

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA



Construcción De Un Vector De Expresión Del Gen CcV1 (De *Cotesia congregata* bracovirus) Para *Escherichia coli*.

Por:

HENRI MANUEL JIMENEZ JIMENEZ

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre, 2021

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Construcción De Un Vector De Expresión Del Gen CcV1 (De *Cotesia congregata*
bracovirus) Para *Escherichia coli*.

Por:

HENRI MANUEL JIMENEZ JIMENEZ

TESIS


Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:



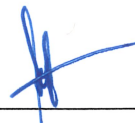
Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Asesor Principal Interno



Dra. Lihua Wei
Asesor Principal Externo



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Co-Asesor



Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Co-Asesor

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre, 2021.

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DOCENTE DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Construcción De Un Vector De Expresión Del Gen CcV1 (De *Cotesia congregata*
bracovirus) Para *Escherichia coli*.

Por:

HENRI MANUEL JIMENEZ JIMENEZ

TESIS

Que somete a la consideración del H. Jurado Examinador como requisito para
obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

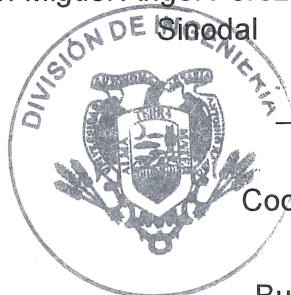
Aprobada por:

Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Presidente

Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Secretario

Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Sinodal

Dra. Lihua Wei
Sinodal



M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

Noviembre, 2021.

"La ciencia, muchacho, está hecha de errores, pero de errores que conviene cometer,
porque poco a poco conducen a la verdad"

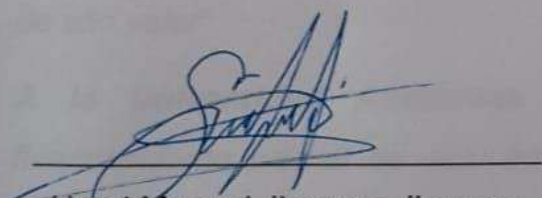
Profesor Otto Lidenbrock-Viaje al centro de la Tierra-Julio Verne

Derechos de Autor y Declaración de no plagio

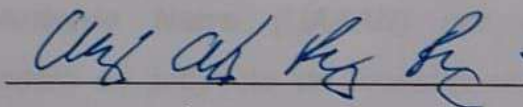
Todo material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor de los Estados Unidos Mexicanos, y pertenece al autor principal quien es el responsable directo y jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, gráficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente. Así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo no ha sido previamente presentado en ninguna otra institución educativa, organización, medio público o privado.



Henri Manuel Jimenez Jimenez
Autor Principal



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Asesor Principal

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor; *Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez. Sus consejos fueron siempre útiles cuando no salían de mi pensamiento las ideas para escribir lo que hoy he logrado. Usted formó parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan. Gracias por sus orientaciones.*

Gracias a mi profesor y co-asesor; *Dr. Marco Adán Juárez Verdayes. Por estar siempre atento a mis dudas, por su gran disposición, por su amor a los estudiantes y sobre todo por su amor al conocimiento; y a quien debo los míos. Sin Usted y sus virtudes, su paciencia y constancia este trabajo no se hubiese logrado; donde quiera que vaya, le llevaré conmigo en mi transitar profesional.*

A mi familia; *Ustedes han sido siempre el motor que impulsa mis sueños y esperanzas. Siempre han sido mis mejores guías de vida. Orgulloso de que estén a mi lado en este momento tan importante. Gracias por ser quienes son y por creer en mí.*

A mis compañeros; *mis amigos y compañeros de viaje, hoy nos toca cerrar un capítulo maravilloso en esta historia de vida y no puedo dejar de agradecerles por su apoyo y constancia.*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) *por el financiamiento parcial de este trabajo por medio del proyecto de Ciencia Básica A1-S-44946: “Modificación genética de Crucíferas con genes inmunosopresores de Polydnavirus: Ampliando el método tradicional transgénico para protección de cultivos agrícolas de alto valor”*

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) *por el financiamiento parcial de este trabajo por medio de proyecto de Investigación Institucional No. 2445: “Eficiencia en la Transformación Genética de Brassica oleracea var. capitata con tres cepas de Rhizobium spp” y por darme un hogar durante 5 años.*

A Dios, Mi Luz de la Mañana. *Gracias infinitas.*

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a Dios, por ser nuestro creador y ayudarme a cumplir esta gran meta en mi vida. Además, de brindarme su protección estuvo para mí en cada segundo, para escuchar mis angustias y llenarme de ánimo y fortaleza.

A mi papá Cicerón Jimenez, a mi mamá Rebeca Jimenez, Mi Luz de la Mañana; por ser pilar fundamental en mi vida, inculcarme buenos valores, darme la mejor educación e impulsarme a ser mejor persona cada día. Por y para Ustedes siempre.

A mi hermano Yovani Jimenez², por siempre estar para mí, sabes que este logro también es tuyo.

A mi cuñada Leydi A. Correa, gracias por tu incondicional apoyo, como la hermana que siempre quise.

A mi hermanito Ednan Jimenez², por ser ejemplo de perseverancia y tenacidad, el cielo ya no es el límite.

A mis tíos, primos y demás familiares que creyeron en mí.

Dedico esta tesis a mi profesor Marco A. Juárez por tener paciencia para ayudarme a realizarla, por sus consejos, por su esfuerzo y por su interés en sus alumnos.

Gracias a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, casa de estudio que me permitió crecer académicamente y tener una educación de calidad.

A los valiosos profesores que me impartieron sus conocimientos y me ayudaron en cada paso que di.

A todos mis amigos que se han convertido en familia, quienes pasaron días y noches estudiando en toda la carrera, ahora somos colegas. En especial a mis amigos del alma: M.C. Mely Olivera y al Ing. Giovanni Torres.

A todos los que aportaron un granito de arena en este trabajo, fueron muchas las manos amigas encontradas en este proceso. Este logro también es de ustedes.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
RESUMEN.....	14
I. INTRODUCCIÓN.....	15
II. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo general:.....	17
2.2 Objetivos específicos	17
III. MARCO TEÓRICO	18
3.1 Los polidnavirus.....	18
3.2 Relación de los polidnavirus con lepidópteros	20
3.4 Efecto sobre la fisiología del huésped.....	23
3.5 CcV1: gen con potencial insecticida.....	24
3.6 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes en <i>Escherichia coli</i>	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1 Análisis <i>in silico</i>	30
4.2 Recuperación del gen CcV1 por medio de PCR	33
4.3 Purificación del vector de expresión pQE30.....	34
4.4 Confirmación de la identidad del vector pQE30	35
4.5 Construcción del vector pQE30-CcV1.....	37
4.6 Ligación y transformación genética en <i>Escherichia coli</i>	38
4.7 Selección de clonas mediante PCR en colonia	40
4.8 Verificación de la direccionalidad de las secuencias mediante PCR en colonia	41
4.9 Extracción y purificación de la construcción genética	44

4.10 Criopreservación de la clona de <i>E. coli</i> transformada con el vector pQE30-CcV1	47
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
5.1 Preparación de los fragmentos de ADN	49
5.2 Construcción del vector pQE30-CcV1	52
5.3 Tamizaje de clonas mediado por PCR	53
5.4 Extracción y purificación de la construcción genética	56
VI. CONCLUSIÓN.....	64
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	65
VIII. ANEXOS	69
8.1 Preparación de gel de agarosa 1% en TAE 1X para electroforesis	69
8.2 Preparación de los stocks de antibióticos	69
8.3 Preparación de medio LB líquido	69
8.4 Preparación de medio LB solido	70
8.5 Preparación de Buffer TAE 10X.....	70
8.6 Preparación de cebadores (liofilizados)	71
8.7 Composición de Buffers y soluciones	71
8.8 Secuencia completa del CDS del gen CcV1	73
8.9 Secuencia de aminoácidos de CcV1.....	74
8.10 Secuencia completa del vector pQE30	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productos génicos del polidnavirus cuya función permite que el parasitoide sobreviva en el insecto huésped	22
Tabla 2. 10 eventos históricos que permitieron el desarrollo de la tecnología para la obtención de organismos transgénicos	25
Tabla 3. Ventajas y desventajas de la localización de la PR producida en <i>E. coli</i> en los procesos de purificación	28
Tabla 4. Secuencias de cebadores usados	31
Tabla 5. Mezcla de reacción de PCR	33
Tabla 6. Programa de amplificación para PCR	33
Tabla 7. Enzimas de restricción usadas en la verificación del vector pQE30	35
Tabla 8. Mezcla de reacción de digestión	35
Tabla 9. Mezcla de reacción de PCR	36
Tabla 10. Programa de amplificación para PCR	36
Tabla 11. Mezcla de reacción de digestión	37
Tabla 12. Componentes de los 4 tratamientos realizados para ligar el gen CcV1 al vector pQE30 linealizado	38
Tabla 13. Mezcla de reacción de PCR.....	41
Tabla 14. Programa de amplificación para PCR	41
Tabla 15. Combinaciones de cebadores utilizados para deducir la orientación de la secuencia insertada	42
Tabla 16. Mezcla de reacción de PCR.....	42
Tabla 17. Programa de amplificación para PCR	42
Tabla 18. Combinaciones de cebadores utilizados para corroborar la orientación de la secuencia del gen CcV1 insertada en las clona #17	43
Tabla 19. Mezcla de reacción de PCR.....	43

Tabla 20. Programa de amplificación para PCR	43
Tabla 21. Mezcla de reacción de PCR.....	46
Tabla 22. Programa de amplificación para PCR	46
Tabla 23. Mezcla de reacción de PCR.....	47
Tabla 24. Programa de amplificación para PCR	47
Tabla 25. Deduciones sobre direccionalidad del inserto	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida del parasitoide.....	21
Figura 2. Elementos básicos en la arquitectura de un vector plasmídico empleado para la expresión recombinante en <i>E. coli</i>	27
Figura 3. Mapa del vector de expresión pQE30	30
Figura 4. Elementos del casete de expresión del vector pQE30	31
Figura 5. Mapa del gen CcV1.....	31
Figura 6. Mapa de la construcción <i>in silico</i> del vector completo pQE30 más el gen CcV1.....	32
Figura 7. Mapa de la construcción <i>in silico</i> que muestra la parte del casete de expresión para el gen CcV1.....	32
Figura 8. Secuencias ilustrativas utilizadas de referencia para tamizar las clonas obtenidas luego de la transformación genética con los productos de la ligación usando los cebadores Fseq y Rseq del vector pQE30.....	39
Figura 9. Comparación de los mapas de la construcción con el gen CcV1	45
Figura 10. Gel de electroforesis para observar la calidad del DNA de pBSK-CcV1	49
Figura 11. Gel de electroforesis de los pPCR.....	50
Figura 12. Gel de electroforesis de los ppPCR.....	50
Figura 13. Gel de electroforesis del producto purificado de pQE30	50
Figura 14. Gel de electroforesis para comprobar la extracción de pQE30.....	52
Figura 15. Digestión del vector pQE30.....	52
Figura 16. Primer tamizaje de clonas	53
Figura 17. Segundo tamizaje de clonas	54
Figura 18. Gel de electroforesis de las reacciones de PCR para deducir la orientación de la cadena de DNA del gen	54

Figura 19. Gel de electroforesis de las reacciones de PCR para corroborar la orientación de la cadena del gen insertada en pQE30.	55
Figura 20. Gel de electroforesis de los productos purificados de pQE30-CcV1	56
Figura 21. Gel de electroforesis de los pPCR de pQE30-CcV1 con el juego de cebadores Fseq y RCcV1	57
Figura 22. Gel de electroforesis de los pPCR de pQE30-CcV1 con el juego de cebadores FCcV1 + Rseq y Fseq + Rseq	57
Figura 23. Alineamientos de la secuenciación (secuencias de 5' a 3') mediante BLAST	61
Figura 24. Alineamientos de la secuenciación reversa (secuencias de 3' a 5') mediante BLAST.....	61

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo la construcción de un vector de expresión del gen CcV1, proveniente de un polidnavirus presente en *Cotesia congregata*, la cual parasita insectos de importancia económica por su papel como plaga en diversos cultivos agrícolas. Dicho proceso implicó el análisis *in silico* de las secuencias, tanto del gen como del vector de expresión pQE30, para desarrollar la mejor estrategia a seguir de manera experimental y así lograr obtener una construcción genética correcta; consistió en amplificar el gen mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) con los cebadores específicos FCcV1; CACCATGTCGCTCGTCAAAAGTACG y RCcV1; CTAAGAAATTGATGAGAAATGAGTTTTAGATAGT (para el Forward y el Reverse, respectivamente; ambas secuencias están de 5' a 3'), luego de extraer y purificar el vector pQE30 se digirió con la enzima *HindIII* y se ligó el gen en dicha secuencia linealizada. Posteriormente se tamizaron las clonas positivas mediante PCR usando combinaciones de los cebadores específicos para el gen, así como los diseñados para el vector (Fseq; AAGTGCCACCTGACGTCTAAG y Rseq; GCCAAGCTAGCTTGGATTCTCACC; para el Forward y el Reverse, respectivamente; ambas secuencias están de 5' a 3') dando como resultado una clona positiva (Clona #17) para la presencia del gen ligado al vector con la correcta orientación de la secuencia de ADN (Ácido Desoxirribonucleico); se corroboró así que la construcción proyectada se realizó satisfactoriamente. Finalmente, se criopreservaron las células que contienen la construcción pQE30-CcV1 para futuras investigaciones.

Palabras clave: PDV, PCR, Ligación, Transformación genética, CcV1, Vector de expresión, Secuenciación.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores problemas al que se enfrentan los productores de alimentos del sector agrario a nivel mundial es el constante ataque de plagas a sus cultivos, a pesar de que se han diseñado estrategias para minimizar el uso de insecticidas y/o plaguicidas de origen químico (con el reemplazo por insecticidas de origen biológico como las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*); la preocupación surge últimamente al comenzar a hallarse evidencia que indican la generación de resistencia por parte de los insectos plagas que son controlados con éstas proteínas, por lo que es de suma importancia buscar nuevas alternativas.

Sin duda alguna la tecnología del ADN recombinante ha revolucionado al mundo científico desde su descubrimiento y/o desarrollo a mediados de la década de los 70, ha permitido realizar cosas, manipulando el ADN, como nunca antes (un claro ejemplo es el rápido desarrollo de las vacunas recombinantes contra la actual pandemia ocasionada por el SARS-Cov-2); y seguirá siendo el medio principal para desarrollar nuevos productos o servicios para la sociedad.

Por otro lado, los polidnavirus pueden generar un debilitamiento o inhibición del sistema inmune de algunos insectos plaga en su etapa larvaria, tal como lo son las proteínas CrV1 y CcV1 de *Cotesia rubecula* y *Cotesia congregata*, respectivamente.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue la construcción de un vector de expresión, mediante análisis *in silico* y técnicas de la tecnología del ADN recombinante, para que el gen CcV1 pueda ser expresado en *E. coli* y ésta pueda ser capaz de expresar la proteína que luego le será evaluada su capacidad de inhibir el sistema inmune de insectos plaga. De esta manera tener una potencial nueva alternativa de control biológico contra las principales plagas que afectan al sector agrícola. Para lo cual se busca amplificar y purificar el gen, extraer y purificar el vector pQE30; digerirlo e

insertar dentro de su MCS (Sitio de Clonación Múltiple) y dentro del casete de expresión al gen CcV1. Posteriormente, verificar que la construcción se llevó de manera correcta mediante PCR y finalmente su secuenciación. De esta manera se asegura la correcta construcción del vector de expresión y la proteína se podrá producir y purificar para ser utilizada en bioensayos que permitan evaluar de manera eficiente su potencial actividad plaguicida.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

- Construir un vector de expresión recombinante con el gen CcV1 (de *Cotesia congregata*) en *Escherichia coli*.

