



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

Expresión de la Proteína de la cápside del Circovirus Porcino en el Virus de Mosaico del Tabaco

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

FRANCISCA PAZ CÁCERES SIEL

Director Dr. Leonardo Sáenz

Profesor patrocinante Dra. Claudia Stange

FECHA

04 de enero de 2021

Santiago – Chile

INFORME DE APROBACION

RESUMEN BIOGRÁFICO



Francisca Paz Cáceres Siel nació el día 12 de agosto de 1992 en la ciudad de Coquimbo. El año 2010 egresó del Liceo N° 7 de niñas de Providencia y el año 2011 ingresó a la carrera de Ingeniería en Biotecnología en la Universidad de Chile. Su unidad de investigación la realizó en el laboratorio de Vacunas Veterinarias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Agropecuarias de la Universidad de Chile bajo la tutela del Dr. Leonardo Sáenz, donde también llevó a cabo su seminario de título.

AGRADECIMIENTOS

Finalizando este largo proceso, quisiera agradecer a quienes me acompañaron y motivaron a cumplir con mi objetivo.

En primer lugar, a mi profesor guía el Dr. Leonardo Sáenz por todo el conocimiento entregado, por su guía y por las múltiples muestras de confianza a lo largo de este proceso. A mi profesora patrocinante, la Dra. Claudia Stange, por la motivación y el apoyo, además de todo lo aprendido durante la carrera y durante el proceso de mi tesis.

A todos mis compañeros con lo que compartí en el Laboratorio de Vacunas Veterinarias Leonardo Santis, Alejandra Loaiza, Alejandra Guerrero, Marcela Molina, John Quiroga, en especial a Daniela Siel, por motivarme a seguir este camino, apoyarme y ser mi modelo a seguir desde que tengo memoria, y a Sonia Vidal, por todo el apoyo, las tiradas de oreja y básicamente por enseñarme y guiarme durante todo mi proceso de tesis y más.

A mis maravillosos amigos, por su apoyo incondicional y creer siempre en mí, Nyna, por las interminables noches de estudio y su increíble amistad, a la patrulla de rescate Matías, Diego y Francisco por apoyarme, acompañarme y estar ahí en todas. A Antonia (con mi Pasco), Alejandra, Anais y Valentina, por ser las mejores amigas que pude pedir, por confiar en mí y motivarme a creer en mis capacidades, junto con mis incondicionales Pía, Romi y Cami.

A mi cubano Dayran Suárez, por apoyarme y motivarme a cerrar este ciclo. Te amo muchísimo y te agradezco eternamente por todo tu apoyo y paciencia.

Por último, gracias a mi familia, principalmente a mis padres, por todas las enseñanzas, por nunca dejar de creer en mí y por acompañarme en cada paso, los amo con toda mi alma y espero hacerlos sentir orgullosos.

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN BIOGRÁFICO.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDOS.....	iv
INDICE DE TABLAS O CUADROS.....	ix
INDICE DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	ii
ABSTRACT	iii
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Uso de vectores virales de plantas para expresión de proteínas recombinantes	3
1.2 Beneficios de la magnificación	4
1.3 Vectores virales.....	7
1.4 Circovirus porcino	10
1.5 Hipótesis:	13
1.6 Objetivo General:.....	13
1.7 Objetivos específicos:	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1 PCR convencional.....	14
2.2 Electroforesis en gel de agarosa y extracción de DNA desde gel de agarosa.....	16

2.3 Digestión con enzimas de restricción	17
2.4 Ligación	18
2.5 Transformación TSS 1X de <i>E. coli</i>	19
2.6 Extracción de DNA plasmidial desde colonia de <i>E. coli</i>	20
2.7 Extracción de DNA plasmidial desde cultivo de <i>E. coli</i>	21
2.8 Secuenciación y análisis de secuencias	22
2.9 Cultivo de plantas <i>N. benthamiana</i>	22
2.10 Preparación de <i>A. tumefaciens</i> competentes	23
2.11 Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	23
2.12 Preparación de medio de agroinfiltración	24
2.13 Agroinfiltración al vacío.....	25
2.14 Extracción de RNA	27
2.15 Síntesis de cDNA.....	27
2.16 Extracción de proteínas.....	28
2.17 Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	28
2.18 Tinción con azul de Coomassie	29
2.19 Tinción de plata	29
2.20 Western Blot	30
RESULTADOS	32

3.1 Desarrollar un vector de expresión que incluya el gen de orf2 de PCV unido a la secuencia codificante para CP de TMV	32
3.1.1 Identificar la secuencia génica del gen orf2	32
3.1.2 Análisis de vectores pTRBO	33
3.1.3 Digestión de orf2 y pTRBO-CP154 con enzimas de restricción.....	34
3.1.4 Ligación.....	36
3.1.5 Transformación <i>E. coli</i>	36
3.1.6 Confirmación de las secuencias.....	37
3.1.7 Secuenciación	40
3.2 Transformar plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> por magnificación con los vectores de expresión.....	45
3.2.1 Obtención de plantas	45
3.2.2 Preparación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competentes	46
3.2.3 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	46
3.2.4 Preparación de medio de agroinfiltración.....	48
3.2.5 Infiltración	48
3.3 Evaluar la expresión de la proteína recombinante TMV-CP:ORF2 en las plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> transformadas por magnificación	49
3.3.1 Observación de las plantas	49
3.3.2 Extracción de RNA y análisis por PCR.....	53

3.3.3 Extracción de proteínas y análisis	57
DISCUSION Y PROYECCIONES	61
CONCLUSIONES	69
BIBLIOGRAFIA	70

INDICE DE TABLAS O CUADROS

Tabla 1. Partidores utilizados.....	14
Tabla 2. Número de colonias de bacterias transformantes obtenidas en cada condición del proceso de ligación; a una razón de vector:inserto de 1:3, 1:5 o vector solo, sin inserto y a una temperatura de 16 o 20°C.....	37
Tabla 3. Condiciones de obtención de colonias transformantes analizadas.....	38

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virus de mosaico del tabaco.....	9
Figura 2. Cambios en índice de mortalidad antes y después del diagnóstico de PMWS en un sitio de producción, reportados por el SAG.....	11
Figura 3. Diagrama de genoma de Circovirus Porcino.....	12
Figura 4. Vectores pTRBO analizados.....	16
Figura 5. Vector pTRBO-CP154:orf2 teórico.....	19
Figura 6. Proceso de agroinfiltración.....	26
Figura 7. Gen de interés orf2 en electroforesis en gel de agarosa.....	32
Figura 8. PCR de vectores pTRBO utilizando vectores trbo.....	34
Figura 9. Doble digestión de vector pTRBO-CPL utilizando enzimas KasI y NotI.....	35
Figura 10. PCR confirmatorio de colonias transformadas.....	39
Figura 11. Análisis de colonia seleccionada utilizando los vectores orf2 y trbo combinados.....	40
Figura 12. Alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación y la esperada para pTRBO-CP154:orf2.....	42
Figura 13. Alineamiento de secuencia esperada para pTRBO-CP154:orf2 y el resultado de la secuenciación desde el partidador trbo f.....	43

Figura 14. Alineamiento de secuencias aminoacídicas pTRBO-CP154:orf2 esperada y obtenida tras la secuenciación con partidior forward, presentadas en el mismo orden en la figura.	44
Figura 15. Alineamiento entre secuencias aminoacídicas de pTRBO-CP154:orf2 y el fragmento obtenido desde la secuenciación, donde (r) corresponde a residuos aminoacídicos.....	45
Figura 16. Plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> preparadas para la agroinfiltración.....	46
Figura 17. Gel de agarosa 1% que contiene los resultados del PCR de las colonias de <i>A. tumefaciens</i> transformantes.	47
Figura 18. Proceso de agroinfiltración.....	49
Figura 19. Control negativo de la agroinfiltración y del medio de agroinfiltración.....	50
Figura 20. Plantas infiltradas con pTRBO-GFP.....	51
Figura 21. Plantas agroinfiltradas con el vector pTRBO-CP154.....	51
Figura 22. Plantas infiltradas con pTRBO-CP154:orf2.....	52
Figura 23. Plantas infiltradas con pTRBO-CP154 y pTRBO-CP154:orf2.....	53
Figura 24. Resultados de PCR con ambos vectores luego del tratamiento con DNAsa.....	54
Figura 25. PCR de cDNA obtenido, utilizando partidiores orf2.....	55
Figura 26. Producto de PCR utilizando gradiente de temperatura entre 56 y 62 °C para los partidiores orf2.	56

Figura 27. PCR de cDNA extraído a partir de plantas infiltradas con pTRBO-CP154:orf2, donde se puede apreciar una banda de 700 pb aproximadamente.....56

Figura 28. Resultado de la tinción por Azul de coomassie.....58

Figura 29. Tinción de plata con dos protocolos distintos.....59

Figura 30. Fotografía de la membrana luego de realizar el Western Blot.....60

LISTA DE ABREVIATURAS

CP: Capsid Protein / Proteína de la cápside	154: <i>A. tumefaciens</i> transformadas con vector pTRBO-CP154
TMV: Virus de Mosaico del Tabaco	O2: <i>A. tumefaciens</i> transformadas con vector pTRBO-CP154:orf2
PVX: Virus de papa X	154/O2: <i>A. tumefaciens</i> co-transformadas con vector pTRBO-CP154 y pTRBO-CP154:orf2
AMV: Virus de Mosaico de la Alfalfa	GFP: <i>A. tumefaciens</i> transformadas con vector pTRBO-GFP
CPMV: Virus de Mosaico del frijol	C: Grupo Control
T-DNA: DNA de transferencia	m.a.i.: Medio de Agroinfiltración
VLP: Virus Like Particle	d.p.i.: Días Post-infiltración
pTRBO: TMV RNA-based overexpression	
ssRNA: RNA de hebra simple	
PCV: Circovirus Porcino	
PCV2: Circovirus Porcino tipo 2	
PCVAD: Enfermedades Asociadas al Circovirus Porcino	
PMWS: Síndrome de Desmedro Multisistémico Post-destete	
MS: Murashige & Skoog	

RESUMEN

El circovirus porcino de tipo 2 (PCV2), es uno de los principales agentes de pérdidas económicas en la industria porcina, pues ataca a lechones generando una serie de afecciones conocidas como enfermedades asociadas al circovirus porcino (PCVAD) y al síndrome de desmedro multisistémico post-destete, llegando a alcanzar en los casos más críticos una mortalidad de hasta 80%. Este virus posee 11 marcos de lectura, siendo ORF1 y ORF2 los más importantes. El gen orf2, de 702 pares de bases, codifica para la proteína de la cápside (CP), cuyo tamaño es de 234 aminoácidos y 27,8 kDa y corresponde a la parte más inmunogénica de PCV2. Debido a esto, y a la falta de herramientas terapéuticas para combatir las enfermedades asociadas, es que la vacunación resulta ser la alternativa más aceptada para su control, utilizando como antígeno la proteína de la cápside Orf2.

Dentro de las técnicas de producción de vacunas, la utilización de vectores virales de plantas para la producción de proteínas de interés productivo ha tomado fuerza, pues resulta ser un proceso eficiente, escalable y de bajo costo. La magnificación es una técnica que utiliza vectores virales de plantas para transformar especies vegetales de manera transiente, por medio de *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) y el proceso de agroinfiltración.

En el presente proyecto de investigación se planteó la expresión de la proteína Orf2 de circovirus porcino, fusionada a las subunidades CP de la cápside del virus de mosaico del tabaco (TMV), obtenidas por medio de la técnica de magnificación en hojas de *Nicotiana benthamiana* (*N. benthamiana*). Para esto se utilizó el plasmidio pTRBO-CP154, el cual posee la secuencia codificante para la cápside de TMV, truncada en el aminoácido 154, y seguido por el sitio de clonamiento donde se insertó la secuencia de interés orf2. A partir de

dicho vector se construyó el plasmidio pTRBO-CP154:orf2, con el cual fue transformada *N. benthamiana*. Posteriormente, se cortaron las hojas y a partir de ellas se realizó extracción de RNA y de proteínas. Si bien, el RNA obtenido fue analizado, encontrando expresión del gen de interés, no fue posible obtener un resultado favorable, pues no se pudo observar por tinción de plata, tinción por azul de Coomassie o western blot, la presencia de la proteína deseada. Por lo que se concluye que los genes de orf2 y cp se están expresando, pero la proteína fusionada no se logra expresar o purificar.

ABSTRACT

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is one of the main agents of economic losses in the swine industry, as it attacks piglets generating a series of conditions known as porcine circovirus associated diseases (PCVAD) and is associated with post-weaning multisystemic wasting syndrome, reaching a mortality rate of up to 80% in the most critical cases. This virus has 11 reading frames, with ORF1 and ORF2 being the most important. The orf2 gene, of 702 base pairs, codes for the capsid protein (CP), whose size is 234 amino acids and 27.8 kDa and corresponds to the most immunogenic part of PCV2. Due to this, and the lack of therapeutic tools to combat associated diseases, vaccination turns out to be the most accepted alternative for its control, using the Orf2 capsid protein as antigen.

Within vaccine production techniques, the use of plant viral vectors for the production of proteins of productive interest has gained strength, as it turns out to be an efficient, scalable and low-cost process. Magniffection is a technique that uses plant viral vectors to transform plant species transiently, by means of *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) and the agroinfiltration process.

In this research project the expression of the porcine circovirus Orf2 protein was proposed, fused to the CP subunits of the capsid of the tobacco mosaic virus (TMV), obtained by means of the magniffection technique in *Nicotiana benthamiana* leaves (*N. benthamiana*). For this, the plasmid pTRBO-CP154 was used, which has the coding sequence for the TMV capsid, truncated at amino acid 154, and followed by the cloning site where the sequence of interest orf2 was inserted. From that vector the plasmid pTRBO-CP154: orf2 was constructed, with which *N. benthamiana* was transformed. Subsequently, the leaves were cut and RNA and protein extraction was carried out from them. Although the RNA obtained was analyzed, finding expression of the gene of interest, it was not possible to obtain a favorable result, since the presence of the protein of interest could not be observed by silver staining, Coomassie blue staining or western blot. Therefore, it is concluded that the orf2 and cp genes are being expressed, but the fused protein cannot be expressed or purified.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, existen numerosos productos biofarmacéuticos e inmunológicos derivados de plantas, tanto experimentales como en el mercado. La producción de proteínas representa la segunda actividad principal dentro de la biotecnología vegetal (Gleba, Tusé, & Giritch, 2013). Estos productos incluyen vacunas, anticuerpos monoclonales y otras proteínas terapéuticas, los que han sido desarrollados por medio de diversas estrategias (Hefferon, 2017).

La primera generación de proteínas obtenidas utilizando la maquinaria de síntesis proteica en especies vegetales, se logró generando especies transgénicas, donde la información genética de la planta era modificada desde su línea germinal con el fin de insertar la secuencia codificante para la proteína de interés acompañada de su respectivo promotor. Sin embargo, esta técnica se enfrentaba a ciertos obstáculos, en primer lugar, el largo tiempo y costo que requería llegar al producto final, en segundo lugar, los problemas asociados a la opinión pública frente a la obtención de productos transgénicos que expresaran dichas proteínas terapéuticas, asociado además a la dificultad para tratar con las diversas agencias reguladoras debido a la preocupación que genera la mantención de cultivos a campo abierto de aquellas especies (Hefferon, 2017).

En respuesta a dichas problemáticas, surgen las primeras tecnologías de transformación transiente, las que no lograron, sin embargo, responder a todas las necesidades del mercado. Si bien se logró disminuir el tiempo empleado, no se ha podido obtener un rendimiento favorable o una tecnología escalable. En este contexto se desarrolla una nueva plataforma, como alternativa para la expresión de proteínas recombinantes en plantas: la magnificación.

Esta técnica consiste en la transformación transiente de especies vegetales utilizando *A. tumefaciens* en una solución diluida para infiltrar plantas completas. De esta manera, gracias a la presencia de un vector viral, se obtiene la propagación célula a célula y un alto nivel de expresión, mientras que la bacteria se encarga de la infección primaria y de abarcar una mayor área de infección, al infiltrarse múltiples áreas de la planta. (Gleba, Klimyuk, & Marillonnet, 2005).

Para esto, resulta de vital importancia el vector a utilizar; dentro de este contexto han resultado particularmente exitosos aquellos que se basan en virus de plantas, por ejemplo, el virus de papa X (PVX), el virus de mosaico de la alfalfa (AMV), el virus de mosaico del frijol (CPMV) y el Virus del Mosaico del Tabaco o TMV por sus siglas en inglés, el que corresponde a un virus pequeño, de estructura icosaédrica y que, debido a la alta tasa de expresión de su proteína de la cápside o CP, ha resultado en la exitosa expresión de proteínas de interés mediante este método (Gleba, Tusé, & Giritch, 2013).

Por medio de esta estrategia, es posible obtener una plataforma con un alto nivel de expresión y rendimiento relativo, un periodo de investigación y desarrollo más acotado y de menor costo, sumado a menores preocupaciones en cuanto a bioseguridad (Gleba, Klimyuk, & Marillonnet, 2005).

En el presente proyecto de estudio se desarrolló la obtención de la proteína Orf2 de circovirus porcino fusionada a las subunidades CP de la cápside del virus de mosaico del tabaco mediante la utilización de vectores virales para plantas y la técnica de magnificación en hojas de *N. benthamiana*.

1.1 Uso de vectores virales de plantas para expresión de proteínas recombinantes

El uso de vectores virales de plantas para expresión de proteínas heterólogas con fines productivos ha mostrado tener ventajas significativas sobre la producción de estas en células animales o en microorganismos como bacterias o levaduras, presentándose como una estrategia segura, confiable, escalable y de bajo costo, sumando a esto la posibilidad de obtener por este medio proteínas plegadas correctamente con sus modificaciones post traduccionales (Shamloul, Trusan, Mett, & Yusibov, 2014).

Dentro de las plataformas de uso de plantas para la producción de proteínas con fines industriales o farmacéuticos, se han desarrollado de manera exitosa aquellos procesos que incluyen transformaciones transientes de las células vegetales, pues son sistemas rápidos, de alto rendimiento, escalables y aceptados de manera positiva por las agencias reguladoras (Gleba, Tusé, & Giritch, 2013).

El mecanismo que se estudia en el presente trabajo de investigación se centra en el uso de vectores virales de plantas, utilizando la capacidad de *A. tumefaciens* para generar transformaciones genéticas transientes en especies vegetales, particularmente en la especie *N. benthamiana*, en la cual se ha descrito que ha resultado especialmente exitosa la agroinfiltración (Shamloul, Trusan, Mett, & Yusibov, 2014).

A. tumefaciens, la bacteria utilizada en este sistema de transformación transiente, posee la particularidad de tener en su interior un plásmido conocido como Plásmido Ti (tumor inducing), responsable de los efectos oncogénicos de esta bacteria (Gelvin, 2008). Este vector posee además una secuencia de DNA conocida como DNA de transferencia (T-DNA) y sus respectivos genes de virulencia. Una vez que la planta sufre daño mecánico, esta libera compuestos fenólicos que llevan a la activación de dichos genes de virulencia, generando

finalmente la transferencia del material genético desde la bacteria a la célula vegetal. Este mecanismo es el que permite utilizar a *A. tumefaciens* como una especie de vehículo en el proceso de síntesis de proteínas de interés (Krenek, y otros, 2015).

