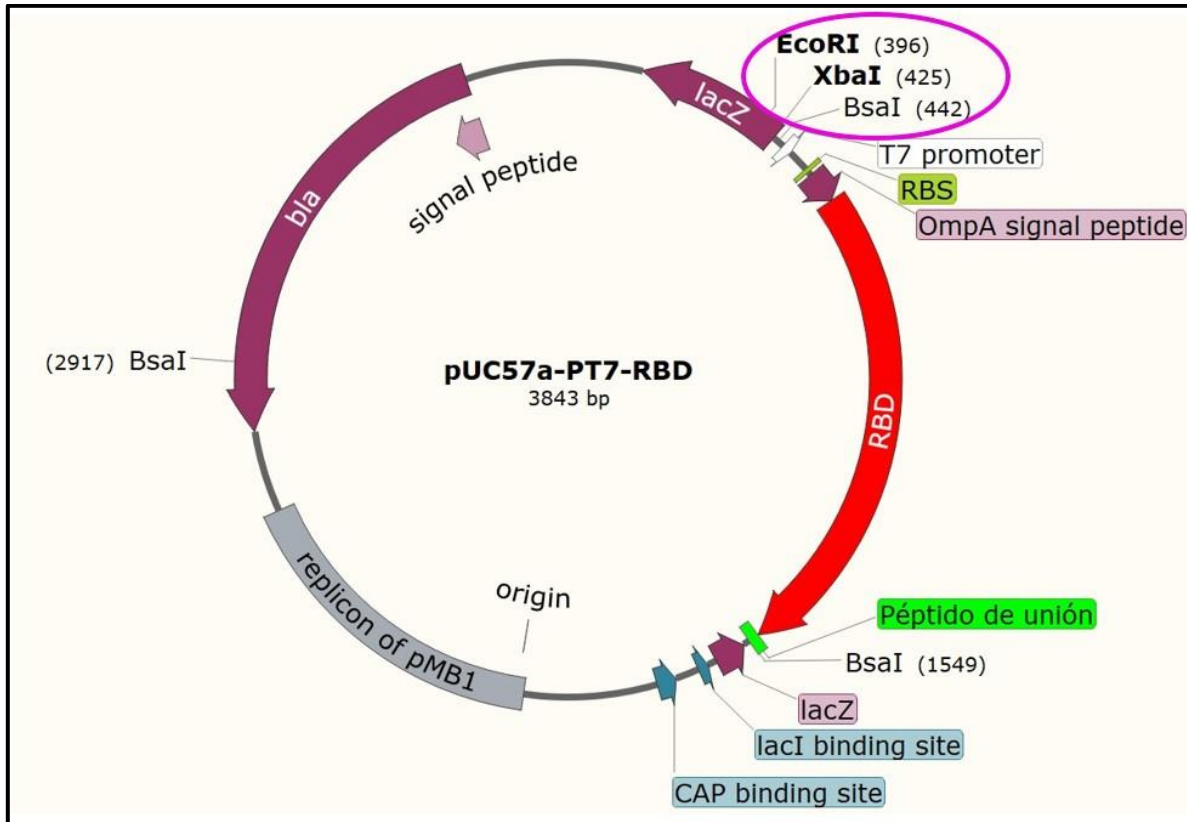


Figura 27. Plásmido pUC57A-PT7-RBD con los sitios BsaI y la enzima EcoRI y XbaI.

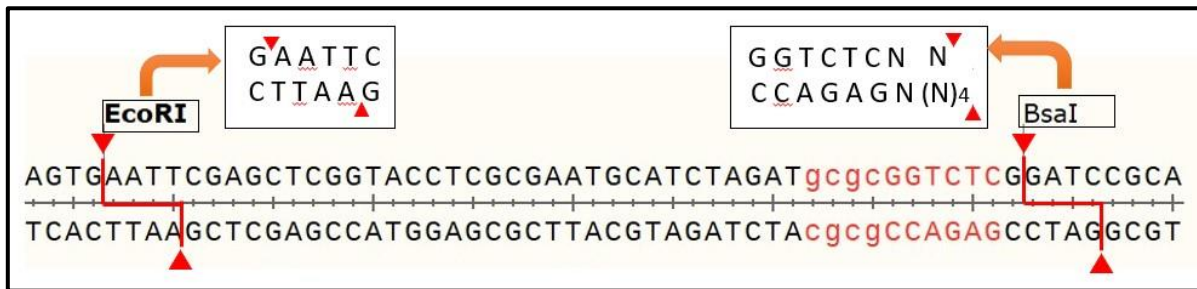


Figura 28. Secuencia de los sitios de reconocimiento y corte de EcoRI y BsaI en pUC57A-PT7-RBD.

-pUC57K-RBD-attP: el plásmido (Figura 29) cuenta con dos sitios BsaI (marcados con flechas rojas) flanqueando al fragmento de la RBD-attP (Figura 30). La enzima que nos permite eliminar el sitio es BamHI (óvalo magenta) (Thermo Fisher).

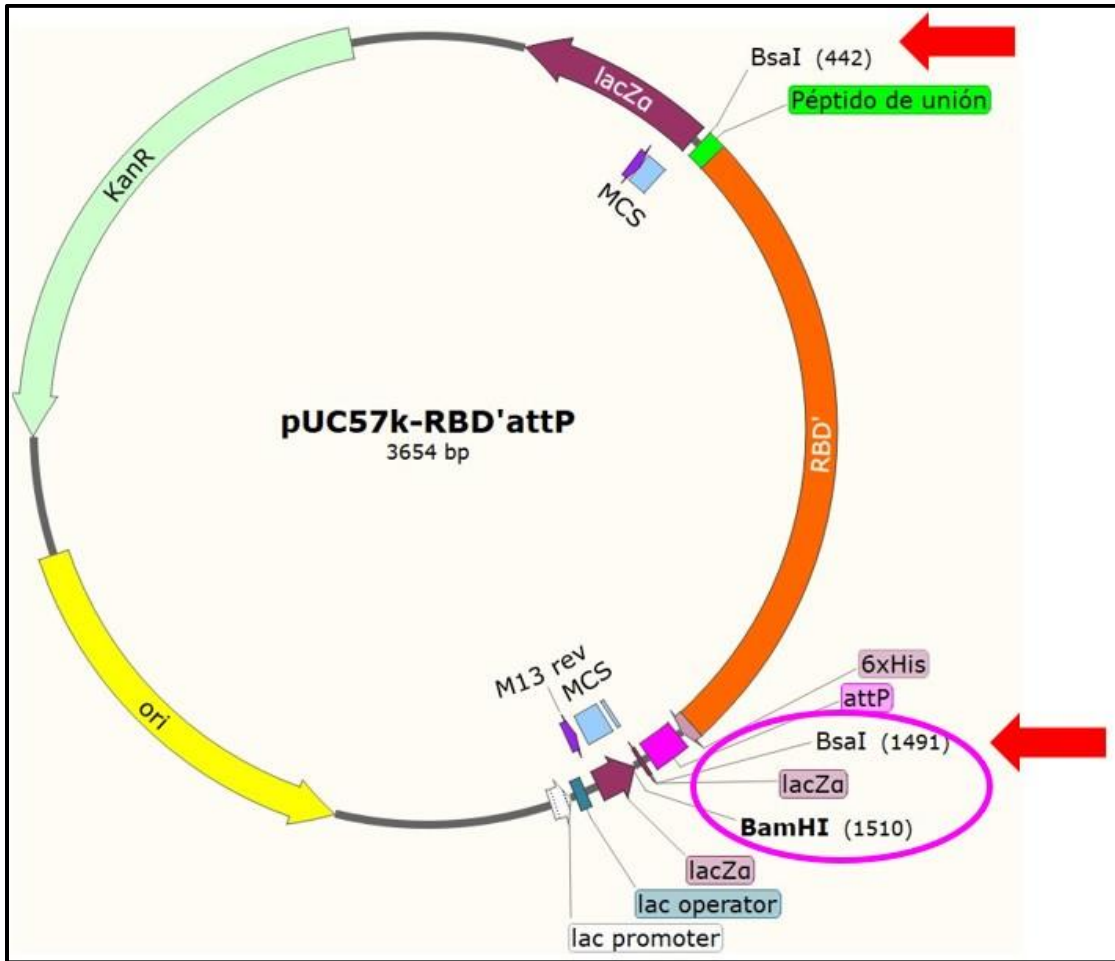


Figura 29. Plásmido pUC57K-RBD-attP con los sitios BsaI y BamHI

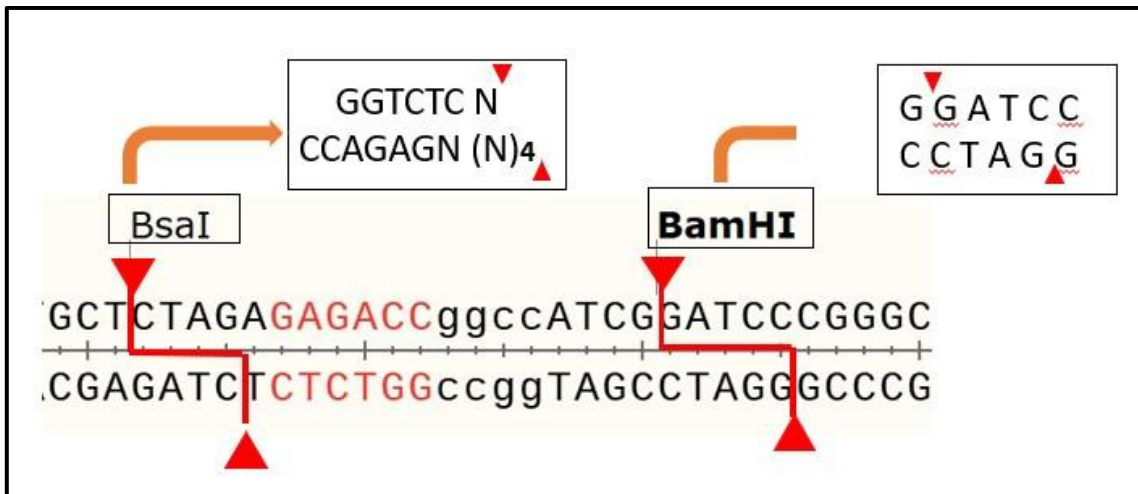


Figura 30. Secuencia de los sitios de reconocimiento y corte de BamHI y BsaI en pUC57K-RBD-attP.