2.2 Objetivos específicos:

- Amplificar el gen CcV1.
- Clonar el gen CcV1 en el vector de expresión pQE30.
- Verificar y corroborar la construcción mediante PCR en colonia y secuenciación.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Los polidnavirus

Existen insectos de vida libre que parasitan otros artrópodos (principalmente en su etapa larvaria) conocidos como parasitoides, los cuales son una gran agrupación de familias de avispas himenópteras, con tamaño promedio de 3 mm, los cuales, a diferencia de los parásitos, si matan eventualmente a su hospedador al alimentarse y desarrollarse en (endoparasitoides) o sobre (ectoparasitoides) él. Las avispas parasitoides hembras adultas suelen ovopositar, uno o varios huevos dependiendo si son de habito solitario o gregario, en larvas de estadio temprano; luego de eclosionar, se da el desarrollo larvario. Todo gracias a los efectos del veneno de la avispa, pero principalmente, a la asociación con PDV (polidnavirus). La expresión genética de los PDV en las células hospedadoras protege a la progenie del parasitoide al inducir tanto una inhibición de las defensas inmunitarias como una detención del desarrollo del hospedador (**Figura 1**). Los virus generalmente se consideran parásitos moleculares que son patológicos para los organismos en los que se replican; pueden ser neutrales, pero no se espera que proporcionen una ventaja selectiva al organismo infectado. Sin embargo, existe una excepción importante: el caso de los PDV que, como ya se mencionó, están asociados con miles de especies de himenópteros parasitoides que se desarrollan en insectos hospedadores lepidópteros. Actualmente se sabe que más de 30,000 especies de parasitoides contienen PDV [(Whitfield, Austin, & Fernandez-Triana, 2018);(Rodríguez-Pérez & Beckage, 2006); (Belle et al., 2002)].

Según Belle y colaboradores en su estudio “Visualización de secuencias de polidnavirus en un cromosoma de avispa parasitoide”, los PDV tienen un genoma segmentado compuesto por docenas de círculos de dsDNA (ADN bicatenario) y que están compuestos por:

- (i) Segmentos provirales utilizados para producir los múltiples círculos de dsDNA que codifican genes de virulencia y que están empaquetados en partículas infecciosas.
- (ii) Genes, que codifican la denominada maquinaria viral que produce las partículas.

Así mismo, mencionan que la secuencia de cada molécula circular también está presente en la avispa en forma lineal integrada en su ADN y que los resultados de los análisis moleculares de dos segmentos de PDV en diferentes especies demostraron que las secuencias que flanquean los segmentos de virus no se incluyeron en las partículas de virus, lo que indica que este ADN correspondía a las secuencias cromosómicas de la avispa y, por lo tanto, que los segmentos de virus se integraron como provirus en el genoma de la avispa. Sin embargo, esta interpretación no se había verificado hasta entonces mediante un enfoque citológico, por lo que en su estudio demuestran la primera visualización de secuencias de PDV integradas dentro de un genoma de avispa utilizando la hibridación *in situ* de sondas virales en *C. congregata* (Braconidae, Microgastrinae) y además demuestran que múltiples sondas se unen a un sitio común en el cromosoma 5, lo que sugiere que el genoma de PDV está organizado como un macrolocus en este cromosoma [(Belle et al., 2002); (Herniou et al., 2013)].

Los polidnavirus asociados a braconidas se asignaron al género Bracovirus (BV) y los PDV asociados a Ichneumonidae se asignaron al género Ichnovirus (IV). Tanto las avispas portadoras de BV como las de IV parasitan principalmente los lepidópteros en etapa larvaria, y varias de ellas también se utilizan como agentes de control biológico para el manejo de especies de plagas. Sin embargo, el interés principal en estos insectos se debió al descubrimiento de que cada especie de avispa depende de su PDV para parasitar con éxito a los huéspedes, mientras que cada PDV depende de su avispa para la transmisión. Por ejemplo, la asociación entre PDV y avispas se consideró el primer ejemplo de virus que evolucionaban hacia simbiosis benéficos. Los PDV funcionalmente activos representan el éxito evolutivo más convincente entre los elementos virales endógenos (EVE). Según Herniou y colaboradores, el género BV evolucionó a partir de la domesticación por

avispas bracónidas de un nudivirus de 100 Ma (millones de años). El genoma del nudivirus se ha convertido en un EVE involucrado en la producción de partículas de BV, pero no está encapsulado. En cambio, los genomas de BV han cooptado genes de virulencia, utilizados por las avispas para controlar la inmunidad y el desarrollo de sus huéspedes [(Herniou et al., 2013); (Dupuy et al., 2006); (Strand & Burke, 2013)].

3.2 Relación de los polidnavirus con lepidópteros

George Salt (1965) encontró que el material depositado por la avispa *Nemeritis canescens* sobre sus huevos al parasitar larvas de la oruga *Ephestia kuhniella* consistía de partículas virales. Tiempo después, en el trabajo “Estrategias co-evolutivas de la interacción entre parasitoides y polidnavirus”, Rodríguez y Beckage (2006) concluyen que el efecto simbiótico (avispa-PDV) inyectan sus huevos y partículas virales en el huésped lepidóptero. Diversos estudios respaldan que la expresión de genes virales de los PDV es esencial para eludir el sistema inmune del insecto parasitado y prevenir su metamorfosis, permitiendo así que las larvas del parasitoide logren desarrollarse. La infección (**Figura 1**) inicia cuando el parasitoide deposita los huevos, PDV, veneno, partículas virales y proteínas del aparato reproductor en la cavidad corporal (hemocèle) del insecto huésped, luego nacen larvas que pasan por varios estadios y emergen del insecto, tejiendo capullos de donde emergen las avispas adultas matando al huésped; la función primordial de las proteínas depositadas es proteger los huevos y prevenir la encapsulación del parasitoide por los hemocitos del huésped. También mencionan en su publicación que “el proceso de replicación del PDV se lleva a cabo únicamente en el ovario de la avispa y que en el momento en que el parasitoide emerge del huésped como larva de tercer estadio ésta contiene muchos viriones (nombre que recibe el estado infeccioso del polidnavirus) en las células del cáliz del ovario. Los núcleos de las células del cáliz contienen los viriones en replicación, la célula se rompe y los viriones son liberados en el lumen y, como consecuencia, el fluido del cáliz se llena de viriones”. Cabe mencionar que los PDV no se pueden replicar en el insecto huésped ya que éste no contiene los genes necesarios para producir las partículas virales por lo que solo se transmiten a través de la línea germinal de las avispas

como provirus [(Rodríguez-Pérez & Beckage, 2006); (Dupuy et al., 2006); (Bézier et al., 2009); (Strand & Burke, 2013)].

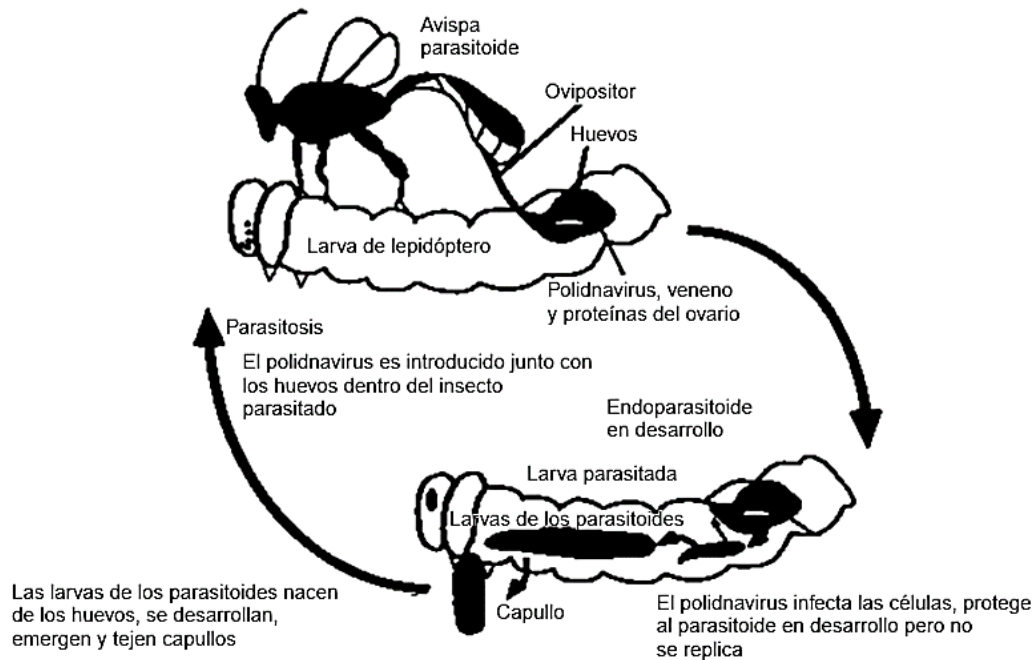


Figura 1. Ciclo de vida del parasitoide. (Tomada de Rodríguez-Pérez & Beckage, 2006).

La asociación del PDV con el parasitoide se ilustra en la **Figura 1**, que muestra una larva del gusano del cuerno del tabaco (*Manduca sexta*), un insecto huésped del parasitoide *Cotesia congregata* (familia Braconidae) que puede depositar, en una sola oviposición, entre 50 y 150 huevos en una sola larva de *M. sexta*. Después de 14 o 15 días, un número elevado de parasitoides emerge de la larva huésped y posteriormente forman capullos (Tomada de Rodríguez-Pérez & Beckage, 2006).

Evidenciando la asociación avispa-PDV, se ha demostrado (mediante pruebas de hibridación de ADN) que el genoma de los polidnavirus está integrado en el genoma de la avispa, es decir, existen genes del PDV en los cromosomas del parasitoide indicando que forman parte de su genoma; incluso algunos investigadores señalan que son simples organelos de los parasitoides. Los estudios muestran además que los genomas de PDV exhiben características organizativas y funcionales a

diferencia de cualquier otro grupo de virus, lo que proporciona información importante sobre por qué su actividad cambia dependiendo de si están en la avispa o en el huésped [(Federici & Bigot, 2003); (Drezen et al., 2003); (Whitfield et al., 2018)].

3.3 Productos génicos documentados de los polidnavirus

Los genes de los PDV se clasifican, de acuerdo a su patrón de expresión, en tres clases, según Kroemer & Webb (2004):

- Clase I: los que sólo se expresan en el parasitoide.
- Clase II: sólo se expresan en el insecto parasitado.
- Clase III: se expresan en los dos tipos de insecto.

La secuenciación del genoma de los icnovirus *Campoletis sonorensis*, *Campoletis chloridae*, así como de los bracovirus *Glyptapanteles indiensis*, *Toxoneuron (Cardiochiles) nigriceps*, *Microplitis demolitor* y de *Cotesia congregata* ha sido finalizada, con esto, se han encontrado diferencias en la estructura del genoma de los icnovirus y del genoma de los bracovirus indicando que ambos se originaron en distintos momentos evolutivos. Las investigaciones en curso, así mismo, estudian el mecanismo de expresión génica del PDV y cómo se produce la disfunción de los hemocitos del insecto huésped. La **Tabla 1** muestra un resumen de los productos génicos del PDV cuya función permite que el parasitoide sobreviva con éxito, obtenida de Rodríguez-Pérez & Beckage, 2006.

Tabla 1. Productos génicos del polidnavirus cuya función permite que el parasitoide sobreviva en el insecto huésped (Tomada de Rodríguez-Pérez & Beckage, 2006).

Producto génico del PDV y especie de parasitoide	Efecto sobre su insecto hospedador o huésped
Proteína homóloga CrV1 de <i>Cotesia congregata</i>	La proteína CrV1 regula la función de los hemocitos durante la parasitosis.
Proteína rica en cisteína de <i>Microplitis demolitor</i>	Los plasmátocitos pierden capacidad para extender filópodos. Esta proteína induce muerte celular o apoptosis de granulocitos.
Proteína VHv 1.1 de <i>Campoletis sonorensis</i>	Esta glicoproteína es endocitada por los hemocitos. La proteína inhibe la respuesta de encapsulamiento.
Proteína CrV1 de <i>Cotesia rubecula</i>	Se produce ARN 4-8 horas después de la parasitosis. La proteína altera el citoesqueleto de actina del hemocito.

ARN de 2.0 kpb de <i>Cotesia kariyai</i>	Esta “proteína de inmunoevasión” se produce en los hemocitos cuando el sistema inmune se encuentra deprimido entre las dos y 10 horas después de la parasitosis.
Proteínas Hd Gorf f6 y Hd Gorf P30 de <i>Hyposoter didmator</i>	Estas proteínas inhiben la respuesta de encapsulamiento.
Proteínas TrIV1, TrIV2 y TrIV4 de <i>Tranosema rostrale</i>	Estas proteínas inducen muerte celular o apoptosis de las células del lepidóptero mantenidas <i>in vitro</i> .
Proteína BV1 de <i>Toxoneuron nigriceps</i>	Esta proteína tiene como presunta función, suprimir la respuesta inmune del insecto huésped. Se le ha localizado en las glándulas pro-torácicas, indicando que también puede modular el sistema endocrino y de desarrollo.
Proteína CiV12g2, CiV2g1, CiV16.8g1 de <i>Chelonus inanitus</i>	Estas proteínas previenen el encapsulamiento del parasitoide. Tienen presunta función en la regulación del desarrollo (detienen el desarrollo) y en mantener la cutícula suave, para que el parasitoide pueda emerger y alimentarse de su huésped.

3.4 Efecto sobre la fisiología del huésped

Como ya se mencionó anteriormente, la función primordial de las proteínas depositadas es proteger los huevos y prevenir la encapsulación del parasitoide por los hemocitos del huésped, dentro de lo que incluye inducir un retraso en el desarrollo, provocar la pérdida de apetito, el cese de la actividad alimenticia, inactividad general y/o detener el crecimiento del insecto huésped. Además, produce también una pigmentación anormal del huésped (la larva con el PDV se torna de color rosado mientras que las larvas no parasitadas son de color azul-verdoso). No se observan todos los efectos en las especies parasitadas, sin embargo, la manifestación puede ocurrir a diferentes tiempos después de la parasitosis o inoculación con el PDV. Por ejemplo, en el estudio realizado por Rodríguez y Beckage (2006); si se inocula PDV en larvas de *M. sexta* se inhibe su desarrollo, pero esto se manifiesta varios días después de la inoculación, el desarrollo se detiene en fase de larva-pre-pupa y, eventualmente ésta muere. Por otro lado, la encapsulación de *Cotesia flavipes* por un huésped no común (*M. sexta*), produce un retraso del desarrollo y disfunción metamórfica del huésped pero ninguno logra sobrevivir [(Rodríguez-Pérez & Beckage, 2006); (Herniou et al., 2013)].

3.5 CcV1: gen con potencial insecticida

El éxito del desarrollo embrionario de las avispas parasitoides en los hospedadores de lepidópteros se logra mediante la inyección conjunta de polidnavirus cuyos productos genéticos se piensa que atacan las respuestas inmunitarias del huésped. Como ya se describió, dentro de los productos genéticos documentados de los PDV se encuentran proteínas que actúan como inhibidores del sistema inmune del huésped, o insectos que son considerados plagas; tal como el gen CrV1, de *Cotesia rubeocula*, que inhibe las respuestas inmunitarias de su huésped lepidóptero endoparasitizado a través de la interferencia con la estructura del citoesqueleto del hematocito. Se establece que CcV1, el ortólogo de CrV1 (de *Cotesia congregata* bracovirus), también es compatible con hemocitos del lepidóptero y líneas celulares establecidas similares a hemocitos, pero CcV1 también tiene una función diferente, que es altamente relevante para la inhibición de la respuestas inmunes del huésped y se basa en su interacción directa con la molécula de reconocimiento de patrón hemolina (Labropoulou et al., 2008) por lo que posee un potencial que podría ser utilizado en el control biológico de insectos plaga de gran importancia económica por su efecto en el sector agronómico. Este gen se compone de un CDS de 1434 pb (pares de bases [ADN]), la cual genera una proteína de 477 aa (aminoácidos [proteína]).