Esta plataforma de producción de proteínas recombinantes ha sido aplicada con éxito en diversas ocasiones, donde se ha logrado producir insulina humana para el tratamiento de la diabetes, además de utilizar vectores basados en TMV a escala de laboratorio para producir antígenos, para el desarrollo de prototipos de vacunas contra patógenos como el virus del papiloma humano, *Yersinia pestis*, virus de influenza tipo A, entre otros. Todos sintetizados utilizando *N. benthamiana* (Shamloul, Trusan, Mett, & Yusibov, 2014).

La compañía farmacéutica PharmaGreen LLC, patentó una vacuna producida por medio de magnificación contra la viruela (US 9,694,086 B2, julio 2017), donde se aprovechan las características de esta estrategia como la rápida producción del producto final, su escalabilidad y bajo costo, como las principales ventajas del producto final.

1.2 Beneficios de la magnificación

Tal como se mencionó anteriormente, este sistema de producción de proteínas presenta diversos beneficios en su investigación y desarrollo, tanto en los niveles de expresión proteica obtenida, en la calidad de los productos obtenidos, como en aquellos asuntos que se refieren a la bioseguridad de los procesos implicados y su impacto en el medioambiente.

En primer lugar, se encuentra la capacidad de las plantas de expresar proteínas en su estructura completa, con sus respectivas modificaciones post-traduccionales, plegamiento y ensamblaje de subunidades (Shamloul, Trusan, Mett, & Yusibov, 2014). Esto se suma a diversas ventajas en cuanto a la producción de proteínas respecto a otros mecanismos, al bajo

costo y tiempo que se requiere para su investigación y desarrollo y a menores preocupaciones en cuanto a la bioseguridad del proceso (Chen & Davis, 2016).

Utilizar especies vegetales en lugar de especies microbianas como bacterias o levaduras, supone un menor costo en términos de inversión inicial y una mayor flexibilidad en cuanto al tamaño de los lotes que se pueden generar. A diferencia de las estrategias tradicionales, esta técnica no se limita por restricciones económicas o técnicas como el tamaño del fermentador microbiano. Sumado a esto, la magnificación permite generar la cantidad suficiente para cubrir una demanda de dosis altas y en un corto periodo de tiempo, lo que resulta fundamental en aplicaciones farmacéuticas como, por ejemplo, en la producción de medicina especializada contra enfermedades como Linfoma no Hodgkin, donde resulta de vital importancia reducir el tiempo que transcurre entre la biopsia tumoral y la obtención de DNA, y finalmente la producción de la vacuna, por lo que la producción de los péptidos por medio de esta plataforma significaría una importante mejora (Gleba, Klimyuk, & Marillonnet, 2005).

Un aspecto importante en el desarrollo de cualquier biotecnología es el impacto medioambiental y la bioseguridad tanto para el entorno como para el usuario del producto final. Esta plataforma, al tratarse de una modificación genética transiente, evita el cultivo de especies transgénicas a campo abierto, lo que resultaría de alto impacto medioambiental. Gracias al alto nivel de expresión y al alto rendimiento que se obtiene, es posible llevar a cabo todo el proceso dentro de recintos cerrados, con medidas de seguridad que son simples, efectivas y de relativo bajo costo (Gleba, Tusé, & Giritch, 2013).

Por otro lado, la utilización de plantas como plataforma de síntesis de proteínas de interés, permite asegurar la ausencia de patógenos potencialmente peligrosos para mamíferos, pues

las especies vegetales son incapaces de hospedar dichos microorganismos y también de endotoxinas provenientes de los microorganismos utilizados, lo que demandaría un proceso extra de purificación del producto final. Además, no compromete la identidad de la secuencia codificante para el péptido de interés, pues se ha demostrado que los replicones generados mediante magnificación pasan por pocos ciclos de replicación gracias a la propagación sistémica del vector en las células del hospedero, disminuyendo así la posibilidad de modificaciones genéticas azarosas e indeseadas. Ambos factores mencionados han resultado fundamentales en que la FDA aprobara pruebas clínicas para vacunas contra la influenza de parte de Fraunhofer USA y vacunas individualizadas contra linfoma no Hodgkin de parte de Icon Genetic's IND creadas por esta plataforma, las que se encuentran en investigación (Gleba, Tusé, & Giritch, 2013) (Hefferon, 2017).

Actualmente, la empresa canadiense Medicago, ha obtenido avances significativos en desarrollo de vacunas utilizando esta técnica. Mediante magnificación y utilizando la especie *N. benthamiana* han desarrollado una vacuna contra la influenza, que ya se encuentra en Fase clínica III de su investigación. Además, se encuentra en desarrollo una vacuna contra Rotavirus y Norovirus, las que se encuentran en fase II y I respectivamente. Todas estas aplicaciones se basan en la síntesis de "Virus Like Particles" o VLP por sus siglas en inglés, las que se asemejan a una partícula viral, pero que no resultan ser infecciosos debido a la ausencia de material genético en su interior, pero que si poseen los elementos necesarios para ser reconocidos por el sistema inmune y levantar una respuesta específica.

En síntesis, la aplicación de *A. tumefaciens* como vector bacterial, para insertar plasmidios virales en plantas combina las ventajas de los tres sistemas biológicos; de los virus se aprovecha la velocidad y alta tasa de expresión génica, de *A. tumefaciens* se obtiene la ventaja

de la eficiencia en la transfección y la administración sistémica del plasmidio viral y por último el bajo costo productivo de las plantas, sumado a su variada capacidad sintética, siendo capaz incluso de agregar las modificaciones post-traduccionales necesarias.

1.3 Vectores virales

Las características del plasmidio utilizado durante este proceso resultan de gran importancia para la obtención del producto final deseado, es por esto, que gran parte de los estudios enfocados en optimizar el proceso de síntesis de proteínas utilizando plataformas vegetales, se centran en el diseño de vectores virales para expresión en plantas que permitan obtener mejoras en el sistema (Hefferon, 2017). En este contexto, y con el fin de mejorar la expresión proteica, se han modificado los vectores virales, manteniendo únicamente el gen de interés y ciertos elementos mínimos de su secuencia genética original. Gracias a esto es posible disminuir las limitaciones respecto al tamaño de secuencia de interés que puede soportar el plasmidio, permitiendo sintetizar proteínas foráneas de mayor tamaño, aumentando los niveles de expresión y sobrepasando ciertas restricciones que podría presentar el virus original frente a la planta hospedera y al tejido infectado, por ejemplo, con la formación de virus completos, capaces de infectar a la planta (Gleba, Tusé, & Giritich, 2013). Sin embargo, al remover genes virales del plasmidio, se eliminan también ciertas cualidades de la partícula viral; tales como su capacidad de transportarse o ensamblarse completamente. Esto implica que las partículas virales formadas a partir de estos vectores modificados deban ser entregadas a la planta por diferentes vías, función que cumple la agroinfiltración (Hefferon, 2017).

Según la literatura, se ha observado dentro del sistema descrito anteriormente, que los vectores basados en TMV han resultado exitosos, siendo parte de los procesos de producción

de prototipos de vacunas contra patógenos como *Yersinia pestis*, papiloma humano, influenza tipo A y *Bacillus anthracis* (Mett, Farrance, Green, & Yusibov, 2008).

El vector “TMV RNA-based overexpresion” (pTRBO), basado en TMV como lo indica su nombre, ha resultado de gran utilidad, en sus diversas variaciones. En el caso particular de este plasmidio, mantener ciertos genes como cp, codificante para la cápside del virus, resulta de gran utilidad, debido a la naturaleza repetitiva de la proteína de la cápside y a su alto nivel de expresión (Lindbo, 2007).

La figura 1 muestra un diagrama de TMV. Se puede apreciar, que corresponde a un virus de aproximadamente 300 nm por 15-18 nm, su forma es de cilindro y posee en un genoma de ssRNA (+) de 6395 nucleótidos, envueltos por subunidades de capsid protein o proteína de la cápside (CP). Dichas subunidades se ensamblan en TMV de una manera muy ordenada, por lo tanto, al fusionar péptidos foráneos a esta proteína, estos quedan expuestos hacia la superficie; esto, sumado a la capacidad de CP de activar linfocitos T en mamíferos, hacen de este virus un vector potencial para la expresión de proteínas de interés en el desarrollo de nuevas vacunas, ya sea formando VLP que posean la proteína de interés fusionada a CP, o aprovechando la alta tasa de expresión de dicha proteína, al reemplazarla en el plasmidio por la secuencia codificante para un péptido de interés, de tal manera de generar una proteína soluble (Jiang, y otros, 2006).

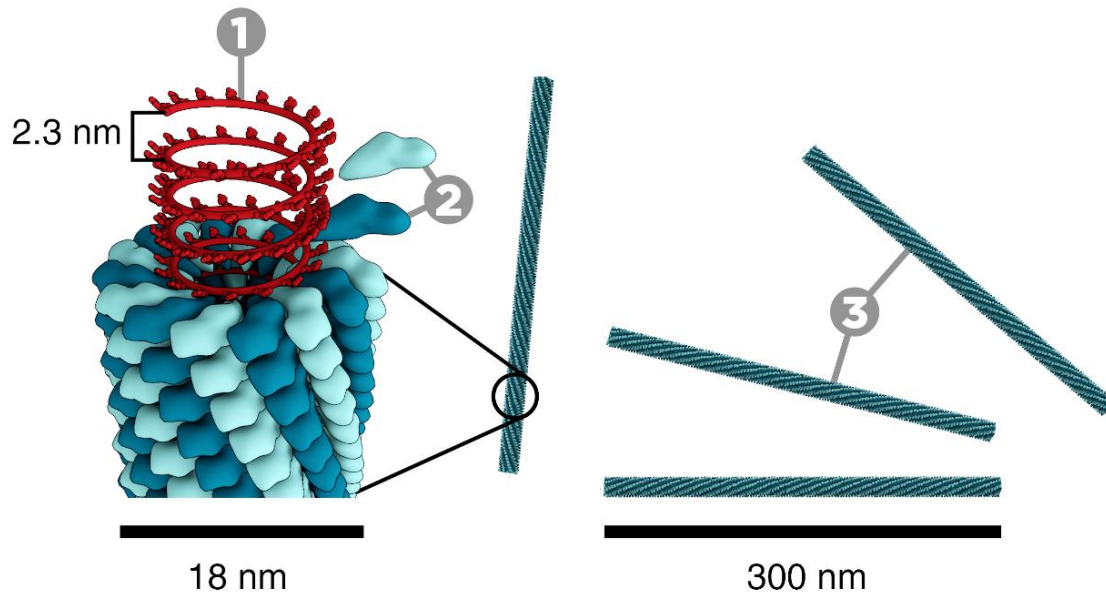


Figura 1. Estructura del virus de mosaico del tabaco. En (1) se observa el genoma del virus, correspondiente a una cadena simple de RNA. En (2) se muestran las subunidades CP de la cápside, ordenadas y de manera repetida, lo que se muestra en azul y celeste, ambos colores representando la misma proteína. Finalmente, en (3) se observa el virus con su cápside completa. (Spletstoesser, 2012)

El vector usado en el presente trabajo de investigación es pTRBO-CP154, este vector deriva del vector pTRBO, al que se le ha mantenido la secuencia génica de la proteína de la cápside, pero truncada en el aminoácido 154, eliminando los 6 últimos de la secuencia proteica. Este vector ha demostrado expresar exitosamente secuencias génicas más largas, al insertar el gen de interés en el sitio de corte NotI/KasI, en el terminal 3' de la secuencia de gen cp (Jiang, y otros, 2006). De esta forma, se sintetiza la proteína esperada fusionada a la cápside del TMV, en el extremo del péptido CP.

1.4 Circovirus porcino

La técnica de uso de vectores virales de expresión en plantas utilizando *A. tumefaciens* ha permitido crear prototipos de vacunas también en el área de la biotecnología veterinaria para distintas enfermedades, tales como diarrea viral bovina (Nelson, Marconi, Periolo, La Torre, & Álvarez, 2012) y la enfermedad de la lengua azul que ataca a rumiantes (Thuenemann, Meyers, Verwey, Rybicki, & Lomonossoff, 2013), proyectándose así, como un proceso factible y eficiente para combatir diferentes patógenos que afectan a animales.

Dentro de estos patógenos se encuentra el virus de Circovirus porcino (PCV), este virus se encuentra en distintos tipos, siendo el de tipo 2 (PCV2) uno de los principales agentes infecciosos causante de las mayores pérdidas económicas y productivas en la industria porcina (Ellis, 2014).

PCV2 es el responsable de múltiples afecciones conocidas como enfermedades asociadas a circovirus porcino (PCVAD), y se ha identificado como el principal agente etiológico del síndrome de desmedro multisistémico post-destete (PMWS) que genera pérdida de peso, debilitamiento corporal general y efectos inmunosupresivos que dejan al infectado susceptible a adquirir otras enfermedades o infecciones, también incluidas dentro de las PCVAD (Noriega, Reyes, & Bucarey, 2007). Este virus ataca principalmente lechones de entre 5 y 18 semanas de edad con una mortalidad por enfermedades asociadas que oscila entre 15 y 20%, pero que ha alcanzado hasta 60 u 80% en casos más críticos (Lv, Guo, & Zhang, 2014) generando un fuerte impacto económico dentro de la industria porcina.

En Chile, se diagnosticó por primera vez un caso de PMWS en el año 2006, según lo reportado por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) en su boletín del año 2009 dedicado a este virus (Estrada, 2009) y hasta la fecha de emisión del documento, se habían reportado 23

sitios productivos afectados por este patógeno a lo largo del país. Se puede observar en la figura 2, el aumento en la tasa de mortalidad en planteles de producción antes y después del diagnóstico de PMWS. Pese a que no se informa a qué corresponde el eje de las abscisas, se puede observar un aumento del porcentaje de mortalidad en un determinado sitio de producción al diagnosticarse la presencia del virus.

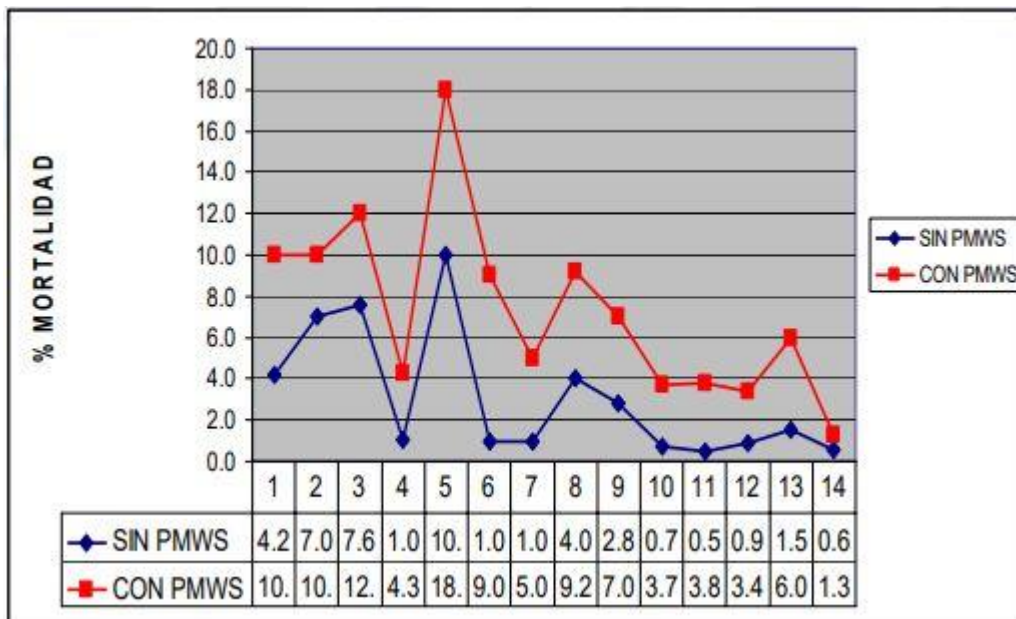


Figura 2. Cambios en índice de mortalidad antes y después del diagnóstico de PMWS en un sitio de producción, reportados por el SAG. En color azul se muestra el porcentaje de mortalidad previo al diagnóstico y en color rojo, luego del diagnóstico (Estrada, 2009).

Estos virus son lo más pequeños conocidos con la capacidad de replicarse autónomamente en células de mamíferos (Ellis, 2014). Son virus icosaédricos, sin envoltura vírica y de 17 nm de diámetro, tienen un genoma simple, conformado por una hebra de DNA circular cerrada y de 1766-1768 nucleótidos. Posee 11 marcos de lectura siendo orf1 y orf2 los principales, que se encuentran orientados en dirección opuesta como se observa en la figura

3, es por esto, que el RNA viral de orf2, junto con el de orf3 y orf4, son transcritos desde la hebra de cDNA (Lv, Guo, & Zhang, 2014).

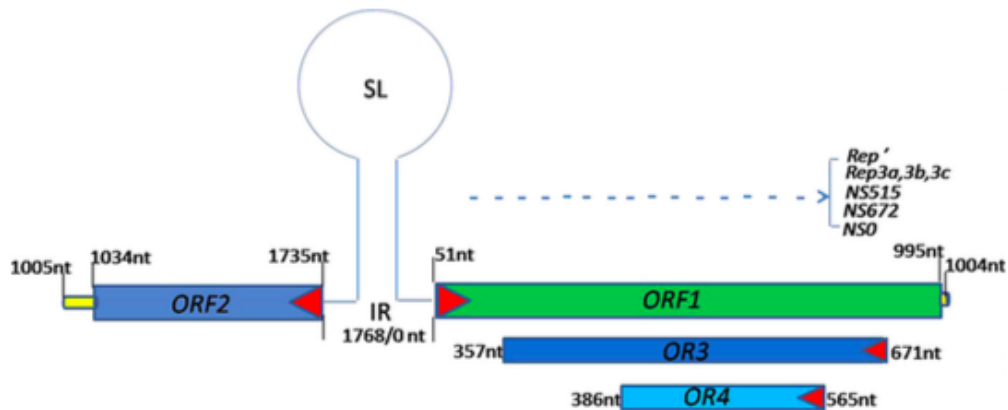


Figura 3. Diagrama de genoma de Circovirus Porcino. Las flechas de color rojo muestran la dirección en la que están codificados los marcos de lectura. (Lv, Guo, & Zhang, 2014).

El gen orf2 se compone de 702 nucleótidos y es el que codifica para la proteína de la capsida del virus, cuyo tamaño es de 27,8 kDa y que posee 234 aminoácidos. Esta proteína corresponde a la parte más inmunogénica del virus, además de ser capaz de formar de manera independiente estructuras icosaédricas, como se ha demostrado previamente (Lv, Guo, & Zhang, 2014). Debido a esto, estudios previos y diseños potenciales de vacunas contra PCV2 se centran en esta proteína en particular.

Con todo esto, debido al gran impacto económico de PCV2 en la industria porcina y a que no existen herramientas terapéuticas eficientes contra esta enfermedad, la vacunación se considera la mejor alternativa para su control (Ellis, 2014).

Considerando la importancia de las pérdidas provocadas por circovirus porcino en la industria porcina, la utilización de vacunas para combatir dicha enfermedad y debido a los beneficios que presenta la técnica de producción de vacunas por medio de vectores virales

en plantas, particularmente la utilización de la plataforma de magnificación con este fin, se plantea a posibilidad de utilizar este procedimiento para expresar la proteína Orf2 de PCV2, unida a la CP del TMV y proyectar estos resultados hacia la producción de una vacuna contra este patógeno.