Una vez ya ubicados los sitios a eliminar se hicieron las restricciones parciales correspondientes, de tal forma se hicieron cinco alícuotas por plásmido, para ir diluyendo por mitad de concentración de enzima BsaI en cada tubo de acuerdo con la Tabla 7.

Tabla 7 Concentración de soluciones para la restricción parcial.

	Volumen (µl)				
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5
Agua	29	14	14	14	14
Regulador G	2	2	2	2	2
BsaI	1	-	-	-	-
Volumen de transferencia	TOMAR 16 32	TOMAR 16 32	TOMAR 16 32	TOMAR 16 32	DESECHAR 16 32
Volumen	16	16	16	16	16
Plásmido	4	4	4	4	4
Volumen final	20	20	20	20	20
Concentración final (U/µl)	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.03125

Se dejaron los cinco tubos por plásmido a 37°C por 1 h y se inactivó a 65°C por 15 min. Pasado el tiempo se comprobó con una electroforesis en qué tubo se había hecho la restricción parcial.

Al tubo seleccionado se le rellenaron los extremos de DNA lineal con el fragmento grande de la DNA Polimerasa I de *E. coli* (fragmento klenow) de Thermo Fisher y dNTP's con un tiempo de incubación de 10 min a 37°C e inactivar a 65°C por 15 min. En seguida se hizo una ligación con la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fisher), la ligación se dejó toda la noche con las condiciones de temperatura recomendadas por el fabricante.

Sólo para el plásmido pUC57A-PT7-RBD se hizo una restricción más con la enzima XbaI (Figura 31) para poder descartar cualquier plásmido dentro de la mezcla que aún siga conservando el sitio BsaI (el que se desea eliminar).

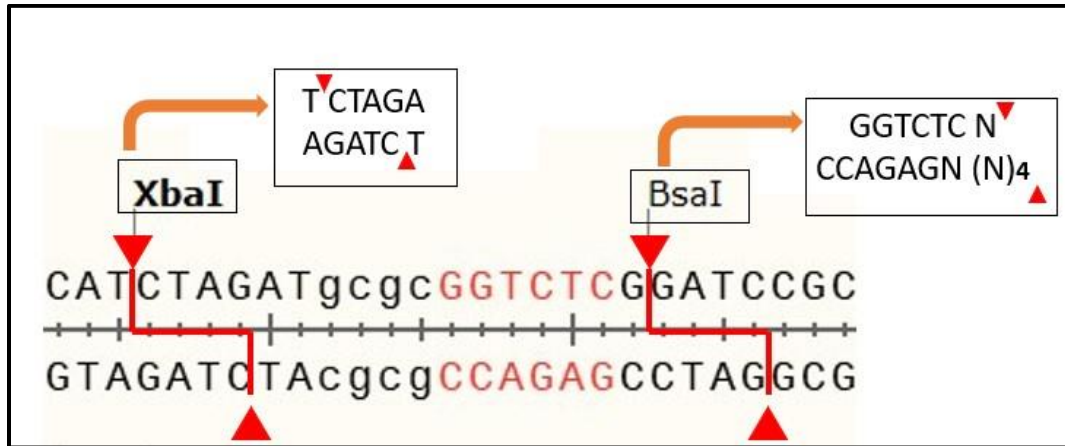


Figura 31. Secuencia de los sitios de reconocimiento y corte de las enzimas XbaI y BsaI del plásmido pUC57A-PT7-RBD.

Después se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 α con la ligación para después extraer el plásmido por miniprep y con una electroforesis comprobar con el tamaño del plásmido que haya eliminado el sitio BsaI.

Por último, se hizo una restricción con BsaI para comprobar que se linearice y utilizarlo para poder hacer las respectivas ligaciones con PT7-RBD-RBD'attP.

Para unir los fragmentos PT7-RBD-RBD'-attP de 2,156 pb (Figura 32), mediante una ligación con la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fisher), la ligación se deja toda la noche con las condiciones de temperatura recomendadas por el fabricante.

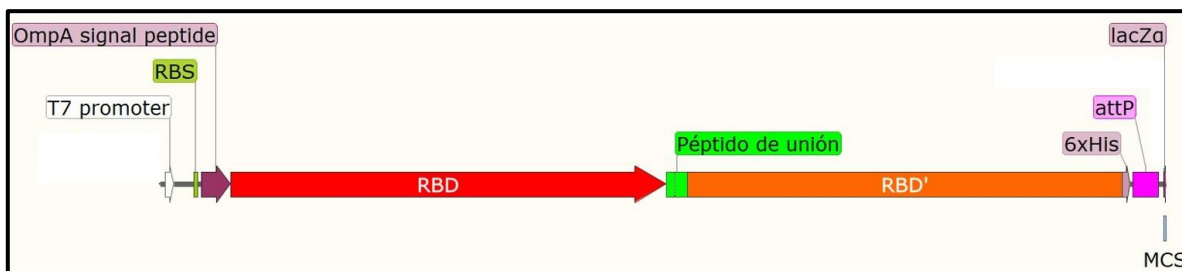


Figura 32. Unión de los fragmentos PT7-RBD-RBD'-attP.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 1^{er} elemento genético P_{neo} -gen *int*

Se amplificó el P_{neo} de 199 pb a partir de Tn5 que se encuentra en el plásmido pSUP2021. En Figura 33 se observa una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la amplificación del P_{neo} de Tn5-pSUP2021, en el carril 1 y 2 les corresponde el P_{neo} de 199 pb y M es el marcador de tamaño GeneRuler 1 kb Plus.

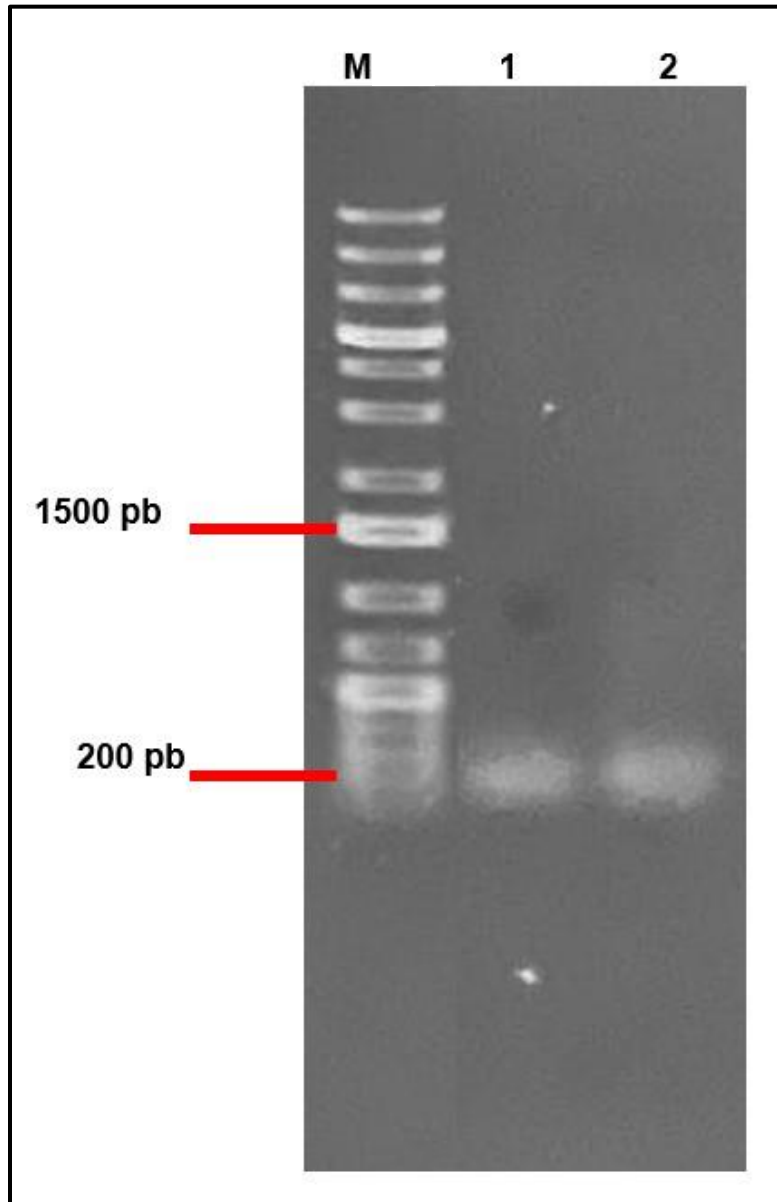


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de amplificación del P_{neo} de Tn5-pSUP2021.