3.6 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*

El descubrimiento de la estructura y el mecanismo de replicación del ADN han permitido el desarrollo de técnicas biomoleculares para su manipulación (y otros, como los mencionados en la **Tabla 2**), gracias a estos avances (tecnología del ADN recombinante y los conocimientos actuales en genómica, proteómica, metabolómica y bioinformática) es posible sintetizar proteínas en organismos en los que no se encuentran de manera natural (sobreexpresión heteróloga). Según Guevara y colaboradores (2013) en su estudio “Perspectivas actuales sobre el uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial”, las proteínas producidas de esta manera se les conoce como proteínas recombinantes (PR). Las PR se pueden producir en una gran variedad de sistemas

biológicos, como bacterias, levaduras y hasta células eucariontes; pueden tener características estructurales y funcionales muy similares a las proteínas naturales y por lo general se producen con alta eficiencia, ya que la purificación de proteínas a partir de sus fuentes naturales no logra suplir en la mayoría de los casos los requerimientos de cantidad, calidad, facilidad de aislamiento o factibilidad económica del proceso. A pesar de estas limitantes, la tecnología de PR es ampliamente utilizada en investigación y en la industria farmacéutica, alimentaria y agrícola (Guevara-Hernández, López-Zavala, Jiménez-Gutierrez, & Sotelo-Mundo, 2013).

Tabla 2. 10 eventos históricos que permitieron el desarrollo de la tecnología para la obtención de organismos transgénicos (Rodríguez, Zumalacárregui, Otero, Calleja, & de la Fuente, 2002; PQBio, 2019).

Año	Inventor o descubridor	Descripción del evento
1865	Gregor Mendel	Propone que existen unidades o factores de información responsables de los caracteres observables, y que tales "factores" (luego conocidos como genes) son transmitidos de una generación a la siguiente.
1910	Tomas Hunt Morgan	Genetista estadounidense, experimenta con moscas y prueba que los genes están en los cromosomas, estableciendo las bases de la genética moderna.
1952	Alfred Hershey y Martha Chase	Realizan los "experimentos de licuadora" usando fagos (virus que infectan bacterias, descubiertos en 1917). Descubren que el ADN, y no las proteínas, puede ingresar desde el fago a la bacteria, aportando otra evidencia a favor de la naturaleza nucleica del material genético.
1953	James Watson y Francis Crick con ayuda de Rosalind Franklin	Proponen un modelo de estructura para el ADN: molécula doble cadena, helicoidal, con dos hebras complementarias y antiparalelas. Es publicado en <i>Nature</i> , describiendo sus propiedades bioquímicas.
1957	Francis Crick y George Gamov	Proponen el "dogma central de la biología", que sugiere que la información genética fluye en una sola dirección, desde el ADN, pasando por ARN mensajero, finalizando en la síntesis de proteínas (concepto central que luego sería modificado con el descubrimiento de la replicación de los retrovirus como el HIV). Matthew Meselson y Franklin Stahl demuestran el mecanismo de replicación del ADN.
1958	Arthur Kornberg	Descubre y aísla la ADN polimerasa, que se convierte en la primera enzima para sintetizar ADN en un tubo de ensayo.
1973	Werner Arber, Hamilton O. Smith y Daniel Nathans.	Técnicas para cortar (enzimas de restricción) y unir (ligasas) ADN que permitieron el desarrollo de la Tecnología del DNA recombinante. La segunda fue descubierta de manera simultánea en varios laboratorios.

1975	Frederick Sanger	Desarrolló el método de secuenciación de ADN conocido como método de Sanger. Dos años más tarde empleó esta técnica para secuenciar el genoma del bacteriófago <i>Phi-X174</i> , el primer ácido nucleico secuenciado totalmente en la historia.
1983	Kary Banks Mullis	Desarrolla la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la técnica de biología molecular que permite obtener una gran cantidad de copias de un fragmento de ADN. Aprueba el primer cultivo genéticamente modificado utilizado como alimento: el tomate Flavr Savr. Para obtenerlo, se introduce el gen que codifica para la enzima poligalacturonasa en una disposición particular para que, al transcribirse, genere moléculas de ARN complementarias al ARNm de poligalacturonasa propio de la planta, impidiendo así su traducción. Dado que dicha enzima es la responsable de degradar la pectina (componente de la pared celular vegetal que le da firmeza a la misma), los frutos de la planta de tomate transgénico Flavr Savr permanecen firmes por más tiempo, mejorando su uso en la industria alimenticia y su comercialización.
1994	FDA (U.S. Food and Drug Administration)	

Al respecto, dado su rápido crecimiento y altos rendimientos de biomasa en medios relativamente económicos, el amplio conocimiento sobre su fisiología y genética, a su relativo bajo costo, alta densidad de cultivo, su fácil manipulación genética y a las diversas herramientas biotecnológicas disponibles que son compatibles, así como su elevada capacidad de producción de proteínas heterólogas, la enterobacteria *Escherichia coli* continúa siendo el sistema de elección para la expresión recombinante, tanto a escala de laboratorio como en la industria. Las cepas de *E. coli* utilizadas para la producción recombinante han sido genéticamente manipuladas delecionando los genes implicados en los mecanismos de patogenicidad [(González & Fillat, 2018); (García et al., 2013); (Lara R., 2011)].

Sin embargo, de acuerdo a González & Fillat (2018), el aspecto de mayor importancia a tener en cuenta para la obtención de una proteína por vía recombinante es la correcta selección del sistema de expresión, el cual lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión que contiene los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción del gen de interés en dicho organismo hospedero. Los vectores de expresión en los sistemas procarióticos comúnmente son vectores plasmídicos obtenidos por manipulación genética. Todos los vectores de expresión tendrán una arquitectura esencial con elementos necesarios para su replicación en el hospedero, para la

transcripción y traducción del gen clonado (el origen de replicación, el promotor, el sitio de unión al ribosoma, la secuencia codificadora, terminadores de la transcripción, así como marcadores de resistencia a antibióticos que facilitan la selección de los recombinantes y garantizan la estabilidad del plásmido en el hospedero mediante el cultivo en un medio selectivo); lo anterior se esquematiza en la **Figura 2**.

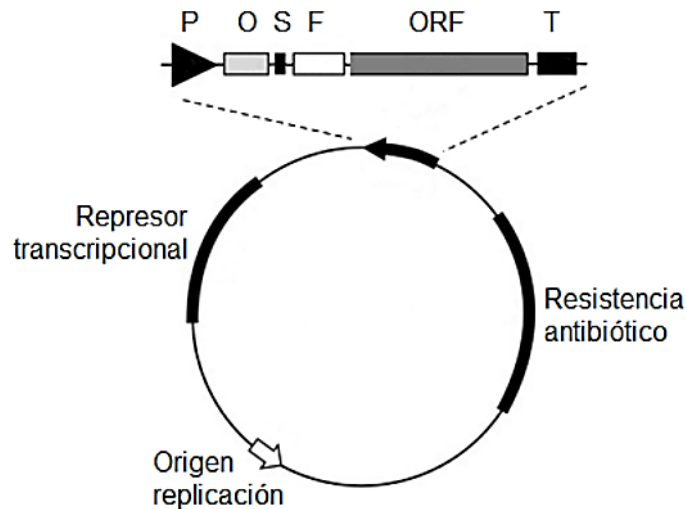


Figura 2. Elementos básicos en la arquitectura de un vector plasmídico empleado para la expresión recombinante en *E. coli*. Su principal característica es la presencia de un casete de expresión: P: promotor, O: operador, S: sitio de unión al ribosoma, F: secuencia de fusión, ORF: secuencia codificadora del gen de interés, T: terminador. (González & Fillat, 2018).

Adicionalmente, los autores mencionan que como parte de la estructura del vector podrá encontrarse un gen regulador que actúe directa (unión a operador) o indirectamente sobre el promotor, modulando su actividad y permitiendo condicionar los niveles de expresión según los intereses de síntesis de la proteína en cuestión. De la misma forma, el vector de expresión podrá incorporar secuencias específicas de codones en el mismo marco de lectura del gen a expresar, que codifican pequeños péptidos o proteínas de fusión (que consiste en la unión de una corta secuencia de aminoácidos, polipéptido o proteína a la proteína que se quiere expresar por vía recombinante a través de un sitio de reconocimiento a proteasas

específicas que posteriormente facilitan la separación de nuestra proteína y usualmente esta fusión se construye a nivel de ADN); esta estrategia se utiliza con frecuencia para facilitar el proceso de purificación, favorecer el plegamiento, incrementar la solubilidad y prevenir cuerpos de inclusión, disminuir la degradación proteolítica, dirigir la translocación a periplasma y en algunos casos ha logrado incrementar los rendimientos de proteína recombinante desde niveles no detectables hasta casi el 20% del contenido proteico celular. Siguiendo con el proceso y complementando lo anterior, según Lara (2011), la purificación de las PR producidas por *E. coli* puede seguir varias vertientes, dependiendo de la localización de la PR, la cual también proporciona ciertas ventajas según cada caso, como puede verse en la **Tabla 3** [(González & Fillat, 2018); (Lara R., 2011)].

Tabla 3. Ventajas y desventajas de la localización de la PR producida en *E. coli* en los procesos de purificación (Lara R., 2011).

Lugar de acumulación	Ventajas	Limitaciones
Citoplasma	Frecuentemente forma cuerpos de inclusión, se puede remover la mayoría de los contaminantes	Requiere relegamiento posterior
Periplasma	Se pueden formar puentes disulfuro, se pueden emplear señales de secreción naturales	La traslocación es empírica y muchas veces ineficiente
Secreción extracelular	Facilidad de cosecha del producto con buena pureza en el sobrenadante. Razonablemente eficiente para péptidos.	La maquinaria de secreción no está completamente estudiada y es ineficiente para proteínas grandes.

La recuperación de la proteína puede llevarse a cabo empleando filtros de diversos tamaños y/o con superficie cargada. La filtración también es escalable y está bien establecida en la escala industrial. El mercado de PR producidas por bacterias es muy importante a nivel mundial, la producción de proteínas por vía recombinante ofrece una vía simple, rápida, económicamente rentable y altamente eficiente para suplir los actuales requerimientos de proteínas puras y biológicamente activas, tanto para fines de investigación como para usos terapéuticos, industriales o agronómicos. Los avances recientes en este campo [cuyas estrategias han estado encaminadas desde el mejoramiento genético de la cepa y los vectores de expresión hasta los métodos de cultivo y purificación de estas proteínas, según

García y colaboradores (2013)], mantienen vigente el interés en lograr sistemas de expresión y de cultivo bacteriano cada vez más eficientes. La ingeniería metabólica y un mejor entendimiento de la fisiología de la bacteria durante la expresión y bajo condiciones de producción industrial permitirán sin duda incrementar los rendimientos y abrirán nuevas opciones de procesamiento y aplicaciones de PR [(Lara R., 2011); (González & Fillat, 2018); (García et al., 2013)].

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Análisis *in silico*

Se realizó un análisis *in silico* usando el programa SnapGene™ 1.1.3 en donde se diseñó la estrategia para clonar el gen CcV1 en el sitio de clonación múltiple (MCS) del vector de expresión pQE30 [vector bacteriano para la expresión de proteínas marcadas con 6xHis (etiqueta de polihistidinas) en el extremo N-terminal], cuyos mapas se muestran a continuación (las secuencias completas se encuentran en la parte de ANEXOS):

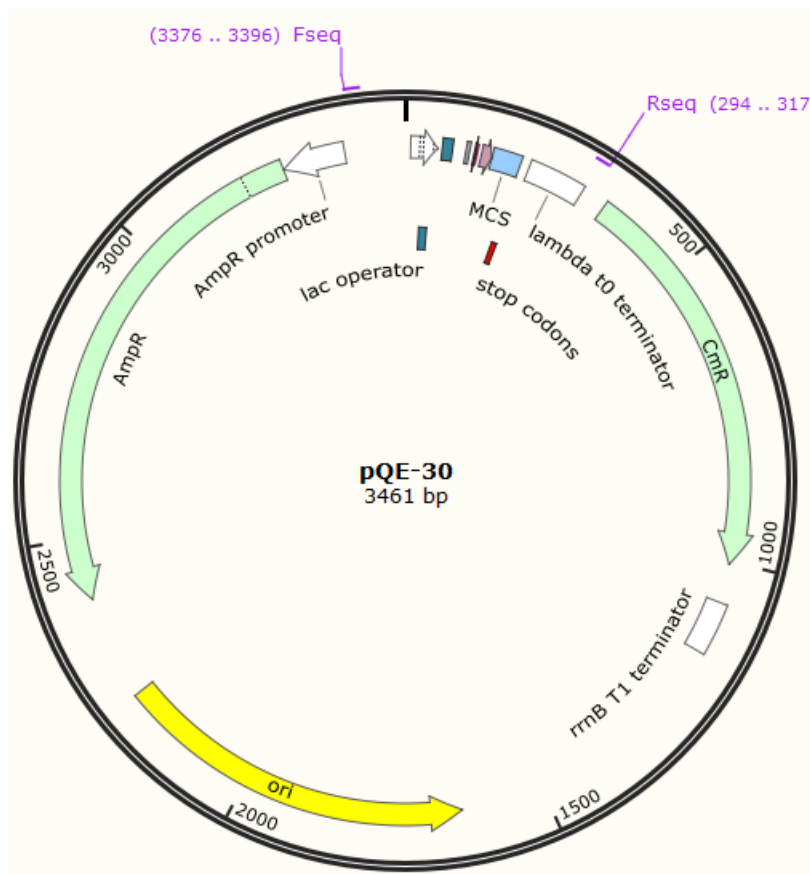


Figura 3. Mapa del vector de expresión pQE30

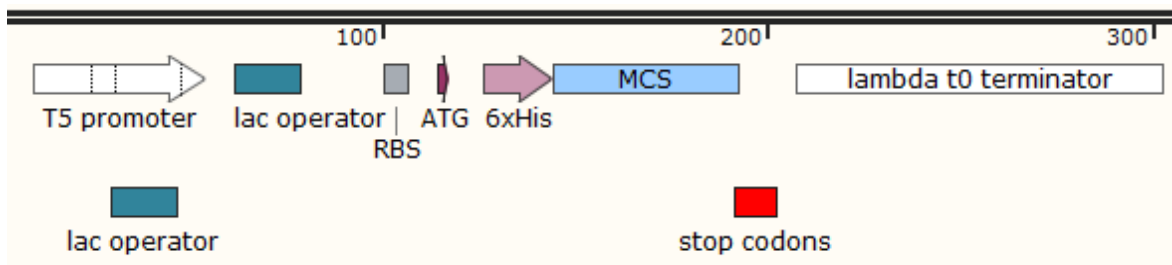


Figura 4. Elementos del casete de expresión del vector pQE30. T5: promotor, lac operator: gen para inducir la expresión, RBS: sitio de unión al ribosoma, ATG: codón de inicio: 6xHis: etiqueta de polihistidinas, MCS: sitio de clonación múltiple, Stop Codons: codones para detener la transcripción y terminador.