1.5 Hipótesis:

Dado que el vector pTRBO-CP154 permite el clonamiento y expresión de proteínas heterólogas asociadas al virus de mosaico del tabaco (TMV), es posible la coexpresión de la proteína Orf2 en la cápside del TMV.

1.6 Objetivo General:

Expresar la proteína de la cápside del circovirus porcino unida a la proteína de la cápside de TMV mediante la magnificación de *Nicotiana benthamiana*.

1.7 Objetivos específicos:

1. Desarrollar un vector de expresión que incluya el gen de orf2 de PCV unido a la secuencia codificante para CP de TMV
2. Transformar plantas de *Nicotiana benthamiana* por magnificación con los vectores de expresión
3. Evaluar la expresión de la proteína recombinante TMV-CP:Orf2 en las plantas de *Nicotiana benthamiana* transformadas por magnificación

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 PCR convencional

Se realizó PCR convencional con la enzima Taq RBC Polimerasa (RBC Bioscience, New Taipei City, Taipei, China), con el fin de amplificar las secuencias de interés, siguiendo las indicaciones del fabricante, donde se especifica una concentración de dNTPs de 0,1 μ m, de partidores F y R de 0,2 μ m, Mg^{2+} a una concentración de 1,5 mM y de 1,25 unidades de la enzima polimerasa. Para los PCR efectuados se utilizó dos sets de partidores, especificados en la Tabla 1.

Tabla 1. Partidores utilizados

Nombre	Secuencia	Tm	Enzima de restricción ¹
orf2 F	5'-AAG <u>GCG CCA</u> TGA CGT ATC CAA GGA G-3'	56 °C/	KasI
orf2 R	5'-GGG <u>GCG GCC GCC</u> TGA ATT GTA CAT ACA TGG-3'	62° C	NotI
trbo F	5'-TAA TGA ACT GGT TCG TGG AAC-3'	56°C	-
trbo R	5'-TTG ACT ACC TCA AGT TGC AG-3'		-

¹ Los partidores orf2 r y f poseen sitios de corte para determinadas enzimas de restricción, estos sitios de corte se observan en la secuencia subrayada de la columna “Secuencia”.

Para ambos sets de partidores, se determinó en primer lugar la temperatura de alineamiento o Tm mediante PCR. Esta se definió utilizando como referencia lo sugerido por el fabricante de los partidores y a partir de eso, se realizó una gradiente con temperaturas mayores a esta

en un PCR, llegando a la T_m especificada en la tabla 1 como la temperatura con la que se trabajaría.

El PCR se efectuó en un termociclador modelo Swift Maxi, marca Esco, utilizando los siguientes parámetros para ambos sets de partidores: la denaturación inicial se llevó a cabo a 94°C durante 5 minutos, luego se realizó 35 ciclos de 30 segundos a 94°C de denaturación, 30 segundos a la temperatura de alineación, definida por los partidores utilizados, y 1 minuto a 72°C para la elongación; por último, la elongación final se realizó a 72°C durante 5 minutos.

Como parte del trabajo previo, en el marco de la unidad de investigación, se obtuvo el vector pGEM-T Easy:orf2 (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), que contiene dentro de su sitio múltiple de clonamiento el fragmento de interés orf2. A partir de este plasmidio, se realizó PCR, utilizando el protocolo para la Taq Polimerasa RBC y los partidores orf2 F y R, con el fin de amplificar la secuencia de interés con los sitios de corte para las enzimas de restricción NotI y KasI, que serán utilizados en la ligación posterior.

Con el fin de expresar el gen de interés orf2, se busca subclonar este, obtenido a partir de PCR como se mencionó anteriormente, dentro de un vector viral de expresión en plantas.

Inicialmente, el subclonamiento se intentó utilizando el vector pTRBO-CPL, sin embargo, se analizaron también los plasmidios TRBO disponibles mediante PCR, con el fin de escoger el vector más indicado para este proceso (Figura 4).

Para esto, se utilizó los partidores “trbo” F y R para analizar los siguientes plasmidios disponibles:

- pJLTRBO
- pTRBO-GFP

- pTRBO-CPL
- pTRBO-CP154

El plasmidio pJLTRBO, tal como se puede observar en la figura 4, posee múltiples sitios de digestión con enzimas de restricción, además porta el gen de resistencia a kanamicina y carece del gen codificante para la proteína de la cápside de TMV. Los otros tres vectores derivan de pJLTRBO; pTRBO-CPL es resultado de la inserción del gen codificante para la cápside, junto con una secuencia “linker” (GGGGS)₃, pTRBO-CP154 también posee el gen codificante para la cápside de TMV pero truncada en el aminoácido 154, por último, pTRBO-GFP consiste en el vector pJLTRBO con el gen codificante para la proteína fluorescente verde (GFP) en el sitio múltiple de clonamiento.

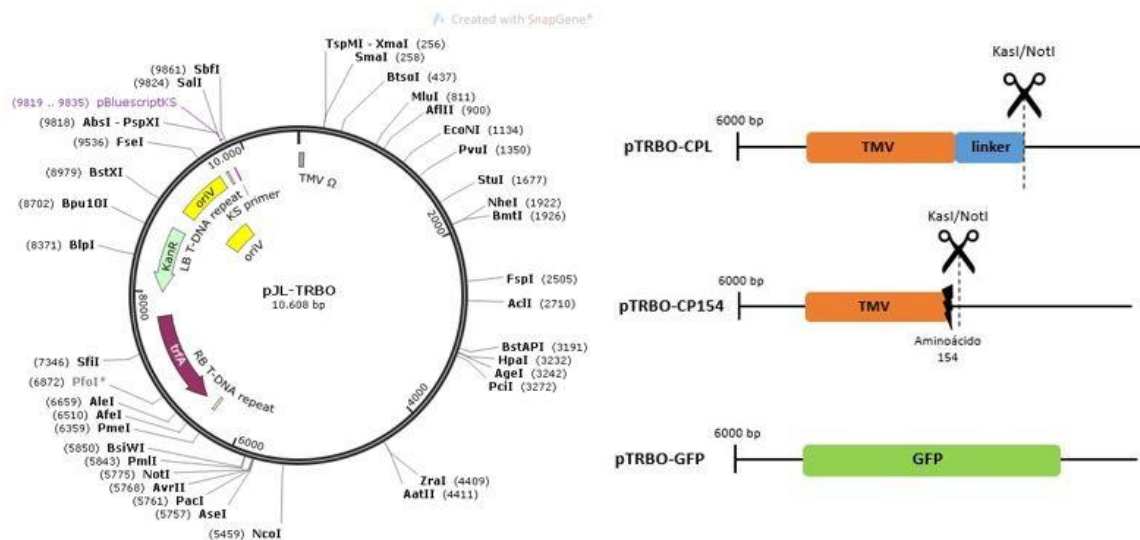


Figura 4. Vectores pTRBO analizados. En pJLTRBO se observa en color celeste el gen de resistencia a kanamicina que poseen los cuatro plasmidios.

2.2 Electroforesis en gel de agarosa y extracción de DNA desde gel de agarosa

El material genético obtenido mediante PCR, fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE y posteriormente extraído desde el gel utilizando el kit comercial

“Zymoclean Gel DNA Recovery” (Zymo Research, Irvine, California, EE.UU.), según las especificaciones del fabricante, protocolo que permite separar mediante columna de afinidad el DNA del gel.

2.3 Digestión con enzimas de restricción

Las secuencias genéticas correspondientes a orf2 y pTRBO-CP154 fueron tratadas con dos enzimas de restricción en tres condiciones diferentes:

- Corte con NotI y luego con KasI
- Corte con KasI y luego con NotI
- Doble digestión con NotI y KasI simultáneamente.

Para los primeros dos casos, se cortó con una enzima, el producto fue separado en gel de agarosa y extraído desde el gel y tratado posteriormente con la otra endonucleasa. En el tercer caso mencionado, la digestión se realizó simultáneamente con NotI y KasI. Para esto, fue necesario definir el mejor buffer de digestión y el protocolo indicado para utilizar con ambas enzimas.

Siguiendo las indicaciones de los fabricantes, se probó con el Buffer Tango (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y con NEBuffer 3.1 (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.), utilizando como DNA templado el vector pTRBO-CPL (500 ng para una reacción de 50 μ l).

Todos los cortes enzimáticos se realizaron durante 16 horas a 37 °C, luego las enzimas fueron inactivadas a 80 °C durante 20 minutos.

Una vez definido el protocolo y el buffer, se realizó la doble digestión enzimática con KasI y NotI a las muestras de orf2 y pTRBO-CP154. Los productos de este proceso fueron

separados mediante electroforesis en gel de agarosa para verificar que la digestión se realizó exitosamente, luego, con el fin de desalinizar las muestras, se concentraron utilizando el kit “DNA Clean & ConcentratorTM-5” de la marca Zymo Research (Zymo Research, Irvine, California, EE.UU.) según las indicaciones del fabricante.

La concentración de las muestras de DNA obtenidas se midió utilizando un espectrofotómetro EPOCH (BioTek, Winooski, Vermont, EE.UU.) y mediante el Software Gel Analyzer 2010a. Para este último método, se cargaron las muestras obtenidas en un gel de agarosa de 1% y se separaron mediante electroforesis. Luego, tomando como referencia las concentraciones conocidas de cada banda del ladder de carga HyperLadderTM 1 Kb (Bioline, Londres, Reino Unido), se calculó la concentración de la muestra basándose en la intensidad de la banda en el gel.

2.4 Ligación

Para ligar los fragmentos de orf2 y pTRBO-CP154 cortados con las enzimas de restricción y construir el vector pTRBO-CP154:orf2 (figura 5) se probaron distintas condiciones. En primer lugar, para la cantidad de vector e inserto se utilizaron las razones 1:3 y 1:5 respectivamente, en ng de DNA.

Ambas razones se probaron incubando durante toda la noche y en tres condiciones distintas de temperatura. En primer lugar, se intentó realizar a ligación con una temperatura de 4 °C, luego se modificó el protocolo y se comenzó a trabajar con las temperaturas de 16 °C y 20 °C.

Todas estas condiciones se replicaron para el vector pTRBO-CP154 vacío y para el mismo plasmidio con el inserto o gen de interés orf2. El proceso de ligación se llevó a cabo utilizando

la enzima Ligasa T4 (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) siguiendo el protocolo indicado por los fabricantes.

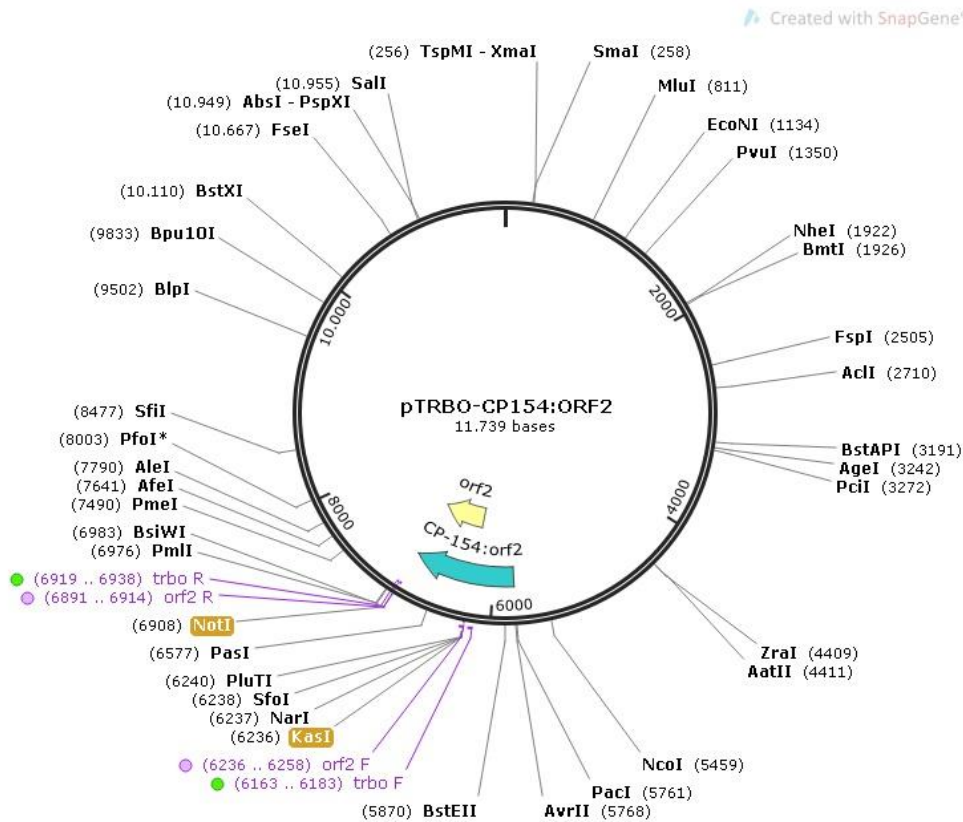


Figura 5. Vector pTRBO-CP154:orf2 teórico. En amarillo se muestra el gen orf2 y en azul el gen de la proteína de la cápside CP unido a orf2. En los círculos morados y verdes se aprecian los partidores orf2 F y R y trbo F y R, respectivamente, en sus sitios de empalme.

2.5 Transformación TSS 1X de *E. coli*

Bacterias de la cepa JM109 de *E. coli* fueron transformadas con el vector obtenido de la ligación realizada previamente, incluyendo el ensayo de vector solo y el control negativo sin ligación. Esto se realizó siguiendo el “protocolo de transformación química TSS 1X” (Chung, Niemela, & Miller, 1989). El cual consta brevemente de: se dejó un inóculo en medio LB creciendo durante la noche a 37 °C y 220 rpm de agitación, al día siguiente se agregó 100 µl

de este inóculo a 5 ml de caldo tibio y se incubó en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6. Una vez obtenida la concentración necesaria se tomó una alícuota de 1 ml del crecimiento por transformación y se centrifugó 1 minuto a 10000 g, se descartó el sobrenadante. El pellet se mantuvo a 4 °C, fue resuspendido en 100 μ l de TSS1X y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se agregó 5 μ l de la ligación y se incubó la muestra durante 1 hora en hielo, posteriormente se dio un golpe térmico de 45 segundos a 42 °C e inmediatamente se volvió a poner las muestras en hielo, donde se mantuvieron por 3 minutos. Luego se agregó en cada tubo 1 ml de caldo LB o SOC, estos se incubaron durante 1 hora a 37 °C y a 220 rpm de agitación para finalmente ser plaqueados en medio selectivo LB agar suplementado con Kanamicina (50 μ g/ml) e incubados a 37 °C, durante la noche y sin agitación.

Se sembraron dos placas por cada grupo y se agregó para cada condición un control negativo, teniendo un total de 18 placas Petri.

2.6 Extracción de DNA plasmidial desde colonia de *E. coli*

Todas aquellas colonias que crecieron frente a kanamicina fueron las que adquirieron el vector (solo o con el inserto) durante la transformación. Estas colonias fueron numeradas y aisladas para crecer en medio LB líquido con la misma concentración de kanamicina. Se extrajo cuidadosamente la colonia desde la placa Petri y se depositó dentro de un tubo Eppendorf de 2 ml con 1 ml del medio selectivo. Estos cultivos quedaron durante toda la noche a 37 °C con 200 rpm.

A partir de los inóculos se extrajo el DNA de cada colonia, para esto se centrifugó 50 μ l del cultivo a 10000 g, descartando el sobrenadante. Se agregó 100 μ l de agua destilada y se

calentaron las muestras a 95 °C durante 5 minutos, estas fueron finalmente centrifugadas a 10000 g por 5 minutos, obteniendo como resultado el DNA en el sobrenadante.

Las colonias obtenidas fueron enumeradas del 1 al 16, de las cuales no todas fueron analizadas, se seleccionó seis, correspondientes a las colonias 2, 4, 6, 10, 12 y 16, con el fin de seleccionar bacterias transformadas en distintas condiciones. Estas colonias fueron analizadas mediante PCR con los partidores trbo, esperando que el distinto tamaño del amplificado indique la presencia del vector solo, en caso de haber una banda de aproximadamente 100 pb o del vector transformado, en caso de encontrarse un amplificado de aproximadamente 700 pb.

El producto de este PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE 1X.

La colonia seleccionada fue analizada nuevamente por PCR y electroforesis, pero esta vez combinando los partidores orf2 y trbo:

1. F trbo y R orf2
2. F orf2 y R trbo

En donde se esperaba una banda de aproximadamente 700 pb, correspondiente a orf2 en ambos casos. El resultado de este PCR fue separado en gel de agarosa 1% en TAE 1X.

2.7 Extracción de DNA plasmidial desde cultivo de *E. coli*

Con el fin de obtener el DNA plasmidial a partir de las bacterias transformadas, se preparó un inóculo de 50 ml de caldo LB con kanamicina (50 µg/ml) con la colonia transformante y se realizó la extracción utilizando el kit comercial “innuPREP Plasmid MIDI Direct Kit” (Analytikjena, Jena, Alemania) según las indicaciones del fabricante.

2.8 Secuenciación y análisis de secuencias

Con el fin de comprobar que la transformación fue exitosa, se mandó a secuenciar el plasmidio extraído a partir de la colonia 4, luego de extraerlo del cultivo de *E. coli* donde se encontraba. El DNA obtenido fue enviado al servicio de secuenciación de la Universidad Católica de Chile, donde se utiliza la tecnología ABI PRISM 3100 para fines de secuenciación a partir de plasmidios.

La secuencia obtenida fue analizada y comparada con la secuencia conocida para orf2, junto con TMV cortado en el aminoácido 154, por medio de dos software diferentes. Jalview 2.11.0 se utilizó para alinear ambas secuencias, pues este programa trabaja directamente con Clustal W y Clustal X, versión 2.0. En primer lugar, se realizó alineamiento de las secuencias nucleotídicas y luego de sus secuencias aminoacídicas. Posteriormente, se usó el Software DS Gene para realizar los mismos alineamientos y corroborar los resultados obtenidos.

2.9 Cultivo de plantas *N. benthamiana*

Las plantas utilizadas para la infiltración corresponden a la especie *Nicotiana benthamiana*. Para obtenerlas se sembraron semillas en tierra de hojas dentro de cubetas de 5x5 cm para la germinación. Cuando alcanzaron el tamaño adecuado, es decir, cuando ya presentaban 4 hojas, fueron transplantadas a macetas de mayor tamaño (diámetro de 12 cm). Una vez en la maceta, fueron regadas 3 veces a la semana y suplementadas semanalmente con 50 ml de medio Murashige & Skoog (MS) a una concentración de ½ MS, cuya equivalencia en g/l esta especificada por el fabricante. En este caso correspondía a 4,4 g por litro de solución, por lo tanto, se utilizó para este propósito 2,2 g de MS en 1 litro de solución con agua destilada.

Durante todo el proceso de germinación y crecimiento de la planta, las condiciones de temperatura y humedad se mantuvieron controladas a 24-28 °C y entre 40 y 60% respectivamente.

A las 4 semanas, las plantas que no desarrollaron flores estuvieron listas para la infiltración.

