

Expresión recombinante de la Proteína de los Cuerpos Esféricos 4 (SBP-4) de *Babesia bigemina*

Recombinant expression of the Spherical Body Protein 4 (SBP-4) of *Babesia bigemina*

ADOLFO CRUZ-RESÉNDIZ¹, GABRIELA AGUILAR-TIPACAMÚ¹, FRANCISCO ALPIREZ², BERNARDO VALDIVIEZO-LÓPEZ³, PAULA MENDOZA-NAZAR³, BENIGNO RUIZ-SESMA³, ANDREA OLVERA-RAMÍREZ¹, GERMINAL JORGE CANTÓ-ALARCÓN¹ Y JUAN MOSQUEDA-GUALITO^{1*}

¹ Cuerpo Académico Salud Animal y Microbiología Ambiental, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Autónoma de Querétaro. Av. de las Ciencias s/n, Col. Juriquilla. C.P. 76230. Querétaro, Qro.; México.

² Campo Experimental "La Posta" INIFAP, Paso del Toro, Veracruz.

³ Cuerpo Académico Producción Animal Tropical Sostenible, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Chiapas.

*Correo electrónico: joel.mosqueda@uaq.mx

ENVIADO EL 12 DE AGOSTO DE 2015/ ACEPTADO EL 25 DE SEPTIEMBRE DE 2015

RESUMEN

La babesiosis bovina, una enfermedad transmitida de un bovino a otro por garrapatas y representa un problema de salud animal y al mismo tiempo un impacto significativo a la ganadería bovina por las pérdidas económicas que ocasiona debido a la disminución de la producción y la muerte de bovinos infectados. A la fecha no hay vacunas recombinantes contra esta enfermedad y por esta razón se han estudiado los genes que codifican a proteínas de la membrana y organelos involucradas en procesos de invasión a las células blanco. Algunos de estos antígenos son las proteínas de los cuerpos esféricos SBP-1, SBP-2, SBP-3 y SBP-4, esta última es una proteína que secreta el parásito durante su fase intraeritrocítica. El objetivo de este trabajo fue clonar y expresar de forma recombinante a SBP4 de *B. bigemina*, para esto, se realizó la clonación del gen *sbp4* en un vector comercial, el cual se usó para transformar células competentes *E. coli*. Posteriormente se purificó el DNA bacteriano de dos clones seleccionadas las cuales fueron secuenciadas en dos sentidos con objeto de verificar si el inserto se encontraba en marco abierto de lectura. Posteriormente se realizó la inducción de la expresión de la proteína en un sistema de expresión bacteriano y finalmente se purificó utilizando una columna de afinidad. La presencia de la proteína fue verificada por western blot.

Palabras clave: Babesiosis, expresión recombinante, antígenos vacunas.

INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina en México es causada por dos especies de *Babesia*: *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*. Es una enfermedad causada por protozoarios intraeritrocíticos y que se transmite de un animal a otro por las garrapatas de bovino (Smith y Kilborne, 1893), principalmente del género *Rhipicephalus* (Minjauw and MacLeod, 2003; Bock et al., 2004; Schnittger et al., 2012). La babesiosis se caracteriza por causar signos clínicos como fiebre, anemia, hemoglobinuria, hemoglobinemia, letargia, anorexia, signos nerviosos y en muchas ocasiones, la muerte. Estos problemas son los causantes de las pérdi-

ABSTRACT

Bovine babesiosis, a disease transmitted among cattle by ticks, is a major animal health problem which has a significant impact on the industry due to reduced production and death of infected cattle. For this reason, methods have been developed for controlling both the vector and the parasite. Nowadays, molecular biology and biotechnology have taken an important role in the development of improved vaccines against babesiosis. membrane and organelle protein coding genes. An example is the identification of membrane and organelle protein coding genes, including the spherical body proteins SBP-1, SBP-2, SBP-3 and SBP-4; the latter is a protein secreted by the parasite during the intraeritrocitic stage. The aim of this study was to clone and express, in a recombinant form, the SBP-4 of *B. bigemina*. For this purpose, the cloning of gene *sbp4* was performed in a vector (pENTR™ / D-TOPO®) which was used to transform competent *E. coli* cells. Subsequently the bacterial DNA was purified from two selected clones and incubated with restriction enzymes (Not I and Asc I) to verify the presence of the insert, which was visualized by electrophoresis on an agarose gel. Two clones were sequenced in both directions to verify whether the sequence was in open reading frame (ORF) to subsequently carry out the expression of the protein in a bacterial expression system (pDEST™ 17 vector). Finally, once purified, it was evaluated as a vaccine antigen against bovine babesiosis.