Se analizó la secuencia del gen CcV1 para diseñar los cebadores específicos FCcV1 y RCcV1; para amplificar la secuencia de 1434 pb correspondientes al CDS (Secuencia Codificante) del gen CcV1 (**Figura 5**). También se diseñaron cebadores para el vector pQE30, de tal manera que permitieran amplificar el MCS (Fseq y Rseq, como se observa en la **Figura 3**). Las secuencias completas de los cebadores mencionados se muestran en la **Tabla 4**.

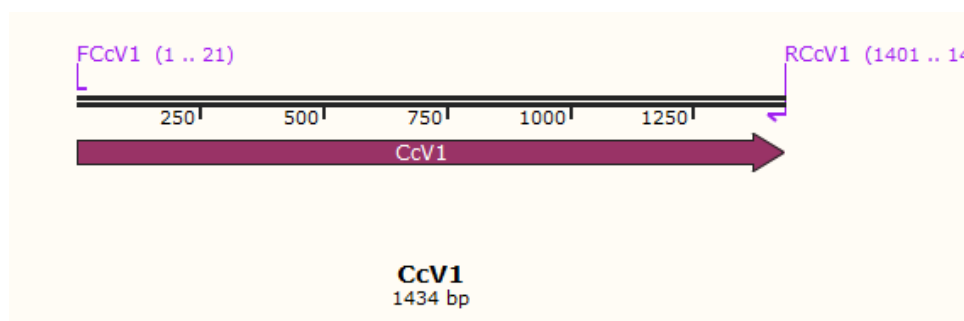


Figura 5. Mapa del gen CcV1.

Tabla 4. Secuencias de cebadores usados

Nombre del cebador	Secuencia (en dirección 5' a 3')
FCcV1	CACCATGTCGCTCGTCAAAGTACG
RCcV1	CTAAGAAATTGATGAGAAATGAGTTTTAGATAGT
Fseq	AAGTGCCACCTGACGTCTAAG
Rseq	GCCAAGCTAGCTTGGATTCTCACC

El análisis *in silico* arrojó datos para concluir que la mejor estrategia a seguir era digerir el pQE30 con la enzima *HindIII* en su MCS, rellenar los extremos cohesivos que deja con dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados) y ligar el inserto en esa parte del vector. De esta manera se asegura que el gen quedan dentro del casete de expresión y sobre todo en marco de lectura con la proteína etiqueta (6xHis). Por lo que el vector con el inserto quedaría de la siguiente forma:

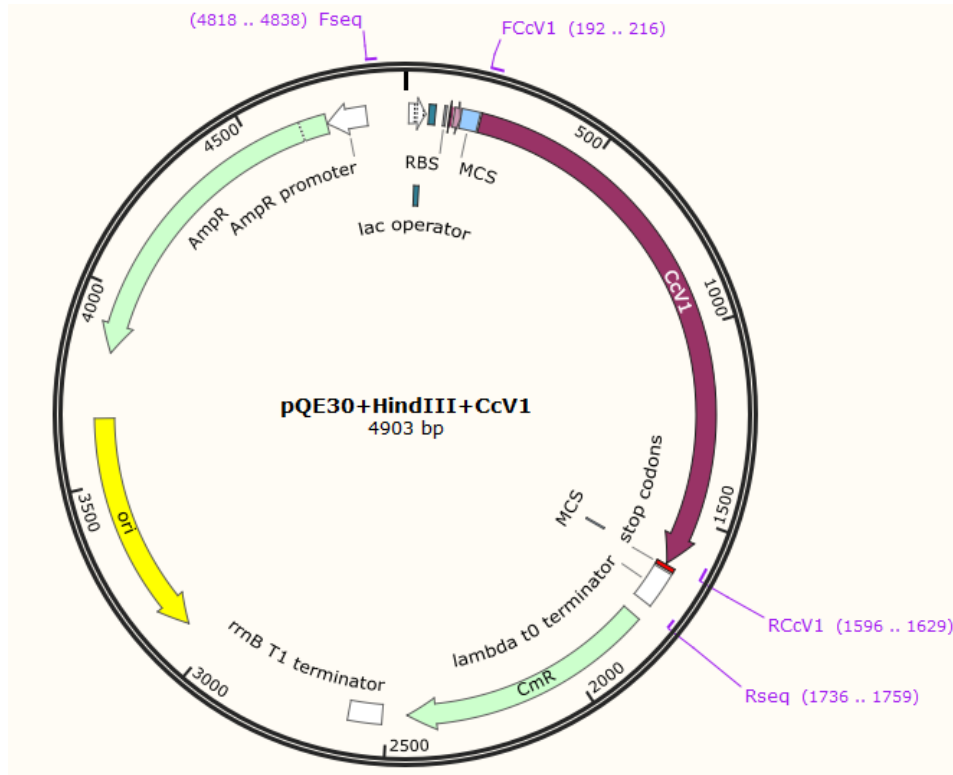


Figura 6. Mapa de la construcción *in silico* del vector completo pQE30 más el gen CcV1.

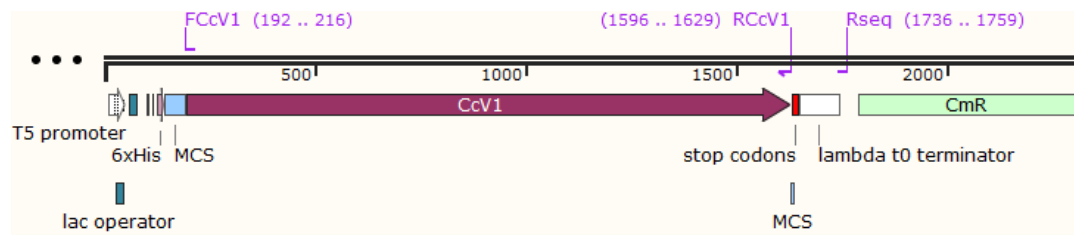


Figura 7. Mapa de la construcción *in silico* que muestra la parte del casete de expresión para el gen CcV1.

4.2 Recuperación del gen CcV1 por medio de PCR

Utilizando el vector denominado pBSK-CcV1 previamente construido, se realizó PCR utilizando los cebadores FCcV1 y RCcV1 (**Tabla 4**) con el estuche comercial Master Mix Phusion (ThermoFisher Cientific) (**Tabla 5**). Se preparó la mezcla en tubos de PCR a un volumen final de 20 μ l (microlitros):

Tabla 5. Mezcla de reacción de PCR

	Concentración	Volumen
Master Mix Phusion	2X	10 μ l
FCcV1	10 pM*	1 μ l
RCcV1	10 pM	1 μ l
DNA molde (pBSK-CcV1)	200 ng**	1 μ l
H ₂ O (inyectable)	--	7 μ l
Volumen final		20 μ l

*pM: Picomole **ng: Nanogramos

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Axygen (USA), usando un programa de amplificación previamente estandarizado (**Tabla 6**).

Tabla 6. Programa de amplificación para PCR

Paso	Temperatura	Tiempo (segundos)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	98 °C*	120 s	1x
Desnaturalización	94 °C	5 s	
Alineamiento	55 °C	15 s	
Extensión	72 °C	75 s	35x
Extensión final	72 °C	300 s	1x
Refrigeración	18 °C	∞ s	1x

* °C: Grados centígrados ** ∞ s: sin tiempo límite

El producto de PCR (pPCR) fue visualizado por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE (Buffer Tris (trisaminometano) – Acetato - EDTA [Ácido

Etilendiaminotetraacético]) 1X a 95 V (Volts), el tamaño del fragmento fue determinado usando un marcador de peso molecular 1Kb Plus (Axygen).

Posteriormente se purificaron los pPCR usando el estuche comercial “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System de PROMEGA™, bajo las especificaciones del fabricante: a 80 µl de pPCR se agregaron 80 µl de Buffer de unión y se pasó todo el contenido a la columna de purificación provista en el estuche, se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto y se descartó el residuo. Se agregaron 100 µl del Buffer de lavado y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto y nuevamente se desechó el residuo. La columna fue colocada dentro de un microtubo estéril de 1.5 ml, se agregaron 35 µl de H₂O inyectable y se esperaron 4 minutos, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos. El ppPCR (producto purificado de PCR) se guardó en refrigeración a -20 °C.

El tamaño de los pPCR resultantes fue determinado por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 95 V, usando el marcador 1Kb plus (Axygen).

4.3 Purificación del vector de expresión pQE30

Las bacterias *E. coli* BL21, previamente transformadas con el vector pQE30, fueron cultivadas en 10 ml de medio LB (Caldo de lisogenia o Luria-Bertani) estéril suplementado con cloranfenicol (60 mg/mL [miligramos por mililitro]) y ampicilina (100 mg/mL) durante 8 horas. El cultivo fue centrifugado a 4,000 rpm (revoluciones por minuto) y se procedió a aislar el plásmido usando el estuche comercial “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega), para lo cual: a la tableta de bacterias se agregaron 250 µl de la Solución de resuspensión, luego se añadieron 250 µl de la Solución de Lisis Celular y se mezcló por inversión cuatro veces, se añadieron 10 µl de la Solución de Fosfatasa Alcalina y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se agregaron 350 µl de la Solución de Neutralización, invirtiendo 4 veces el tubo para mezclar y luego se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos. La fase líquida fue transferida a la columna de purificación y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto, tras lo cual se desechó el residuo.

A continuación, se añadieron 500 µl de la Solución de lavado a la columna y se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 1 minuto, se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió de la misma manera. Luego se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 2 minutos.

Se transfirió la columna a un microtubo de 1.5 mL estéril y se le agregaron 75 µl de H₂O (agua) libre de DNAsas. Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 1 minuto a temperatura ambiente, se descartó la columna y se guardó el plásmido purificado a -20 °C.

Con el resultado de la extracción se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 1% en TAE 1X, a 95 V; usando el marcador 1Kb plus (Axygen).

4.4 Confirmación de la identidad del vector pQE30

Para confirmar la identidad del vector se realizó restricción del vector con las enzimas que se muestran en la **Tabla 7** (de Thermo Fisher Scientific).

Tabla 7. Enzimas de restricción usadas en la verificación del vector pQE30

Vector	Enzimas usadas	Fragmentos esperados (pb)
pQE30	SmaI + XbaI	2466
		995
	SmaI + FspI	2521
		940

Se prepararon las reacciones tal y como se describe en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Mezcla de reacción de digestión

	Concentración	Reacción	
		SmaI + XbaI	SmaI + FspI
<i>Buffer (Tango)</i>	10X	2 µl	10 µl
<i>pQE30</i>	1 µg/µL*	1 µl	1 µl
<i>Enzima</i>	10 U/µL**	1 µl	1 µl
<i>H₂O (inyectable)</i>	--	16 µl	16 µl
	<i>Vol. Final</i>	<i>20 µl</i>	<i>20 µl</i>

* µg/µL: Microgramos por microlitro ** U: Una Unidad se define como la cantidad de enzima necesaria para digerir fragmentos de ADN en el tiempo, temperatura y tampón establecidos por el fabricante.

Con el producto de la restricción se llevó a cabo una electroforesis en un gel de agarosa (1% TAE 1X, 95 V), usando el marcador de peso molecular 1Kb Plus (Axygen).

Se realizó PCR con los cebadores específicos Fseq y Rseq (**Tabla 4**). Con la siguiente mezcla de reacción en un volumen final de 30 μ l, usando GoTaq® Green Master Mix (Promega):

Tabla 9. Mezcla de reacción de PCR

	Concentración	Volumen
Master Mix	2X	15 μ l
Fseq	10pM	1 μ l
Rseq	10pM	1 μ l
DNA molde (pQE30)	1 μ g/ μ L	1 μ l
H₂O (inyectable)	--	12 μ l
Volumen final		30 μ l

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Axygen (USA), usando un programa de amplificación previamente estandarizado (**Tabla 10**).

Tabla 10. Programa de amplificación para PCR

Condiciones de PCR en el termociclador			
Paso	Temperatura	Tiempo (segundos)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	98 °C	120 s	1x
Desnaturalización	94 °C	5 s	
Alineamiento	55 °C	15 s	35x
Extensión	72 °C	75 s	
Extensión final	72 °C	300 s	1x
Refrigeración	18 °C	∞ s	1x

Los productos de PCR fueron separados por medio de electroforesis (en gel de Agarosa al 1% en TAE 1X, 95 V).

4.5 Construcción del vector pQE30-CcV1

Se procedió a la digestión del vector pQE-30 previamente purificado para luego realizar la ligación del pPCR purificado del gen CcV1 en el sitio de corte que reconoce la enzima *HindIII*, cuya secuencia y sitio de corte se muestra en la **Figura 20-C**. Para digerir el vector se preparó la mezcla de reacción (**Tabla 11**) en un microtubo:

Tabla 11. Mezcla de reacción de digestión

	Concentración	Volumen
Buffer (NEBuffer 2)	10X	4 μ l
<i>HindIII</i>	10 U/ μ L	1 μ l
pQE30	1 μ g/ μ L	6 μ l
H₂O (inyectable)	--	29 μ l

Se mezclaron a un volumen final de 40 μ l.

Luego se incubó a 37 °C por 2 horas.

Transcurrido el tiempo se procedió a purificar el producto de digestión utilizando el estuche comercial “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (PROMEGA); según las especificaciones del fabricante: se agregaron 200 μ l del Buffer de unión a la mezcla, se pasó a una columna de purificación y se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Se desechó el líquido filtrado y se agregaron 200 μ l del Buffer de lavado a la columna, nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm por 1 minuto. Se repitió el paso de centrifugación y se pasó la columna a un microtubo de 1.5 ml limpio agregando 70 μ l de H₂O (libre de DNAsas) y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos para colectar el ADN y se guardó a -20 °C.

Con el producto purificado se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 90 V, el marcador de peso molecular 1KbPlus (Axygen) fue utilizado para determinar el tamaño del fragmento resultante.

Para rellenar los extremos cohesivos se mezclaron 30 μ l del vector pQE30 digerido y purificado con 30 μ l de Master Mix Phusion (ThermoFisher Cientific) en un microtubo de 1.5 ml estéril. La mezcla se colocó a 72 °C durante 50 minutos. Así el

producto tratado fue nuevamente purificado con el estuche comercial “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (PROMEGA), del mismo modo que se señala arriba.

El tamaño del producto purificado fue determinado por electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 90 V y utilizando el marcador de peso molecular 1Kb Plus (Axygen).

4.6 Ligación y transformación genética en *Escherichia coli*

Se realizó la mezcla de reacción para la ligación usando T4 ligasa (Jena Bioscience); para ligar el vector linealizado y el gen CcV1 como se mostró en el análisis *in silico*. Para lo anterior se procedió a realizar diferentes reacciones en las que se variaba la concentración del inserto. Por lo que se prepararon las mezclas en microtubos como se mencionan en la **Tabla 12**. Adicionalmente se realizó un control negativo (**Tubo #4**) donde se agregaron todos los componentes de la reacción, pero sin el inserto:

Tabla 12. Componentes de los 4 tratamientos realizados para ligar el gen CcV1 al vector pQE30 linealizado

	Concentración	Volumen			
		Tubo #1	Tubo #2	Tubo #3	Tubo #4
<i>Fast Ligation Buffer</i>	2X	10 µl	12.5 µl	15 µl	10 µl
<i>pQE30 (digerido)</i>	1 µg/µL	3 µl	3 µl	3 µl	3 µl
<i>CcV1</i>	200 ng	1 µl	6 µl	10 µl	-
<i>T4 ligasa</i>	8x10 ⁴ CEU*	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
<i>H₂O (inyectable)</i>	--	4 µl	1.5 µl	-	5 µl
	<i>Vol. Final</i>	<i>20 µl</i>	<i>25 µl</i>	<i>30 µl</i>	<i>20 µl</i>

* Una Unidad de Ligadura de Extremos Cohesivos (CEU) se define como la cantidad de enzima requerida para dar 50% de ligadura de fragmentos HindIII de ADN λ (concentración de terminación 5' de ADN de 0.12 µM, 300 µg/ml) en un volumen de reacción total de 20 µl en 30 minutos a 16 °C en tampón de reacción 1X de ADN ligasa T4.