2.10 Preparación de *A. tumefaciens* competentes

Con el fin de transformar *A. tumefaciens*, fue necesario volverlas competentes, por lo tanto, se tomó una colonia de placa fresca y se inoculó 4 ml de caldo LB con gentamicina (25 µg/ml) y rifampicina (10 µg/ml), estos inóculos fueron incubados a 28 °C y 220 rpm por 18 horas. Luego, en un matraz de 250 ml se colocó 50 ml de caldo LB con gentamicina (25 µg/ml) y rifampicina (10 µg/ml), se agregó los 4 ml del inóculo y se incubó a 28 °C con 220 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de entre 0,5-0,6, una vez obtenida esta concentración se dejó el cultivo en hielo durante 10 minutos. Se transfirió el cultivo a dos tubos Falcon de 50 ml fríos y se centrifugó durante 5 minutos a 3000 g y 4 °C, el sobrenadante se descartó completamente, mientras que el pellet fue resuspendido en 1 ml de CaCl₂ 20 mM. Finalmente, las bacterias fueron alicuotadas y almacenadas en -80 °C.

2.11 Transformación de *A. tumefaciens*

Se realizó la transformación de *A. tumefaciens* con los plasmidios de interés pTRBO-CP154, pTRBO-CP154:orf2 en duplicado y su respectivo control negativo en una muestra única. En stock ya se mantenían bacterias transformadas con pTRBO-GFP.

Se utilizaron las células de *A. tumefaciens* competentes obtenidas previamente, estas se descongelaron en hielo desde los -80 °C donde se encontraban y se les agregó 10 ml del plasmidio de interés, se mezcló suavemente invirtiendo el tubo. Se incubaron las células en

nitrógeno líquido durante 5 minutos e inmediatamente se traspasaron a un baño de agua a 37 °C, donde se mantuvieron nuevamente durante 5 minutos. Se agregó 1 ml de medio SOC, se mezcló suavemente y se incubaron los tubos a temperatura ambiente y sin agitación durante 3 horas. Se centrifugaron las muestras a 7000 g durante 7 minutos y se extrajo 0,9 ml del sobrenadante para resuspender el pellet con lo que quedó de sobrenadante. Finalmente se sembraron las células en placas de LB agar selectivo con gentamicina (25 µl/ml), rifampicina (10 µg/ml) y kanamicina (50 µg/µl) y se incubaron a 28 °C sin agitación 2 a 3 días o hasta tener colonias contables. Las colonias transformantes fueron analizadas mediante PCR con los partidores trbo F y R para confirmar la presencia del gen de interés.

Una vez amplificadas estas colonias se preparó un inóculo en caldo LB con los mismos antibióticos para generar un stock de bacterias, agregando 500 µl de glicerol 80% estéril al mismo volumen del cultivo bacteriano en caldo LB. Estas bacterias fueron almacenadas a -80 °C en alícuotas.

2.12 Preparación de medio de agroinfiltración

Se preparó medio de agroinfiltración utilizando las bacterias transformadas:

- pTRBO-CP154
- pTRBO-CP154:orf2
- pTRBO-GFP

En primer lugar, se inoculó 100 µl del cultivo stock de *A. tumefaciens*, transformadas con los plasmidios de interés, en 5 ml de caldo LB con gentamicina (25 µl/ml), rifampicina (10 µl/ml) y kanamicina (50 µg/ml) y se incubó a 28 °C con 220 rpm de agitación durante 32 horas. Con 3 ml de este cultivo se inoculó 50 ml de caldo L-MESA, incubando en las mismas condiciones anteriores hasta alcanzar una DO₆₀₀ de entre 0,5 y 1,0, siendo lo ideal entre 0,8

y 1,0. Una vez alcanzada la concentración necesaria se centrifugó el cultivo por 10 minutos a 5000 g y a 15°C, el sobrenadante fue descartado en su totalidad. El pellet fue resuspendido suavemente en la cantidad de medio de agroinfiltración necesaria para obtener una DO₆₀₀ de 1,0-1,1 e incubado durante la noche en oscuridad y a temperatura ambiente.

2.13 Agroinfiltración al vacío

La agroinfiltración se realizó en cuatro grupos según el vector contenido en *A. tumefaciens*:

- pTRBO-CP154 (154)
- pTRBO-CP154:orf2 (O2)
- pTRBO-CP154/pTRBO-CP154:orf2 (154/O2)
- pTRBO-GFP (GFP)

De estos, el grupo 154/O2 corresponde a una mezcla de medio de agroinfiltración de 154 y de O2, mezclados en partes iguales una vez preparados. Además, se infiltró una planta únicamente con agua destilada como control negativo, este grupo se denomina C.

El grupo correspondiente a GFP fue utilizado como control del proceso de agroinfiltración debido a la presencia en su estructura del gen codificante para la proteína fluorescente verde, que permite evaluar la efectividad de la infiltración según la presencia o ausencia de fluorescencia en las hojas.

El medio de agroinfiltración (m.a.i.) preparado el día anterior, quedó durante toda la noche incubando en oscuridad y a temperatura ambiente (20°C). Este fue diluido en una razón de 30 ml de m.a.i por 900 ml de agua destilada.

Esta solución se vertió en un vaso de precipitado de 1 l, de tal manera que el líquido quedara cercano al borde del vaso.

Por otro lado, la maceta que contiene la planta a infiltrar fue cubierta con papel aluminio sobre la tierra, dejando al descubierto la parte aérea de la planta sin que se vierta la tierra al voltear el macetero (figura 6A). Se invirtió la maceta sobre el vaso de precipitado, sumergiendo las hojas de la planta dentro del m.a.i. (figura 6B) y juntos se pusieron dentro de la cámara de vacío como se aprecia en la figura 6C. Una vez sellada la cámara, se aplicó presión entre 60 y 70 kPa durante 5 minutos, luego se fue liberando la presión de manera gradual, durante aproximadamente 3 minutos, mientras el líquido ingresaba lentamente a la hoja.

Posteriormente, se retiró la planta del medio y se limpió sumergiéndola en agua destilada para retirar el exceso de m.a.i. que no ingresó a la hoja. Finalmente, la planta infiltrada fue devuelta a las condiciones anteriores en el invernadero.

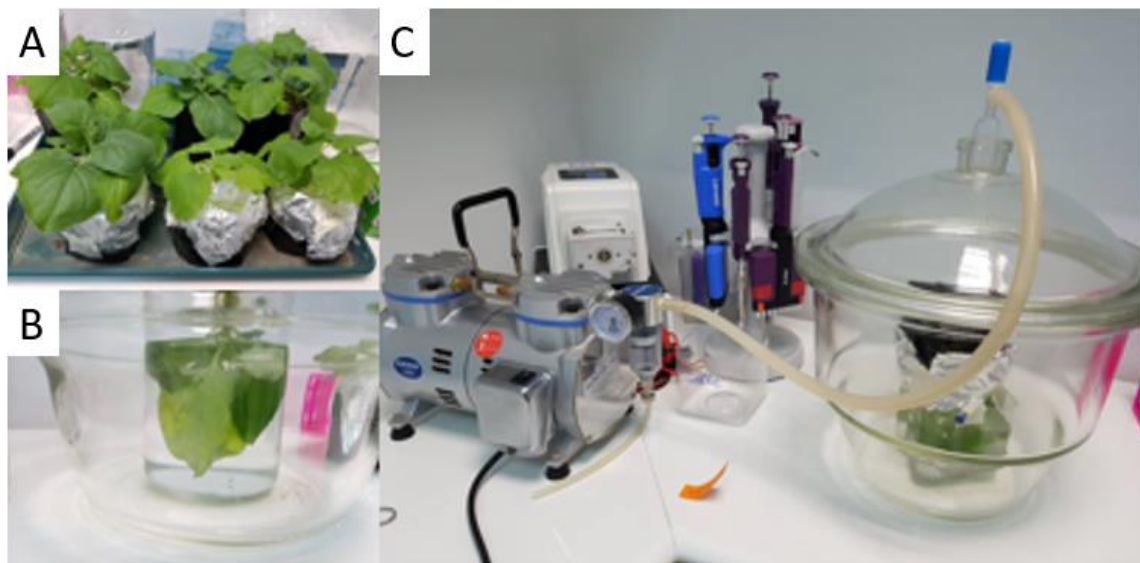


Figura 6. Proceso de agroinfiltración. En (A) se puede apreciar cómo se cubrió la tierra de cada maceta, dejando libre la parte aérea de la planta. (B) muestra en detalle la hoja dentro del medio de agroinfiltración. Finalmente, (C) instalación completa del proceso; la planta

invertida y con sus hojas sumergidas dentro de la solución de infiltración, dentro de la cámara conectada al vacío.

2.14 Extracción de RNA

Las hojas que presentaron signos de infección tales como lesiones o marcas en las hojas, coincidentes con las zonas infiltradas, durante los días 4 y 10 luego de la infiltración, fueron cortadas con bisturí en el peciolo y almacenadas en RNAlater a -20 °C.

Posteriormente, desde esta hoja se extrajo RNA utilizando RNAsolv (Omega Bio-tek, Norcross, Georgia, EE.UU.) mediante el protocolo indicado por los fabricantes.

2.15 Síntesis de cDNA

El RNA obtenido fue tratado con DNAsa (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) según indicaciones del fabricante, para eliminar todo el DNA que haya podido quedar contaminando la muestra, y así obtener RNA lo más puro posible. Con el fin de comprobar la ausencia de DNA en esta etapa se realizó un PCR confirmatorio con los partidores orf2 y trbo utilizando el mismo protocolo antes mencionado para estos partidores.

Luego, el RNA obtenido se pasó a cDNA mediante transcripción reversa utilizando la enzima RT-mM_ulV (NEBiolabs, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.) según las indicaciones del fabricante y utilizando los partidores reverse de orf2 y trbo en muestras por separado.

Una vez obtenido el cDNA, se realizó PCR con los partidores trbo y orf2. Con el fin de obtener mejores resultados y más precisos, se realizó una gradiente de temperatura con los partidores orf2, de manera de poder probar temperaturas más altas y obtener una mayor especificidad de los partidores. La gradiente se realizó entre 56 y 62°C y finalmente se utilizó la temperatura de 62 °C.

2.16 Extracción de proteínas

De las mismas hojas que se cortaron desde las plantas infectadas, antes de ser almacenadas en RNA later, se separaron algunas para evaluar la expresión proteica. Usando un bisturí se cortó las hojas desde el peciolo para colectar el tejido infectado, estas hojas fueron pesadas y posteriormente congeladas con nitrógeno líquido para ser molidas en un mortero. A esto se le agregó 4 veces el peso del tejido infectado en ml de buffer de extracción para continuar moliendo y homogeneizar lo más posible. Este buffer está compuesto de acetato de sodio 50 mM, metabisulfito de sodio en una concentración de 0,1% p/v y betamercaptoetanol en 0,01% p/v y su pH fue ajustado a 5,0 al momento de su preparación.

El líquido obtenido fue filtrado con dos capas de gasa, colectado, calentado durante 5 minutos a 50 °C y centrifugado a 8000 g por 25 minutos para clarificar, dejando el material verde en el pellet. El sobrenadante se traspasó a un tubo limpio y se mantuvo en hielo. Su pH se ajustó a 7,00 y se agregó NaCl 5M en un volumen de 0,17 veces el sobrenadante obtenido y 0,2 veces del mismo volumen de PEG 40% (p/v). Se dejó reposar la solución en hielo y a 4 °C por al menos 60 minutos.

Terminado el tiempo de incubación se centrifugó la solución por 25 minutos a 4 °C a 15000 g, el sobrenadante fue traspasado a un tubo limpio y guardado, mientras que el pellet fue resuspendido en 1/10 del peso de tejido obtenido inicialmente de buffer fosfato 10 mM pH 7,2. Finalmente se centrifugó el pellet resuspendido a 7000 g por 7 minutos, el virus quedó en el sobrenadante, al que se le agregó 1 volumen de glicerol para preservarlo.

2.17 Electroforesis en gel de poliacrilamida

El extracto de proteínas obtenido del paso anterior fue analizado mediante separación por electroforesis en gel de poliacrilamida denaturante (de concentración 16,5%) y Western Blot.

Para esto, se preparó cada muestra con su buffer de carga, el que posee SDS, β -mercaptoetanol, colorante azul de bromotimol y tris; mezclando 80 μ l de la muestra con 20 μ l del buffer de carga que se encuentra concentrado 5X. La solución obtenida se calentó a 95°C durante 5 minutos y posteriormente se separó en gel de poliacrilamida a un voltaje de 170 volts.

2.18 Tinción con azul de Coomassie

El gel fue teñido directamente durante la noche a 20°C con 70 rpm de agitación en buffer de tinción, el que contiene metanol 40%, ácido acético 7% y azul de Coomassie 0,1%. Al día siguiente se le aplicó solución de destinción (metanol 40% y ácido acético 7%), manteniéndolo en agitación y renovando la solución a medida que se saturaba.

2.19 Tinción de plata

Como complemento, también se realizó tinción de plata del gel de poliacrilamida, probando dos técnicas diferentes. El primer protocolo se realizó en su totalidad a una temperatura de 20°C y 60 rpm de agitación. Se comenzó con la fijación del gel durante toda la noche, utilizando 100 ml de la solución fijadora 1, compuesta de 50 ml de etanol 100%, 12 ml de ácido acético 100% y 50 μ l de formaldehído 37%; terminada esta incubación se continuó fijando el gel utilizando 4 ml de glutaraldehído 4% en 20 ml total de solución, durante 30 minutos. Luego de la fijación, el gel se lavó 3 veces durante 20 minutos con una solución de etanol 50% y se continuó con el pretratamiento; para este paso se mantuvo el gel durante un minuto en 50 ml de una solución compuesta de 0,5 ml de solución stock (tiosulfato de sodio 80 mM). Posteriormente, el gel se lavó con agua destilada 3 veces con agua destilada para luego ser incubado durante 20 minutos con 50 ml de solución de tinción, preparada

previamente con 100 mg de nitrato de plata, 37,5 μ l de formalina 37% y agua destilada. Esta solución se lavó con agua 3 veces.

Finalmente, la tinción fue revelada utilizando 50 ml de la solución compuesta de 3 g de carbonato de sodio, 25 μ l de formalina 37% y 10 μ l de la solución stock utilizada previamente. Esta incubación se realizó por aproximadamente 4 minutos, cuando se pudo distinguir las bandas del gel, en este punto se lavó la solución de revelado 2 veces por 2 minutos con agua destilada y se detuvo la reacción con metanol al 50%.

El segundo protocolo de tinción de plata que se utilizó consistió en fijar el gel utilizando una solución de etanol 10% y ácido acético 0,5% durante 30 minutos; luego, se incubó durante 2 horas en solución de tinción, preparada con nitrato de plata 0,011 M, e lavó el gel con agua destilada y se reveló la tinción con hidróxido de sodio 0,75 M, Formaldehído 0,1 M y borohidruro de sodio 0,0023 M. Finalmente, la solución se detuvo utilizando agua destilada. Cada paso de este protocolo, al igual que el anterior, se realizó a 20°C y a 60 rpm de agitación

2.20 Western Blot

A partir de un gel de poliacrilamida donde se separaron las muestras se realizó el Western blot. La transferencia a membrana de nitrocelulosa se realizó durante 45 minutos a 250 mA de corriente. Esta membrana fue bloqueada en leche 5% en buffer fosfato (PBS) durante la noche a 20°C y 70 rpm de agitación. Posteriormente fue incubada con el anticuerpo primario anti TMV (Capture Antibody for TMV, Agdia, Indiana, EE.UU.) que reconoce la proteína de la cápside de TMV, el que se encontraba en solución de leche 0,5% en PBS, durante una hora a 37°C y el mismo nivel de agitación. Luego de esta incubación, la membrana fue lavada con buffer PBS con Tris PBST para poder utilizar el anticuerpo secundario anticonejo en leche 0,5% en PBS (Peroxidase conj aff pur anti-rabbit igg, Rockland Immunochemicals,

Pottstown, Pensilvania, EE.UU.), el cual se mantuvo con la membrana durante 45 minutos a 35°C y 70 rpm de agitación.

Finalmente, el Western Blot fue revelado utilizando TMB, sustrato de la enzima peroxidasa que se encuentra unida al anticuerpo secundario.

RESULTADOS

3.1 Desarrollar un vector de expresión que incluya el gen de orf2 de PCV unido a la secuencia codificante para CP de TMV

3.1.1 Identificar la secuencia génica del gen orf2

A partir del vector pGEMT Easy:orf2 (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) obtenido previamente en la unidad de investigación y mediante PCR, se obtuvo la secuencia génica de orf2 junto con los sitios de corte para NotI y KasI proporcionados por los partidores. El producto de PCR se separó mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 7) y se obtuvo una banda correspondiente al gen de interés, en el tamaño deseado de aproximadamente 700 pb como se observa en el recuadro rojo. Esta banda de DNA se extrajo desde el gel obteniendo una concentración de 95,9 ng/ μ l.

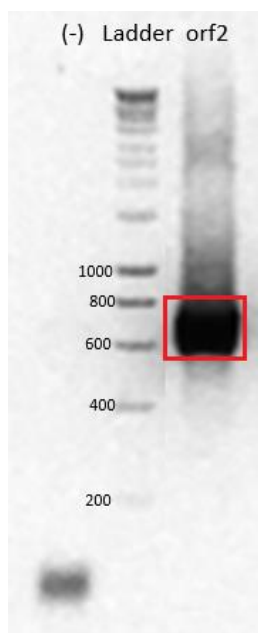


Figura 7. Gen de interés orf2 en electroforesis en gel de agarosa. Se observa en el tercer carril la banda deseada a 700 pb, marcada en el recuadro rojo. En el primer carril se

muestra el control negativo del PCR, el que se realizó con agua libre de nucleasas en lugar de DNA como templado; se observa que se encuentra ausente la banda mencionada. El Ladder utilizado corresponde a HyperLadder 1Kb de la marca Bioline.

3.1.2 Análisis de vectores pTRBO

En la figura 8 se observa el resultado de la electroforesis en gel de agarosa de todas las variantes del plasmidio pTRBO analizadas por medio de PCR con los partidores trbo F y R, con el fin de seleccionar el vector para continuar utilizando. Se puede ver que cada plasmidio presenta bandas en diferentes tamaños, pero analizando particularmente los vectores pTRBO-CPL y pTRBO-CP154, que son los de mayor interés se puede ver en cada vector una única banda entre los 1000 y 1500 pb y una banda bajo 200 pb respectivamente. Por la secuencia con la que fueron construidos los partidores, se esperaba para pTRBO-CPL obtener un amplificado de 170 pb, mientras que para pTRBO-CP154, se esperaba uno de 110 pares de bases aproximadamente. Debido a este resultado y a las características propias del vector, se trabajó de aquí en adelante con el vector pTRBO-CP154 para las siguientes etapas.

