

Expresión de la proteína B8Y674 *Candidatus Liberibacter asiaticus* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (page) y dot blot

Expressão da proteína B8Y674 *Candidatus Liberibacter asiaticus* por eletroforese em gel de poliacrilamida (page) e dot blot

DOI: 10.34188/bjaerv6n1-073

Recebimento dos originais: 20/12/2022

Aceitação para publicação: 02/01/2023

María Genoveva Álvarez Ojeda

Formación académica superior y área: Doctor en Ciencias, especialidad en Microbiología por la Universidad Autónoma de Nuevo León - Facultad de Ciencias Biológicas
Dirección completa (institucional): INIFAP-Campo Experimental Río Bravo. Km 61, Carretera Matamoros-Reynosa. CP. 88900, Río Bravo, Tamaulipas, México
Correo electrónico: alvarez.genoveva@inifap.gob.mx

Cynthia Guadalupe Rodríguez Quibrera

Formación académica superior y área: Maestría en Ciencias especialidad en Biotecnología Genómica por el Instituto Politécnico Nacional - Centro de Biotecnología Genética.
Dirección completa (institucional): INIFAP-Campo Experimental Ixtacuaco. Km 4.5, Carretera Martínez de la Torre-Tlapacoyan. C.P. 93655, Martínez de la Torre, Veracruz, México
Correo electrónico: rodriguez.cynthia@inifap.gob.mx

Roberto Omar Castañeda Arreola

Formación académica superior y área: Maestría en Ciencias, especialidad en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural por la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
Dirección completa (institucional): INIFAP-Campo Experimental Huimanguillo-Sitio Experimental Pichucalco. Km 8, Carretera Federal Pichucalco, C.P. 29520, Pichucalco, Chiapas, México
Correo electrónico: castaneda.roberto@inifap.gob.mx

Isidro Humberto Almeyda León

Formación académica superior y área: Doctor en Ciencias, especialidad en Biotecnología por la Universidad Autónoma de Nuevo León - Facultad de Ciencias Biológicas
Dirección completa (institucional): INIFAP-Campo Experimental General Terán. Km 31, Carretera Montemorelos-China, Ex-hacienda Las Anacuas, C.P. 67400, Cd. General Terán, Nuevo León, México
Correo electrónico: almeyda.isidro@inifap.gob.mx

RESUMEN

El Huanglongbing (HLB), es una de las enfermedades más devastadoras de los cítricos a nivel mundial y representa una seria amenaza para la citricultura mexicana. El agente causal es una bacteria incultivable que pertenece al género *Candidatus Liberibacter spp.* y afecta a todas las especies de cítricos, especialmente los cítricos agrios. Para su detección, se emplean técnicas moleculares como es la reacción en cadena de la polimerasa (QT-PCR), técnicas serológicas y espectrofotométricas. El objetivo de este trabajo fue expresar la proteína recombinante BY8743 de *Candidatus Liberibacter* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 % (PAGE) y Dot Blot. Para obtener la secuencia se acudió a la base de datos del National Center Biotechnology Information (NCBI). Una vez obtenida la secuencia, se revisó y modificó el marco de lectura abierto,

por sus siglas en inglés Open Reading Frame (ORF) mediante el programa CLC Main Workbench 7 y se procedió a sintetizar el vector pET22b+, también se verificó el codón de inicio y de término acoplado al vector. Para la transformación se usaron células comerciales One Shot® TOP10 Chemically Competent (Invitrogen™), posteriormente fueron subclonadas en células de *E. coli* BL21. Se realizaron minipreparaciones usando un método de lisis alcalina y además se realizó una cinética de crecimiento, observando que en tres horas se alcanza la fase estacionaria. Se aplicaron concentraciones de 0,5, 0,8 y 1 mM del inductor metabólico isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y la mejor concentración fue 1 mM, ya que a las cuatro horas después de su aplicación se pudo visualizar una proteína sobreexpresada de 38 kDa. Cuando se realizó el Dot Blot se obtuvieron resultados sobresalientes de inmun expresión en las tres concentraciones del inductor utilizado a diferencia del control y de las células sin transfectar.