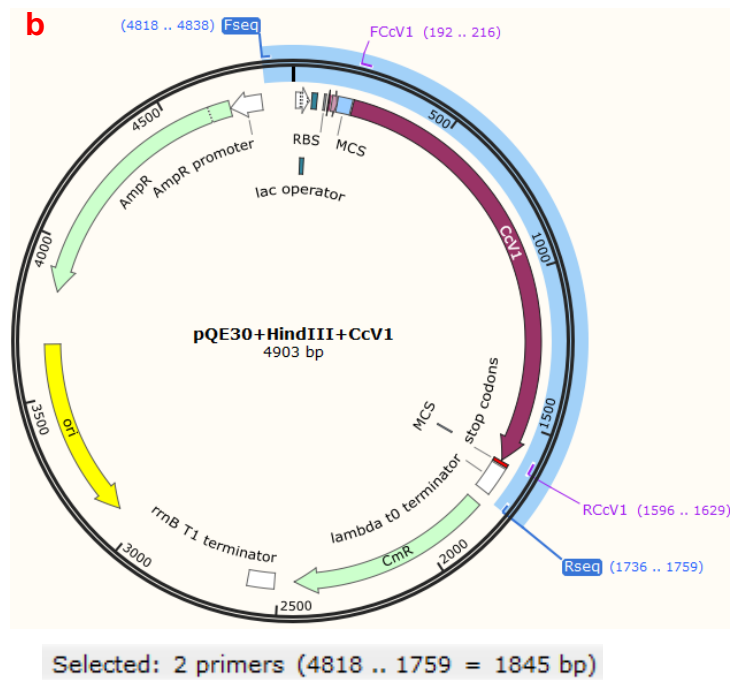
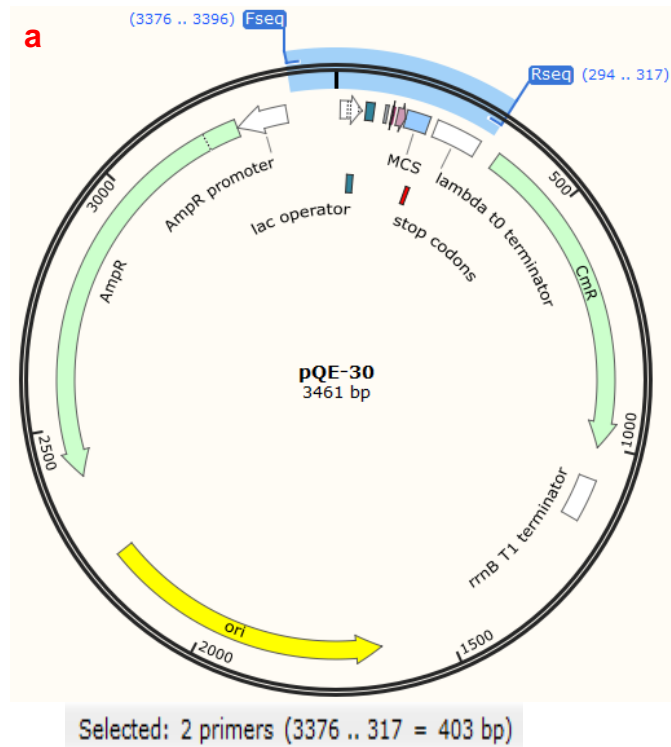


Figura 8. Secuencias ilustrativas utilizadas de referencia para tamizar las clonas obtenidas luego de la transformación genética con los productos de la ligación usando los cebadores *Fseq* y *Rseq* del vector *pQE30*. a) vector sin inserto; b) vector con el inserto *CcV1*.

Todos los tubos se colocaron a 25 °C durante 1 hora y se procedió a realizar transformación de células calcio competentes de *E. coli* TOP 10 mediante choque-térmico, con el siguiente procedimiento: se colocaron 5 µl del producto de ligación de cada tubo (**Tabla 12**) y se les agregaron 5 µl del Buffer KCM, que contiene KCl (Cloruro de potasio), CaCl₂ (Cloruro de calcio) y MgCl₂ (Cloruro de magnesio) a cada uno (excepto por el tubo del tercer tratamiento del cual se tomaron 10 µl y se mezclaron con 10 µl del Buffer KCM). Se incubaron en hielo por 10 minutos; luego se agregaron a las mezclas anteriores 100 µl de células *E. coli* Top10 quimiocompetentes a cada uno y se dejaron incubando por 30 minutos en hielo, tras lo cual se colocaron los tubos a 42 °C por 1 minuto y luego se regresaron al hielo por 5 minutos.

Posteriormente, a cada tubo se le agregaron 600 µl de medio LB líquido estéril y se incubaron a 37 °C por 1 hora con agitación a 4,000 rpm.

Transcurrido el tiempo, cada tubo se centrifugó y se desechó el sobrenadante, excepto 100 µl; donde se resuspendió el pellet de cada tubo. Estos 100 µl se sembraron en placas de Agar-LB con ampicilina (50 mg/ml). Las 4 placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche.

Al siguiente día, se resembraron las colonias obtenidas en placas nuevas de Agar-LB con antibiótico (ampicilina 50 mg/ml) y nuevamente se incubaron a 37 °C durante 8 horas.

4.7 Selección de clones mediante PCR en colonia

Las colonias resembradas fueron analizadas mediante PCR para verificar la presencia del inserto dentro del vector y su direccionalidad. Se utilizaron los cebadores Fseq y Rseq que amplifican una secuencia de 403 pb en el vector no modificado y una secuencia de 1845 pb en el vector con el inserto CcV1; de acuerdo con el análisis *in silico* y como se ilustra en la **Figura 8 y 21**.

Se prepararon 16 reacciones de PCR a un volumen final de 20 µl por cada uno (**Tabla 13**) usando GoTaq® Green Master Mix (Promega), se incluyó una reacción con el DNA del vector pQE30 (1 µg/µl) como control negativo:

Tabla 13. Mezcla de reacción de PCR

	Concentración	Volumen
Master Mix	2X	10 μ l
Fseq	10 pM	1 μ l
Rseq	10 pM	1 μ l
DNA molde (Clonas)	--	--
H ₂ O (inyectable)	--	8 μ l
Volumen final		20 μ l

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Axygen (USA), usando un programa de amplificación previamente estandarizado (Tabla 14).

Tabla 14. Programa de amplificación para PCR

Paso	Temperatura	Tiempo (segundos)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	98 °C	120 s	1x
Desnaturalización	94 °C	5 s	35x
Alineamiento	55 °C	15 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	300 s	1x
Refrigeración	18 °C	∞ s	1x

Con los productos de PCR se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 95 V, se incluyó marcador de peso molecular de 1 Kb.

El segundo tamizaje (15 clonas restantes) siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente.

4.8 Verificación de la direccionalidad de las secuencias mediante PCR en colonia

La clona que resultó contener el inserto fue analizada para determinar la direccionalidad del mismo, por medio de PCR utilizando combinaciones de cebadores. Las combinaciones fueron las siguientes:

Tabla 15. Combinaciones de cebadores utilizados para deducir la orientación de la secuencia insertada

Reacción No.	Gen	Combinación de cebadores		Tamaño esperado
		Forward	Reverse	
1	CcV1	FCcV1	RCrV1	1438 pb
2		Fseq	RCcV1	1715 pb
3		Fseq	FCcV1	1715 pb

Se realizó la PCR en colonia para la clona a un volumen final de 20 µl usando GoTaq® Green Master Mix (Promega) para lo cual se prepararon las reacciones de acuerdo a la **Tabla 16**:

Tabla 16. Mezcla de reacción de PCR

	Concentración	Volumen
Master Mix	2X	10 µl
Forward	10 pM	1 µl
Reverse	10 pM	1 µl
DNA molde (Clona 17)	--	--
H ₂ O (inyectable)	--	8 µl
Volumen final		20 µl

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Axygen (USA), usando un programa de amplificación previamente estandarizado (**Tabla 17**).

Tabla 17. Programa de amplificación para PCR

Paso	Temperatura	Tiempo (segundos)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	98 °C	120 s	1x
Desnaturalización	94 °C	5 s	35x
Alineamiento	55 °C	15 s	
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	300 s	1x
Refrigeración	18 °C	∞ s	1x

Con los productos de PCR se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 95 V, se incluyó marcador de peso molecular de 1 Kb Plus (Axygen).

Posteriormente se realizaron nuevas combinaciones de cebadores para comprobar la direccionalidad del inserto. Dichas combinaciones fueron las siguientes:

Tabla 18. Combinaciones de cebadores utilizados para corroborar la orientación de la secuencia del gen CcV1 insertada en las clona #17

Reacción No.	Gen	Combinación de cebadores		Tamaño esperado
		Forward	Reverse	
1	CcV1	FCcV1	RCcV1	1438 pb
2		Fseq	Rseq	1845 pb
3		FCcV1	Rseq	1568 pb
4		Fseq	RCcV1	1715 pb

Se realizó la PCR en colonia para la clona #17, usando GoTaq® Green Master Mix (Promega) para lo cual se prepararon las reacciones de acuerdo a la **Tabla 19**:

Tabla 19. Mezcla de reacción de PCR

	Concentración	Volumen
Master Mix	2X	10 µl
Forward	10 pM	1 µl
Reverse	10 pM	1 µl
DNA molde (Clona 17)	--	--
H ₂ O (inyectable)	--	8 µl
Volumen final		20 µl

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Axxygen (USA), usando un programa de amplificación previamente estandarizado (**Tabla 20**).

Tabla 20. Programa de amplificación para PCR

Paso	Temperatura	Tiempo (segundos)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	98 °C	120 s	1x
Desnaturalización	94 °C	5 s	

Alineamiento	55 °C	15 s	35x
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	300 s	1x
Refrigeración	18 °C	∞ s	1x

Con los productos de PCR se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 95 V, se incluyó marcador de peso molecular de 1 Kb Plus (Axygen).

4.9 Extracción y purificación de la construcción genética

La clona #17 que resultó positiva para el inserto y la direccionalidad correcta fue cultivada en medio LB suplementado con antibiótico en dos tratamientos; el primero con ampicilina (100 mg/mL) y el segundo con ampicilina (100 mg/mL) + cloranfenicol (60 mg/mL); 8 horas a 37 °C. Para la purificación del plásmido se utilizó el estuche comercial “Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) con el procedimiento previamente establecido.

Con los productos purificados se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 95 V.

Posteriormente, se prepararon diluciones 1:20 de los 2 productos purificados del pQE30-CcV1 (obtenidos a partir de la clona #17 y que crecieron en medio con los dos tratamientos con antibióticos, como se mencionó anteriormente). Luego se prepararon las mezclas de reacción de PCR, como se muestran en la **Tabla 21**, (la combinación que se usó fue Fseq y RCcV1 como ya antes se había utilizado esperando una banda de 1715 pb) a un volumen final de 20 µl por cada uno, usando GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA):

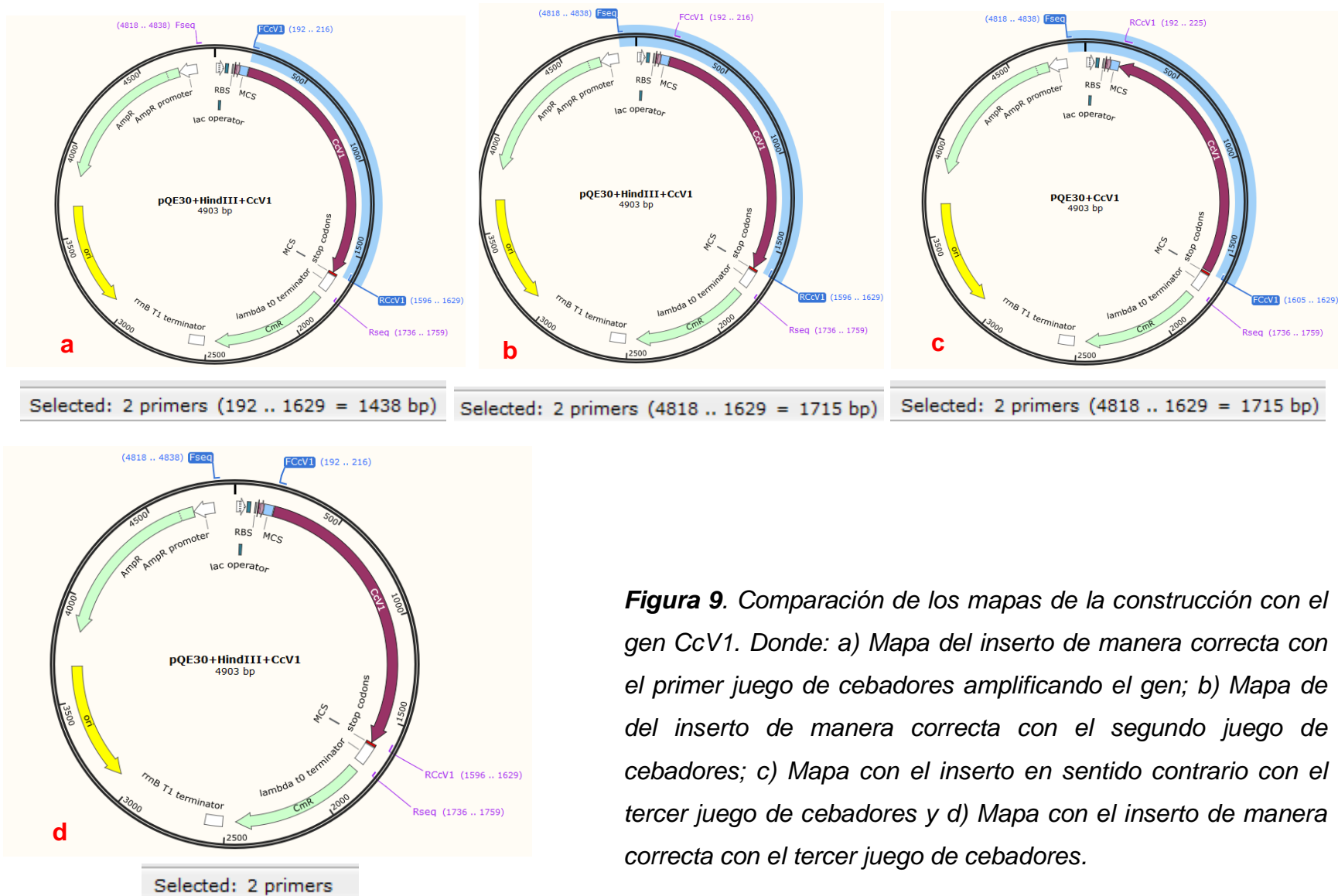


Figura 9. Comparación de los mapas de la construcción con el gen CcV1. Donde: a) Mapa del inserto de manera correcta con el primer juego de cebadores amplificando el gen; b) Mapa de del inserto de manera correcta con el segundo juego de cebadores; c) Mapa con el inserto en sentido contrario con el tercer juego de cebadores y d) Mapa con el inserto de manera correcta con el tercer juego de cebadores.