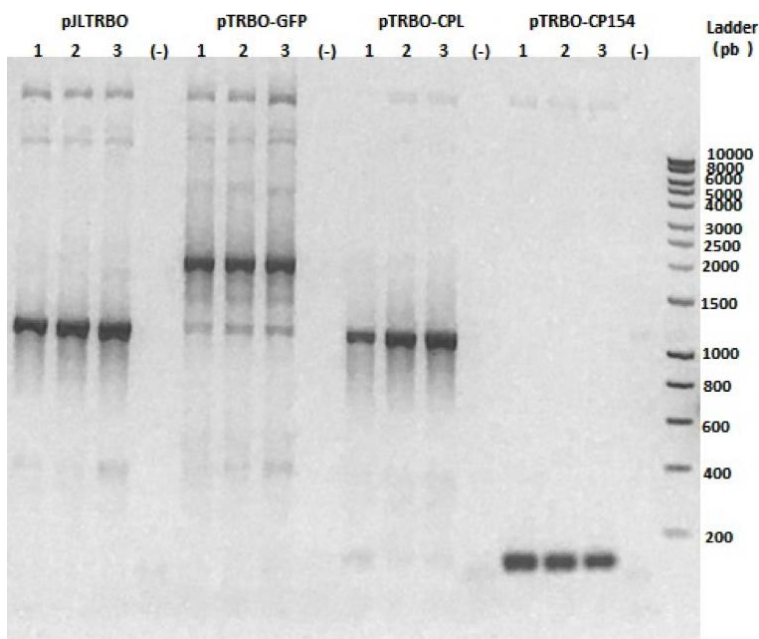


Figura 8. PCR de vectores pTRBO utilizando partidores trbo. Las temperaturas de alineamiento analizadas corresponden a 53,3°C, 54,8°C y 55,8°C y se representan en la figura como 1, 2 y 3. Para cada vector analizado se realizó con control negativo con agua libre de nucleasas en lugar de DNA como templado, el que se muestra como (-). El Ladder utilizado corresponde a HyperLadder 1Kb (Bioline, Londres, Reino Unido).

3.1.3 Digestión de orf2 y pTRBO-CP154 con enzimas de restricción

Con el fin de obtener la secuencia de interés orf2 y el vector pTRBO-CP154 cortados, con sus respectivos bordes cohesivos y disponibles para la ligación, se probó en reiteradas ocasiones el corte consecutivo con ambas enzimas, utilizando primero una endonucleasa y la otra luego de la extracción de DNA desde el gel. En todas estas pruebas la concentración final obtenida resultó ser muy baja, perdiéndose mucho DNA posterior a los dos cortes enzimáticos y sus respectivas extracciones desde el gel.

El resultado del corte de pTRBO-CPL con ambas enzimas simultáneamente y con los buffer Tango 2X y NE 3.1 se muestra en la figura 9. Como se puede apreciar, la digestión funciona

mejor utilizando el buffer Tango 2X que con NEBuffer 3.1. Se observa que, con el primer buffer, el vector se abre mostrando una banda cerca de los 10000 pb, además de liberar un fragmento cerca de los 2500 pb como se esperaba, considerando que el vector pTRBO-CPL posee en realidad un inserto que se desconoce y por lo mismo fue descartado. Sin embargo, el corte con NEBuffer 3.1, muestra dos bandas cercanas a los 10000 pb, y una marca muy tenue cercana a los 2500 pb, lo que indica que el corte no fue eficiente, pues se observa el mismo patrón que se genera con la doble digestión utilizando el buffer Tango 2X pero en menos concentración, prevaleciendo la banda de mayor tamaño que se presume, podría corresponder al vector linealizado, cortado únicamente por una enzima.

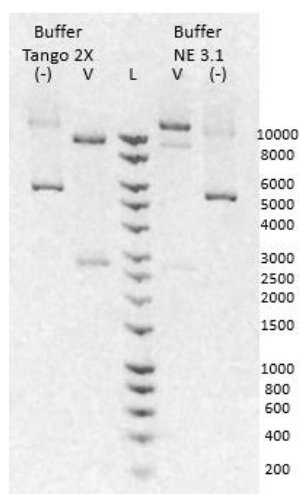


Figura 9. Doble digestión de vector pTRBO-CPL utilizando enzimas KasI y NotI. Se muestra el resultado del corte enzimático con dos buffer diferentes; Buffer Tango en concentración 2X y NEBuffer 3.1. En la figura, (-) corresponde al control negativo del corte enzimático, realizado sin enzimas de restricción, mientras que “V” se refiere a “vector” indicando que en dicho carril está cargado el vector pTRBO-CPL sometido a la doble digestión con el buffer correspondiente. El Ladder utilizado corresponde a HyperLadder 1Kb de la marca Bionline.

Posteriormente, se realizó la doble digestión del vector pTRBO-CP154 y del gen de interés orf2, mediante el protocolo definido gracias a los resultados obtenidos previamente. Utilizando el gel de electroforesis se calculó la concentración de la muestra de orf2 que fue obtenida en primer lugar, mediante el software Gen Analyzer 2010a, teniendo como referencia las concentraciones de las bandas de ladder de carga Bioline 1 Kb. El valor obtenido es de 43,49 ng/μl.

Luego se midió con el mismo sistema la concentración de la muestra de pTRBO-CP154 obtenida tras el corte enzimático, medida que se corroboró utilizando el equipo Epoch. El valor obtenido fue de 48,043 ng/μl.

3.1.4 Ligación

Se intentó la ligación con el protocolo, mencionado en la sección 2.4 de materiales y métodos, a una temperatura de 4°C, sin embargo, no se obtuvo colonias transformantes en el paso posterior, por lo tanto, se comenzó a trabajar únicamente con las temperaturas de 16 °C y 20 °C.

3.1.5 Transformación *E. coli*

Las placas obtenidas de la transformación bacteriana fueron incubadas durante toda la noche en condiciones controladas. Luego se analizó la formación de colonias.

Se puede observar en la tabla 2 la cantidad de colonias obtenidas en cada condición analizada. Todas estas colonias corresponden a bacterias producto de una transformación exitosa. Además, en las placas correspondientes a cada control negativo no se observó crecimiento de colonias. El control negativo se realizó sometiendo a las bacterias al mismo proceso de

transformación, pero sin utilizar algún vector, únicamente transformando con agua libre de nucleasas.

Tabla 2. Número de colonias de bacterias transformantes obtenidas en cada condición del proceso de ligación; a una razón de vector:inserto de 1:3, 1:5 o vector solo, sin inserto y a una temperatura de 16 o 20°C.

	1:3	1:5	Vector solo
16 °C	2	2	4
20 °C	1	1	6

3.1.6 Confirmación de las secuencias

Las colonias obtenidas de la transformación bacteriana se analizaron mediante PCR con los partidores trbo y posteriormente fueron separadas mediante electroforesis en gel de agarosa. La Tabla 3 muestra las condiciones a las que se llevó a cabo la ligación para cada una de las colonias analizadas. Como se muestra en la figura 10 el carril donde se cargó el control positivo de orf2 presenta una banda en aproximadamente 700 pb, que presumiblemente correspondería al gen orf2, esta misma banda se observa en el carril correspondiente a la colonia 2, pero con mayor claridad en la colonia número 4, donde además de estar mucho más concentrado este fragmento, es la única banda que se puede apreciar.

Por otro lado, el carril que muestra el control positivo para el vector vacío posee solo una banda levemente sobre los 100 pb, coincidente con el análisis anterior mediante PCR de los vectores vacíos, particularmente para el vector pTRBO-CP154 (figura 8), que corresponde al fragmento contenido entre los sitios de alineamiento de los partidores trbo F y R en el

vector vacío según su secuencia. Este mismo fragmento se observa en las colonias 6, 12 y 16, indicando que estas colonias poseen el vector pTRBO-CP154 sin inserto.

Tabla 3. Condiciones de obtención de colonias transformantes analizadas.

Colonia	Vector utilizado	Razón de ligación de vector:inserto	Temperatura
2	pTRBO-CP154:orf2	1:3	16 °C
4	pTRBO-CP154:orf2	1:5	16 °C
6	pTRBO-CP154	-	20 °C
10	pTRBO-CP154	-	20 °C
12	pTRBO-CP154	-	16 °C
16	pTRBO-CP154:orf2	1:3	16 °C

La colonia número 4 fue seleccionada para continuar con los análisis. Para corroborar la presencia del inserto, se vuelve a realizar PCR, pero esta vez combinando los partidores trbo y orf2. Como se puede apreciar en la figura 11, ambas combinaciones de partidores arrojan el mismo resultado, mostrando una única banda muy clara de un tamaño aproximado de 700 pb en los carriles donde se cargó la colonia 4, banda que no se observa en el control utilizado, el vector pTRBO-CP154 vacío.

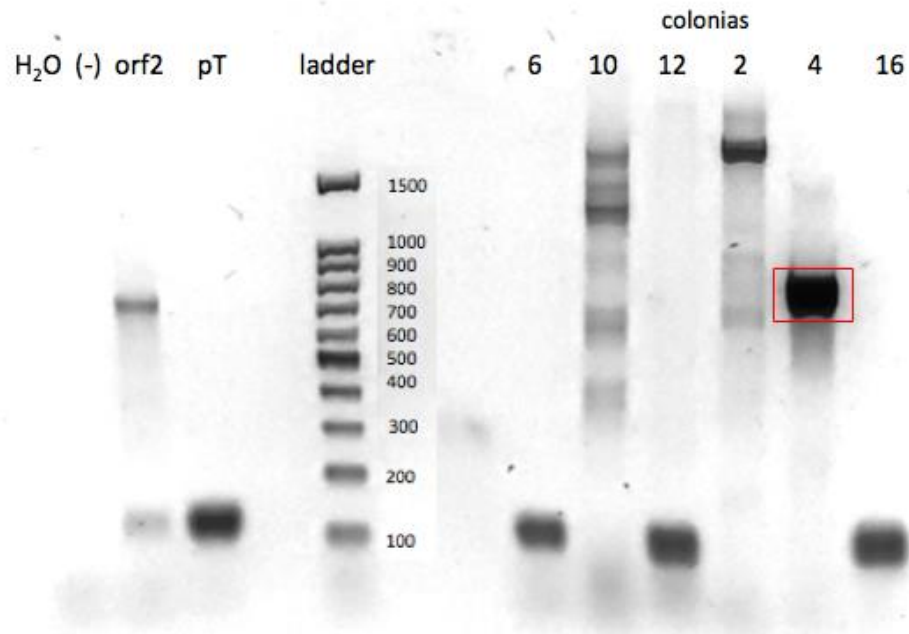


Figura 10. PCR confirmatorio de colonias transformadas. Al lado izquierdo del Ladder de carga, se encuentran los grupos control y al lado derecho las colonias analizadas. Los controles corresponden a; agua cargada directamente en el gel (H_2O), PCR con partidores trbo realizado con agua libre de nucleasas como templado (-), fragmento de interés orf2 extraído previamente desde gel (orf2) y producto de PCR de vector pTRBO-CP154 con los partidores trbo (pT). Encerrada en el recuadro rojo se encuentra la banda de aproximadamente 700 pb, coincidente con la banda del mismo tamaño en el control positivo orf2. El Ladder de carga corresponde a 100 bp DNA Ladder de la marca Promega.

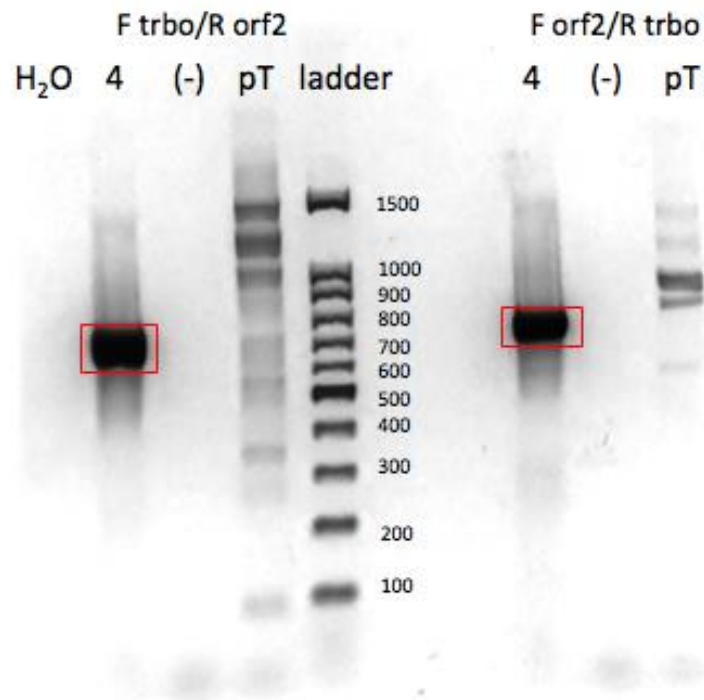


Figura 11. Análisis de colonia seleccionada utilizando los partidores orf2 y trbo combinados. En el recuadro rojo se marca la banda de aproximadamente 700 pb. A la izquierda del Ladder de carga, primer carril corresponde únicamente a agua libre de nucleasas, cargada como control negativo de la electroforesis, luego, el segundo carril corresponde a la colonia número 4, el tercer carril es el control negativo del PCR, donde se utilizó agua como templado y, por último, pT corresponde al vector pTRBO-CP154 utilizado como templado en PCR. Al lado derecho del Ladder se encuentran la colonia número 4, el control negativo del PCR y el producto de PCR realizado con el vector vacío como templado, en ese orden. El Ladder de carga utilizado corresponde a 100 bp DNA Ladder de la marca Promega.

3.1.7 Secuenciación

La muestra obtenida a partir de la colonia seleccionada fue secuenciada y analizada mediante alineamiento de secuencias. Para esto se comparó la secuencia obtenida desde el partidore f con la secuencia esperada de pTRBO-CP154:orf2. La figura 12, muestra el alineamiento

obtenido en el programa Jalview para la secuencia esperada y la obtenida, tanto con el partidor forward, como con el reverse (utilizando el reverso complementario de esta secuencia), se observa en el recuadro rojo el nucleótido desde donde coinciden las secuencias, correspondientes al nucleótido 6211 al 6926. Se puede observar que, dentro de la secuencia alineada, existen 4 gaps o saltos, representados en la secuencia por guiones, todos ellos se encuentran en el secuenciado a partir del partidor trbo R y en uno de sus extremos, que es donde generalmente se presenta la mayor tasa de error e imprecisión en una secuenciación, por lo tanto, se utiliza para posteriores análisis el secuenciado desde el partidor F. El mismo alineamiento se realizó con el Software DS Gene, los resultados se muestran en la figura 10 en el formato de “Dot Plot”, donde se observa una recta que indica la alta identidad entre ambas secuencias. En ambas figuras se puede apreciar una alta identidad entre ambos fragmentos, indicando la presencia de orf2 en el vector. Pese a que el resultado del Dot Plot utilizando los dos secuenciados obtenidos es bastante similar, se decide analizar el secuenciado desde trbo F. Se puede observar en la figura 13 una pequeña línea roja, que se debe a una pequeña secuencia invertida que coincide con la secuencia teórica, sin embargo, es muy pequeña y posee poca precisión, por lo que es despreciable.

pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	AACTGGCATGTTCAATCAAGCAAGGCTTT--GAGACTGCTAGTGGACTTGTGTGGACGGGG ----GAGGGGTTT--TTTGGCAGGCTTTTGGAGACTGCTAGTGGACTTGTGTGGACGGGG AACTGGCATGTTCAATCAAGCAAGGCTTT--GAGACTGCTAGTGGACTTGTGTGGACGGGG
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	GCCATGACGTATCCAAAGGAGGGGTTACCGGAGAAGAAGACACCGCCCCGGCAGGCATGTT GCCATGACGTATCCAAAGGAGGGGTTACCGGAGAAGAAGACACCGCCCCGGCAGGCATGTT GCCATGACGTATCCAAAGGAGGGGTTACCGGAGAAGAAGACACCGCCCCGGCAGGCATGTT
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	GGCCAGATCCTCCGGCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGTTACCGGTGGAGA GGCCAGATCCTCCGGCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGTTACCGGTGGAGA GGCCAGATCCTCCGGCGCCGCCCTGGCTCGTCCACCCCGCCACCGTTACCGGTGGAGA
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	AGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCCGCCTCTCCCGCACCTTGGATATACTGTCAAGCGA AGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCCGCCTCTCCCGCACCTTGGATATACTGTCAAGCGA AGGAAAAATGGCATCTTCAACACCCCGCCTCTCCCGCACCTTGGATATACTGTCAAGCGA
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	ACCACAGTCAGAAAGGCCCTCCTGGGGGGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTT ACCACAGTCAGAAAGGCCCTCCTGGGGGGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTT ACCACAGTCAGAAAGGCCCTCCTGGGGGGTGGACATGATGAGATTCAATATTAATGACTTT
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	CTTCCCGCAGGAGGGGGGCTCAAACCCCGCCTGTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGA CTTCCCGCAGGAGGGGGGCTCAAACCCCGCCTGTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGA CTTCCCGCAGGAGGGGGGCTCAAACCCCGCCTGTGTGCCCTTTGAATACTACAGAATAAGA
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	AAGGTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCGCATCACCAGGGTGACAGGGGAGTGGGG AAGGTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCGCATCACCAGGGTGACAGGGGAGTGGGG AAGGTTAAGGTTGAATTCTGGCCCTGCTCCCGCATCACCAGGGTGACAGGGGAGTGGGG
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	TCCAGTGTGTTATTCTAGATGATAAAGGTTGTAAGAAAGGCCACAGCCCTCACCTATGAC TCCAGTGTGTTATTCTAGATGATAAAGGTTGTAAGAAAGGCCACAGCCCTCACCTATGAC TCCAGTGTGTTATTCTAGATGATAAAGGTTGTAAGAAAGGCCACAGCCCTCACCTATGAC
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	CCCTATGTAAGTACTCCTCCCGCATACCATAAACCCAGCCCTTCTCCTACCACTCCCGC CCCTATGTAAGTACTCCTCCCGCATACCATAAACCCAGCCCTTCTCCTACCACTCCCGC CCCTATGTAAGTACTCCTCCCGCATACCATAAACCCAGCCCTTCTCCTACCACTCCCGC
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	TACTTTACCCGCAAAAGCCTGTCTAGATTCCACTATTGATTACTTCAACCAAAACAA TACTTTACCCGCAAAAGCCTGTCTAGATTCCACTATTGATTACTTCAACCAAAACAA TACTTTACCCGCAAAAGCCTGTCTAGATTCCACTATTGATTACTTCAACCAAAACAA
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	AGAAATCAGCTGTGGCTGAGACTACAAACTGCTGGAAATGTAGACCAAGTGGCCTGGGC AGAAATCAGCTGTGGCTGAGACTACAAACTGCTGGAAATGTAGACCAAGTGGCCTGGGC AGAAATCAGCTGTGGCTGAGACTACAAACTGCTGGAAATGTAGACCAAGTGGCCTGGGC
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	ACTGCGTTGAAAAACAGTATATAAGCACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATGTATGTA ACTGCGTTGAAAAACAGTATATAAGCACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATGTATGTA ACTGCGTTGAAAAACAGTATATAAGCACCAGGAATACAATATCCGTGTAACCATGTATGTA
pTRBO-CP154 orf2/1-11739 secuenciadoF/1-1177 secuenciadoR/1-1210	CAATTCAGGGCGCGCGGGTCCCTGCACTTTGAGCTAGTCAAGATGDATAATAATAAAGGGA CAATTCAGGGCGCGCGGGTCCCTGCACTTTGAGCTAGTCAAGATGDATAATAATAAAGGGA TAGATCGGGCGCGCGGGGAGAAAAAACAG-----

Figura 12. Alineamiento de la secuencia obtenida por secuenciación y la esperada para pTRBO-CP154:orf2. Los recuadros rojos corresponden a la primera y última base nitrogenada coincidente entre las secuencias, correspondientes al nucleótido 6211 y 6926 respectivamente. El recuadro verde marca el codón ATG, que indica el comienzo de la proteína Orf2 y el recuadro azul marca el codón de término.