Palabras clave: HLB, proteína recombinante, inmunogeno.

RESUMO

Huanglongbing (HLB) é uma das doenças cítricas mais devastadoras em todo o mundo e representa uma séria ameaça à citricultura mexicana. O agente causador é uma bactéria inculturada pertencente ao gênero *Candidatus Liberibacter* spp. e afeta todas as espécies cítricas, especialmente as azedas. Para sua detecção, são utilizadas técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (QT-PCR), técnicas sorológicas e espectrofotométricas. O objetivo deste trabalho foi expressar a proteína recombinante BY8743 de *Candidatus Liberibacter* por eletroforese em géis de poliacrilamida 12% (PAGE) e Dot Blot. Para obter a sequência, foi utilizado o banco de dados do National Center Biotechnology Information (NCBI). Uma vez obtida a sequência, o Quadro de Leitura Aberta (ORF) foi revisado e modificado usando o programa CLC Main Workbench 7 e o vetor pET22b+ foi sintetizado, também foi verificado o start e stop códon acoplado ao vetor. Para a transformação, foram utilizadas células comerciais One Shot® TOP10 Quimicamente Competentes (Invitrogen™), posteriormente subclonadas em células *E. coli* BL21. Minipreparações foram feitas pelo método de lise alcalina e também foi realizada uma cinética de crescimento, observando que a fase estacionária foi atingida em três horas. Foram aplicadas concentrações de 0,5, 0,8 e 1 mM do inductor metabólico isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) e a melhor concentração foi de 1 mM, pois quatro horas após sua aplicação foi possível visualizar uma proteína superexpressa de 38 kDa. Quando o Dot Blot foi realizado, foram obtidos excelentes resultados de imun expressão nas três concentrações do inductor utilizado, ao contrário das células controle e não transfectadas.

Palavras-chave: HLB, proteína recombinante, imunógeno.

1 INTRODUCCIÓN

En México la citricultura es una actividad económica importante, sin embargo, esta riqueza se ve amenazada por una serie de enfermedades, destacando el Huanglongbing (HLB) o también conocida como “enverdecimiento de los cítricos” (Trujillo *et al.*, 2008); causada por una alfa – proteobacteria, gram negativa, incultivable (Robles *et al.*, 2013), perteneciente al género *Candidatus Liberibacter*, denominada así ya que deriva del término “*Candidatus*” organismos que no se puede cultivar y “*Liberibacter*” del latín Liber (corteza) y bacter (bacteria) (FAO, 2013). Esta bacteria se restringe al floema vascular de la planta, originando obstrucción al paso de los nutrientes por los tubos cribosos del floema, generando un déficit nutricional y problemas metabólicos (Collazo-

Cordero *et al.*, 2011). Actualmente se conocen tres especies de esta bacteria: *Ca. L. asiaticus*, *Ca. L. americanus* y *Ca. L. africanus* (Teixeira *et al.*, 2005). La bacteria causante del HLB se disemina ampliamente, gracias a que es transmitida por dos insectos vectores: *Diaphorina citri* (Asia y América) y *Trioza erytreae* (África), las cuales son capaces de transmitir y portar la bacteria con solo alimentarse de una planta infectada. Los síntomas iniciales que se presentan, como: brotes nuevos amarillentos, el moteado asimétrico, la clorosis difusa, entre otros, no son propios de la enfermedad, por lo que se puede llegar a confundir con alguna deficiencia de minerales u alguna otra patología (da Graca, 2008).