Tabla 21. Mezcla de reacción de PCR

	Concentración	Volumen
Master Mix	2X	10 μ l
Forward	10 pM	1 μ l
Reverse	10 pM	1 μ l
DNA molde	200 ng	1 μ l
H ₂ O (inyectable)	--	7 μ l
		20 μ l

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Axygen (USA), usando un programa de amplificación previamente estandarizado (**Tabla 22**).

Tabla 22. Programa de amplificación para PCR

Paso	Temperatura	Tiempo (segundos)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	98 °C	120 s	1x
Desnaturalización	94 °C	5 s	
Alineamiento	55 °C	15 s	35x
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	300 s	1x
Refrigeración	18 °C	∞ s	1x

Con los productos de PCR se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 95 V, se incluyó marcador de peso molecular de 1 Kb Plus (Axygen).

Para corroborar los datos una vez más, se preparó una dilución 1:10 del purificado proveniente de bacterias crecidas en medio con solo Ampicilina. Los juegos de cebadores usados fueron: FCcV1 + Rseq (con el que se esperaba un fragmento de 1568 pb) y Fseq + Rseq (con una banda esperada de 1845 pb).

Se prepararon las 4 reacciones de PCR a un volumen final de 20 μ l por cada uno (**Tabla 23**), usando Master Mix (GoTaq® Green Master Mix de PROMEGA):

Tabla 23. Mezcla de reacción de PCR

	Concentración	Volumen
Master Mix	2X	10 μ l
Forward	10 pM	1 μ l
Reverse	10 pM	1 μ l
DNA molde	200 ng	1 μ l
H ₂ O (inyectable)	--	7 μ l
		20 μ l

La PCR se llevó a cabo en un termociclador Axygen (USA), usando un programa de amplificación previamente estandarizado (Tabla 24).

Tabla 24. Programa de amplificación para PCR

Paso	Temperatura	Tiempo (segundos)	Repeticiones
Desnaturalización inicial	98 °C	120 s	1x
Desnaturalización	94 °C	5 s	
Alineamiento	55 °C	15 s	35x
Extensión	72 °C	45 s	
Extensión final	72 °C	300 s	1x
Refrigeración	18 °C	∞ s	1x

Con los productos de PCR se llevó a cabo electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE 1X a 95 V, se incluyó marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Axygen).

4.10 Criopreservación de la clona de *E. coli* transformada con el vector pQE30-CcV1

La clona que resultó positiva para el inserto y la dirección correcta fue cultivada en 10 ml de medio LB suplementado con antibiótico en dos tratamientos; el primero con ampicilina (100 mg/mL) y el segundo con ampicilina (100 mg/mL) + cloranfenicol (60 mg/mL), durante 8 horas a 37 °C a 200 rpm.

Posteriormente a cada tubo se mezclaron 500 μ l de glicerol estéril y 500 μ l del cultivo. Se etiquetaron de manera correcta, se homogenizaron y se guardaron a -80 °C.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Preparación de los fragmentos de ADN

En la **Figura 10** se observa buena calidad del DNA del plásmido (pBSK-CcV1) que contiene la secuencia del gen CcV1, es decir, no se observa degradado y por lo tanto fue la secuencia que se utilizó para reamplificar y obtener la secuencia del gen que se usó en este trabajo:



Figura 10. Gel de electroforesis para observar la calidad del DNA de pBSK-CcV1. Donde a: CcV1 y b: Marcador 1Kp Plus.

El vector purificado permitió la amplificación del gen CcV1 con los cebadores establecidos, los cuales fueron diseñados específicamente para que hibridaran en la secuencia del CDS de este gen usando SnapGene™ 1.1.3. Los productos de PCR (pPCR) y los productos purificados de PCR (ppPCR), se observan a continuación en las **Figuras 11** y **12**, respectivamente.

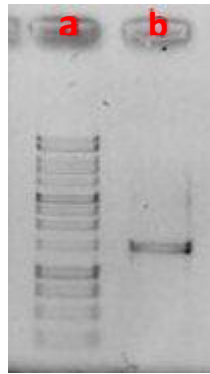


Figura 11. Gel de electroforesis de los pPCR. Donde a: Marcador 1Kp Plus; b: CcV1.

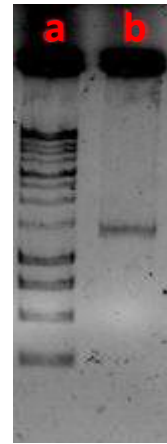


Figura 12. Gel de electroforesis de los ppPCR. Donde a: Marcador 1Kp Plus; b: CcV1.

Asimismo, la metodología establecida permitió la correcta purificación del vector pQE30 (**Figura 13**):

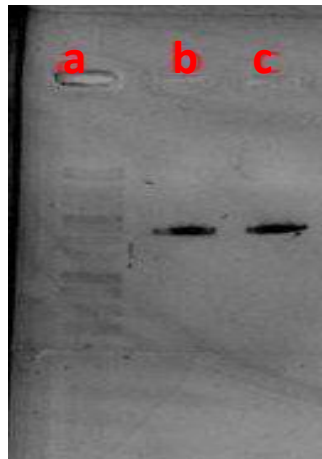


Figura 13. Gel de electroforesis del producto purificado de pQE30. Donde a: Marcador 1Kp Plus; b y c: producto purificado de pQE30.

El vector de expresión pQE-30 es un vector bacteriano para la expresión de proteínas marcadas con 6xHis (etiqueta de poli-Histidinas) en el N-terminal ampliamente usado; encontramos el caso de la “Optimización de la producción y expresión de serratiopeptidasa heteróloga” por (Rouhani, Valizadeh, Molasalehi, &

No-Rouzian, 2020) donde hacen uso de este vector bacteriano para la clonación y expresión de la proteína serratiopeptidasa en condiciones óptimas en *E. coli*, para posteriormente ser usado en tratamientos para el dolor y la inflamación. Otro ejemplo, un poco más relacionado al tema, es el caso de estudio de (Luo & Pang, 2006) en el que se clona un gen proveniente de *Microplitis bicoloratus*, asociado a polidnavirus, dentro del vector de expresión pQE30 para posteriormente evaluar la actividad de esta proteína y su función al deteriorar la actina de los hemocitos de su hospedador (larvas de *Spodoptera litura*). Para nuestro caso, las dos estrategias establecidas para corroborar la identidad del vector arrojaron resultados positivos; por un lado, la digestión del vector con enzimas de restricción resultó en el patrón de bandeado esperado (**Figura 14 A**) y en la segunda estrategia se planteó realizar PCR utilizando los cebadores específicos, igualmente en este caso resultó el fragmento que se esperaba (**Figura 14 B**). Además, el uso de los antibióticos (ampicilina y cloranfenicol) en el medio de crecimiento para las bacterias permite corroborar que es el vector pQE-30, ya que este vector contiene estos dos genes de resistencia a antibiótico como marcador de selección; es decir, las bacterias que se hayan transformado correctamente podrán degradar el antibiótico presente en el medio gracias a que el vector les confiere esa capacidad; es el primer paso para obtener clones con la construcción esperada y se parte de esta primicia para posteriormente corroborar la presencia o no del inserto dentro del vector. Esta capacidad de seleccionar las células transformadas mediante el uso de genes de resistencia a antibióticos es ampliamente usada en la investigación. (Flores, Hilda, Armando, & Mario, 2017) usan estos mismos genes en su estudio “Obtención de una construcción génica para interrumpir el gen *nusg* de *Bacillus subtilis*”; (Ruiz, 2020) también hace uso de estos marcadores de selección en su trabajo “Inactivación de cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de infecciones asociadas a prótesis articulares, mediante la herramienta CRISPR/Cas9”; otro ejemplo es el trabajo “Plasmido pLR para expresión de proteínas recombinantes en bacterias del género *Bifidobacterium*” patentado por (De Leon, Reyes, & Barba, 2008).

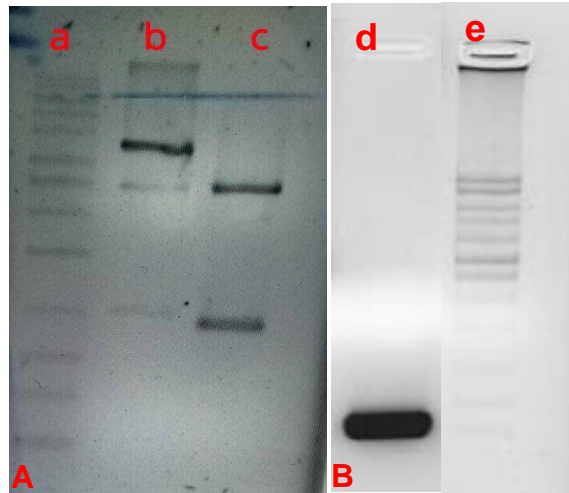


Figura 14. Gel de electroforesis para comprobar la extracción de pQE30. Donde a: Marcador 1Kp Plus; b: pQE30+Smal+XbaI; c: pQE30+Smal+FspI; d) pPCR usando los cebadores Fseq y Rseq y e) Marcador 1Kb Plus.

5.2 Construcción del vector pQE30-CcV1

Luego que se corroboró la identidad del vector pQE30, se procedió a digerirlo con la enzima *HindIII* y posteriormente, rellenar los extremos y purificarlo para los experimentos de ligación ya descritos en la sección de Métodos. Los resultados de la digestión, rellenado y purificado se muestran a continuación:

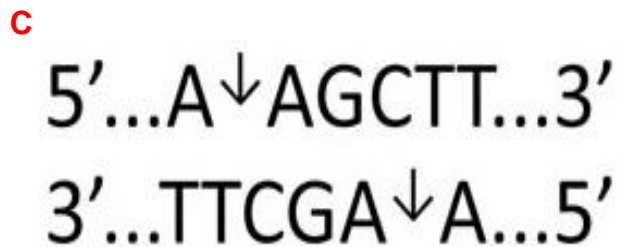
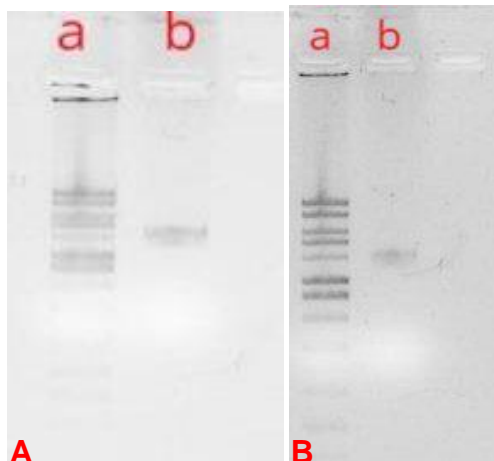


Figura 15. Digestión del vector pQE30. Donde: A y B muestran el gel de electroforesis de los productos purificados de pQE30 digerido con *HindIII* y con

extremos rellenos, respectivamente. Donde a: Marcador 1Kp Plus; b: pQE30. La C muestra la secuencia y sitio de corte reconocida por *HindIII*.

Luego de tener, tanto el gen CcV1 amplificado y purificado, y el vector digerido con *HindIII*, relleno y purificado; se realizó la ligación utilizando T4 ligasa para obtener una construcción como se mostró en el análisis *in silico* en la **Figura 6**.

5.3 Tamizaje de clonas mediado por PCR

De las clonas que se obtuvieron se realizó un análisis (en dos tamizajes) para determinar si contenían el vector con el inserto en la dirección correcta. Se analizaron por medio de PCR con cebadores específicos un total de 33 clonas, de las cuales solamente una exhibió el fragmento de 1845 pares de bases que implica la presencia del inserto CcV1, el resto de las clonas exhibió una banda de 403 pb. Es decir, se presentó sólo un 3.03% de eficiencia en el proceso de construcción del vector y transformación genética. A continuación, se muestran los resultados del primer y segundo tamizaje, (**Figura 16** y **Figura 17**, respectivamente).

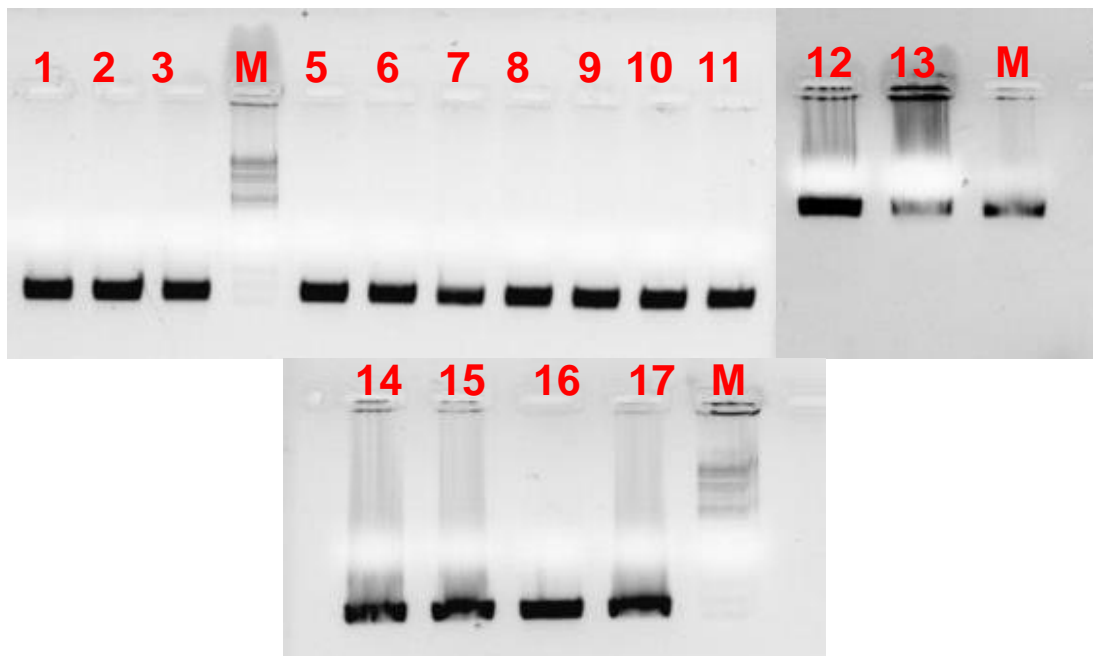


Figura 16. Primer tamizaje de clonas. a) 1-16=Clonas CcV1; 17= Control positivo (vector purificado 1:6) y M= Marcador 1Kb Plus.

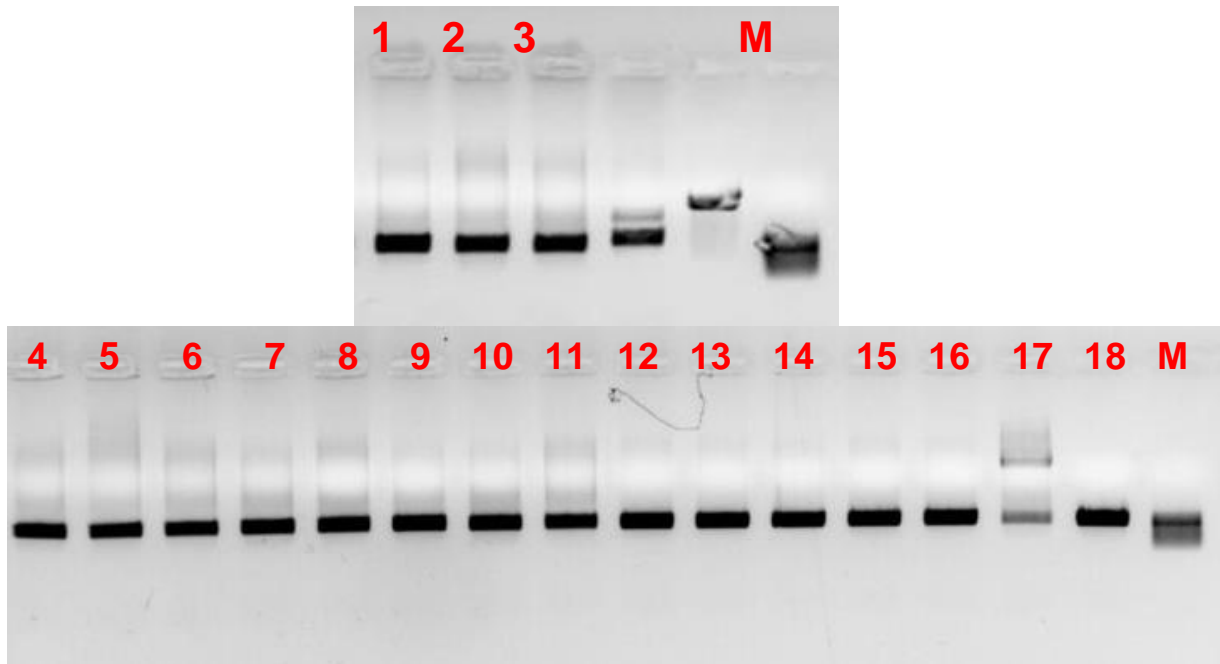


Figura 17. Segundo tamizaje de clonas. 1-17=Clonas CcV1; 18= Control positivo (vector purificado 1:6) y M= Marcador 1Kb Plus.