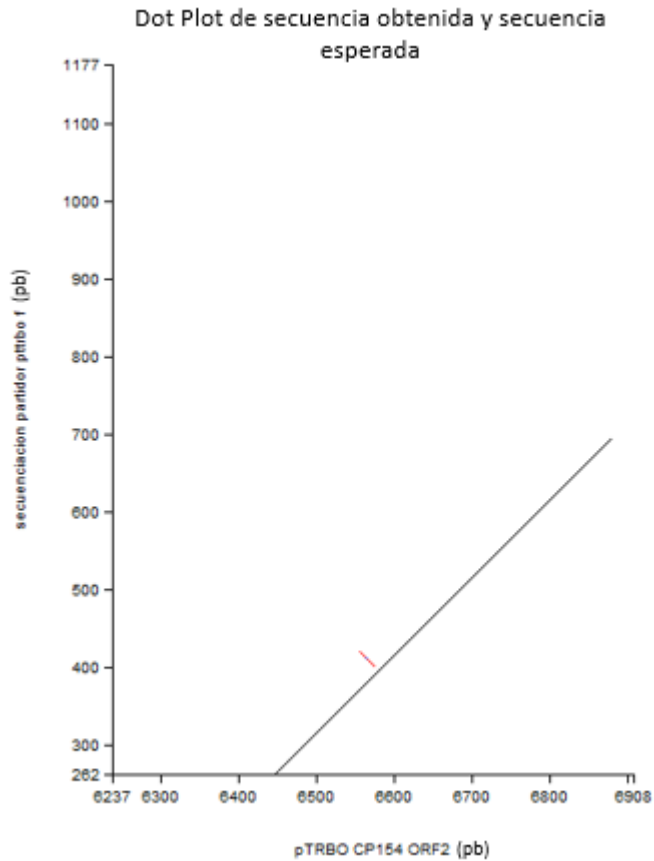


Figura 13. Alineamiento de secuencia esperada para pTRBO-CP154:orf2 y el resultado de la secuenciación desde el partidor trbo f. Ambos ejes se muestran en pares de bases (pb). En rojo se observa una pequeña secuencia que fue reconocida por el software como una secuencia invertida.

Posteriormente se analizó ambos fragmentos en sus secuencias aminoacídicas, con el fin de corroborar que la secuencia clonada se encontrara en marco de lectura. En la figura 14 se muestran los resultados del Clustal WS, donde se observa un alto nivel de conservación entre ambas secuencias. La figura 15 corresponde al alineamiento realizado con el Software DS Gene y se puede ver una amplia identidad entre ambas proteínas.

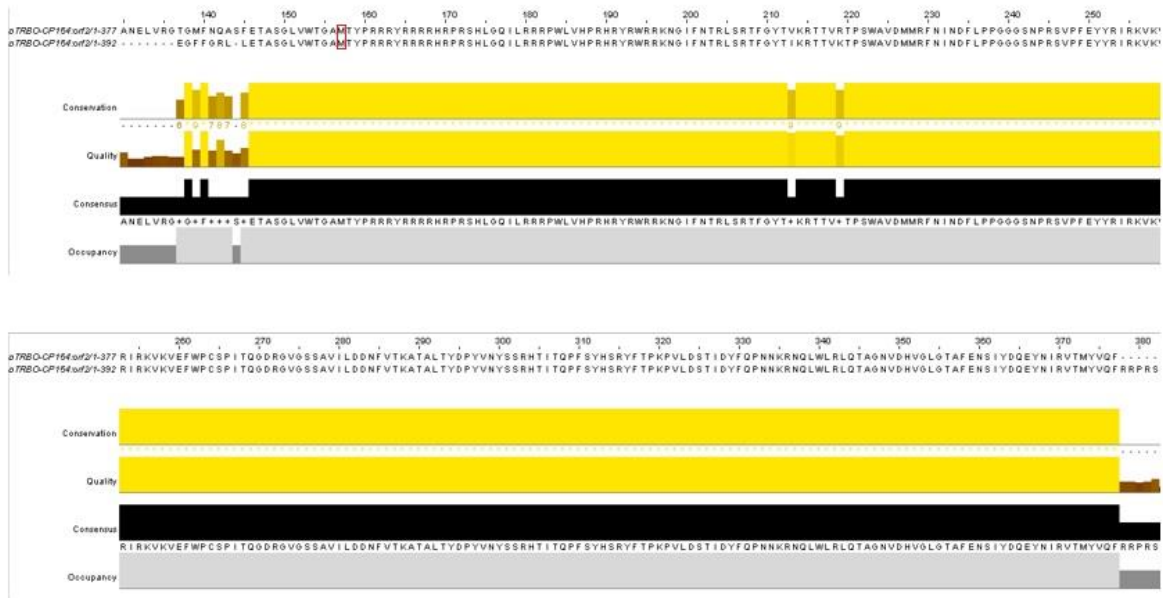


Figura 14. Alineamiento de secuencias aminoacídicas pTRBO-CP154:orf2 esperada y obtenida tras la secuenciación con partidador forward, presentadas en el mismo orden en la figura. Los aminoácidos coincidentes corresponden al fragmento contenido entre los residuos 146 y 377. En el recuadro rojo se muestra el comienzo de la proteína de interés orf2.

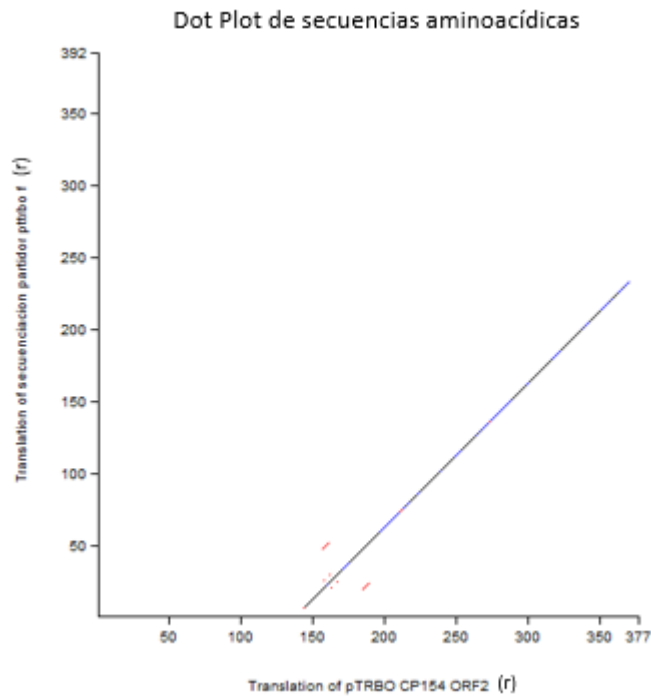


Figura 15. alineamiento entre secuencias aminoacídicas de pTRBO-CP154:orf2 y el fragmento obtenido desde la secuenciación, donde (r) corresponde a residuos aminoacídicos y la línea roja corresponde a pequeños ensambles que reconoce el programa por similitud de secuencia, pero que resultan despreciables.

3.2 Transformar plantas de *Nicotiana benthamiana* por magnificación con los vectores de expresión

3.2.1 Obtención de plantas

Las semillas plantadas fueron mantenidas hasta aproximadamente 4 semanas, para este momento, ya presentaban las características deseadas para la infiltración. Tal como se muestra en la figura 16, fue posible obtener plantas con hojas gruesas y anchas, sin brotes de flores y de poca altura. Estas características le permitirían a cada planta resistir los cambios de presión del proceso de agroinfiltración.



Figura 16. Plantas de *Nicotiana benthamiana* preparadas para la agroinfiltración.

3.2.2 Preparación de *Agrobacterium tumefaciens* competentes

Este proceso fue realizado exitosamente, se logró preparar un stock de bacterias competentes, disponibles para realizar la transformación. La última incubación mencionada en el protocolo se llevó a cabo durante aproximadamente 4 horas, tiempo necesario para alcanzar una correcta densidad óptica, en este caso 0,540. La competencia adquirida por las células sólo fue comprobada al realizar la posterior transformación.

3.2.3 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Se realizó la transformación bacteriana de *A. tumefaciens* con los vectores obtenidos previamente desde *E. coli*. El proceso se realizó siguiendo el protocolo y pasados 3 días de incubación fue posible observar colonias transformantes en las placas de agar selectivo.

Estas colonias fueron cultivadas en LB selectivo, analizadas mediante PCR y almacenadas a -80°C en glicerol.

El PCR realizado mostró en primer lugar, el mismo resultado para los duplicados de cada muestra (figura 17). Se puede observar en la imagen, una sola banda a una altura aproximada de 100 pb, tanto en el primer, como en el segundo carril, los cuales corresponden a bacterias transformadas con el vector pTRBO-CP154 vacío. Luego, en el tercer y cuarto carril del gel de agarosa, cargados con el vector transformado pTRBO-CP154:orf2, se observa una banda ancha y no muy clara, el Ladder utilizado no permite definir correctamente el tamaño de dicha banda, pues no resultó en un carril de bandas claras, sin embargo, se estima que se encuentre entre 600 y 1000 pares de bases, presumiblemente en 700 pb. Finalmente, el carril correspondiente al control negativo no presenta bandas.

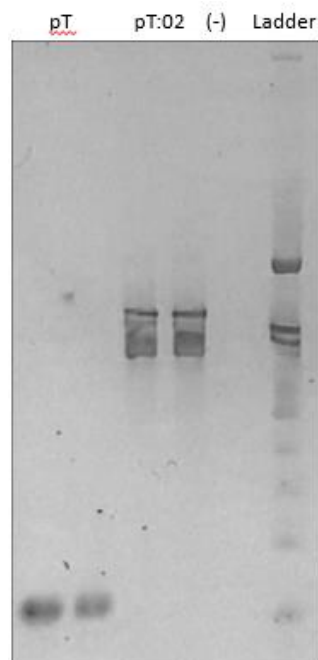


Figura 17. Gel de agarosa 1% que contiene los resultados del PCR de las colonias de *A. tumefaciens* transformantes. El PCR fue realizado utilizando los partidores trbo. Los dos primeros carriles corresponden al PCR realizado con los partidores trbo al vector pTRBO-CP154 vacío (pT), los dos carriles siguientes corresponden al PCR con los mismos partidores

del vector transformado pTRBO-CP154:orf2 (pT:o2), por último, el quinto carril corresponde al control negativo del PCR, utilizando agua como templado y el sexto carril al Ladder de carga. El patrón formado por el Ladder de carga en el último carril no permite determinar de manera precisa el tamaño de las bandas.

3.2.4 Preparación de medio de agroinfiltración

Utilizando los cultivos de *A. tumefaciens* transformadas, se preparó el medio de agroinfiltración para cada plasmidio. Para esto fue necesario incubar las bacterias hasta alcanzar la densidad óptica deseada, descrita en el protocolo, el crecimiento de las bacterias se llevó a cabo durante aproximadamente 5 horas, midiendo frecuentemente la densidad óptica hasta obtener la concentración bacteriana deseada.

Finalmente se obtuvo la suspensión de bacterias transformadas en el medio de agroinfiltración, que se mantuvo durante la noche a 20 °C y en oscuridad.

3.2.5 Infiltración

El medio de agroinfiltración preparado el día anterior se utilizó para infiltrar las plantas seleccionadas. Al someter cada planta al cambio de presión indicado en el protocolo, se observó que la hoja liberaba burbujas, tal como se aprecia en la figura 18 y posteriormente, al liberar el vacío lentamente, fue posible apreciar el medio de agroinfiltración ingresando a la hoja. Luego, al retirar la planta de la cámara de vacío y lavarla en agua destilada se pudo observar en el envés de la hoja, zonas donde el tejido se había oscurecido, mostrando un aspecto mojado (figura 18).



Figura 18. Proceso de agroinfiltración. En la figura (A) se observa la hoja liberando burbujas producto del cambio de presión. Luego en las imágenes (B) y (C) se observan las hojas luego de ser retiradas de la cámara de vacío y lavadas. Se observa el haz y el envés de la hoja respectivamente marcados por el proceso al que fueron sometidas.

3.3 Evaluar la expresión de la proteína recombinante TMV-CP:ORF2 en las plantas de *Nicotiana benthamiana* transformadas por magnifeción

3.3.1 Observación de las plantas

Luego de transcurridos los primeros 4 días post infiltración (dpi) se observaron manchas en las hojas, las que se fueron acentuando más con los días, tal como se muestra en las figuras a continuación (figuras 19-23), donde se muestran imágenes de los 4 y 7 dpi. Posteriormente, se formaron heridas en las hojas, coincidentes tanto con las manchas observadas anteriormente, como con las zonas de infiltración. Estas manchas aparecieron en todos los grupos, excepto el control negativo infiltrado únicamente con agua.

Se muestra en primer lugar los controles negativos (figura 19), que incluyen plantas sin infiltrar e infiltradas únicamente con agua. A los 4 dpi, se ve la presencia de manchas blancas leves en la hoja de la planta infiltrada con agua destilada, dichas marcas no se observan en la hoja de la planta que no fue sometida al proceso de infiltración. Luego 7 dpi, se ve que prácticamente no aumenta el deterioro de la hoja en la planta infiltrada con agua; con marcas

en las zonas que coinciden con el ingreso del medio en la misma intensidad que se observaban previamente.



Figura 19. Control negativo de la agroinfiltración y del medio de agroinfiltración. En ambas imágenes, a la izquierda se encuentra la planta infiltrada únicamente con agua destilada y al lado derecho la planta sin infiltrar. La figura (A) corresponde a ambas plantas el cuarto dpi mientras que la figura (B) muestra las mismas plantas a los 7 dpi.

La figura 20 muestra los resultados de las plantas infectadas *A. tumefaciens* transformadas con el vector pTRBO-GFP, este grupo corresponde al control positivo del proceso de agroinfiltración. Como se puede apreciar, las zonas infiltradas muestran las manchas mencionadas anteriormente y, además, al exponer las plantas a luz ultravioleta, es posible observar fluorescencia de color verde. Esta fluorescencia se presenta a partir del 4 dpi, acentuándose con los días y difundiéndose a lo largo del tejido.

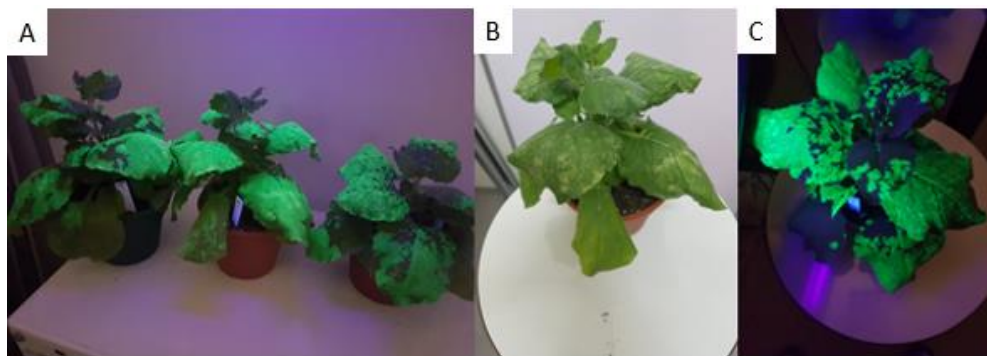


Figura 20. Plantas infiltradas con pTRBO-GFP. Se observa en la figura (A), tres plantas al 4 dpi bajo luz UV. En (B) se observa una de aquellas plantas al séptimo dpi sin presencia de luz UV, donde se aprecian las heridas presentes en la hoja. Finalmente, en la figura(C) se puede ver la fluorescencia de las hojas al observar la misma planta de la figura (B), pero bajo luz UV.

Luego, se observan las plantas infiltradas con el vector pTRBO-CP154, como se puede ver en la figura 21, las hojas presentan las manchas y heridas descritas previamente, acentuándose el daño con el transcurso de los días. Además, en este grupo se ven manchas negras en las hojas, donde el tejido se vio muy afectado por el proceso.

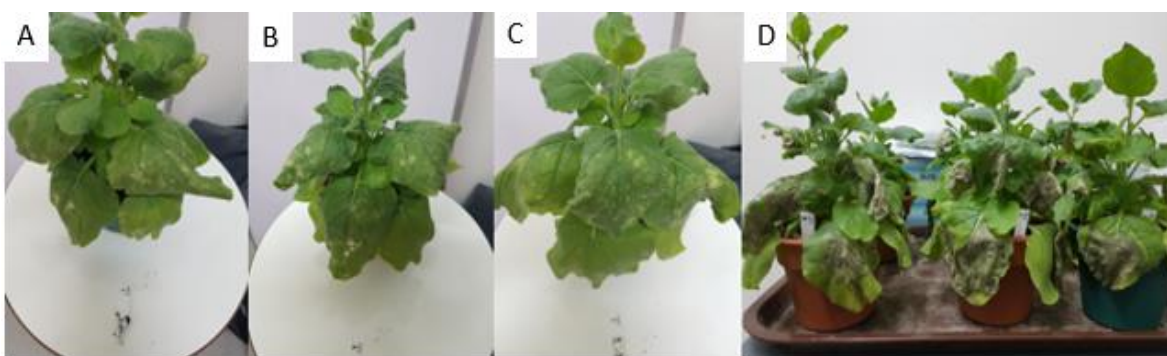


Figura 21. Plantas agroinfiltradas con el vector pTRBO-CP154. Las figuras (A), (B) y (C) corresponden a 3 plantas distintas infiltradas con dicho vector al cuarto dpi. La figura (D) corresponde a las mismas plantas al séptimo dpi.

En la figura número 22, se muestran las plantas infiltradas con el vector pTRBO-CP154:orf2. Transcurridos 4 dpi, se puede ver que las hojas presentan manchas de color blanco y amarillento, al igual que los otros grupos. Las manchas son significativamente menos que las que se observan en las plantas infiltradas con el vector vacío, además, no aumentan considerablemente a los 7 dpi.

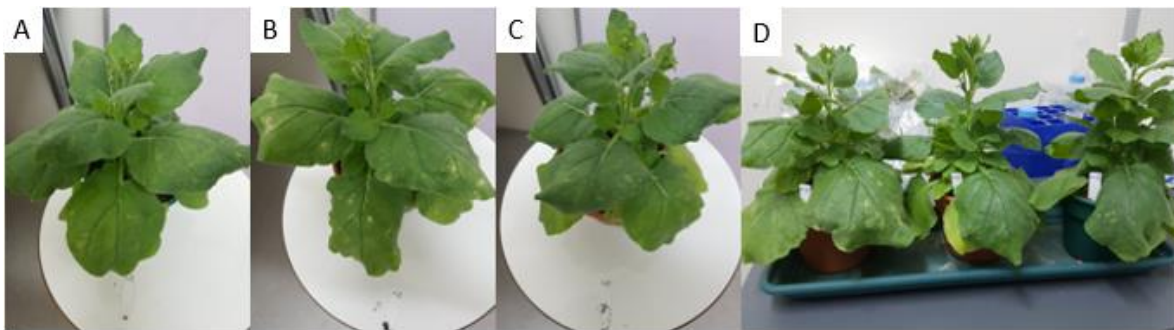


Figura 22. Plantas infiltradas con pTRBO-CP154:orf2. En la figura (A), (B) y (C) se muestran tres plantas infiltradas a los 4 dpi, mientras que la figura (D) muestra las mismas plantas a los 7 dpi.

Luego, se observan las plantas infiltradas con la mezcla del medio de agroinfiltración preparado con pTRBO-CP154 y pTRBO-CP154:orf2 (figura 23) donde se mezcló el vector vacío con el vector transformado para descartar que una alta presencia de orf2 pudiese resultar tóxico para la planta en el caso de expresarse. Se observa la presencia de manchas blancas y amarillas principalmente en la planta número 2 (figura 23 B). Estas manchas van aumentando con los días y mostrando un aspecto dañado y enfermo de la hoja, similar a lo ocurrido en las plantas infiltradas con el vector vacío.