Key words: Babesiosis, recombinant expression, antígenos, vaccines.

das económicas y de las inversiones millonarias que se emplean para el control de la enfermedad, que se acercan a los tres billones de dólares (Bock et al., 2004; USAHA, 2008; Schnittger et al., 2012). Aunque no se tiene el dato estimado de las pérdidas económicas en el país, se calcula que cerca del 75% de la población ganadera se encuentra en zonas de alta prevalencia; solo en el 2011 se registraron 555 focos de importancia epidemiológica en los que estaba presente la garrapata (Osorno, 1978; SIAP, 2008; Sagarpa, 2012). Hoy en día los principales métodos de control y/o tratamiento de la enfermedad son

mediante medicamentos para disminuir los síntomas, tratamientos para controlar al vector que transmite la enfermedad y el método que se ha venido utilizando en los últimos tiempos son las vacunas con el agente patógeno vivo atenuado y agente patógeno muerto (Bock et al., 2004). A la fecha no hay vacunas vivas comerciales contra esta enfermedad en México, ni hay vacunas recombinantes de ningún tipo en el mundo; sin embargo, ya se están estudiando algunas proteínas del parásito en diferentes fases de su ciclo de vida que puedan ser utilizadas para generar vacunas que al ser aplicadas en los animales puedan montar una respuesta inmunitaria capaz de bloquear al parásito e impedir su replicación. Es el caso de una proteína que en estudios recientes se ha podido identificar, y que se denominó Proteína de los Cuerpos Esféricos 4 (SBP-4 por sus siglas en inglés). Esta proteína se encontró en unos organelos llamados cuerpos esféricos, los cuales están presentes durante la fase intraeritrocítica en el desarrollo del parásito, la proteína es liberada por el parásito y se distribuye en el citoplasma del eritrocito, lo que hace suponer que su importancia radica en esta parte de su ciclo de vida. (Alaa et al., 2011a)

Actualmente se ha evaluado a SBP-4 de *Babesia bovis* como método de diagnóstico, no obstante no se han hecho trabajos evaluando a esta proteína como candidato vacunal (Alaa et al., 2011b). En estudios recientes en *B. bigemina* se logró identificar, mediante herramientas bioinformáticas, una proteína homóloga a SBP-4, por lo tanto la producción de la proteína SBP-4 de manera recombinante, permitirá evaluar su potencial diagnóstico y vacunal. Los objetivos del trabajo fueron expresar la proteína SBP4 de forma recombinante, además de su purificación por columnas de afinidad y su cuantificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Método para extraer ADN de garrapatas infectadas con *Babesia bigemina*

La extracción de ADN se realizó a partir de garrapatas infectadas utilizando el método de fenol-cloroformo-alcohol iso-amílico siguiendo protocolos previamente estandarizados (Mosqueda, 2010). Brevemente, se utilizaron dos

garrapatas adultas sin eviscerar. Se maceraron con un mortero y pistilo mantenidos a -20 °C en 4 ml de una solución de lisis (EDTA 10mM, Tris 10mM, SDS 0,5%). Se colectó la muestra en tubos de 1,5 ml, la cual se incubó durante 5 minutos. Se le agregó proteinasa K (100µg/ml) y se incubó toda la noche a 45 °C en baño maría. Se agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol iso-amílico y se dejó en agitación durante 10 minutos. Se centrifugó la muestra a 1 000 g durante 10 minutos. La fase acuosa se separó en un tubo nuevo y se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó la muestra a -70 °C por 2 horas y se centrifugó el ADN a 16 000 g por una hora. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó la muestra a 16 000 g durante 10 minutos a 4 °C. La pastilla se secó durante 15 minutos al aire, para resuspender el ADN se agregaron 50 µl de agua libre de nucleasas y se incubó la muestra durante 10 minutos a 55 °C. La concentración de ADN se obtuvo por espectrofotometría en un equipo Nanodrop (ThermoFisher Scientific, EUA). Finalmente, para evaluar la integridad del ADN se realizó un electroforesis en gel de agarosa a 0,8% y se visualizó mediante tinción de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) con luz UV en un fotodocumentador (Bio Rad).

II. Método para amplificación del gen *sbp4* de *B. bigemina*

El ADN de *B. bigemina* obtenido de las garrapatas infectadas se utilizó para amplificar el gen *sbp4* mediante una reacción de PCR, para lo cual se utilizaron oligonucleótidos específicos (Cuadro 1). La reacción se realizó con el siguiente protocolo de termociclado: 95 °C 1' (1x), 94 °C 15", 54 °C 30", 72 °C 50" (10x), 94 °C 15", 56,8 °C 30", 72 °C 50" (20X), 72 °C 7' (1X). Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó mediante tinción de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) con luz UV (590nm).

Cuadro 1. Oligonucleótidos para amplificación del gen *sbp4*

Oligonucleótidos	Secuencia
Forward	5'-CAC CTT TGA CAA CGT CAT CGA GGT GA-3'
Reverse	5'-TCA CTG GTG CTC CTC AAC CTC-3'

III. Método para la clonación del gen *sbp4* de *B. bigemina*

Con el producto de PCR obtenido se realizó la clonación. Primero se realizó la reacción de ligación. Se mezcló la reacción junto con el vector de entrada pENTRTM y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 2 µl de la reacción de ligación a un vial de células competentes *E. coli* TOP10 (1 x 10⁹ ufc). La muestra se mezcló suavemente y se dejó incubando por 20 minutos en hielo. Se realizó un choque térmico a las células por 30 segundos a 42 °C. Inmediatamente se transfirieron a hielo. Se agregaron 250 µl de medio súper óptimo con represor catabólico (S.O.C. por sus siglas en inglés) a temperatura ambiente. Se dejaron en agitación horizontal (200 rpm) a 37 °C x 1 hora. Una vez transcurrido el tiempo se colocó la reacción en placas de cultivo LB (Luria Bertani) con dos volúmenes diferentes; en una se colocaron 100 µl y en otra 150 µl. Las placas de cultivo se dejaron toda la noche en crecimiento a 37 °C. (Invitrogen, 2006)