Una vez obtenida la clona positiva para el inserto se procedió a corroborar la direccionalidad de dicho inserto, con la estrategia ya descrita en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados se muestran en la **Figura 18**:

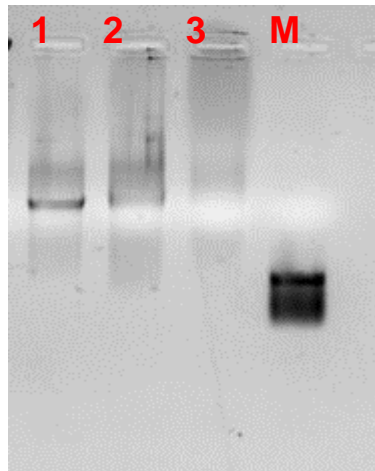


Figura 18. Gel de electroforesis de las reacciones de PCR para deducir la orientación de la cadena de DNA del gen. Donde: 1= Reacción #1; 2= Reacción #2; 3= Reacción #3; y M= pPCR de Fseq+Rseq con pQE30.

De acuerdo al experimento anterior, la clona #17, además de tener el inserto del gen CcV1 también se había clonado en el sentido correcto. Por lo que se procedió a corroborar dichos datos empleando otros juegos y/o combinaciones de cebadores (descritas en la **Tabla 18**) tanto del vector como de la secuencia del gen.

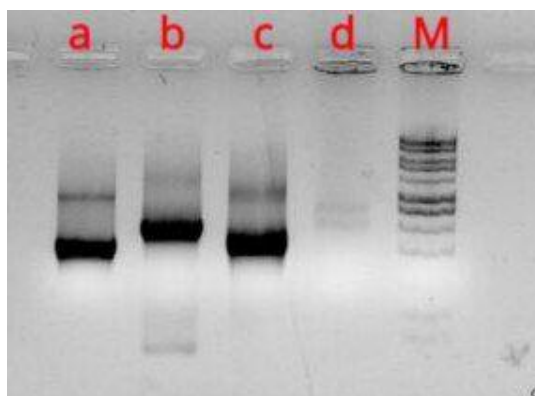


Figura 19. Gel de electroforesis de las reacciones de PCR para corroborar la orientación de la cadena del gen insertada en pQE30. Donde: a= Reacción #1; b= Reacción #2; c= Reacción #3; d= Reacción #4 y M= Marcador de peso molecular 1Kb Plus.

Las deducciones sobre la direccionalidad del inserto en cada juego de cebadores utilizados tanto en las primeras 3 reacciones, así como en las 4 reacciones que se realizaron posteriormente para corroborar los resultados se resume a continuación en la **Tabla 25**:

Tabla 25. Deducciones sobre direccionalidad del inserto

Primeras reacciones		Reacciones para corroborar	
Reacción No.	Deducción	Reacción No	Deducción
1	El gen está presente	1	El gen está presente
2	Dirección correcta	2	
3	Dirección incorrecta	3	Dirección correcta
		4	

De esta manera y con los resultados observados en las **Figuras 18** y **19**, se concluye que el gen se insertó de manera correcta, es decir, en sentido de 5' a 3'.

5.4 Extracción y purificación de la construcción genética

Luego de haber comprobado mediante PCR en colonia que el gen se había insertado dentro del vector de manera correcta se procedió a aislar y purificar el plásmido.

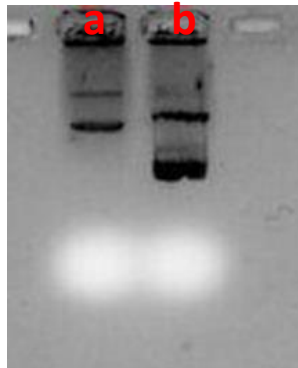


Figura 20. Gel de electroforesis de los productos purificados de pQE30-CcV1. Donde a) Bacterias crecidas con ampicilina y b) Bacterias crecidas con ampicilina + cloranfenicol.

Para corroborar que se había extraído el vector correcto, y a su vez rectificar que la construcción había sido clonada con éxito se realizaron diversas reacciones de PCR con un juego de cebadores tanto del vector como del gen. La combinación que se usó fue Fseq y RCcV1 como ya antes se había utilizado esperando una banda de 1715 pb; el resultado lo observamos en la **Figura 21**. Con esto se corrobora una vez más que el gen está presente en el vector de manera correcta.

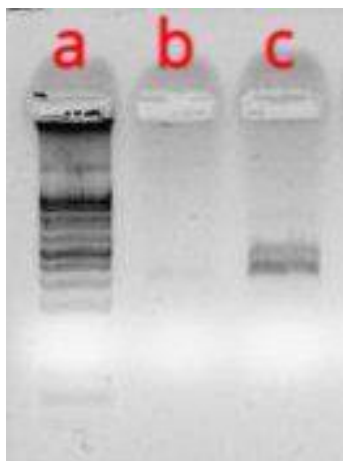


Figura 21. Gel de electroforesis de los pPCR de pQE30-CcV1 con el juego de cebadores Fseq y RCcV1. Donde a) Marcador de peso molecular; b) Bacterias crecidas con ampicilina y c) Bacterias crecidas con ampicilina + cloranfenicol.

Al observarse que la banda que corresponde a la reacción con el producto purificado de pQE30-CcV1 proveniente de las bacterias crecidas solo con ampicilina estaba muy tenue se procedió a realizar otras reacciones de PCR (los juegos de cebadores usados fueron: FCcV1 + Rseq, con el que se esperaba un fragmento de 1568 pb; y Fseq + Rseq, con una banda esperada de 1845 pb; los resultados se muestran a continuación:

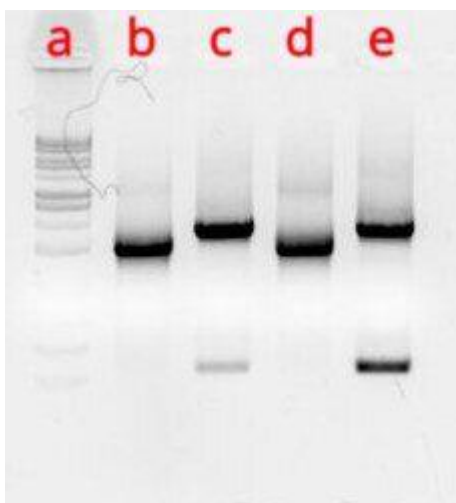


Figura 22. Gel de electroforesis de los pPCR de pQE30-CcV1 con el juego de cebadores FCcV1 + Rseq y Fseq + Rseq. Donde a) Marcador de peso molecular

1Kb Plus; b) Bacterias crecidas con ampicilina con el primer juego de cebadores; c) Bacterias crecidas con ampicilina con el segundo juego de cebadores; d) Bacterias crecidas con ampicilina+cloranfenicol con el primer juego de cebadores y e) Bacterias crecidas con ampicilina+cloranfenicol con el segundo juego de cebadores.

De esta manera se corrobora de manera contundente que el gen de interés se insertó de manera correcta, tal y como se esperaba desde el análisis *in silico* y, como ya se mencionó anteriormente, el uso de los antibióticos (ampicilina y cloranfenicol) en el medio de crecimiento para las bacterias permite corroborar que es el vector pQE-30, por la razón que ya se mencionó. Es por eso que el siguiente paso fue la criopreservación de la cepa.

Ahora bien, de acuerdo con el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) el genoma de *Cotesia congregata* bracovirus está compuesta por 36 cromosomas, con un tamaño completo de 0.56767 Mbp (Mega pares de bases), un total de 155 proteínas y un porcentaje de GC (Guanina/Citocina) de 33.5667. Por su parte, la secuencia del gen CcV1 se encuentra en el cromosoma 13; con ID (Identificador): 3238857, está compuesta por 1831 nucleótidos; sin embargo, la CDS está compuesta por 1434 pb y genera una proteína de 477 aa y un peso de 52.8 kDa (Kilodaltons). El tamaño de la secuencia del CDS concuerda con los datos obtenidos luego de la amplificación mediante PCR realizada en este trabajo con la hibridación de los cebadores específicos (FCcV1 y RCcV1) que se diseñaron específicamente para la secuencia, es decir, el tamaño de la banda obtenida está dentro del rango del tamaño hipotético del CDS del gen (tal y como se observa en la **Figuras 10,11 y 12**). También concuerdan los datos luego del diseño de los cebadores específicos para una región del vector usado, ya que el tamaño esperado durante el análisis *in silico* y el obtenido experimentalmente son similares; además se comprueba al digerir el vector con enzimas de restricción, y los tamaños esperados concuerdan con los obtenidos (**Figura 14**).

Por otro lado, los resultados de la digestión, rellenado y ligación no pudieron ser evaluados sino hasta luego del tamizaje de las clonas que se obtuvieron. Es posible

que la cantidad de inserto haya sido insuficiente ya que de 33 colonias tamizadas en total para el gen CcV1, solo 1 tenía el inserto, es decir, una relación de 1/33 (3.03%) de efectividad. Y eso disminuye aún más con la posibilidad de que el inserto haya sido ligado en dirección correcta.

Cabe mencionar que a pesar de que la clona #17 fue rectificadas varias veces por PCR mediante varias combinaciones de los juegos de cebadores (**Figuras 18, 19, 21 y 22**) aún queda la incógnita de que, al momento de rellenar los extremos cohesivos luego de la digestión con *HindIII*, la polimerasa haya agregado o eliminado alguna base. Esto es preocupante ya que con una sola base que se modifique (ya sea que se elimine o agregue) en esta parte de la secuencia (en el 5' de la secuencia del gen) el marco de lectura podría verse afectado, es decir, el CDS del CcV1 no quedaría en marco con los elementos del casete de expresión del vector pQE30 (promotor, el RBS, el codón de inicio y la proteína etiqueta de polihistidinas, tal y como se observa en las **Figuras 4, 6 y 7**); y así, la proteína no se llegaría a expresar de manera correcta. A propósito, el promotor usado en este caso fue el T5, el cual, según Bujard y colaboradores (1978), en su trabajo "Un sistema de transcripción-traducción basado en el promotor T5 para el análisis de proteínas *in vitro* e *in vivo*", es un promotor derivado del colifago T5 que es utilizado por el Ácido Ribonucleico (RNA) polimerasa de *E. coli*, dirige eficientemente la síntesis de ARN mitocondrial (ARNmt) *in vitro* y la traducción de tales ARNs en presencia de metionina produce proteínas únicas de tan alta actividad específica y pureza que pueden ser directamente analizadas por electroforesis en gel sin la necesidad de inmunoprecipitación previa; por lo que es un promotor ampliamente usado en investigación (Bujard et al., 1987).

Por otro lado, el Software SnapGene™ 1.1.3 es muy confiable ya que es una herramienta que permite, de manera sencilla, planificar, visualizar y documentar procedimientos de clonación molecular simulando métodos comunes de clonación y PCR estándar con sus propios cebadores o que los diseñe automáticamente, ayuda a identificar y evitar errores comunes al realizar un seguimiento de detalles como la metilación y fosforilación del ADN, permite anotar características en plásmidos utilizando la base de datos de características seleccionadas de

SnapGene o características personalizadas, muestra sitios de enzimas, características, cebadores, ORF (marco de lectura abierto), traducciones y más en mapas de plásmidos o en detalle en la vista de secuencia, también permite personalizar mapas con controles flexibles de anotación y visualización, permite también realizar simulaciones realistas de gel de agarosa; permite realizar mutaciones, traducciones y alineaciones a secuencias de interés, entre muchas otras cosas. Este software ha sido utilizado en diferentes estudios, por ejemplo el uso que se le está dando con la actual contingencia sanitaria, tal y como mencionan (Abraham Peele, Srihansa, Krupanidhi, Ayyagari, & Venkateswarulu, 2020) en su estudio donde se diseña una nueva vacuna multiepítipo utilizando herramientas *in silico* (SnapGene y otros) que potencialmente desencadenan respuestas inmunes de células T CD₄ y CD₈ contra el nuevo Coronavirus. Por lo mencionado anteriormente, realizar una simulación del proceso para este trabajo con ayuda de esta herramienta es una manera muy confiable que permite ahorrar tiempo y dinero y también genera confianza de tener un procedimiento con resultados seguros y confiable.

Sin embargo, para corroborar que la secuencia del vector con el inserto está de manera que se diseñó originalmente en el análisis *in silico* con esta herramienta, es decir, que el marco de lectura no se vio afectado; se está a la espera de los datos de la secuenciación de la construcción genética, con la cual se podrá descartar o confirmar esta posibilidad. De acuerdo al Laboratorio de Servicios Genómicos (LABSERGEN) del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), la secuenciación de ADN por tecnología capilar que ofrecen se realiza utilizando el método del dideoxi-terminal, desarrollado por Frederick Sanger, este método se basa en la capacidad de la DNA polimerasa para generar cadenas de diferentes tamaños de ADN complementario a una cadena patrón, esto debido a que en la mezcla de reacción son incluidos los 4 dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia diferencial, que al ser incorporados a la cadena en crecimiento detienen la polimerización. Utilizando la técnica de Sanger en sistemas automatizados de tecnología capilar y de fluorescencia, se puede detectar de

manera diferencial cada uno de los dideoxinucleótidos que se adicionan al final de un fragmento en polimerización que es separado, de otros fragmentos de diferente tamaño, por medio de una electroforesis capilar y por medio de un software, se descifra la secuencia de un fragmento de ADN.

Sequence ID: Query_214367 Length: 182 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 116 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
195 bits(105)	4e-54	113/116(97%)	3/116(2%)	Plus/Plus
Query 164	AGGAGAAATTAAC	ATGAGAGGATCG	CATCACCATCACCATCACG	GATCCGCATGCGAGC 223
Sbjct 1	AGGAGAAATTAAC	TATGAGAGGATCG	CATCACCATCACCATCACG	GATCCGCATGCGAGC 60
Query 224	TCGGTA-CCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCT	-	CCATGTCGCTCGTCAAAGTACG	276
Sbjct 61	TCGGTACCCGGGTCGACCTGCAGCCAAGCT	CACCATGTCGCTCGTCAAAGTACG		116

Figura 23. Alineamientos de la secuenciación (secuencias de 5' a 3') mediante BLAST. Donde: Query: Datos de secuenciación, Sbjct: Secuencia del vector pQE30-CcV1 (SnapGene). Las secuencias marcadas con AGGAGAAATTAAC, ATGAGAGGATCG, CATCACCATCACCATCACG y -CCATGTCGCTCGTCAAAGTACG, pertenecen a una parte del RBS, codón de inicio, His-Tag y secuencia del gen CcV1; respectivamente.