La citricultura representa un segmento económico muy importante en la agricultura mexicana, ya que genera una derrama económica superior a los 375 millones de dólares (González *et al.*, 2020). En los últimos años, la superficie cultivada con cítricos en el país se ha incrementado en 8 % al registrarse 620,000 ha en 2021 con respecto a las 569,914 ha existentes en 2010. La especie con mayor importancia en México es la naranja dulce, principalmente por la superficie sembrada (340 mil ha⁻¹) y producción (rendimientos promedio de 13.95 ton ha⁻¹), con un valor superior a los 10.18 mil millones de pesos (Rivera *et al.*, 2020). El primer reporte de presencia del HLB fue en 2009, en el estado de Yucatán, diseminándose rápidamente hacia estados cercanos, como: Quintana Roo, Jalisco, Nayarit y Colima (Esquivel *et al.*, 2012). El Huanglongbing afecta las Rutáceas que sirven como hospederas de los vectores, a la mayoría de las especies cítricas, siendo los cítricos agrios los de mayor prevalencia (da Graca, 2008). La enfermedad y los costos de su manejo producen pérdidas económicas y en el valor del producto, ocasionando consecuencias sociales y ambientales, ya que hasta ahora no existe una cura para el HLB. Actualmente, las técnicas que se utilizan para la detección del agente causal del HLB tanto en plantas como en su vector son las moleculares como el PCR convencional y PCR tiempo real, además de técnicas serológicas y espectrofotométricas. Sin embargo, el uso de proteínas recombinantes utilizadas, como método de diagnóstico para diversos agentes infecciosos, se ha convertido en un avance importante en proteómica. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue expresar la proteína recombinante BY8743 de membrana externa de la bacteria *Candidatus Liberibacter* para el desarrollo de un método de diagnóstico serológico mediante el uso de antígenos recombinantes para la detección temprana de la bacteria causante del HLB.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de trabajo. El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología del Campo Experimental de Río Bravo, Tamaulipas, km 61 Carretera Matamoros-Reynosa, C. P 88900, Cd. Río Bravo, localizado en las coordenadas (25° 57' de latitud norte y 98° 01' de longitud oeste, a una media altura

de 20 metros sobre el nivel del mar (MSNM) en colaboración con el Laboratorio de sanidad vegetal del Centro de Biotecnología Genómica del IPN donde se realizó el diseño de la secuencia y construcción del vector pET22.

Características del vector. El vector posee un promotor T7, un gen que codifica para la enzima Betalactamasa, y en el sitio C terminal tiene una etiqueta de 6 histidinas que se unen a la proteína de interés. Además, posee un gen de resistencia a la ampicilina y un sitio de reconocimiento de varias enzimas de restricción.

Transformación en One Shot® TOP10. Se usaron las células comerciales Chemically Competent (invitrogen™) y la transformación se realizó mediante el método de choque térmico.

Extracción de DNA plasmídico. Se realizaron minipreparaciones de acuerdo al protocolo mencionado por Sambrook y Russell (2001) para la extracción del ADN plasmídico a partir de las cepas TOP10 pET 22+. La identificación y caracterización del plásmido se realizó usando las enzimas de restricción *EcoRI* y *Hin III*.

Preparación de *E. coli* BL21 calciocompetente. La preparación de células *E. coli* BL21 calciocompetentes se realizó siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001).

Transformación de *E. coli* BL21. Se descongelaron las células calciocompetentes previamente preparadas en hielo, después, se añadieron 2 µl del ADN plasmídico obtenido de *E. coli* TOP10, como control se usó un vial con BL21 calciocompetentes sin vector, y se utilizó el protocolo de choque térmico para la transformación (Sambrook y Russell, 2001).

Cinética de crecimiento. Para la expresión de la proteína recombinantes B8Y674 de *Candidatus Liberibacter*, la primera variable evaluada fue el número de bacterias que se obtuvo mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀ nm) por unidad de tiempo. Así se identificaron las diferentes fases (latencia, exponencial y estacionaria). Se realizó una curva de crecimiento de las bacterias transformadas, para lo cual se determinó la DO₆₀₀ nm cada hora, teniendo en cuenta la relación directa entre el incremento del número de células y el valor de absorbancia registrado sin discriminar la viabilidad de las mismas. A partir de esta curva de crecimiento se pudo definir la fase exponencial entre 0.4 y 0.6 de absorbancia (DO₆₀₀ nm), la curva fue monitoreada por cinco horas.