VI. Análisis de transformantes

Se seleccionaron 5 colonias y se cultivaron toda la noche en medio LB conteniendo 50 mg/ml de kanamicina. Cada colonia se cultivó en 5 ml de medio LB en tubos cónicos de 15 ml y se realizó una resiembra en otra placa de medio LB. Se centrifugaron los tubos a 6 440 g x 10 minutos y se decantó el sobrenadante (se almacenó el botón celular a -20 °C). Posteriormente se realizó la purificación de plásmidos con el sistema Illustra plasmidPrep mini spin (GE) y con el producto obtenido se realizó una digestión enzimática. La reacción se dejó incubando 1 hora a 37 °C. Después de transcurrido el tiempo se corrieron las reacciones en un gel de agarosa al 1% y se visualizó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) en UV (590nm). Una vez comprobado que se encontraba el inserto en los plásmidos, se seleccionaron 2 clonas y secuenciaron en ambos sentidos utilizando el método de Sanger en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

VII. Método para la expresión recombinante de la proteína SBP4

Para la expresión de la proteína SBP-4 se utilizó el vector de expresión pDEST 17 y se siguió el

protocolo del fabricante (ThermoFisher Scientific, EUA). Primero se realizó una reacción de recombinación utilizando el vector control pENTR-gus. A la reacción se le agregaron 2 µl de la mezcla de enzimas LR clonasa II y se dejó en incubación durante 18 horas. Posteriormente se le agregó 1 µl de proteinasa K y se dejó en incubación a 37 °C durante 10 minutos. Posteriormente se tomaron 2 µl de la reacción y se agregaron a un vial de células BL21-AI. Se incubaron en hielo por 30 minutos. Se les dio un choque térmico a las células por 30 segundos a 42 °C. Se transfirieron a hielo. Se les agregaron 250 µl de medio S.O.C. a temperatura ambiente. Se dejaron en agitación (200 rpm) a 37 °C por 30 minutos. Se vertieron 2 volúmenes diferentes en 2 placas con agar LB con ampicilina [100 µg / 1 ml], el primero con 100 µl y el segundo con 200 µl, igualmente se realizó con el control pENTR-gus y se dejaron en incubación toda la noche a 37 °C. Una vez obtenidas las colonias se realizó la inducción de la expresión. Se seleccionaron 2 colonias del control y 2 colonias con el gen de interés. Se cultivaron en 5 ml de medio LB con ampicilina [100 µg/1 ml], se dejaron en incubación a 37 °C en agitación hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,6-1,0. Con estas muestras se inocularon nuevos medios con ampicilina para tener una dilución de 1:20 y se dejaron crecer los cultivos hasta alcanzar una OD₆₀₀ = 0,4. Todos los cultivos se dividieron en dos y a uno de cada colonia se le agregó L-arabinosa a una concentración final de 0,2% para tener un cultivo inducido y uno no inducido. Se dejaron crecer durante 3 horas, se tomaron 2 ml de cada tubo y se centrifugaron a 16 000 g por 10 minutos. Se les retiró el sobrenadante y se almacenaron los pellets a -20 °C. Se realizó lo mismo con el resto de los cultivos.

VIII. Método para confirmación de la expresión de la proteína

Se realizó la electroforesis en 2 geles de bisacrilamida al 12%. Se cargaron las muestras de lisados de bacterias conteniendo el plásmido con el gen de interés de cultivo inducido y no inducido, los controles de expresión de cultivo inducido y no inducido y bacterias sin vectores de cultivo inducido y no inducido. Se co-

rrió la electroforesis a 75 volts durante 2 horas. Un gel se dejó en fijación durante 30 minutos. Posteriormente se le agregó el colorante azul de Coomassie (0,025% p/v) y se dejó en agitación durante 1 hora. Finalmente se dejó 30 minutos en solución desteñidora y se analizó en el fotodocumentador (590nm). El segundo gel se dejó en solución de transferencia para realizar la inmunoelectrotransferencia por Western Blot. Se realizó la electroinmunotransferencia a 100 v durante 1 hora sobre una platina con agitación. Enseguida se le realizó un lavado a la membrana de nitrocelulosa (BioRad, EUA) con TBS 1x durante 15 minutos. La membrana se bloqueó con leche al 5% en TTBS 1x toda la noche a 4 °C. Después se realizó un lavado con TTBS 1x durante 20 minutos y dos lavados con TBS 1X durante 15 minutos cada uno. Se incubó con el anticuerpo primario de conejo con afinidad hacia una etiqueta de 6 histidinas que contenía la proteína SBP-4, con una concentración de 1:500 diluido en leche descremada al 1% p/v más TTBS y se dejó en incubación durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación a 60 rpm. Terminada la incubación se retiró la solución del primer anticuerpo y se realizaron 3 lavados; 1 con TTBS durante 15 minutos y 2 más con TBS 1X por 15 minutos cada uno y en agitación (100 rpm). Posteriormente se realizó una incubación con el anticuerpo secundario anti-anticuerpo de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1:1 000) en leche descremada al 1% más TTBS. Se dejó incubando durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación ligera (60 rpm). Se realizaron 3 lavados más; 1 con TTBS y 2 con TBS, cada uno de 15 minutos y en agitación (100 rpm). El revelado se realizó por colorimetría, a la membrana se le agregó el sustrato para la fosfatasa alcalina de NBT/BCIP (cloruro de nitroblue tetrazolium/5-Bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato). (ThermoFisher Scientific, EUA)