También se hizo una amplificación del gen *int* del fago lambda y, por ende, una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de esta amplificación. En la figura 34 se observa la electroforesis en el que él se encuentra en el carril 1 de esta amplificación de 1,160 pb y M al marcador de tamaño GeneRuler 1 kb Plus.

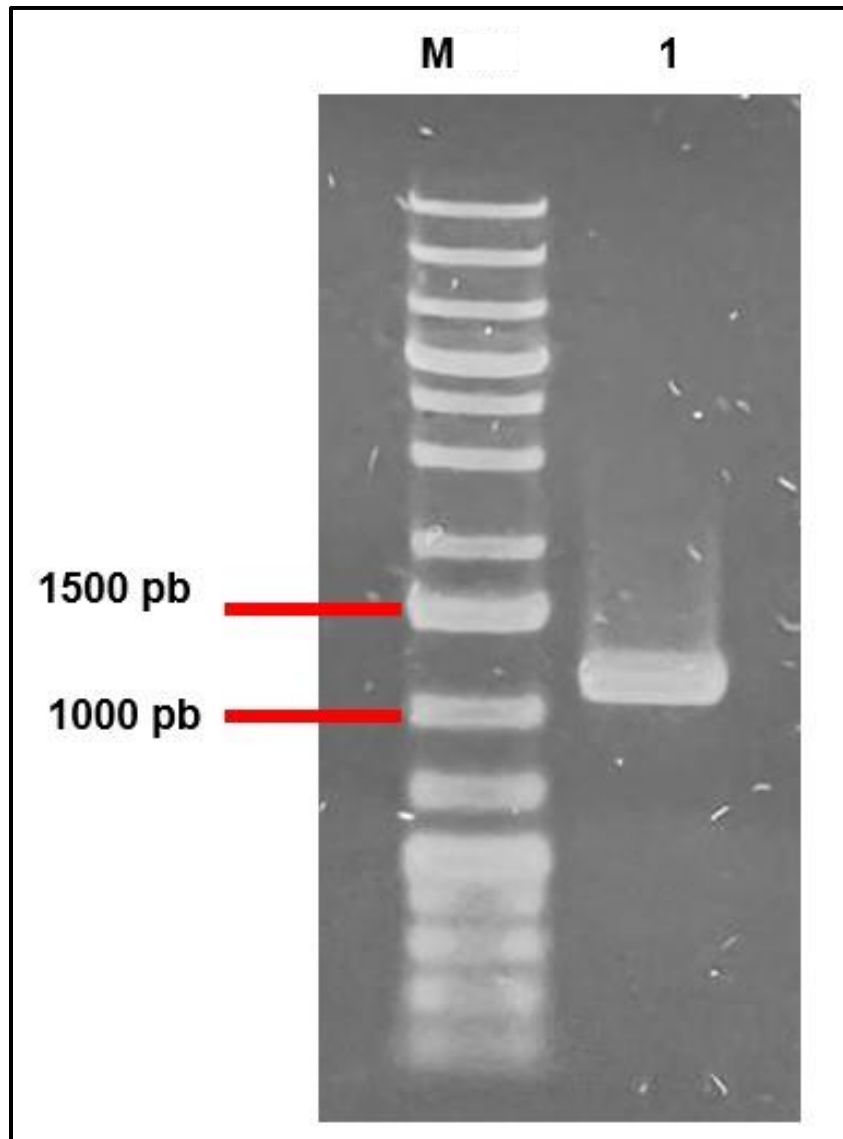


Figura 34. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de amplificación del gen *int* del fago lambda.

Después de dirigir los fragmentos con EcoRI y ligar para después reamplificar se obtuvo un amplicón de 1,359 pb, que es la unión de los dos fragmentos que corresponde al primer elemento genético.

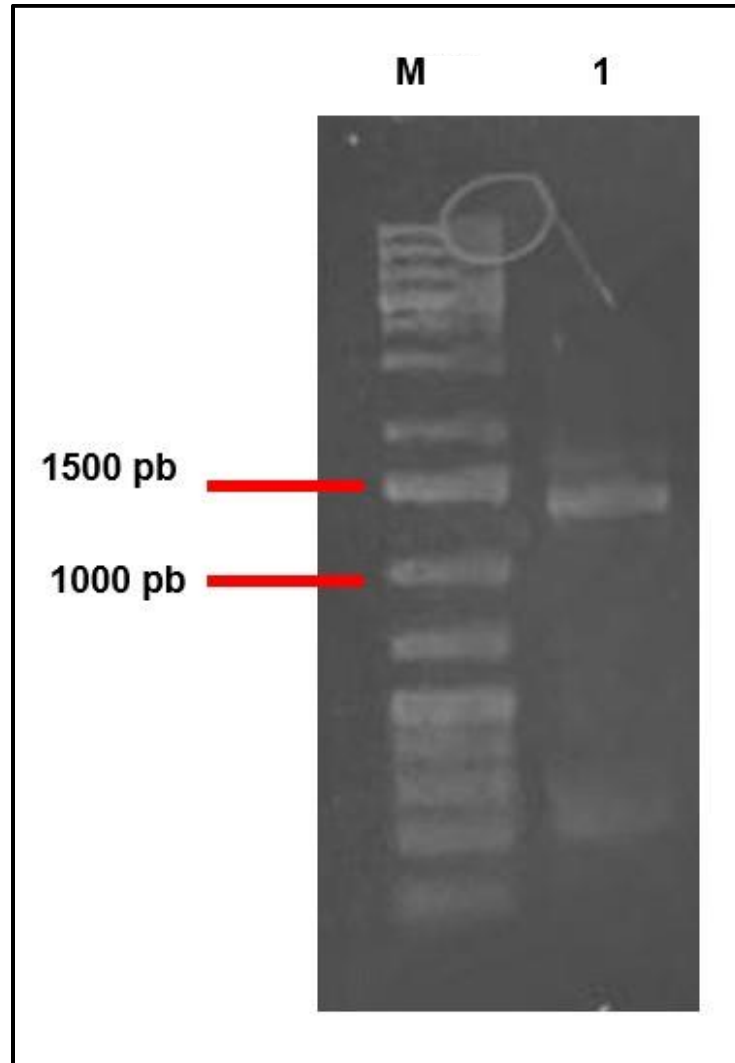


Figura 35. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de amplificación del *P_{neo-int}*.

La Figura 35 es el resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la amplificación del *P_{neo-int}* de 1,359 en el que el carril 1 corresponde a esta amplificación y M al marcador de tamaño GeneRuler 1 kb Plus.

5.2 2^{do} elemento genético pBTB3

Se transformó el plásmido pMPJAS01 de 6,247 pb, este plásmido es una unión de dos plásmidos: pK18 de 2,661 pb con resistencia a kanamicina y el pBTB3 de 3,586 pb con resistencia a cloranfenicol, por lo que se pudo usar un medio selectivo con cualquiera de estos dos antibióticos; con células químicamente competentes de la cepa de *E. coli* TOP10, después

se hizo una selección de colonias transformadas y con una extracción por midiprep se hizo una purificación del plásmido.

Posteriormente para poder liberar cada plásmido del pMPJAS01 se hizo una restricción la enzima HindIII (Figura 36), esta enzima reconoce los sitios que flanquean los extremos del pK18 y el pBTB3 (Figura 37).

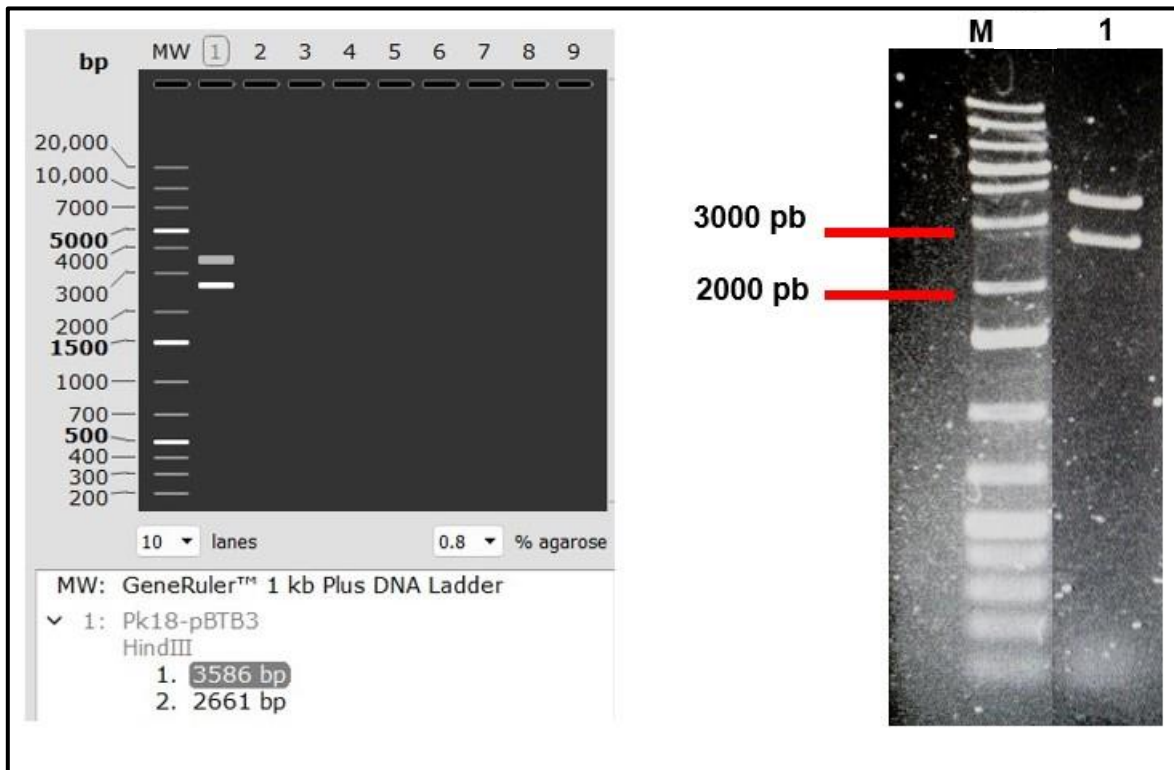


Figura 36. Restricción con la enzima HindIII.