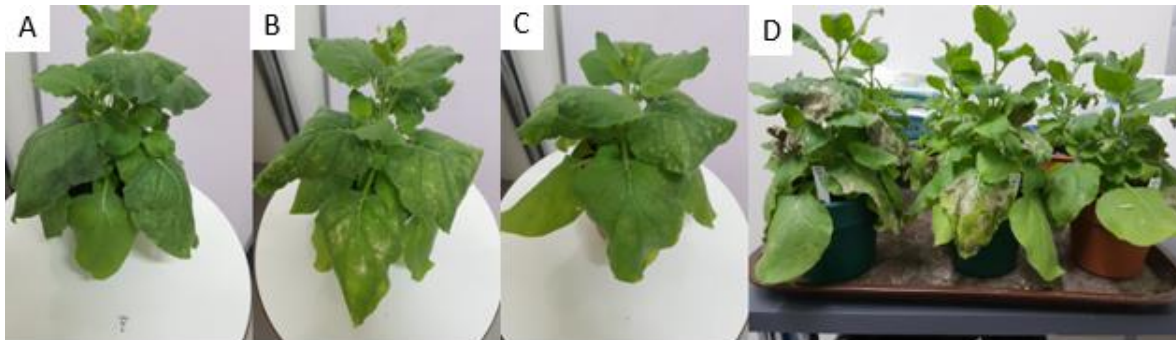


Figura 23. Plantas infiltradas con pTRBO-CP154 y pTRBO-CP154:orf2. Se observan tres plantas infiltradas con este vector a los 4 dpi en las figuras (A), (B) y (C). La figura (D) contiene las plantas a los 7 dpi.

3.3.2 Extracción de RNA y análisis por PCR

EL RNA de los grupos “O2”, “154”, “154/O2” y “C”, que corresponde al control negativo sin infiltrar, fue extraído y cuantificado, obteniendo las siguientes concentraciones:

- pTRBO-CP154: 634,4 ng/μl
- pTRBO-CP154:O2:798,6 ng/μl
- pTRBO-CP154/ pTRBO-CP154:O2: 87,4 ng/μl
- Control: 620,5 ng/μl

Luego fue tratado con DNAsa y al resultado de este proceso se le realizó PCR con ambos sets de partidores, lo que se puede ver en la figura 24, donde se muestra el gel de agarosa. En la imagen se observa que no hay DNA presente en las muestras, por lo tanto, se continúa trabajando con este RNA.

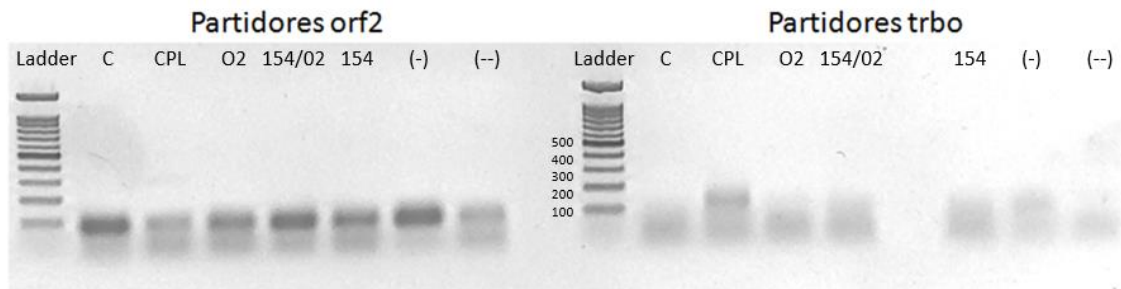


Figura 24. Resultados de PCR con ambos vectores luego del tratamiento con DNAsa. El Ladder utilizado corresponde a 100 bp DNA Ladder de la marca Promega. Los carriles corresponden al control negativo de la infiltración, la planta sin infiltrar (C), pTRBO-CPL (CPL), pTRBO-CP154:orf2 (O2), mezcla de pTRBO-CP154:orf2 y pTRBO-CP154 (o2/154), pTRBO-CP154 (154), el control negativo del PCR y finalmente el control negativo del tratamiento con DNAsa.

Se realizó el paso del RNA a cDNA y el resultado obtenido se analizó mediante RT-PCR con los partidores orf2 y trbo. La figura 25 muestra el resultado obtenido en la electroforesis luego de este RT-PCR, utilizando los partidores orf2. Se observan numerosas bandas, sin embargo, es posible observar una en particular aproximadamente de 700 pb en el carril del RNA extraído del grupo (ORF2).

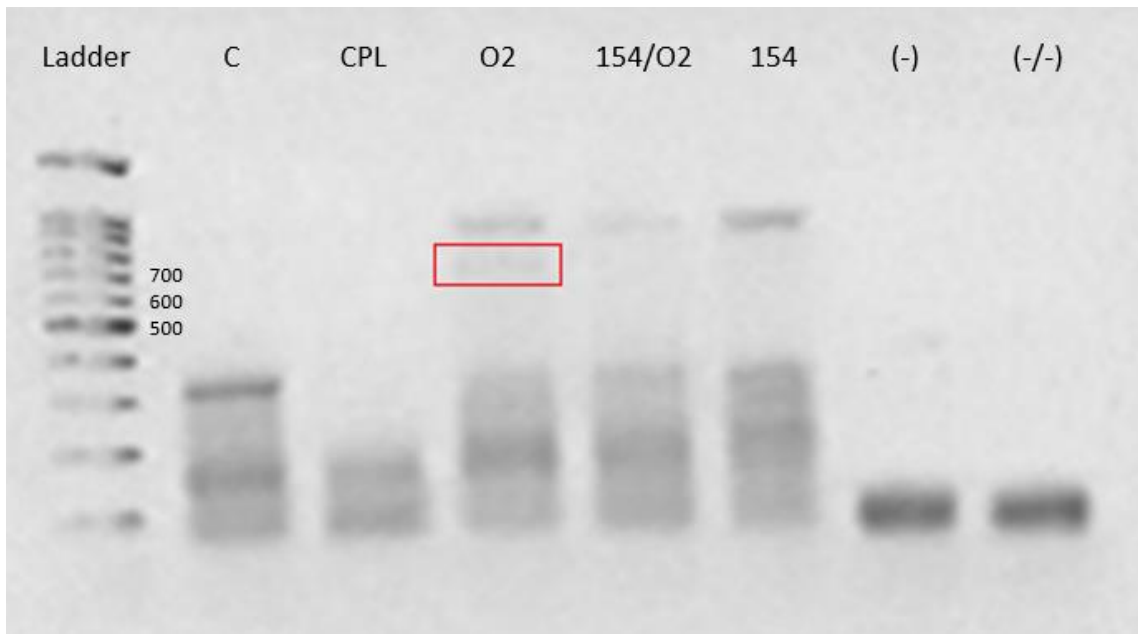


Figura 25. RT-PCR de cDNA obtenido, utilizando partidores orf2. En el recuadro rojo se marca una banda tenue de aproximadamente 700 pb. Los carriles corresponden consecutivamente a Ladder de carga, hojas de plantas sin infiltrar como control negativo de la agroinfiltración (C), hojas infiltradas con pTRBO-CPL (CPL), hojas infiltradas con pTRBO-CP154:orf2 (O2), hojas infiltradas con mix pTRBO-CP154/pTRBO-CP154:orf2 (154/O2), hojas infiltradas con pTRBO-CP154 (154), control negativo del PCR (-), usando agua como templado, control negativo del paso a cDNA, utilizando agua en lugar de RNA (-/-).

Para obtener un resultado más confiable se aumentó la temperatura de alineación de los partidores, con el fin de obtener una mayor especificidad. Se realizó un gradiente de temperatura para el mismo experimento, obteniendo los resultados expuestos en la figura número 26. En la imagen se puede observar cómo a medida que se aumenta la temperatura se obtiene un resultado más claro y preciso, definiéndose más la banda correspondiente a 700 pb, por lo tanto, se define como nueva temperatura de alineación 62°C. Una vez determinada

la temperatura necesaria para un alineamiento más preciso, se repitió el PCR únicamente para el grupo infiltrado con pTRBO-CP154, el resultado de esto se muestra en la figura 27. Se observa en el gel de agarosa, una banda de aproximadamente 700 pb que no aparece en los carriles de control negativo.

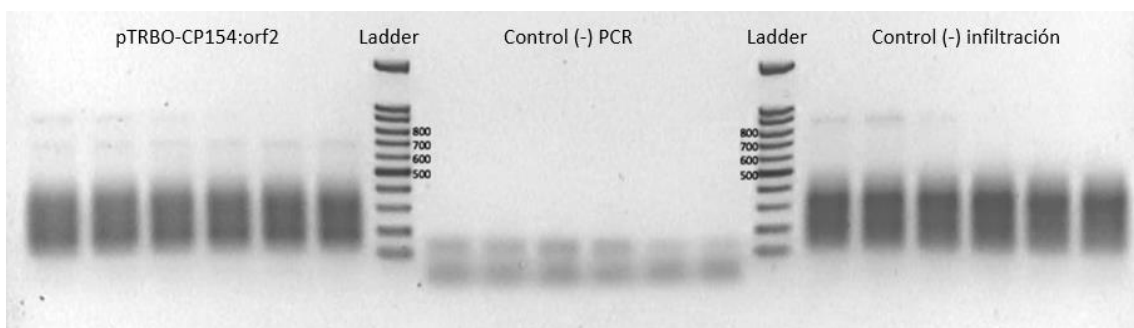


Figura 26. Producto de PCR utilizando gradiente de temperatura entre 56 y 62 °C para los partidores orf2. El control (-) de la infiltración corresponde al grupo “C” mencionado previamente. Las temperaturas corresponden a 56,6; 57,4; 58,6; 60,2; 61,7; 62,9 °C.

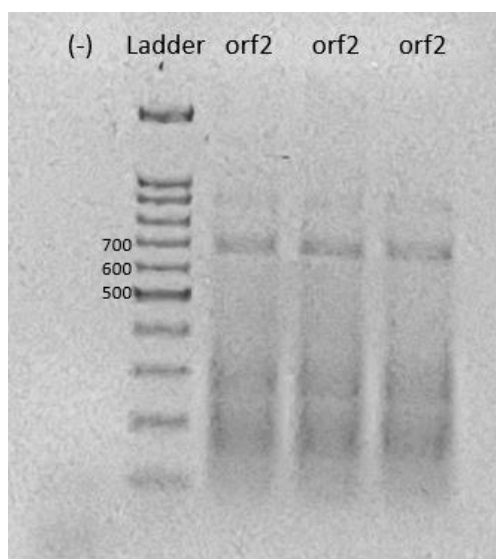


Figura 27. RT-PCR de cDNA extraído a partir de plantas infiltradas con pTRBO-CP154:orf2, donde se puede apreciar una banda de 700 pb aproximadamente. Los tres carriles marcados como orf2, poseen el mismo templado, que se corrió en triplicado.

Los resultados obtenidos en este punto del proyecto investigación permiten inferir una correcta obtención del vector pTRBO-CP154:orf2 transformado y su posterior infiltración en plantas de la especie *Nicotiana benthamiana*, observándose una expresión del gen orf2 en la planta, detectada a través de la presencia de mRNA.

3.3.3 Extracción de proteínas y análisis

A partir de las hojas infiltradas se extrajo también las proteínas virales, con el fin de obtener la proteína deseada. Estas fueron analizadas en primer lugar mediante separación por electroforesis y tinción de plata y azul de coomassie. En segundo lugar, se realizó Western Blot.

De la separación electroforética y tinción por azul de coomassie se observan los resultados en la figura 28, donde se puede apreciar la presencia de una banda muy marcada, en un peso ligeramente superior a 25 KDa, en el carril correspondiente a pTRBO-GFP. Esta misma banda se puede ver en las figuras 29 y 30, correspondientes a las tinciones de plata realizadas con dos protocolos diferentes., donde se ven varias bandas y marcas de distintos tamaños e intensidades, pero donde llama la atención la banda mencionada pues está presente en los tres geles analizados.

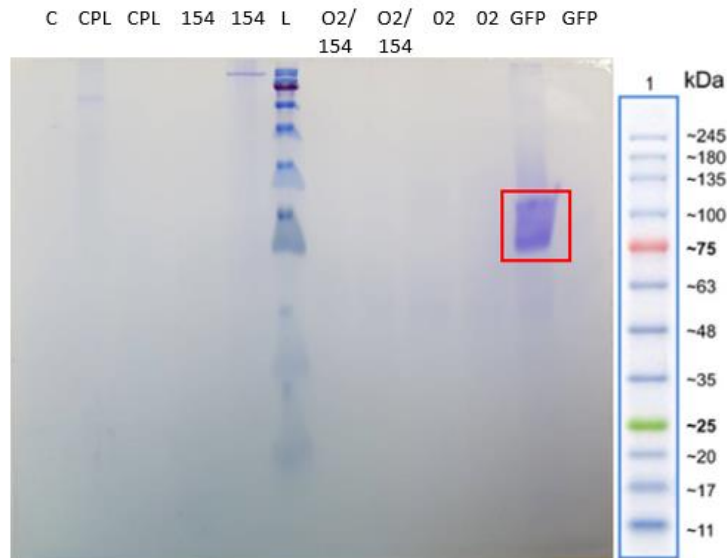


Figura 28. Resultado de la tinción por Azul de coomassie. El carril rotulado como “C” corresponde al grupo control de hojas sin infiltrar, “CPL” corresponde a la extracción de proteínas de plantas infiltradas con el vector pTRBO-CPL, “154” corresponde a hojas infiltradas con pTRBO-CP154, “L” es el estándar de peso, “O2/154” corresponde a la mezcla de medio de agroinfiltración pTRBO-CP154 y pTRBO-CP154:orf2, O”2” es la extracción desde las hojas infiltradas con pTRBO-CP154:orf2 y el carril que contiene el recuadro rojo corresponde a las hojas infiltradas con pTRBO-GFP, donde se observa una banda levemente sobre los 25 KDa. El Ladder de carga utilizado corresponde a AccuRuler RGB Plus de la marca Maestrogen.

Para los otros grupos de proteínas extraídas no se observan bandas claras, mostrando una baja concentración de proteínas totales en el extracto obtenido. La tinción de plata muestra bandas de diferentes tamaños, mientras que la tinción de azul de coomassie prácticamente no permite determinar la presencia de proteínas y sus tamaños.

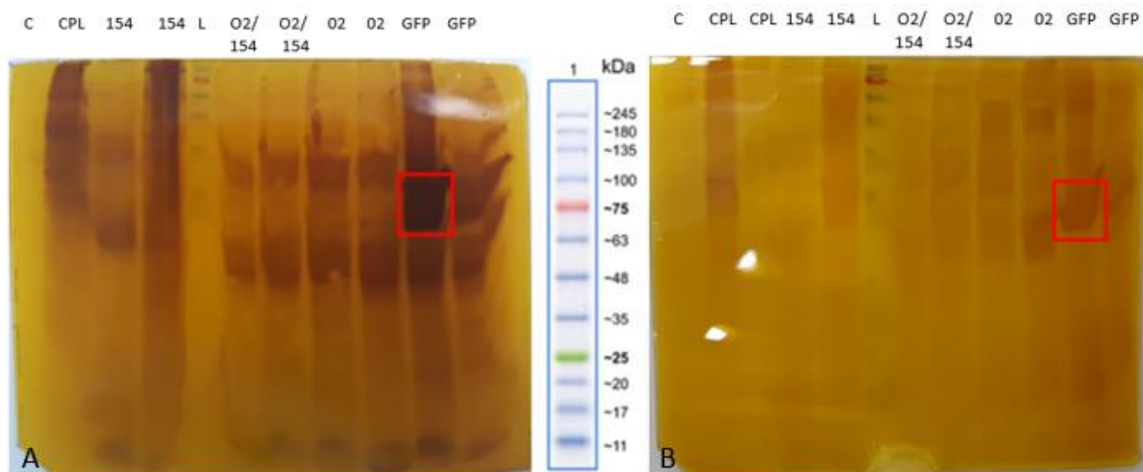


Figura 29. Tinción de plata con dos protocolos distintos. En el recuadro rojo se marca la banda mencionada en el carril “GFP” de pTRBO-GFP, sobre los 25 KDa, en ambos geles. El Ladder de carga utilizado, marcado en la figura como “L” corresponde a AccuRuler RGB Plus de la marca Maestrogen. En la figura, A corresponde a la tinción realizada con el primer protocolo y B corresponde al segundo protocolo. En ambas figuras “C” corresponde al control negativo de hojas sin infiltrar, “CPL” al vector pTRBO-CPL, “154” a pTRBO-CP154, “O2/154” al mix de pTRBO-CP154 y pTRBO-CP154:orf2 y “O2” al vector pTRBO-CP154:orf2.

Luego, se realizó la transferencia de las proteínas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa para realizar Western Blot contra la proteína de la cápside de TMV (figura 30), sin embargo, no se obtuvo ninguna banda observable en la membrana. Este gel fue cargado con las mismas muestras, en el mismo orden que la figura 28.

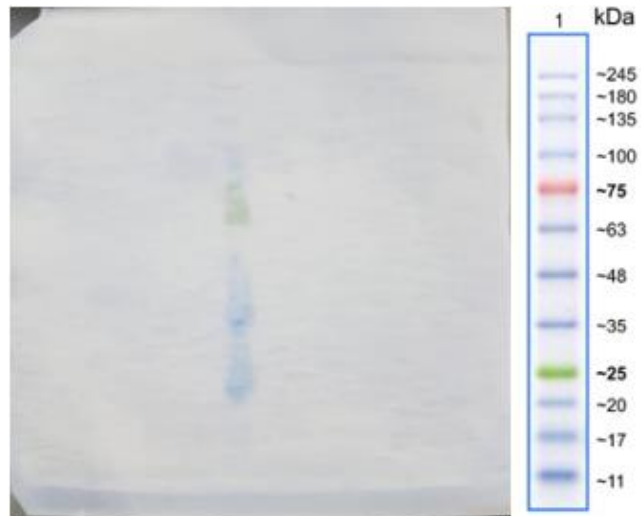


Figura 30. Fotografía de la membrana luego de realizar el Western Blot. Al costado derecho se encuentra el Ladder de carga utilizado, correspondiente a AccuRuler RGB Plus de Maestrogen. El gel con el que se hizo la transferencia fue cargado de la misma manera que la figura 28.

DISCUSION Y PROYECCIONES

El objetivo propuesto para este trabajo de investigación consistía en expresar la proteína de la cápside del circovirus porcino unido a la cápside del virus de mosaico del tabaco o TMV. Para esto se clonó el gen orf2 dentro del plasmidio pTRBO-CP154, obteniendo el vector transformante pTRBO-CP154:orf2, con el cual se transformó *Agrobacterium tumefaciens* para finalmente infiltrar plantas de *Nicotiana benthamiana* y obtener la proteína deseada.