IX. Purificación de proteínas marcadas con 6xHis de *E. coli* bajo condiciones desnaturalizantes

La purificación se realizó utilizando la metodología descrita por Porath y col., en 1975 y Schäfer y col., en 2002. Brevemente, utilizando columnas de níquel (Ni-NTA Purification

System, ThermoFisher Scientific, EUA), se colocaron las células bacterianas congeladas a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se agregaron 10 ml de buffer B-7 M urea (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 7 M urea a pH a 8) a las células descongeladas. Se re-suspendió el botón celular por pipeteo. Se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C). El lisado crudo se transfirió a un tubo y se centrifugó por 30 minutos por 15 000 g a temperatura ambiente. El sobrenadante se colectó en otro tubo. La columna se equilibró con 10 ml de buffer B-7 M urea. Posteriormente se transfirieron los lisados limpios en las columnas equilibradas y dejaron drenar por gravedad. Se realizó el primer lavado agregando 10 ml de buffer B-7 M urea. Un segundo lavado con 10 ml de buffer C-7 M urea (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 7 M urea pH a 6,3). Para obtener la proteína se realizaron 5 eluciones de 1 ml de buffer E-8 M urea (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M urea pH a 4,5).

X. Cuantificación de proteína por el método Bradford

Para la cuantificación se utilizó el kit Quick Start Bradford Protein Assay (BioRad, EUA). Se prepararon los estándares de cuantificación (125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - 2 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Se prepararon las diluciones de las muestras a cuantificar, 100, 50 y 25%. Se colocaron 5 μl de cada estándar por triplicado en los pozos de una placa de ELISA, lo mismo se realizó con las muestras. A todos los pozos se les agregaron 250 μl del colorante Bradford y se dejaron incubando durante 20 minutos. Posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro a una OD595.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. Extracción de ADN de *Babesia bigemina*

Al utilizar el método de extracción de ADN publicado por Mosqueda (2010), se obtuvieron concentraciones y purezas de ADN adecuadas de acuerdo con lo descrito por Sambrook y colaboradores (1989) y Wassenaar (2002), que son: concentraciones mínimas de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para ADN de cadena doble y lectura de pureza (260/280) de 1,8. (Cuadro 2, Figura 1)

Cuadro 2. Cuantificación de ADN extraído a partir de garrapatas infectadas con *B. bigemina* cepa Chiapas

Muestras	Concentración (ng/μl)	260/280
1	491,7	1,87
2	476,3	1,91
3	518,9	1,88

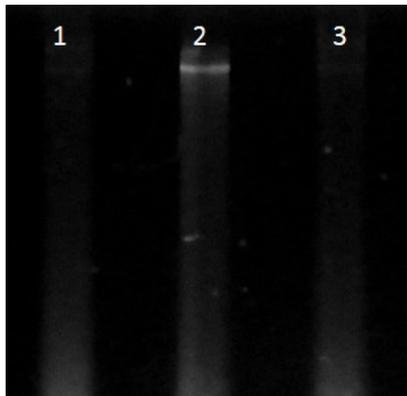


Figura 1. Electroforesis para evaluación de integridad de ADN (se presentan tres muestras diferentes).

II. Amplificación del gen *sbp4* mediante PCR

El ADN extraído se utilizó para amplificar el gen *sbp4* con la prueba de PCR. Después de añadir bromuro de etidio (0,5 μg/ml) al gel y observarlo en el transiluminador (590 nm) se detectó una banda del tamaño esperado que era de aproximadamente 800 pb. (Figura 2)

III. Clonación del gen *sbp4* en un vector bacteriano

El protocolo utilizado permitió obtener varias unidades formadoras de colonias (ufc). Shuman (1991) y Cheng y Shuman (2000) describieron este protocolo por primera vez y en él mencionan que una buena eficiencia en el crecimiento