En la figura 36 la ilustración que está a la izquierda corresponde a la simulación de electroforesis en gel de agarosa de la restricción con la enzima HindIII con el programa Snap Gene. Y la figura de la derecha corresponde a la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la restricción con Hind III del pMPJAS01 en el carril 1, podemos identificar en las bandas como son liberados los plasmidos pBTB3 de 3,586 pb y pK18 2,661 pb.

Después de hacer la restricción se ligó con T4 DNA ligasa (ThermoFisher) para circularizar los plásmidos. En seguida, se hizo una segunda restricción con la enzima BgIII, esta enzima reconoce el sitio único en el plásmido pK18. Posteriormente el plásmido restringido se transformó con células químicamente competentes de la cepa de *E. coli* TOP10, y se sembró

en medio selectivo (cloranfenicol). El propósito de hacer la restricción fue que al tener un plásmido linealizado (pK18) con BglII y el otro no linealizado (pBTB3), solamente el plásmido no linealizado será el que podrá transformar correctamente, además, el sembrar en medio selectivo potencializa la obtención de colonias con el plásmido y con una purificación del plásmido por miniprep y una restricción con la enzima AfIII que nos permite corroborar que el plásmido (pBTB3) es el correcto (Figura 38).

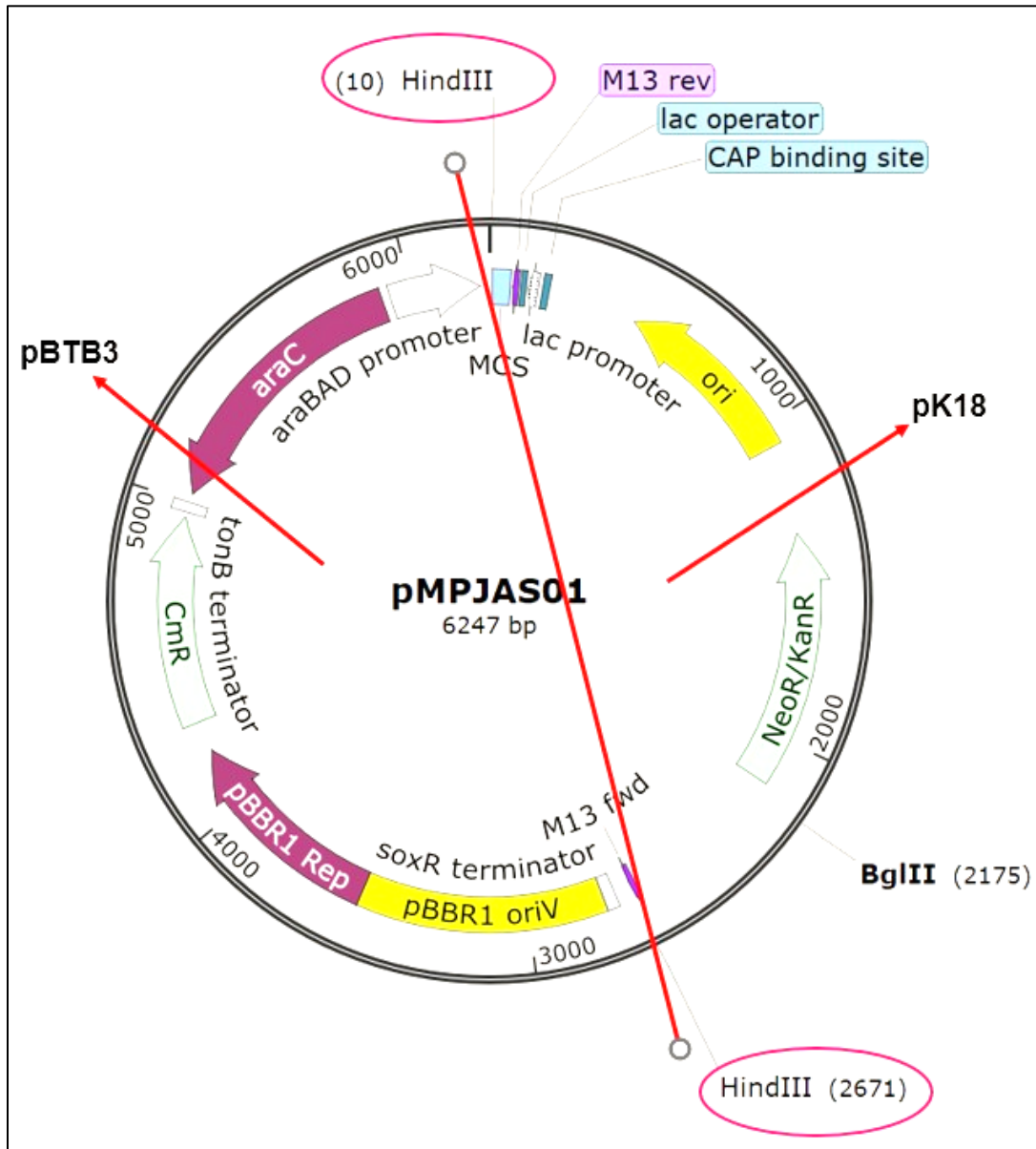


Figura 37. Mapa del plásmido pMPJAS01 marcado con sitios donde la enzima hace la restricción para liberar los plásmidos pK18 y pBTB3.

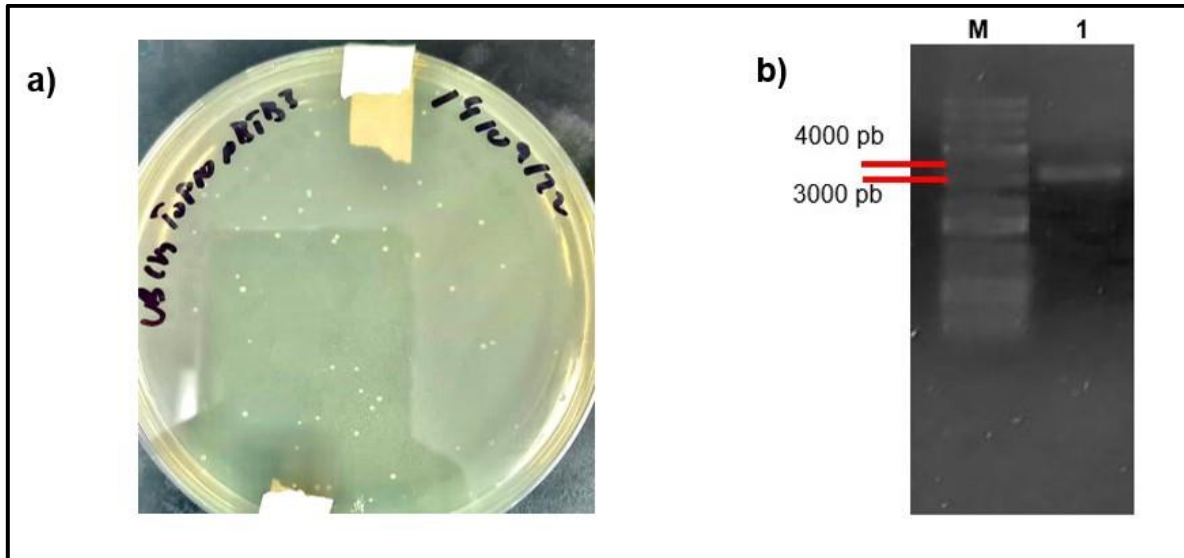


Figura 38. Comprobación de la obtención de pBTB3.

En la figura 38 en a) se observó el crecimiento de colonias transformadas con el plásmido pBTB3 en medio con cloranfenicol y en b) corresponde a la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la restricción de pBTB3 de 3586 pb con la enzima AfIII.

5.3 3^{er} elemento genético RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-attP

Este elemento genético está conformado por tres fragmentos que fueron obtenidos de diferentes fuentes.