Determinación de la concentración del inductor. Usando los datos de la cinética de crecimiento, se inocularon con *E. coli* BL21 transformadas cuatro matraces con 30 ml de caldo LB adicionado con ampicilina (50 µg/ml), y uno con *E. coli* BL21 sin transfectar y sin ampicilina. Los matraces se incubaron a 37 °C en agitación (220 rpm) hasta alcanzar la fase exponencial. Después de alcanzada dicha fase, se agregó el isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor metabólico, se seleccionaron tres concentraciones de IPTG tomando en cuenta la concentración mínima de 0.5 mM y la máxima de 1.0 mM recomendada por Sambrook y Russell (2001). Como control se utilizó un matraz con *E. coli* BL21 transformadas sin inductor y otro con *E. coli* BL21, sin transfectar, cada hora se tomó 1 ml de los cultivos de cada matraz y fueron almacenados a -20 °C, a la cuarta hora después de la inducción todas las alícuotas fueron centrifugadas a 12,000 rpm por dos minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con PBS 1X pH 7.5, éstos fueron congelados a -20 °C para ser analizados posteriormente.

Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE). Las muestras se descongelaron y se adicionó 1 ml del amortiguador de lisis (Ni-NTA Fast Star Kit QIAGEN®), siguiendo la metodología del fabricante. Posteriormente las muestras fueron separadas en gels de poliacrilamida 12 % teñidos con azul de coomassie por 1 hr y desteñidos para ser observados.

Inmunodetección de las proteínas recombinantes en Dot Blot. Se utilizó una membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF), se trazaron cinco círculos para delimitar el área de la muestra. Para activar la membrana, se colocó por 1 min en metanol al 100 %, posteriormente se lavó con agua tridestilada estéril y se dejó secar. Se colocó 5 µl del lisado en cada círculo, se dejó secar y se incubó en solución de bloqueo (TBS con BSA al 3 %) durante una hora a temperatura ambiente. En seguida se incubó en el anticuerpo primario (anti histidinas) en la solución de bloqueo por una hora a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados de cinco minutos con TBS/Tween (0.05 %) y se incubó por una hora a temperatura ambiente en el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón). Posteriormente se realizaron tres lavados de 15 minutos con TBS/Tween y por último se realizó un lavado de cinco minutos con TBS. Se incubó la membrana con el sustrato TMB por 10 minutos o hasta que apareciera una coloración y se detuvo la reacción con agua tridestilada estéril.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clonación, transformación de *E. coli* TOP10 y BL21, aislamiento y caracterización del plásmido. Se obtuvieron las células competentes de las cepas de *E. coli* TOP10 y BL21 empleadas en esta investigación. Se transformó correctamente la cepa que porta el plásmido de interés (B8Y674

pET 22b+) (Figura 1). También se obtuvo el DNA plasmídico mediante minipreparaciones alcalinas (Invitrogen™) el cual fue subclonado en las células *E. coli* BL21 (Figura 2).

Cinética de crecimiento. Una vez que las células BL21 se transformaron con el plásmido de *Candidatus* Liberibacter las colonias se aislaron en placa y se tomó una de ellas para realizar una cinética de crecimiento con la finalidad de determinar la fase exponencial y aplicar diferentes concentraciones del inductor metabólico IPTG. La clona de *Candidatus* Liberibacter llega a su óptima densidad óptica (0.5 y 0.6 de absorbancia) a las cuatro horas (Figura 3).

Figura 1. Colonias transformadas de *E. coli* TOP10 (a) y BL21 (b) con el vector BY8743 pET 22b+ (*Candidatus* Liberibacter) en agar LB con 50 µg/ml de ampicilina.

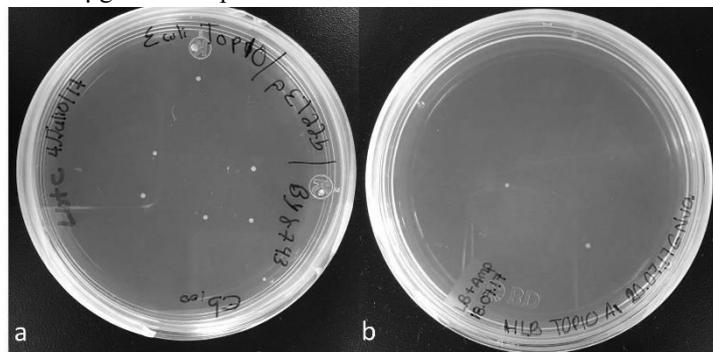


Figura 2. ADN plasmídico purificado.