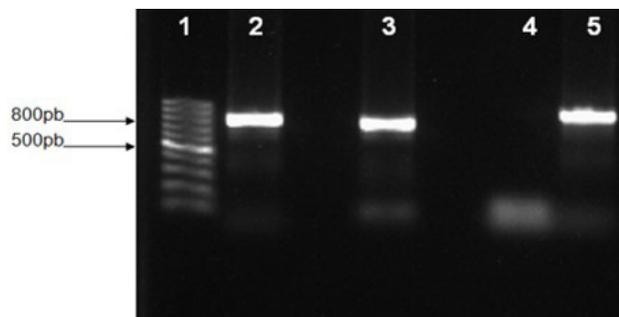


Figura 2. Amplificación del gen *sbp4* (774pb) a partir de ADN extraído de garrapatas infectadas con *B. bigemina*. Carril 1: marcador de peso molecular (1KB), carril 2: muestra 1 de ADN de *B. bigemina*, carril 3: muestra 2 de ADN de *B. bigemina*, carril 4: control de reacción negativo y carril 5: control de reacción positivo.

es de 1×10^9 ufc, aunque en este trabajo las ufc se obtuvieron en menor cantidad debido ya sea a un mal tratamiento a las bacterias; una mala purificación del producto de PCR que se utilizó para la ligación o bien a una mala relación entre el producto de PCR y el vector (Sambrook y Russell, 2001); no obstante, se detectaron colonias bacterianas que contenían el vector con el inserto al crecerlas en un medio con kanamicina (Landy, 1989). De las colonias obtenidas se seleccionaron 7, las cuales se crecieron en medio LB con kanamicina [50 μg/ml], se les extrajo y purificó el ADN plasmídico, posteriormente se cuantificó y se realizó una electroforesis del ADN purificado para observar la presencia del inserto (Figura 3). A la colonia positiva se le realizó una digestión enzimática con las enzimas Not I y Asc I, el resultado se muestra en la Figura 4 (Digestión enzimática con Not I y Asc I). Adicio-

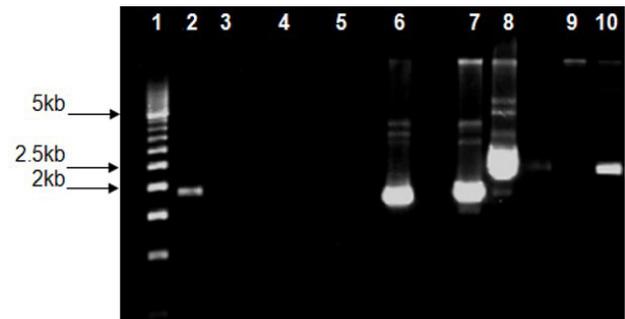


Figura 3. Electroforesis de ADN plasmídico purificado de colonias transformadas con el vector de clonación pENTR™D-TOPO® (2580pb). Carril 1: mpm (5KB), carril 2: control negativo (plásmido sin inserto), carril 3: ADN plasmídico colonia 1, carril 4: ADN plasmídico colonia 2, carril 5: ADN plasmídico colonia 3, carril 6: ADN plasmídico colonia 4, carril 7: ADN plasmídico colonia 5, carril 8: ADN plasmídico colonia 6 (positivo a la inserción de gen *sbp4* al vector 3358pb aprox.), carril 9: ADN plasmídico colonia 7, carril 10: control positivo (vector con un inserto de tamaño aproximado al de *sbp4*).

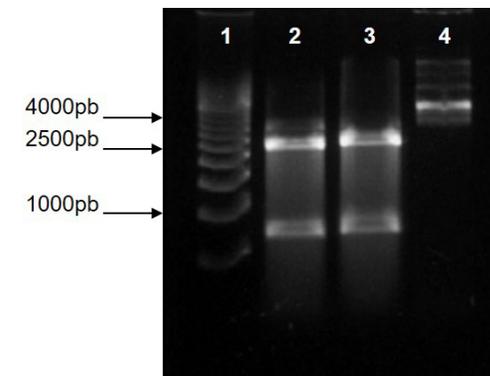


Figura 4. Digestión enzimática con Not I y Asc I. Carril 1 mpm. (5KB), carril 2: reacción 1 de la colonia 6; carril 3: reacción 2 de la colonia 6, carril 4: ADN plasmídico de la colonia 6 no digerido.

nalmente, se analizó la secuencia de nucleótidos obtenida y se comparó con la secuencia del genoma *B. bigemina* del Instituto Sanger y con la secuencia parcial reportada por Guillemi y colaboradores (2013), en la que observó un porcentaje de similitud de 99%. Cuando se evaluó la secuencia predicha de proteína y se comparó con la secuencia descrita por los mismos autores, se observó un porcentaje de similitud de 99%. Estos resultados confirman que el gen clonado es *sbp4* de *B. bigemina* y que su secuencia es muy conservada comparada con la secuencia del gen *sbp4* de *B. bigemina* de una cepa argentina. (Guillemi et al., 2013) (Cuadros 3 y 4)

IV. Expresión de la proteína SBP-4 en un sistema bacteriano

Los resultados de la secuenciación de cada una de las clonas y el análisis posterior de las secuencias permitió dos cosas: primero, corroboró la existencia de la secuencia del gen *sbp4* y segundo, que esta secuencia estaba en marco de lectura abierto, con lo que se podía proceder con la expresión. Se realizó la reacción de recombinación utilizando sitios específicos de recombinación del vector, llamados attL (vector de clonación) y attR (vector de expresión), los cuales hacen más eficiente el proceso y por consiguiente la expresión. La catálisis de la mezcla de enzimas LR clonasa II que contiene