5.3.1 RNAPolT7

El amplicón del gen de la RNAPolT7 es de 3,312 pb (Figura 39), que se obtuvo de la cepa de *E. coli* BL21(DE3). Posteriormente se clonó (Figura 40) en pJET1.2/Blunt (ThermoFisher) y se transformó con células químicamente competentes de la cepa de *E. coli* TOP10, ya que el plásmido en el que se clonó le confiere resistencia a ampicilina se usó un medio selectivo con este antibiótico para la propagación de las células transformadas.

Las colonias de las cepas transformadas que crecieron se seleccionaron y se purificaron.

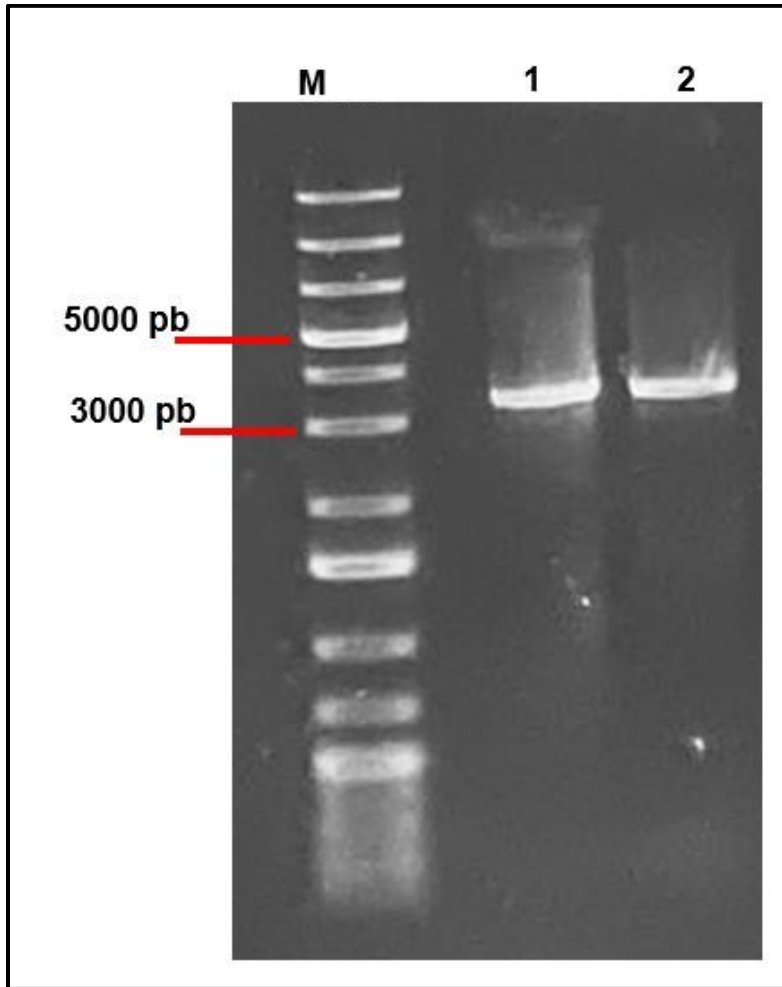


Figura 39. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de amplificación de RNAPolT7.

En la figura 39 se observó en el carril 1 y 2 un bandeo correspondiente a la amplificación de la RNAPolT7 de 3,312 pb y M para el marcador de tamaño GeneRuler 1 kb Plus.

Después de la purificación de plásmido, se comprueba con una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Figura 41) y se selecciona el carril número 7, ya que cuando existe una correcta clonación e inserción del fragmento en pJET1.2/Blunt, nos da un tamaño molecular aproximado a los 6,287 pb. Para confirmar se hizo una amplificación (Figura 41) con los iniciadores AJ05-F y AJ06-R que amplifican la RNAPolT7 (3,312 pb).

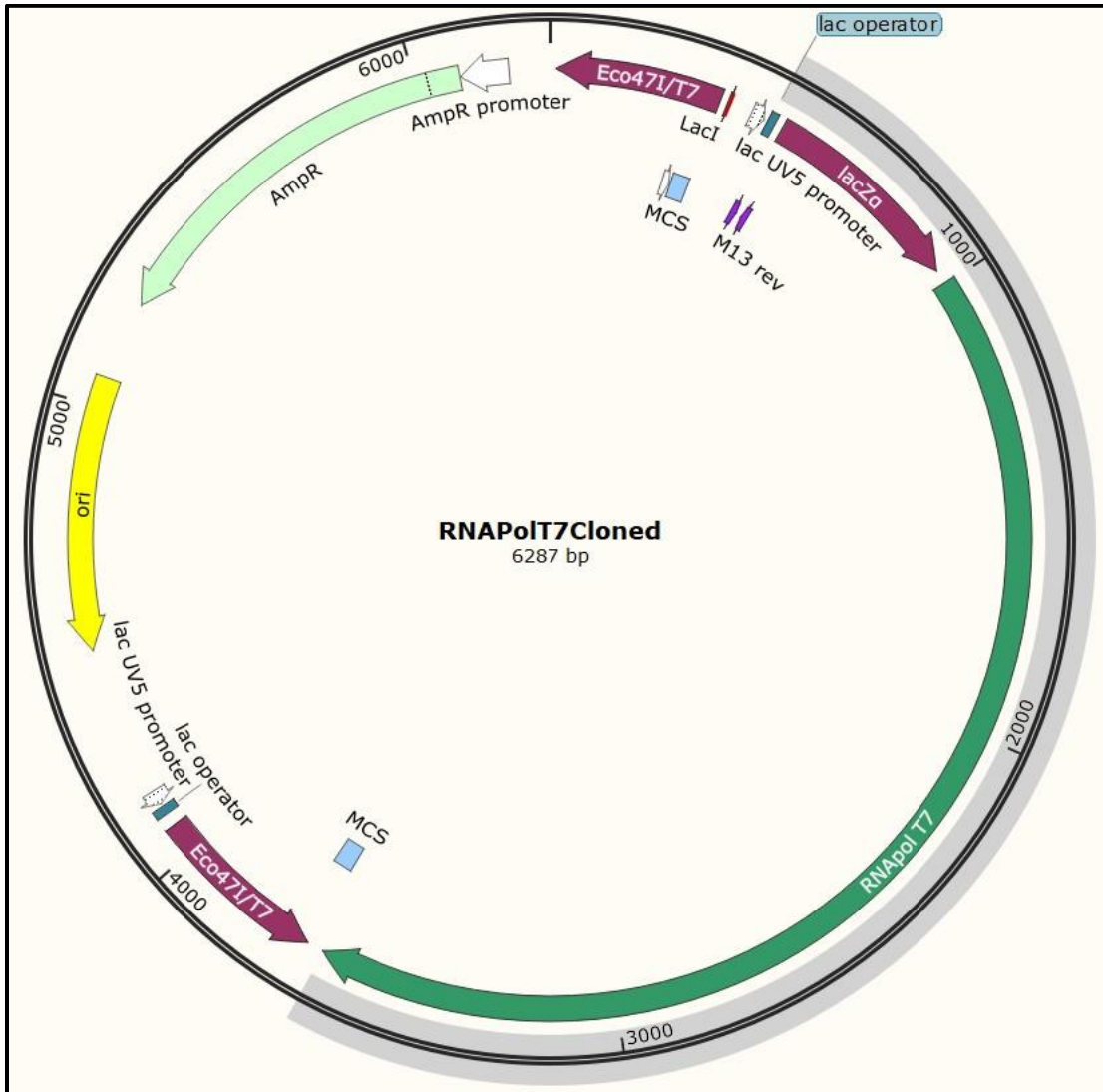


Figura 40. Mapa del pJET 1.2/Blunt. La parte sombreada corresponde a la RNAPolT7.

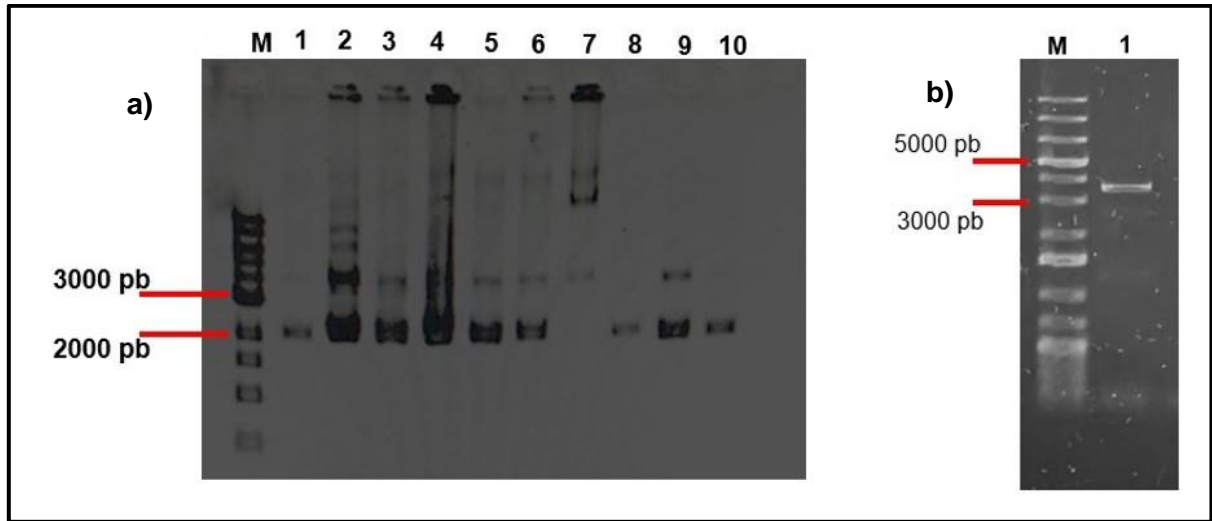


Figura 41. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de la clonación de RNAPolT7 y amplificación de RNAPolT7.