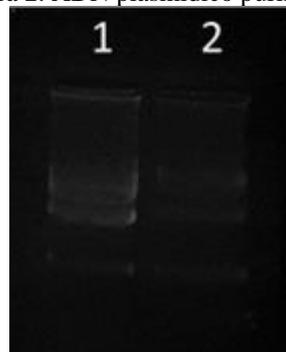
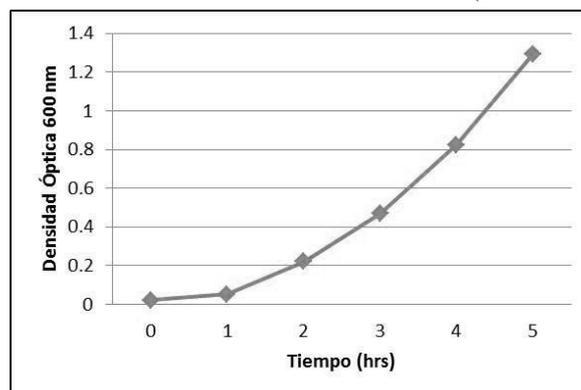
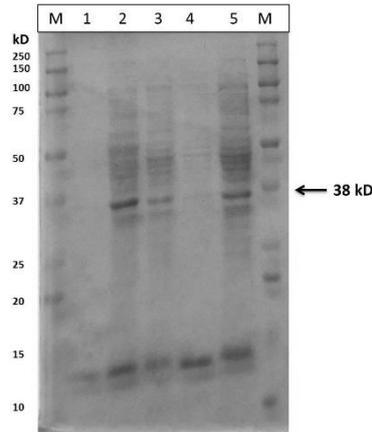


Figura 3. Cinética de crecimiento del cultivo de *E. coli* BL21 (absorbancia contra el tiempo).



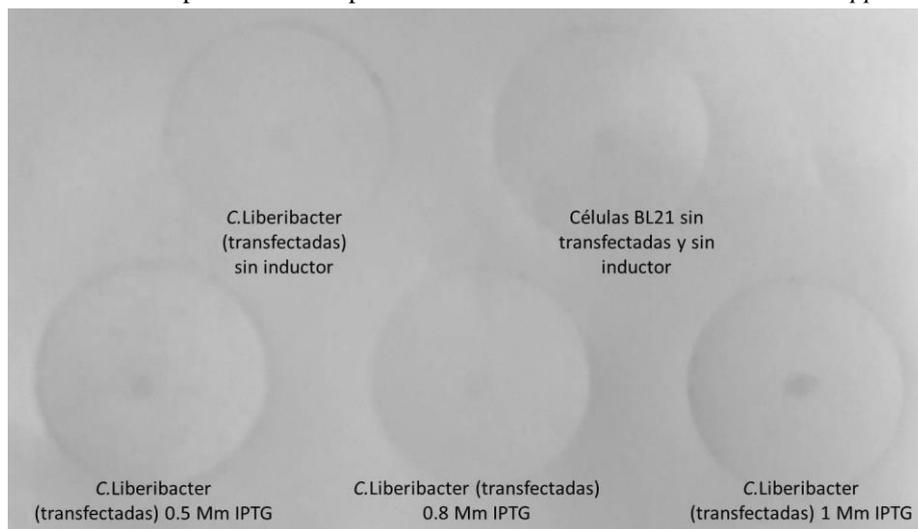
Electroforesis de poliacrilamida al 12 %. Se eligió la concentración de 12 % porque fue donde se observaron los fragmentos con mayor resolución. La separación e identificación de la proteína por SDS-PAGE, se muestra en la Figura 4. La expresión de la proteína B8Y674, se obtuvo a partir de la concentración mínima de 0.5 mM, pero con mejor resolución a las cuatro horas de crecimiento que es similar a lo reportado por Corona *et al.*, en el 2009.