Cuadro 3. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de SBP4 de la cepa Kuttler (cepa de referencia) y la cepa Cintalapa, Chiapas

ProSBP4cepaKuttler	FDNVLVETVFEHGESDNNMVLDSLIPSESDMMIHRQTDGCAPRTPVVYTPV 50
ProSBP4cepaChiapas	FDNVLVETVFEHGESDNNMVLDSLIPSESDMMIHRQTDGCAPRTPVVYTPV 50

ProSBP4cepaKuttler	RPNKLRLVWSDTVIHGVGEDDEDTEIEKVTVHTHCHETLIEVSLGSKVH 100
ProSBP4cepaChiapas	RPNKLRLVWSDTVIHGVGEDDEDTEIEKVTVHTHCHETLIEVSLGSKVH 100

ProSBP4cepaKuttler	YLGRDGEFEFISEHKYQEELREMTKTIVDINDVNDNKYLSYETNTAYGI 150
ProSBP4cepaChiapas	YLGRDGEFEFISEHKYQEELREMTKTIVDINDVNDNKYLSYETNTAYGI 150

ProSBP4cepaKuttler	TWYNIVPISCFYSKDVVAGNVTVWTVGVC HQRFAGASVYVNGHEKLVALI 200
ProSBP4cepaChiapas	TWYNIVPISCFYSKDVVAGNVTVWTVGVC RQRFAGASVYVNGHEKLVALI 200

ProSBP4cepaKuttler	YHDVDGMKEALYHGKNEIYEELTLEQFDEQFKLLEEKFAAGKNSVDAEVR 250
ProSBP4cepaChiapas	YHDVDGMKEALYHGKNEIYEELTLEQFDEQFKLLEEKFAAGKNSVDAEVR 250

ProSBP4cepaKuttler	KEVEEHQ 257
ProSBP4cepaChiapas	KEVEEHQ 257

Cuadro 4. Análisis Blast de la secuencia de aminoácidos de SBP4. Se muestran las secuencias de mayor porcentaje de similitud *B. bigemina* cepa Argentina

Puntuación	Predicho	Identidad	Positivos	Espacios
337 bits (863)	2e-114	162/163 (99%)	162/163 (99%)	0/163 (0%)
Query 47	YTPVVRPNKLRHLVWSDTVIHGVGEDDEDTEIEKVTVHTHCHETLIEVSLGSKVHYLGRDG			106
Sbjct 1	YTPVVRPNKLRHLVWSDTVIHGVGEDDEDTEIEKVTVHTHCHETLIEVSLGSKVHYLGRDG			60
Query 107	EFEFISEHKYQEELREMTKTIVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSKDV			166
Sbjct 61	EFEFISEHKYQEELREMTKTIVDINDVNDNKYLSYETNTAYGITWYNIVPISCFYSKDV			120
Query 167	VAGNVTVWTVGVC HQRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE 209			
Sbjct 121	VAGNVTVWTVGVC RQRFAGASVYVNGHEKLVALIYHDVDGMKE 163			

una integrasa, una excisionasa y un factor de integración del huésped (IHF por sus siglas en inglés), es lo que permite la recombinación de los vectores (Weisberg y Landy, 1983; Landy, 1989; Ptashne, 1992). Durante este proceso únicamente se obtuvieron las ufc recombinadas, ya que la tecnología de este sistema de expresión permitió la selección de las colonias mediante el gen de resistencia a antibiótico y un gen letal llamado “*ccdB*” evitando el crecimiento de las bacterias no recombinadas y permitiendo que se desarrollara de manera más eficiente la expresión únicamente de colonias con el gen de interés (Bernard y Couturier, 1992; Invitrogen, 2012). Finalmente, para lograr expresión de la proteína exógena por las bacterias transforma-

das, se usó el promotor de LacZ, por lo que se siguió el proceso que utiliza la L-arabinosa y cuyo principio lo describieron Ogden y colaboradores en 1980 y Schleif en 1992. Se realizó la electroforesis en gel de bis-acrilamida de las proteínas de las células BL21-AI™ inducidas, y se tiñó con azul de Coomassie (Reisner et al., 1975), observando una banda del tamaño esperado de la proteína recombinante SBP-4 (Figura 5). La detección de la proteína mediante anticuerpos anti-etiqueta de histidinas se realizó mediante inmunoelectrotransferencia tanto para la detección de la proteína utilizada como control, como para la proteína SBP-4 (Figuras 6 y 7). No se observó ninguna banda en los cultivos de bacterias no inducidos o sin inserto (Figura 6), pero

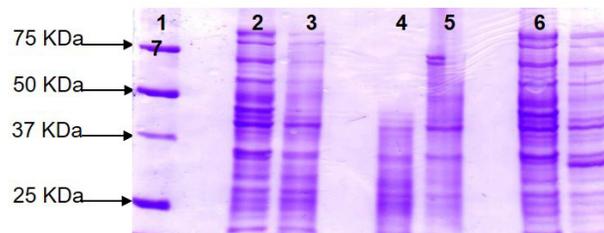


Figura 5. Electroforesis de proteínas en células BL21-AI™ inducidas. Carril 1: mpm. Carril 2: Plásmido vacío no inducido. Carril 3: Plásmido vacío inducido. Carril 4: pENTR-gus™ no inducido. Carril 5: pENTR-gus™ inducido. Carril 6: colonia de BL21-AI™ transformada SBP4 no inducida. Carril 7: colonia de BL21-AI™ transformada SBP4 inducida.