En la figura 41 en a) se observaron los carriles del 1 al 10 la purificación del plásmido (6,287 pb) para detectar en donde se haya clonado satisfactoriamente la RNAPolT7 clonada siendo solamente el carril 7 el seleccionado puesto que presentaba un bandeo correspondiente al deseado por y M corresponde al marcador de tamaño DNA Leader 1kb. En b) se observó la amplificación de RNAPolT7 de 3,312 pb y M corresponde al marcador de tamaño DNA Leader 1kb.

5.3.2 PT7-RBD-RBD'-attP

Los fragmentos PT7-RBD y RBD'-attP los obtuvimos después transformar con células químicamente competentes de la cepa de *E. coli* TOP 10, con el plásmido pUC57a-PT7-RBD y pUC57k-RBD'-attP, se sembraron en medio selectivo de acuerdo con el gen de resistencia de cada plásmido, ampicilina y kanamicina respectivamente. Las colonias de las cepas transformadas que crecieron se seleccionaron y con una extracción por midiprep se hizo una purificación del plásmido.

Para poder unir los fragmentos fue necesario hacer las restricciones parciales por lo que después de hacer diluciones seriadas con la enzima BsaI para la eliminación de los sitios que no eran de nuestro interés, se comprobó con una electroforesis (Figura 42).

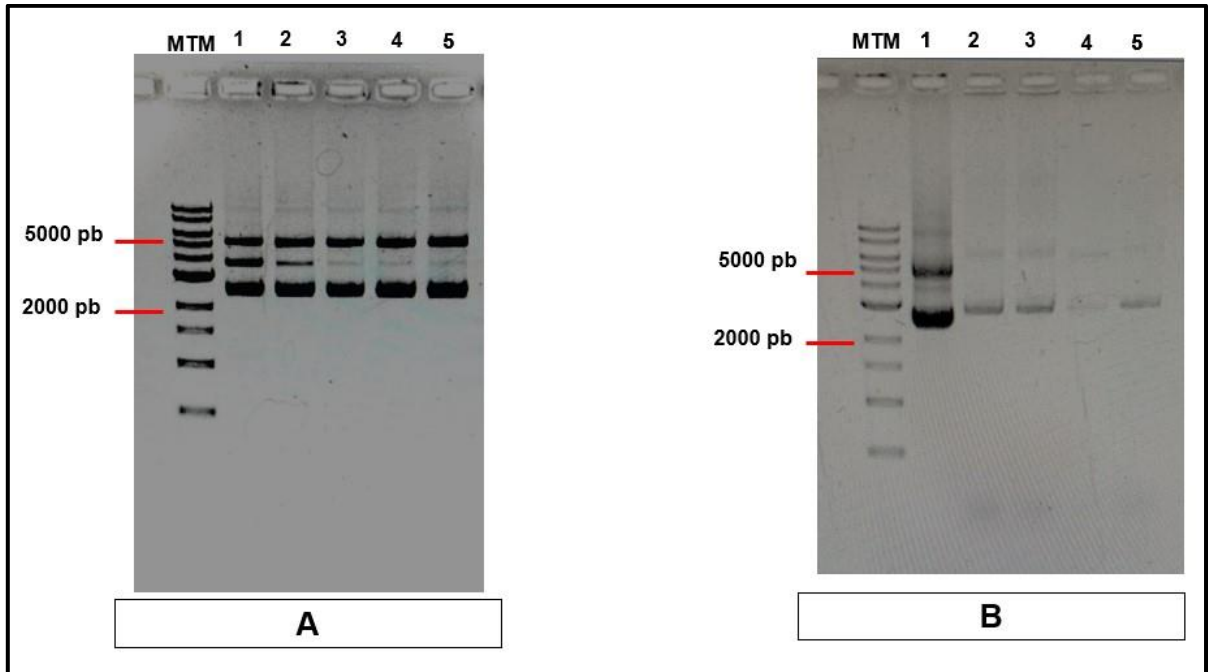
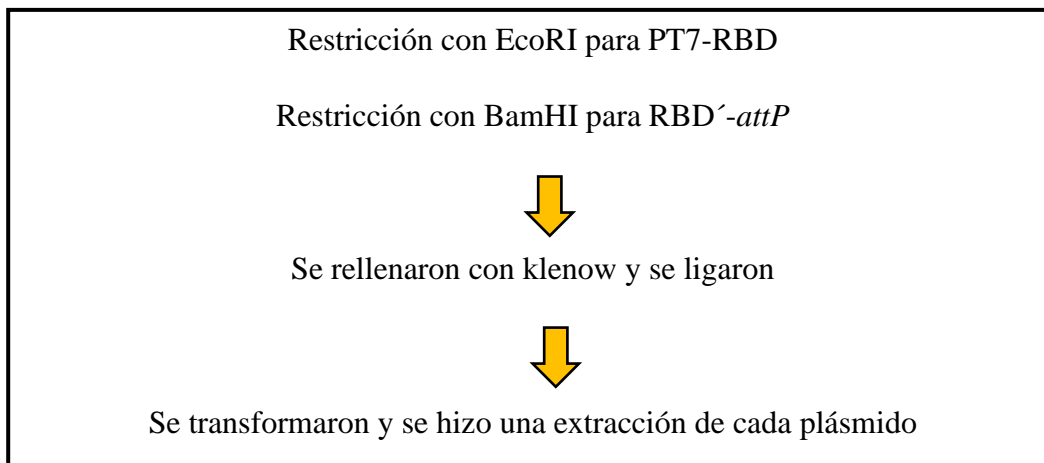


Figura 42. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las restricciones parciales.

En la figura anterior en la imagen A se seleccionaron los carriles 1 y 2 por estar más cercanos a la linealización (3,843 pb) y en la imagen B se seleccionó el carril 1 por estar más cerca a la linealización (3,654 pb).

Después se hizo el siguiente flujo de trabajo:



Se hizo un monitoreo (Figura 43) para observar el comportamiento de la restricción y observar la actividad de estos sitios respecto al sitio que se pretendía eliminar.

De las extracciones se hicieron unas restricciones de confirmación para poder comprobar la eliminación de los sitios, por lo que con BsaI se restringió PT7-RBD para poder observar que de acuerdo con el tamaño el sitio que se planeó eliminar ya no lo tuviera el plásmido y para RBD'-attP se restringió con HindIII, con esta enzima al estar cerca del sitio que eliminamos nos dio un indicativo de que el sitio se eliminó. Por último, se comprobó con una electroforesis (Figura 44) que se haya llevado correctamente esta metodología.

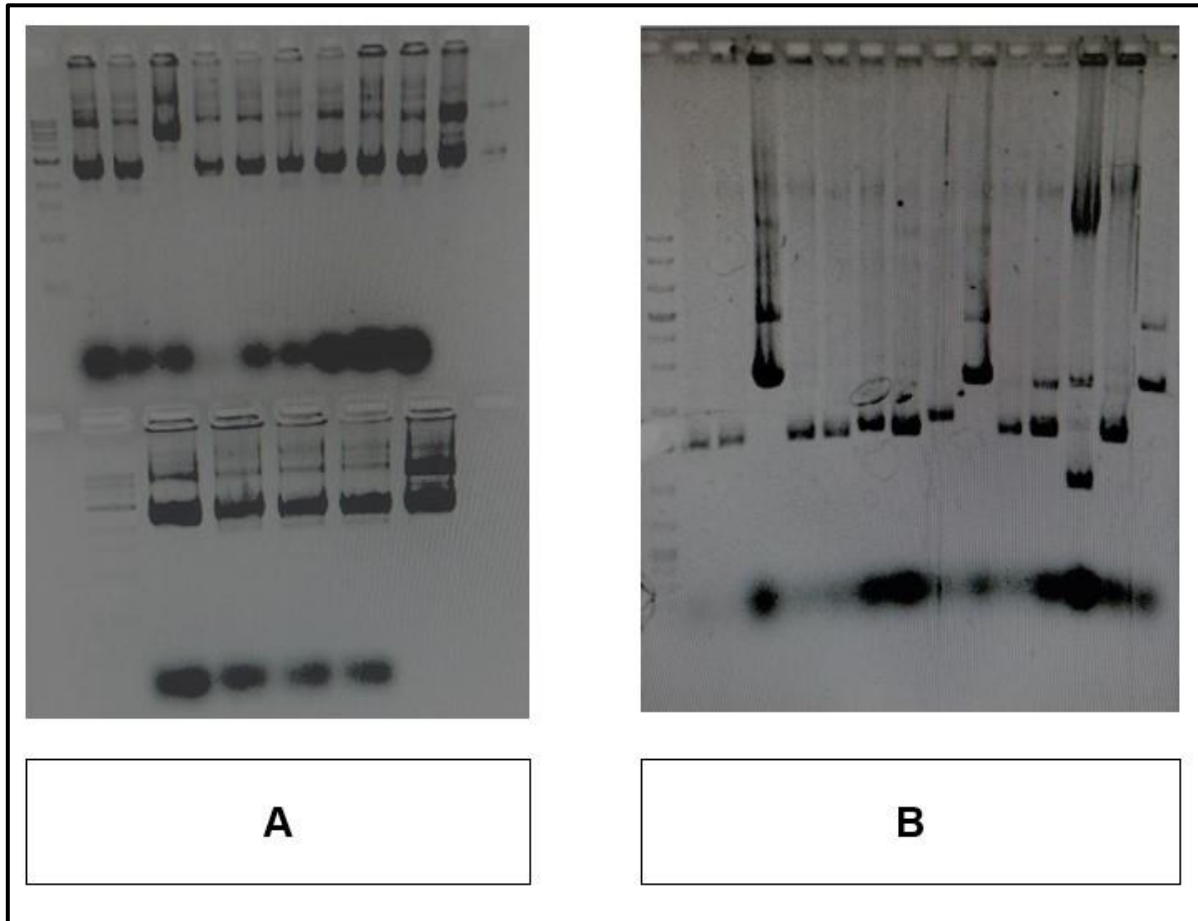


Figura 43. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las extracciones.