La selección del plasmidio a utilizar se basó en el análisis de dos principales candidatos; pTRBO-CPL y pTRBO-CP154, pues ambos mantenían en su secuencia el gen de la proteína de la cápside de TMV, lo que permitiría obtener la proteína de interés unida a la partícula viral. Al analizar ambos vectores mediante PCR se pudo notar, tal como se muestra en la figura 8, que el primero arrojaba una banda de entre 100 y 1500 pares de bases (pb), mayor tamaño al esperado según su secuencia, desde la cual se calculaba un fragmento de 170 pb aproximadamente. Esto indica que el vector no se encuentra en las condiciones esperadas, probablemente contiene algún inserto desconocido, lo que podría implicar un bajo rendimiento en los pasos posteriores o que el gen de interés orf2 quedara insertado fuera de marco de lectura.

Por otro lado, al observar las bandas obtenidas a partir de pTRBO-CP154 se puede apreciar una banda única bajo los 200 pb, lo que coincide con el resultado esperado a partir de la secuencia génica del vector, donde se calcula un tamaño de 110 pb. El resultado obtenido a partir de este análisis indica que este sería el plasmidio más apropiado para seguir trabajando el resto de los objetivos específicos. Esto, sumado a las características propias del vector que fueron descritas previamente en la literatura, tales como la presencia del gen codificante para la cápside de TMV, tanto por su naturaleza repetitiva y la estructura que es capaz de formar

con proteínas foráneas, como por su capacidad de activar linfocitos T en mamíferos, además de haber demostrado buena capacidad para expresar secuencias de interés de mayor longitud, tal como es el gen *orf2* (Hefferon, 2017) (Jiang, y otros, 2006).

Una vez seleccionado el vector, se realizó la ligación de este con el gen de interés para la posterior transformación de *E. coli* con el mismo. Para obtener el vector ligado se probaron distintas condiciones, siendo la más determinante de estas la temperatura a la cual se llevó a cabo este proceso. La primera temperatura utilizada, correspondiente a 4°C, fue determinada siguiendo las indicaciones del fabricante de la enzima ligasa, sin embargo, la literatura expone que este proceso se logra de mejor manera sometiendo la enzima a mayores temperaturas, particularmente 16 o 20°C, para diversas variedades de ligasas (Kumar Ranjan & Rajagopal, 2010), tal como ocurrió en este caso al aumentar dicha variable, lo que se tradujo en el crecimiento de colonias transformantes en el medio selectivo, indicando una ligación y transformación exitosas.

De las colonias transformantes obtenidas fue seleccionada una en particular que presentaba una banda de aproximadamente 700 pb, coincidente con el tamaño esperado para el gen *orf2* (Lv, Guo, & Zhang, 2014), la que fue enviada a secuenciar. Los resultados obtenidos tanto con el partidor *trbo* F, como con el R muestran una alta identidad con la secuencia esperada al ser comparados mediante alineamiento, sin embargo, en la secuencia obtenida a partir de “*trbo* R” se encontró 4 gaps o saltos en la secuencia, respecto a la teórica, los que se encuentran al comienzo de esta, precisamente donde suelen haber más errores o imprecisiones en la secuenciación. Debido a esto, se realizan las comparaciones o análisis posteriores con la secuencia obtenida a partir de *trbo* F, la que presenta una mayor identidad con la secuencia génica teórica.

Al analizar el fragmento obtenido con la secuencia esperada, se puede apreciar en primer lugar la alta identidad mencionada previamente, esto es tanto en su secuencia génica (figuras 12 y 13) como en su secuencia aminoacídica (figuras 14 y 15), además del codón de término correctamente ubicado en marco de lectura. Esto permite inferir que el gen de interés fue insertado de manera exitosa y en marco de lectura en el vector, con el cual se transformó posteriormente *A. tumefaciens* y se llevó a cabo el proceso de agroinfiltración.

Las plantas infiltradas, al ser observadas y analizadas días posteriores al proceso de agroinfiltración, mostraron marcas en las hojas que indicaban las zonas donde había ingresado el medio. Esto pues al realizar el proceso de infiltración con vacío se pudo observar que, al cambiar la presión, las hojas liberaban burbujas dentro del líquido; según lo descrito, esto se debe a la liberación de aire desde el espacio intercelular de la hoja, lo que estaría indicando la apertura de los estomas producto de la diferencia de presión generada por una presión atmosférica negativa en el exterior de la hoja. Al liberar lentamente el vacío, se aprecia la entrada de medio de agroinfiltración, llenando el espacio que era ocupado previamente por aire (Chen, y otros, 2014). Esto se observa tanto al liberar lentamente el vacío, como al voltear la hoja inmediatamente terminado este proceso, donde se ven marcas del líquido dentro de ella, al oscurecerse el tejido, tal como se observa en la figura 18 y también en los días posteriores a este.

Cabe mencionar que para la activación de los genes de virulencia de *A. tumefaciens*, necesarios para realizar el traspaso de material genético a la planta, es necesaria la presencia de ciertos compuestos fenólicos que la misma planta libera al sufrir daño mecánico. Debido a que el proceso de agroinfiltración por vacío no genera este daño en las plantas, la activación de estos genes es dada por la presencia de acetosiringona en el medio (Norkunas, Harding,

Dale, & Dugdale, 2018). Es por esto, que este proceso funciona a pesar de no tener heridas en la planta generadas, por ejemplo, por jeringas.

Las hojas de aquellas plantas infiltradas mostraron llagas coincidentes con las zonas de entrada del medio de agroinfiltración, estas marcas muestran un patrón muy similar a las heridas que se describen en la literatura como consecuencia de TMV (Balique, y otros, 2013) (Diamos & Mason, 2019). Esto podría indicar la formación exitosa del virus TMV, sin embargo, no permite inferir nada sobre la presencia del gen de interés en los grupos que corresponda y tampoco permiten descartar que la presencia de TMV activase algún mecanismo de defensa en la planta que impida la expresión de la proteína de interés.

Luego, la extracción de RNA se realizó con el fin de analizar si se estaba llevando a cabo la transcripción del material genético codificante para la proteína de interés. Se ajustó la temperatura de alineamiento de los partidores orf2 con el fin de aumentar su especificidad y se obtuvo a partir de cDNA y mediante PCR una banda de aproximadamente 700 pb en aquellas plantas infiltradas con pTRBO-CP154:orf2, lo que estaría indicando la correcta síntesis de mRNA a partir de la secuencia codificante de TMV unido por su proteína de la cápside a la CP de circovirus porcino. Si bien este resultado no permite confirmar la síntesis y ensamblaje de las proteínas fusionadas, si permite concluir que la formación de mRNA a partir del gen de interés se estaría llevando a cabo de manera exitosa. Pese a identificarse la secuencia génica de orf2 en el cDNA obtenido a partir del mRNA extraído desde las plantas infiltradas, con el fin de confirmar este resultado de manera más precisa, se pretende secuenciar el fragmento obtenido mediante este último paso, sin embargo, las cantidades obtenidas resultaron en una concentración insuficiente para realizar este proceso, por lo tanto,

para afirmar con mayor seguridad el resultado obtenido sería necesario estudiar un proceso más eficiente de purificación de mRNA y de obtención de cDNA a partir del mismo.

Luego de confirmar la expresión del gen de interés, se buscaba comprobar la síntesis de las proteínas en la conformación que se esperaba, pues se ha descrito que no todas las proteínas llegan a expresarse o acumularse en plantas, debido a que la expresión o sobreexpresión de ciertas proteínas foráneas pueden activar mecanismos de defensa en *N. benthamiana*, llevando a la disminución o impedimento de la replicación viral, en ciertas ocasiones mediante la necrosis del tejido de la hoja, la que se evidencia zonas de hipoclorosis dentro de la hoja y al pasar de los días, como llagas o áreas reseca y muertas, tal como se pudo observar en las hojas infiltradas en el presente estudio con los todos los medios de agroinfiltración utilizados, esto se produciría por una respuesta hipersensible de la planta, la que lleva a la liberación de especies reactivas de oxígeno y como consecuencia la muerte celular programada (Balique, y otros, 2013) (Diamos & Mason, 2019). Para esto se realizó extracción de proteínas a partir de las hojas infiltradas, utilizando también como control aquellas hojas infiltradas con pTRBO-GFP y hojas de plantas no infiltradas, pues al existir respuesta hipersensible en todos los grupos infiltrados, no es posible atribuir este fenómeno específicamente a la presencia de TMV o de la proteína de interés CP de circovirus. Estas proteínas fueron luego separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida y analizadas mediante tinción y Western blot.

Las diversas tinciones realizadas mostraron la presencia de la proteína GFP libre, mostrando una banda del tamaño esperado (levemente sobre los 25 KDa), coincidente con los 27 KDa reportados en la literatura como tamaño de dicha proteína (Lv, Guo, & Zhang, 2014). Sin embargo, no se obtuvo con claridad bandas del tamaño esperado para las demás muestras,

pues se observa en cada carril una gran cantidad de bandas de distintos tamaños en el caso de las tinciones de plata, y en el caso de la tinción por medio de azul de Coomassie, se puede apreciar en general baja cantidad de bandas en todos los carriles, lo que estaría evidenciando una extracción proteica deficiente a partir de las muestras, pues esta tinción no es específica y debería mostrar varias bandas a distintos tamaños, correspondiente a todas las proteínas del extracto; en este caso no es posible apreciar la proteína de interés, pero tampoco se marcaron bandas correspondientes a las otras proteínas propias de la planta. Debido a este resultado se optó por realizar Western Blot. Por parte del Western blot tampoco fue posible observar la proteína de la cápside de TMV.

Este resultado es atribuible a diversas causas; en primer lugar, no se comprobó la eficacia del anticuerpo que reconocería a TMV por su cápside, esto, pues no se disponía de un control positivo apropiado. En segundo lugar, es posible pensar que, debido al gran tamaño de la proteína de interés, no se logró ensamblar correctamente unida a la proteína de la cápside de TMV, dado que esta tiene un tamaño aproximado de 30 KDa, mientras que la proteína de la cápside de TMV solo 17 KDa. Se ha descrito previamente que, debido al gran tamaño de ciertas proteínas de interés, éstas no logran sintetizarse correctamente (Jiang, y otros, 2006), y a pesar de que el vector seleccionado se caracteriza por tolerar fragmentos de gran tamaño, probablemente 30 KDa resultó aun mayor al límite tolerable por este plasmidio. En este contexto, la proteína podría encontrarse también presente en otra fracción del proceso de purificación de proteínas, quedando por su peso o punto isoeléctrico en alguno de los pasos anteriores.

El hecho de no haber logrado con éxito la extracción de la proteína de interés a partir de las hojas infiltradas, independiente de la razón tras esto, impide demostrar mediante este trabajo

investigación, gran parte de los beneficios mencionados que aportaría la magnificación como estrategia de producción de proteínas de interés. Si se pudo apreciar que corresponde a un proceso seguro, relativamente sencillo una vez que está puesto en marcha y seguro, tanto al momento de trabajar como en lo relativo a contaminación ambiental, además de presentar posibilidades muy reales de escalabilidad. Por otro lado, no fue posible corroborar el rendimiento de proteínas que esta plataforma permite obtener, además del correcto plegamiento de los péptidos de interés y su funcionalidad.

Pese a no haber obtenido la proteína purificada y ensamblada de la manera que se esperaba, la técnica resulta prometedora para generar vacunas contra este u otros patógenos; tanto el clonamiento y la agroinfiltración fueron realizados de manera correcta y estandarizados los protocolos a llevar a cabo. Sin embargo, para posteriores investigaciones sería conveniente buscar alternativas para mejorar el proceso y obtener finalmente la proteína de interés expresada correctamente. Para esto se plantea diversas alternativas, una de ellas sería lograr un protocolo alternativo para la extracción del péptido deseado desde las hojas. Por otro lado, también se plantea como una opción utilizar insertos de menor tamaño, buscando los fragmentos más inmunogénicos de la proteína de interés mediante herramientas bioinformáticas, un ejemplo de esto es “Immune epitope database and analysis resource”, esto, con el fin de asegurar el correcto ensamblaje de la estructura deseada, es decir, TMV unido por medio de las subunidades de la cápside a los fragmentos inmunogénicos del virus estudiado. Otra alternativa sería utilizar el mismo plasmidio pTRBO, pero que no posea la secuencia codificante para CP, insertando el gen de interés donde se encontraría dicho péptido. De esta manera, se aprovecha el promotor 35S presente en el vector, y la alta tasa de expresión de la proteína de la cápside, para generar la proteína de forma soluble, en lugar

de obtenerla unida a TMV, buscando un proceso de purificación y extracción del péptido de interés. Sumado a esto se ha encontrado en la literatura que la proteína de interés mejora considerablemente su tasa de expresión cuando su secuencia génica se encuentra optimizada para la especie *N. benthamiana* (Ma, Li, & Wang, 2019). Por último, para proyectos posteriores, podría considerarse el uso de vectores supresores del silenciamiento del RNA viral (Shamloul, Trusan, Mett, & Yusibov, 2014) o inhibidores de proteasas, los que han demostrado incrementar la expresión del gen de interés (Grosse-Holz, y otros, 2018).

CONCLUSIONES

1. Se logró de manera exitosa el subclonamiento del gen orf2 de circovirus porcino en el plasmidio pTRBO-CP154, formando exitosamente el vector pTRBO-CP154:orf2.
2. El sistema de agroinfiltración al vacío resulta ser efectivo y eficiente a la hora de infectar plantas, obteniéndose un área considerable de la hoja infectada con el medio utilizado.
3. Se logró comprobar la síntesis de mRNA codificante para la proteína de interés Orf2.
4. No se logró la purificación de proteínas desde las hojas infiltradas, lo que no permite confirmar o descartar la síntesis de la proteína de interés Orf2.
5. Pese a la capacidad de pTRBO-CP154 de ser transformado con genes de mayor tamaño, se presume que este no fue capaz de expresar orf2, por lo tanto, se debiese buscar alguna alternativa, tanto al proceso de extracción de proteínas desde hojas de *N. benthamiana*, como a las características del vector y/o del fragmento génico de interés.
6. Finalmente, la hipótesis planteada en este trabajo de investigación “Dado que el vector pTRBO-CP154 permite el clonamiento y expresión de proteínas heterólogas asociadas al virus de mosaico del tabaco (TMV), es posible la coexpresión de la proteína Orf2 en la cápside del TMV” no fue aceptada, pues pese a que se logró con éxito llevar a cabo gran parte de la estrategia planeada, finalmente no fue posible comprobar la expresión de la proteína TMV-CP:Orf2.

BIBLIOGRAFIA

- Balique, F., Colson, P., Barry, A., Nappez, C., Ferretti, A., Al Moussawy, K., . . . Raoult, D. (2013). Tobacco Mosaic Virus in the Lungs of Mice following Intra-Tracheal Inoculation. *PLoS ONE*, *8(1)*, e54993. doi:10.1371/journal.pone.0054993
- Chen, Q., & Davis, K. (2016). The potential of plants as a system for the development and production of human biologics. *F1000Research*, *5*(F1000 Faculty Rev):912. doi:10.12688/f1000research.8010.1)
- Chen, Q., Lai, H., Hurtado, J., Stahnke, J., Leuzinger, K., & Dent, M. (2014). Agroinfiltration as an Effective and Scalable Strategy of Gene Delivery for Production of Pharmaceutical Proteins. *Adv Tech Biol Med*. doi:10.4172/atbm.1000103
- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *2172-2175*. doi:10.1073/pnas.86.7.2172
- Diamos, A., & Mason, H. (2019). Modifying the Replication of Gemiviral Vectors Reduces Cell Death and Enhances Expression of Biopharmaceutical Proteins in *Nicotiana benthamiana* Leaves. *Frontiers in Plant Science*, *9*(1974). doi:10.3389/fpls.2018.01974
- Ellis, J. (2014). Porcine Circovirus: A Historical Perspective. *Veterinary Pathology*, *51*(2), 315-327. doi:10.1177/0300985814521245

- Estrada, A. (2009). Síndrome de desmedro multisistémico posdestete (PMWS). *Boletín Veterinario Oficial*, 9.
- Gelvin, S. (2008). Agrobacterium-mediated DNA transfer, and the some. *Nature Biotechnology*, 998-1000.
- Gleba, Y. Y., Tusé, D., & Giritch, A. (2013). Plant Viral Vectors for Delivery by Agrobacterium. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 155-192.
doi:10.1007/82_2013_352
- Gleba, Y., Klimyuk, S., & Marillonnet, S. (2005). Magniffection-a new platform for expressing recombinant vaccines in plants. *Vaccine*, 2042-2048.
doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.006
- Grosse-Holz, F., Madeira, L., Zahid, M., Songer, M., Kourelis, J., Fesenko, M., . . . Van der Hoorn, R. (2018). Three unrelated protease inhibitors enhance accumulation of pharmaceutical recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana*. *Plan Biotechnology Journal*, 16, 1797-810. doi:10.1111/pbi.12916
- Hefferon, K. (2017). Plant Virus Expression Vectors: A Powerhouse for Global Health. *Biomedicines*, 44. doi:10.3390/biomedicines5030044
- Jiang, L., Li, Q., Li, M., Zhou, Z., Wu, L., Fan, J., . . . Xu, Z. (2006). A modified TMV-based vector facilitates the expression of longer foreign epitopes in tobacco. *Vaccine*, 109-115. doi:10.10.16/j.vaccine.2005.09.060
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Dosekocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015). Transient plant transformed mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: PRinciples, methods and applications. *Biotechnology Advanced*, 33, 1024-1042.

- Kumar Ranjan, R., & Rajagopal, K. (2010). Efficient ligation and cloning of DNA fragments with 2-bp overhangs. *Analytical Biochemistry*, *402*, 91-92.
- Lindbo, J. A. (Diciembre de 2007). TRBO: A High-Efficiency Tobacco Mosaic Virus RNA-Based Overexpression Vector. *plant Physiology*, *145*, 1232-1240.
doi:10.1104/pp.107.106377
- Lv, Q.-z., Guo, K.-k., & Zhang, Y.-m. (2014). Current Understanding of Genomic DNA of Porcine Circovirus Type 2. *Virus Genes*, *49*, 1-10. doi:10.1007/s11262-014-1099-z
- Ma, T., Li, Z., & Wang, S. (2019). Production of Bioactive Recombinant Reteplase by Virus-Based Transient Expression System in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science*, *10*(1225). doi:10.3389/fpls.2019.01225
- Mett, V., Farrance, C., Green, B., & Yusibov, V. (2008). Plants as Biofactories. *Biologicals*, *36*, 354-358. doi:10.1016/j.biologicals.2008.09.001
- Nelson, G., Marconi, P., Periolo, O., La Torre, J., & Álvarez, M. (2012). Immunocompetent truncated E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus (BVDV) expressed in *Nicotiana tabacum* plants: A candidate antigen for new generation of veterinary vaccines. *Vaccine*, *30*, 4499-4504.
- Noriega, J., Reyes, P., & Bucarey, S. (2007). Circovirus porcino: un virus pequeño que genera un gran problema. *Avances en Ciencias Veterinarias*, *22*, 62-71.
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., & Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Methods*.

Shamloul, M., Trusan, J., Mett, V., & Yusibov, V. (19 de abril de 2014). Optimization and Utilization of Agrobacterium-mediated Transient Protein Production in Nicotiana.

Journal of Visualized Experiments, 86. doi:10.3791/51204

Splettstoesser, T. (2012). *Schematic Model of TMV*. SciStyle, Berlín, Alemania.

Thuenemann, E., Meyers, A., Verwey, J., Rybicki, E., & Lomonossoff, G. (2013). A method for rapid production of heteromultimeric protein complexes in plants: assembly of protective bluetongue virus-like particles. *Plant Biotechnology Journal*, 11, 839-846. doi:10.1111/pbi.12076