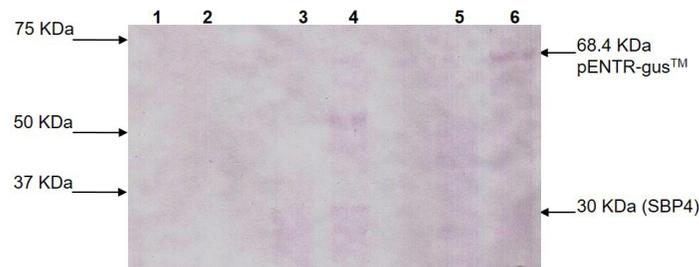


Figura 6. Western Blot para confirmar expresión de la proteína SBP4 de *Babesia bigemina*. Carril 1: plásmido vacío no inducido, carril 2: plásmido inducido. Carril 3: plásmido con SBP4 no inducida, carril 4: plásmido con SBP4 inducida. Carril 5: pENTR-gus™ control de expresión no inducido y carril 6: pENTR-gus™.

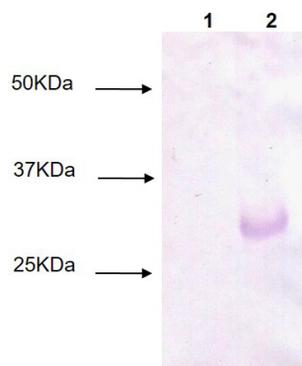


Figura 7. Western Blot de lisado de bacterias con la proteína SBP4 no inducida e inducida. Carril 1: plásmido con SBP4 no inducida. Carril 2: plásmido con SBP4 inducida.

sí se observó una banda en cultivos inducidos de bacterias conteniendo el inserto (Figura 7). Estos análisis permitieron identificar una proteína de un peso aproximado de 30 KDa, que corresponde al tamaño esperado para SBP-4, lo cual confirma la expresión recombinante.

V. Purificación y cuantificación de la proteína SBP-4

Al realizar la electroforesis en gel de bis-acrilamida de la proteína purificada, se observó una banda única sin contaminación por proteínas de otros pesos moleculares (Figura 8, carril 5). Finalmente, la metodología de Bradford se utilizó para determinar la concentración de la proteína con ayuda de un espectrofotómetro a una densidad óptica de 595, lo cual arrojó una concentración de 123,4-125 µg/ml. (Cuadro 5) (Bradford, 1976; Compton y Jones, 1985)

CONCLUSIÓN

En este trabajo se demostró la expresión recombinante, en un sistema bacteriano, de SBP4 de *Babesia bigemina*, la cual fue purificada y cuantificada. Esta proteína puede ser utilizada en experimentos que permitan su evaluación como candidato vacunal y de diagnóstico contra la babesiosis bovina.

Cuadro 5. Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Muestra	DO ₅₉₅	[µg/ml] proteína
Eluato 2	0,6253	125
Eluato 3	0,6173	123,4

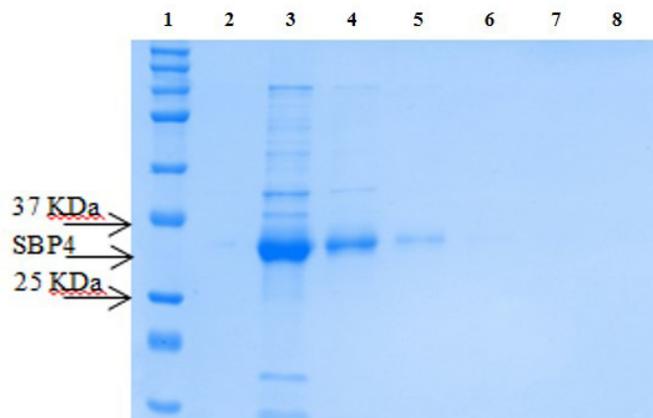


Figura 8. Electroforesis en gel de bis-acrilamida 12%. Carril 1: m.p.m. Carril 2: primer lavado. Carril 3: eluato 1. Carril 4: eluato 2. Carril 5: eluato 3. Carril 6: eluato 4. Carril 7: eluato 5. Carril 8: eluato 6

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Conacyt-Ciencia Básica 167129 y PRODEP-REDES. Adolfo Cruz recibió un financiamiento para su tesis de licenciatura de FOPER-UAQ.

REFERENCIAS

Alaa, T.M.; Junior, S.F.; Eko, W.P.; Xuan, H.N.; Minoda, Y.; AbouLaila, M. et al. (2011a). Secretion of a new spherical body protein of *Babesia bovis* into the cytoplasm of infected erythrocytes. *J. Elsevier Molecular and Biochemical Parasitology*. 178: 40-45.