Lo que podemos observar en la Figura 43 en la imagen A todos los carriles que corresponden al monitoreo de PT7-RBD después de los procedimientos de restricción parcial con BsaI-rellenado con Klenow-ligado-restricción con EcoRI-Transformación-Extracción y en la imagen B todos los carriles corresponden al monitoreo de RBD'-attP después de la restricción con BamHI-Transformación-Extracción.

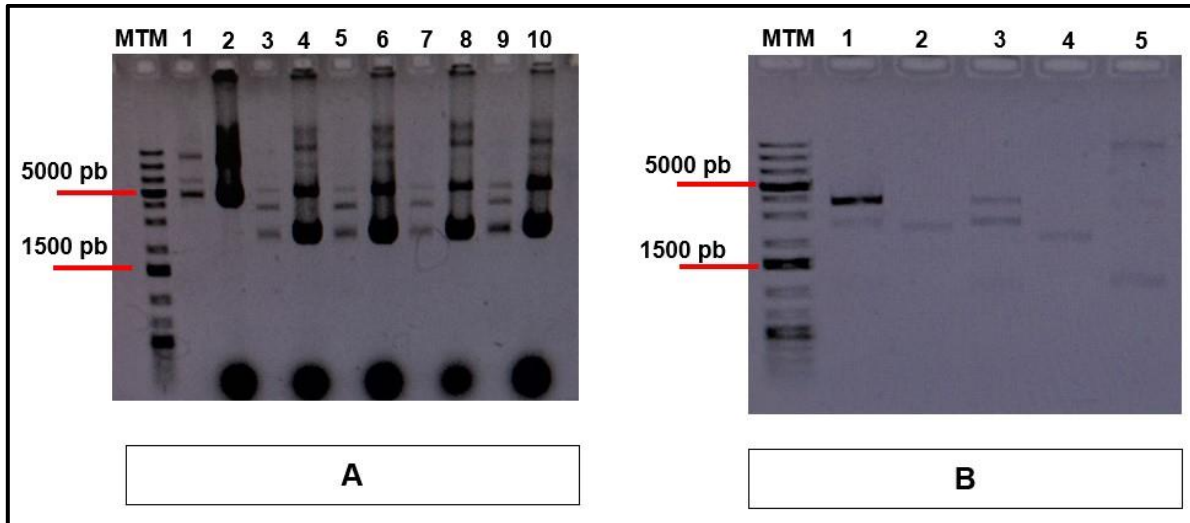


Figura 44. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% de las restricciones:

En la Figura 44 en A es el resultado correspondiente al monitoreo de la restricción con *BsaI* de pUC57a-PT7-RBD de 3,843 pb, siendo el carril 2 el que nos indica la eliminación de los sitios que no eran de nuestro interés. En B corresponde al monitoreo de la restricción *BsaI*+*HindIII* de pUC57k-RBD'-*attP* de 3,654 pb, siendo el carril 1 el que nos da el indicativo de la eliminación de los sitios que no eran de nuestro interés.

6. CONCLUSIONES

- Se diseñó una secuencia que contendría la construcción RNAPolT7-PT7RBD-RBD'-*attP*, ésta contenía los elementos necesarios para la integración en el cromosoma de la cepa de la bacteria *E. coli* BL21.

El diseño de la RNAPolT7-PT7RBD-RBD'-*attP* planteado en este trabajo supone una contribución a los trabajos ya existentes a manera global o para futuros proyectos, pues es parteaguas para futuras investigaciones en el diseño de vacunas.

Para futuros estudios, es conveniente analizar los fenómenos que ocurren en las ligaciones con el objeto de agilizar los tiempos y la eficacia de las uniones y combinado con una estrategia experimental ayudar a la creación de la cepa.

Por último, podemos concluir que el diseño de la construcción es optimista para la integración en el cromosoma de *E. coli* BL21 pese a las limitantes en tiempos y dificultades experimentales.

7. PERSPECTIVAS

- Continuar con la ligación de la RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-*attP* con una enzima que dirija a la PT7-RBD-RBD'-*attP* para ligarse con la RNAPolT7 y propagar la construcción
- Insertar los elementos genéticos por electroporación a la cepa de *E. coli* BL21:
 1. Pneo-*int*
 2. pBTB3
 3. RNAPolT7-PT7-RBD-RBD'-*attP*
- Verificar la inserción mediante PCR colony

8. REFERENCIAS

- Bruce Alberts *et al.* (2006). Replicación, reparación y recombinación del DNA. En *Introducción a la biología celular* (p. 197). Madrid, España: Panamericana.
- Devlin, T. (2000). Recombinación del DNA. En *Bioquímica: Libro de Texto con Aplicaciones Clínicas* (p. 669). Barcelona, España: Editorial Reverte.
- Díaz, Sanchez, Matute & Llumiquinga, (2021). Proteína de la espícula del virus SARS-CoV-2 y su relación con la enzima convertidora de angiotensina-2. *Revista Información Científica*. Retrieved from:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-99332021000500015
- Dominguez & Amador. (2020). El origen de COVID-19: lo que se sabe, lo que se supone y (muy poquito) sobre las teorías de complot. *Revistas UNAM* 31(2).
<https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2020.2.75461>
- Fernández, J. (2020). Nuevo mapa genético del SARS-CoV-2. *Biotech magazine & news*. Retrieved from:
<https://biotechmagazineandnews.com/nuevo-mapa-genetico-del-sars-cov-2/>
- Flores *et al.* (2020). Descripción anatómica de las placas de Peyer en el intestino delgado de la alpaca (*Vicugna pacos*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 31(3). <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.31i3.18175>
- González, F., & Picazo J. (2015). El desarrollo de nuevas vacunas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 33(8), 557-568. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.06.013>
- Hoffmann *et al.* (2020). La entrada de células SARS-CoV-2 depende de ACE2 y TMPRSS2 y está bloqueada por un inhibidor de proteasa clínicamente probado. *Cell*, 181(2):271-280.e8. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Lan *et al.* (2020). Estructura del dominio de unión al receptor Spike del SARS-CoV-2 unido al receptor ACE2. *Nature* **581**, 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>

- Lewin, B. (1993). La recombinación y otras manipulaciones topológicas del ADN. En *Genes: Tomo II* (pp. 873-881). Barcelona, España: Editorial Reverte.
- Parham, P., & Giovanniello, O. (2006). Defensas del cuerpo contra la infección. En *Inmunología* (pp. 247-258). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Passarge, E., & Bumashny, V. (2010). Bases moleculares de la genética. En *Genética: texto y atlas* (pp. 50-53). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Pastian, G. (2020). Presencia y Expresión del Receptor ACE2 (Target de SARS-CoV-2) en Tejidos Humanos y Cavidad Oral. Posibles Rutas de Infección en Órganos Orales, 14(4). <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2020000400501>
- Peña, B., Rincón, B., & Castillo, J. (2020). SARS-CoV-2: aspectos bioquímicos y métodos de diagnóstico. *Nova* vol. 18 no. Spe 35 <https://doi.org/10.22490/24629448.4183>
- Pierce, B. (2009). Replicación y recombinación del DNA. En *Genética: Un enfoque conceptual* (pp. 318-328). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Reina, J. (2020, junio). El SARS-CoV-2, una nueva zoonosis pandémica que amenaza al mundo. *Elsevier*, 21, pp. 17-22.
- Ramiro *et al.* (2008). El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*. 100 (1). (pp. 29-34). Disponible en http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082008000100006&lng=es&tlng=es.
- Saltigeral, P. & León-Lara, X. (2020). Virus SARS-CoV-2 ¿Qué se sabe al momento? *Pediatría Mexicana*, 41, pp. S3-S7.
- Santos, N & Salas, R. (2020). Origen, características estructurales, medidas de prevención, diagnóstico y potenciales fármacos para prevenir y COVID-19. *MedWave* 20(8). <http://doi: 10.5867/medwave.2020.08.8037>
- Simon R., Priefer, U. and Pühler, A. (1983) Un sistema de movilización de amplio rango de huéspedes para la ingeniería genética in vivo: mutagénesis de transposones en bacterias gram negativas. *Bio/Technol.* 1, 784–791
- Thomas, L. (2020). SARS-CoV-2 de neutralización vía la proteína de S. *News Medical*. Retrieved from: <https://www.news-medical.net/news/20200510/10/Spanish.aspx>