Figura 4. Gel de poliacrilamida al 12 % de las distintas concentraciones de IPTG a las 4 horas. M= Marcador de peso molecular, carril 1 control HLB, carril 2 control BL21, carriles 3-5: 0.5 mM, 0.8 mM y 1 mM.



Inmunodetección mediante Dot Blot. Se usó un anticuerpo de IgG antihistidinas de ratón diluido 1:500 en solución de bloqueo, y como anticuerpo secundario se usó un anticuerpo IgG de cabra anti ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:5000. Se obtuvo una expresión proteína (Figura 5).

Figura 5. Determinación de la presencia de la proteína BY8734 de *Candidatus Liberibacter spp* mediante Dot Blot.



4 CONCLUSIONES

Se logró la clonación y subclonación de *Candidatus Liberibacter spp* en células TOP10 y BL21.

Se identificó la presencia de la proteína B8Y674 por SDS-PAGE y su expresión en Dot Blot, y se le considera una excelente alternativa para ser utilizada como un antígeno recombinante en la detección temprana de *Candidatus Liberibacter asiaticus*.

REFERENCIAS

Collazo-Cordero, C.; Núñez-Luis, J. Y.; Luis-Pantoja, M.; Llauger-Riverón, R. 2011. Optimización de una reacción en cadena de la polimerasa anidada para el diagnóstico de la enfermedad "huanglongbing" de los cítricos. *Revista Citri Frut*, vol. 28(2).

Corona, B., Rodríguez, M., Sánchez, L., Machado, H., and Martínez, S. 2009. Expresión, solubilización y purificación de la proteína MSP5 recombinante del aislamiento Habana de *Anaplasma marginale*. *Tecnología, ciencia, educación*, 24(1), 76-86.

da Graca J. V. 2008. Biology, history and world Status of huanglongbing. *Memorias del Taller Internacional sobre el Huanglongbing y el Psílido asiático de los Cítricos*. 8 de abril. Hermosillo, Sonora. Pp: 60-68.

Esquivel-Chávez, F.; Valdovinos-Ponce, G.; Mora-Aguilera, G.; Gómez-Jaime, R.; Velázquez-Monreal, J. J.; Manzanilla-Ramírez, M. A.; Flores-Sánchez, J. L.; Arroyo-López, J. I. 2012. Análisis histológico foliar de cítricos agrios y naranja dulce con síntomas ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. *Agrociencia* vol.46 no.8. México.

FAO. 2013. Marco estratégico para la gestión regional del Huanglongbing en América Latina y el Caribe. Santiago: FAO.

González Á, Guillén D, Alia I, López V, Juárez P, y Bárcenas, D. 2020. Comportamiento de variedades de naranja injertadas en diferentes portainjertos en Xalostoc, Morelos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11 (5): 1123-1134.

Rivera S, Perales A, Del Valle M, y Caamal I. 2020. Panorama de la producción y comercialización de naranja en México. *Agro productividad* 13 (7): 9-14.

Robles-González, M. M.; Velázquez-Monreal, J. J.; Manzanilla-Ramírez, M. A.; Orozco-Santos M.; Medina-Urrutia, V. M.; López-Arroyo, J.I.; Flores-Virgen R. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19(1): 15-31.

Sambrook, J., and Russel, D. W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory Manual* 3ra. Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor New York.

Teixeira, D. C.; Danet, J. L.; Eveillard, S.; Martins, E. C.; de Jesus, W. C JR.; Yamamoto, P. T.; Lopes. S. A.; Bassanezi, R B.; Ayres, A, J.; Saillard, C.; Bové, J. M. 2005. Citrus huaglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the "Candidatus" *Liberibacter* species associated with the disease. *Molecular and cellular probes* 19: 173-179.

Trujillo Arriaga, J.; Sánchez Anguiano, H. M.; Robles García, P. L. 2008. Situación actual y perspectivas del Huanglongbing y el psílido asiático de los cítricos en México. *Memorias del Taller Internacional sobre Huanglongbing y el Psílido asiático de los Cítricos*, 8 de abril. Hermosillo, Sonora.