Alaa, T.M.; Xuan, H.N.; Eko, W.P.; Junior, S.F.; Aboulaila, M.; Ueno, A. et al. (2011b). Spherical body protein 4 is a new serological antigen for global detection of *Babesia bovis* infection in cattle. *J. Clinical and vaccine immunology*. 18 (2): 337-347.

Bernard, P. & Couturier, M. (1992). Cell killing by the F plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of ADN-Topoisomerase II Complexes. *J. of Molecular Biology*. 226, 735-745.

Bock, R.; Jackson, L.; De Vos, A. & Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of cattle. *J. Cambridge Parasitology*. 129: 247-269.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *J. Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Cheng, C. & Shuman, S. (2000). Recombinogenic flap ligation pathway for intrinsic repair of Topoisomerase IB-Induced Double-Strand breaks. *J. Molecular and Cellular Biology*. 20, 8059-8068.

Compton, S.J. & Jones, C.G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay, *J. Analytical Biochemistry* 151, 369-374.

Guillemi, E.; Ruybal, P.; Lia, V.; González, S.; Farber, M. & Wilkowsky, S.E. (2013). Multi-locus typing scheme for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* reveals high levels of genetic variability in strains from Northern Argentina. *Infection, genetics and evolution*. 14 (2013) 214-222.

Invitrogen. 2006. pENTR Directional TOPO® cloning kits. Five-minute, directional TOPO® cloning of blunt-end PCR products into an entry vector for the Gateway® system. Recuperado: Junio 15, 2012. Proviene de http://openwetware.org/images/bd/PENTR_Directional_TOPO_Cloning_Kit.pdf

- Invitrogen. 2012. *E. coli* expression system with Gateway technology. Gateway®-adapted destination vectors for cloning and high-level expression of native or tagged recombinant proteins in *E. coli*. Recuperado: Enero 27, 2013. Proviene de: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ecoli_gateway_man.pdf
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural and regulatory aspects of Lambda site-specific recombination. *J. Annual Review of Biochemistry*. 58, 913-949.
- Minjauw, B. & McLeod, A. (2003). Tick-borne diseases and poverty. The impact of ticks and tick-borne diseases on the livelihood of small-scale and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. Edinburgh: Centre for Tropical Veterinary, Medicine, University of Edinburgh, UK.
- Mosqueda, G.J.J. (2010). Sagarpa. Diagnóstico de enfermedades parasitarias selectas de rumiantes. 11. Extracción de ADN de hemoparásitos. pp. 178-191. México.
- Ogden, S.; Haggerty, D.; Stoner, C.M.; Kolodrubetz, D. & Schleif, R. (1980). The *Escherichia coli* L-Arabinose Operon: binding sites of the regulatory proteins and a mechanism of positive and negative regulation. *J. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. USA 77, 3346-3350.
- Osorno, E.M. (1978). Babesiosis en México. *Veterinaria México*; (9): 203-218.
- Porath, J.; Carlsson, J.; Olsson, I. & Belfrager, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *J. Nature* 258, 598.
- Ptashne, M. (1992). A Genetic Switch: Phage (Lambda) and higher organisms (Cambridge, MA: Cell Press).
- Reisner, A.H.; Nemes, P. & Bucholtz, C. (1975). The use of Coomassie Brilliant Blue G-250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels. *J. Analytical Biochemistry* 64, 509-516.
- Sagarpa. (2012). XII Foro SIAP-Sagarpa Expectativas del sector agroalimentario y pesquero. México.
- Sambrook, J.; D.F. Fritsch et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, Cold Spring Harbor Press.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*. 3rd edition. Cold spring harbor laboratory press. USA.
- Schnittger, L.; Rodriguez, A.E.; Florin, C.M. & Morrison, D.A. (2012). *Babesia*: A world emerging. *Infection, Genetics and Evolution*. (8): 1788-809.
- Schäfer, F.; Schäfer, A. & Steinert, K. (2002). A highly specific system for efficient enzymatic removal of tags from recombinant proteins. *J. of Biomolecular Techniques*. 13, 158.
- Shuman, S. (1991). Recombination mediated by vaccinia virus ADN Topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. USA 88, 10104-10108.
- Schleif, R.S. (1992). ADN Looping. *Annual Review of Biochemistry*. 61, 199-223.
- SIAP. (s/f). Cattle population in México 1999-2008. Recuperado de: www.sagarpa.gob.mx, 2008.
- Smith, T. & Kilborne F. L. *Investigations into the Nature, Causation, and Prevention of Texas or Southern Cattle Fever*. University of North Texas Libraries, The Portal to Texas History, University of Texas Health Science Center Libraries. USA. 1: 1-372.
- USAHA. (2008). *Foreign animal diseases*. 7th Ed. United State Animal Health Association. p. 14
- Wassenaar, T. (2002). Index of ADN purity. Ask as scientist. Molecular Biology Archive. Recuperado: Abril 3, 2013. Proviene de: <http://www.newton.dep.anl.gov/askasci/mole00/mole00371.htm>
- Weisberg, R.A. & Landy A. (1983). Site-Specific recombination in Phage Lambda. Cold Spring Harbor Press. pp. 211-250.