- Tolosa, A. (2020). Coronavirus SARS-CoV-2: estructura, mecanismo de infección y células afectadas. Genotipia. Retrieved from: https://genotipia.com/genetica_medica_news/coronavirus-estructura-infeccion-celulas/
- Wang, L., Wang, L. & Zhuang, H. Perfilado y caracterización de la infectividad y antigenicidad de los mutantes del SARS-CoV-2. *Sig Transduct Target Ther* **5**, 185 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00302-8>
- Wu F, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020;579:265–269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3. - [DOI](#) - [PMC](#) - [PubMed](#)

9. ANEXO

9.1 Preparación de células quimiocompetentes por CaCl₂ a 0.1 M y glicerol al 15%

1. De un cultivo de toda la noche inocular con la centésima parte del matraz con el medio de cultivo (200 µl del matraz en 20 ml de medio fresco).
2. Incubar a 37°C por 90 min con agitación vigorosa.
3. Enfriar rápidamente el matraz en un baño de hielo/agua.
4. Colocar en tubos de microcentrífuga (Eppendorf) estériles de 1.5 ml del cultivo frío.
5. Centrifugar por 35 s a 5000 rpm. Descartar el sobrenadante.
6. Agregar 100 µl de una solución fría de CaCl₂ 0.1 M y glicerol al 15%, resuspender haciendo uso de un agitador orbital a máxima velocidad entre 5 y 10 s. Enfriar rápidamente en un baño de hielo/agua.
7. Centrifugar por 25 s a 5000 rpm. Descartar el sobrenadante.
8. Resuspender con 33 µl de la solución fría de CaCl₂ 0.1 M y glicerol al 15%.
9. Almacenar a -70°C.

9.2 Transformación de células quimiocompetentes con cloruro de calcio

1. Descongelar en un baño de hielo las células competentes.
2. Agregar de 1-3 µl del DNA (plásmido). Mezclar suavemente en el seno de la solución bacteriana.
3. Incubar en un baño de hielo/agua por 20 min.
4. Dar un choque térmico a las células, incubando a 42°C por 1 min.
5. Incubar en un baño de hielo/agua por 10 min.
6. Agregar 1 ml de medio LB, incubar con agitación vigorosa por 1 h a 37°C.
7. Sembrar en medio selectivo.
8. Incubar a 37°C toda la noche.

9.3 Medio LB (Luria-Bertani)

Tabla 8 Fórmula para preparar medio LB

Ingredientes	Cantidad
Bacto-"Tryptone" *	10 g
Bacto-Extracto de Levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

* Bacto-"Tryptone" puede ser substituida por peptona de caseína. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH, y agregar 15 g de agar bacteriológico para preparar medio sólido. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.

9.4 Medio Terrific Broth (TB)

Tabla 9 Fórmula para preparar medio TB

Ingredientes	Cantidad
Triptona de caseína	12 g
Extracto de levadura	24 g
K ₂ HPO ₄	9.4 g
KH ₂ PO ₄	2.2 g

Formula por litro

1. Disolver 47.6 g de medio en 1 l de agua destilada. Añadir 4 g de glicerol.
2. Agitar, calentando hasta ebullición para su completa disolución, ajustar a un pH de 7.

3. Distribuir en tubos o frascos.
4. Esterilizar a 121°C por 15 min. El color final del medio es ámbar, ligeramente opalescente.

9.5 Preparación de plásmidos por la técnica modificada de Birnboim y Doly (BD).

9.5.1 Preparación de soluciones BD

Solución I

Tabla 10 Fórmula para preparar la solución I.

Componentes	Volumen (ml)	Concentración final
Tris·HCl (pH 8.0) 1 M	1.25	25 mM
EDTA 0.25 M	2.00	10 mM
Glucosa 1 M	2.5	50 mM
Agua destilada c.b.p.	50.00	

Guardar en refrigeración.

Solución II:

Tabla 11 Fórmula para preparar la solución II.

Componentes	Volumen (ml)	Concentración final
NaOH 1 N	5.00	0.2 N
SDS al 10%	2.50	1.0 %
Agua destilada c.b.p.	25.00	

Guardar a temperatura ambiente no más de dos meses, si se ve floculada, la solución ya no sirve.

Solución III:

Tabla 12 Fórmula para preparar la solución III.

Componentes	Volumen (ml)
Acetato de potasio 5 M	30.00
Ácido acético glacial	5.75
Agua destilada c.b.p.	50.00

Guardar en refrigeración no más de seis meses, el pH debe permanecer aproximadamente en 4.6.

9.5.2 1. Procedimiento para preparación a pequeña escala (miniprep).

1. Obtener un paquete celular de la bacteria con el plásmido que se quiere purificar y resuspenderlo en 150 μ l de solución I BD:

- a) A partir de medio líquido, colocar en un tubo para microcentrífuga, 1.5 ml de un cultivo de toda la noche en el medio selectivo apropiado, centrifugar 1 min en una microcentrífuga, eliminar el sobrenadante, agregar 150 μ l de solución I BD y agitar hasta que se resuspenda el paquete celular.
- b) A partir de un cultivo de toda la noche en medio selectivo sólido, tomar una asada gruesa y resuspenderla en 150 μ l de solución I BD, en un tubo para microcentrífuga.

2. Agregar 300 μ l de la solución II BD y agitar en agitador orbital por 5 ó 10 s y dejar reposar 4 min en un baño de hielo/agua.

3. Agregar 300 μ l de la solución III BD, agitar por inversión unas 100 veces para mezclar perfectamente y dejar reposar en el baño de hielo/agua por 10 min.

4. Centrifugar por 10 min (de preferencia a 4°C) y transferir el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga nuevo y estéril.

5. Agregar 700 μ l de isopropanol, agitar bruscamente por inversión y dejar reposar por 10 a 15 min en el baño de hielo/agua o bien, por 20 min a -20°C.

6. Centrifugar por 15 min (de preferencia a 4°C) y eliminar el sobrenadante.

7. Para eliminar el exceso de sales agregar 1 ml de etanol al 70 %, agitar en agitador orbital por 30 s y centrifugar nuevamente por 5 min, eliminar el sobrenadante.

8. Secar la pastilla calentando a 56 ó 65°C el tiempo requerido y resuspenderla con 40 µl de agua destilada estéril.

El rendimiento es entre 2 y 40 µg de plásmido por preparación, dependiendo del plásmido.

9.6 Electrotransformación *E. coli* BL21

9.6.1 Preparación de células electrocompetentes

1. Dejar un inóculo con la cepa de interés toda noche a 37°C durante toda la noche con agitación.
2. Incubar dos matraces de 50 ml con medio TB con 500 µl del cultivo inoculado y dejar incubando a 37°C por 120 min con agitación vigorosa.
3. Reposar en hielo/agua por 20 min.
4. Transferir a tubos de centrifuga 25 ml de cada matraz inoculado y centrifugar a 4000 rpm por 15 min y descartar el sobrenadante.
5. Resuspender con 25 ml de glicerol al 10% y centrifugar por 20 min a 4000 rpm y descartar el sobrenadante.
6. Hacer un lavado con 12.5 ml de glicerol al 10% y centrifugar en las mismas condiciones del paso anterior y descartar el sobrenadante.
7. Resuspender en 2 ml de glicerol al 10% y agitar suavemente con la pipeta.
8. Transferir el volumen de dos tubos a uno y centrifugar con las mismas condiciones.
9. Resuspender en 600 ó 300 µl* y transferir 100 µl en tubos de 1.5 ml (Eppendorf) y almacenar a -70 µl.

*Dependiendo de la concentración de la biomasa

(Modificado de Sambrook & Russell, 2001)

9.6.2 Transformación de células electrocompetentes

1. Descongelar células electrocompetentes.
2. Mezclar de 1-10 μ l de la solución (plásmido) de DNA (dializada), con 50 μ l de células y colocarlas en una celda de electroporación fría.
3. Colocar la celda en el equipo de electroporación de la marca BioRad modelo MicroPulser y programarlo de acuerdo con el microorganismo que se trabaja (*E. coli*) EcR1 y efectuar la descarga.
4. Pasar la mezcla de la celda a tubos de 1.5 ml (Eppendorf) y agregar de 950 μ l a 1 ml de medio LB e incubar con agitación vigorosa por 1 h a 37°C.
5. Sembrar en medio selectivo e incubar a 37°C preferentemente toda la noche.

9.7 Técnica para rellenar extremos de DNA

Para rellenar los extremos de DNA lineal, se usó el fragmento grande de la DNA Polimerasa I de *E. coli* (Fragmento Klenow).

1. Colocar juntos todos los componentes de la mezcla de reacción según la Tabla 13:

Tabla 13 Fórmula de solución para rellenar extremos de DNA

Material	Volumen (μ l)
DNA de trabajo	De 0.1 a 5.0 μ g
*dNTP's (5Mm c/u)	1.0
Klenow (4 o 5 u/ μ l)	1.0
Agua destilada c.b.p.	De acuerdo con el volumen de trabajo deseado

*dNTPs = dATP, dTTP, dCTP y dGTP.

2. Incubar a 37°C por 10 min, inactivar a 65°C por 20 min. (Sambrook & Russell, 2001).