Sequence ID: Query_61755 Length: 189 Number of Matches: 1

Range 1: 59 to 150 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous M](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
163 bits(88)	1e-44	91/92(99%)	1/92(1%)	Plus/Minus
Query 17	GCGGC-ACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGGTCATTACTGGATCTAT			75
Sbjct 150	GCGGCAACCGAGCGTTCTGAACAAATCCAGATGGAGTTCTGAGGTCATTACTGGATCTAT			91
Query 76	CAACAGGAGTCCAAGCT	CAGCTAATT	AAGCTC	107
Sbjct 90	CAACAGGAGTCCAAGCTCAGCTAATTAAGCTC			59

Figura 24. Alineamientos de la secuenciación reversa (secuencias de 3' a 5') mediante BLAST. Donde: Query: Datos de secuenciación, Sbjct: Secuencia del vector pQE30-CcV1 (SnapGene). Las secuencias marcadas con CAGCTAATT, AAGCTC y AAGCTC pertenecen a una parte de los codones de stop, sitio de clonación múltiple y secuencia del gen CcV1; respectivamente.

La secuenciación se realiza utilizando la química BigDye Terminator v3.1 y electroforesis en sistema multicapilar automático. Los datos obtenidos indican que, luego de realizar un BLAST (Herramienta básica de búsqueda de alineación local) con la secuencia del vector pQE30-CcV1 y los datos obtenidos en la secuenciación, en las secuencias del forward (5' - 3') faltan dos pares de bases (AC) en la secuencia del gen que forman parte del primer, tal y como se observa en la **Figura 23**; y en el Reverse solo aparece una base del gen, pero si concuerda con la secuencia en SnapGene (**Figura 24**).

Sin embargo, en el caso de que se han agregado las bases AC se propone, en lugar de realizar de nuevo todo el procedimiento que se hizo en este trabajo, llevar a cabo la técnica de Mutación Sitio Dirigida mediante PCR; la cual es, según (Andreassen, Pettersen, & Jørgensen, 2019) una técnica que se utiliza para introducir mutaciones específicas en el ADN, además sirve para investigar la interacción entre moléculas pequeñas de ácido ribonucleico no codificante (ARNs) y los ARN mensajeros diana (ARNm). Por lo que resultaría relativamente sencilla realizar mutaciones puntuales para agregar o remover bases que se hayan agregado por algún error de la polimerasa; o al menos se evitaría realizar todos los pasos que conllevan desde la amplificación del gen hasta obtener una clona con la construcción correcta.

La clonación del gen CcV1 dentro del vector de expresión pQE-30 es el primer paso para poder expresar y purificar la proteína resultante; la cual podrá ser usada para evaluar su potencial actividad insecticida contra algunas plagas que afectan seriamente los principales cultivos de hortalizas provocando grandes pérdidas monetarias y el aumento del uso de químicos que ocasionan un efecto colateral grave al medio ambiente. La potencial actividad como antagonista de insectos plaga de este gen se deduce al observar los datos documentados sobre el estudio de los polidnavirus, se observa que la principal actividad de estos es regular o inhibir la actividad de los hemocitos de los huéspedes, es decir, altera la actividad de las células de la hemolinfa (sangre de los invertebrados) incluyendo a los fagocitos que juegan un papel fundamental en el sistema inmune del insecto; tal y como observan (Luo & Pang, 2006) en su trabajo "Efecto disruptivo de la proteína similar a EGF de polidnavirus de *Microplitis bicoloratus*, MbCRP, sobre el citoesqueleto de actina en

hemocitos de insectos lepidópteros” al clonar y expresar el gen MbCRP proveniente de la avispa endoparasita *Microplitis bicoloratus* y asociada al polidnavirus *Microplitis bicoloratus* bracovirus (*MbBV*) en el vector pQE30 (como ya se mencionó anteriormente) para después averiguar su función en el proceso de parasitismo. Se descubrió que la proteína recombinante inhibió la expresión de la actina en células de la hemolinfa en larvas de 6 a 7 días. Además, se observó que la proteína de fusión MbCRP-GFP se localiza en el citoplasma, lo que indica que la expresión de este gen en células de lepidópteros altera la función de los citoesqueletos de actina. Aunado a esto, en el trabajo “Una región en espiral de una proteína inmunosupresora de insectos está involucrada en la unión y absorción por los hemocitos” realizada por Asgari y Schmidt (2002), corrobora que estos genes de polidnavirus asociadas a parasitoides provocan la supresión del sistema inmune de lepidópteros al inactivar eficazmente los hemocitos mediando la degradación del citoesqueleto. Demuestran también que se requiere un dominio en espiral que contenga una cremallera de leucina para la función del gen que ellos analizan, el CrV1 proveniente de *Cotesia rubecula* (Asgari & Schmidt, 2002). Otros estudios también sostienen que la principal actividad de los genes producidos por los polidnavirus asociados a parasitoides son los encargados de alterar la función del sistema inmune del huésped para que los huevos ovopositados en las larvas no sean expulsados por los lepidópteros (Strand, 2012); por lo que esperamos que el gen CcV1 (ortólogo de CrV1) ahora clonado en pQE-30 pueda ser expresada y purificada en futuros experimentos, de esta forma se podrá evaluar su capacidad para ser usada como antagonista a lepidópteros que son importantes por su papel como plaga en diferentes cultivos.

VI. CONCLUSIÓN

Se ha logrado confirmar, mediante el tamizaje mediado por PCR, que se obtuvo con éxito la construcción del vector de expresión (pQE30-CcV1) del gen CcV1 para ser expresada en *E. coli*; y, claramente se ha llevado a cabo satisfactoriamente todo el proceso que esto incluye: desde la digestión del vector con la enzima de restricción *HindIII*, el rellenado de sus extremos cohesivos, el proceso de ligación del gen en este vector, la transformación genética mediante choque-térmico, el largo proceso de tamizaje mediado por PCR y al final, el haber podido criopreservar la clona con la construcción que seguramente servirá para realizar futuras investigaciones que conlleven a diseñar una alternativa eficaz a los insecticidas convencionales o bien, una alternativa a las proteínas de origen biológico que ya se usan con este propósito (como las proteínas Cry de *B. thuringiensis*) y que últimamente se ha estado encontrando evidencia de que se comienza a generar resistencia por parte de los insectos plaga que son controlados con ésta, por lo que pronto serán obsoletas. No cabe duda que se deben buscar otras alternativas y el posible uso de los genes provenientes de PDV's son un gran candidato.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abraham Peele, K., Srihansa, T., Krupanidhi, S., Ayyagari, V. S., & Venkateswarulu, T. C. (2020). Design of multi-epitope vaccine candidate against SARS-CoV-2: a in-silico study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 0(0), 1–9. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1770127>
- Andreassen, P. R., Pettersen, J. S., & Jørgensen, M. (2019). Site-Directed Mutagenesis for In Vitro and In Vivo Experiments Exemplified with RNA Interactions in Escherichia Coli. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (144), 1–10. <https://doi.org/10.3791/58996>
- Asgari, S., & Schmidt, O. (2002). A coiled-coil region of an insect immune suppressor protein is involved in binding and uptake by hemocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(5), 497–504. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00127-8)
- Belle, E., Beckage, N. E., Rousselet, J., Poirié, M., Lemeunier, F., & Drezen, J.-M. (2002). Visualization of Polydnavirus Sequences in a Parasitoid Wasp Chromosome. *Journal of Virology*, 76(11), 5793–5796. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5793-5796.2002>
- Bézier, A., Annaheim, M., Herbinière, J., Wetterwald, C., Gyapay, G., Bernard-Samain, S., ... Drezen, J. M. (2009). Polydnaviruses of braconid wasps derive from an ancestral nudivirus. *Science*, 323(5916), 926–930. <https://doi.org/10.1126/science.1166788>
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., ... Dobberstein, B. (1987). A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods in Enzymology*,

155(1985), 416–433. <https://doi.org/10.11588/heidok.00009187>

ChileBIO. (2011). *Mitos y realidades de la Biotecnología agrícola*. Retrieved from https://www.chilebio.cl/wp-content/uploads/2018/06/rev_mit_chilebio.pdf

De Leon, A., Reyes, M., & Barba, A. (2008). *Plasmido pLR para expresión de proteínas recombinantes en bacterias del genero Bifidobacterium*.

Drezen, J. M., Provost, B., Espagne, E., Cattolico, L., Dupuy, C., Poirié, M., ... Huguet, E. (2003). Polydnavirus genome: Integrated vs. free virus. *Journal of Insect Physiology*, 49(5), 407–417. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00058-1)

Dupuy, C., Huguet, E., Cattolico, L., & Drezen, J.-M. (2006). Vers la compréhension de l'histoire évolutive des polydnavirus. *Virologie*, 10, 109–118. Retrieved from [c:%5CDocuments and Settings%5CAurore Dubuffet%5CMes documents%5Cthèse%5CINFOS%5CARTICLES%5CArticles PDF%5CParasitoids%5CDupuy & al 2006 \(virologie\).pdf](c:%5CDocuments and Settings%5CAurore Dubuffet%5CMes documents%5Cthèse%5CINFOS%5CARTICLES%5CArticles PDF%5CParasitoids%5CDupuy & al 2006 (virologie).pdf)

Federici, B. A., & Bigot, Y. (2003). Origin and evolution of polydnaviruses by symbiogenesis of insect DNA viruses in endoparasitic wasps. *Journal of Insect Physiology*, 49(5), 419–432. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00059-3)

Flores, G., Hilda, L. S., Armando, O. H., & Mario, P. R. (2017). Obtención de una construcción génica para interrumpir el gen nusg de *Bacillus subtilis*. *Revista de Divulgación Científica*, 3(1).

García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *VacciMonitor*, 22(2), 30–39. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v22n2/vac06213.pdf>

González, A., & Fillat, M. (2018). ASPECTOS METODOLÓGICOS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN *Escherichia coli*. *Revista de Educación Bioquímica*, 37(1), 14–27. Retrieved from <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2018/reb181c.pdf>

Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutierrez, L., & Sotelo-Mundo,

- R. (2013). Current perspectives on the use of recombinant proteins and their importance in scientific and industrial research. *Biotechnia*, XV(3), 8–17.
- Herniou, E. A., Huguet, E., Theze, J., Bezer, A., Periquet, G., & Drezen, J. (2013). When parasitic wasps hijacked viruses : genomic and functional evolution of polydnaviruses. *The Royal Society*.
- ISAAA. (2018). Brief 54 Executive Summary. *Servicio Internacional Para La Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA)*.
- ISAAA. (2019). Comunicado de Prensa. *Servicio Internacional Para La Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA)*, 1–2. Retrieved from <http://www.isaaa.org/>
- Kroemer, J. A., & Webb, B. A. (2004). POLYDNAVIRUS GENES AND GENOMES : Emerging Gene Families and New Insights into Polydnavirus Replication. *Annual Review of Entomology*, 49(1), 431–456. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.49.072103.120132>
- Labropoulou, V., Douris, V., Stefanou, D., Magrioti, C., Swevers, L., & Iatrou, K. (2008). Endoparasitoid wasp bracovirus-mediated inhibition of hemolin function and lepidopteran host immunosuppression. *Cellular Microbiology*, 10(10), 2118–2128. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01195.x>
- Lara R., A. (2011). Recombinant protein production in escherichia coli. *Revista Mexicana de Ingeniera Quimica*, 10(2), 209–223. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v10n2/v10n2a6.pdf>
- Luo, K. J., & Pang, Y. (2006). Disruption effect of *Microplitis bicoloratus* polydnavirus EGF-like protein, MbCRP, on actin cytoskeleton in lepidopteran insect hemocytes. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(8), 577–585. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00195.x>
- Rodríguez-Pérez, M. A., & Beckage, N. E. (2006). Estrategias co-evolutivas de la interacción entre parasitoides y polidnavirus. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(1), 31–43.
- Rodríguez, E., Zumalacárregui, J., Otero, A., Calleja, A., & de la Fuente, L. (2002).

- Los alimentos transgénicos. In *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* (Vol. 45). Retrieved from <http://www.saber.es/web/biblioteca/libros/los-alimentos-transgenicos/los-alimentos-transgenicos.pdf>
- Rodríguez, P., & González R, O. (2007). Plantas transgénicas: una revisión de los principales cultivos básicos en México. *Revista Electrónica y Tecnológica E-Gnosis*, (5), 1.
- Rouhani, M., Valizadeh, V., Molasalehi, S., & No-Rouzian, D. (2020). Production and expression optimization of heterologous serra-tiopeptidase. *Iranian Journal of Public Health*, 49(5), 931–939. <https://doi.org/10.18502/ijph.v49i5.3211>
- Ruiz, J. (2020). Inactivación de cepas de *Staphylococcus aureus* procedentes de infecciones asociadas a prótesis articulares, mediante la herramienta CRISPR/Cas9. . *Universidad Pública de Navarra*.
- Sandoval V., D. (2017). Treinta Años de Transgenicos (compendio cartográfico). *Ceccam*, 11–15. Retrieved from http://ceccam.org/sites/default/files/30_años_transgenicos.pdf
- Strand, M. R. (2012). Polydnavirus Gene Products that Interact with the Host Immune System. In *Parasitoid Viruses: Symbionts and Pathogens*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384858-1.00012-6>
- Strand, M. R., & Burke, G. R. (2013). Polydnavirus-wasp associations: Evolution, genome organization, and function. *Current Opinion in Virology*, 3(5), 587–594. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.06.004>
- Urretabizkaya, N., Vasicek, A., & Saini, E. (2010). Insectos perjudiciales de importancia gronómica: Lepidópteros. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*, 1(1), 1–77. Retrieved from https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_lepidopteros.pdf
- Whitfield, J. B., Austin, A. D., & Fernandez-Triana, J. L. (2018). Systematics, Biology, and Evolution of Microgastrine Parasitoid Wasps. *Annual Review of Entomology*, 63(October), 389–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043405>

VIII. ANEXOS

8.1 Preparación de gel de agarosa 1% en TAE 1X para electroforesis

1. Pesar 0.25 g de poliacrilamida con ayuda de la balanza analítica
2. Medir 25 mL de buffer TAE 1X
3. Mezclar y homogenizar la mezcla con ayuda del microondas
4. Cargar el contenido en la cámara de electroforesis debidamente armada y esperar a que solidifique para su uso.

8.2 Preparación de los stocks de antibióticos

- a. Para 10 ml de ampicilina [Concentración]_{final} = 50 mg/mL:
 - i. Pesar 500 mg de ampicilina
 - ii. Medir 10 mL de agua inyectable estéril
 - iii. Mezclar y esterilizar por filtración
- b. Para 10 ml de cloranfenicol [Concentración]_{final} = 30 mg/mL:
 - i. Pesar 300 mg de cloranfenicol
 - ii. Medir 10 mL de agua inyectable estéril
 - iii. Mezclar y esterilizar por filtración

Distribuir en tubos Eppendorf estériles, etiquetar y congelar (-20 °C) hasta su uso.

8.3 Preparación de medio LB líquido

1. Pesar la cantidad equivalente de medio LB considerando que se deben mezclar 25 gramos por cada 1000 ml.
2. Agregar la cantidad correcta de H₂O destilada.
3. Homogenizar y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
4. Si se va a suplementar con antibiótico, agregar la cantidad correcta considerando que del stock de antibióticos se agregan 1 µl de antibiótico por cada 1 ml de medio.

8.4 Preparación de medio LB solido

1. Pesar la cantidad equivalente de medio LB considerando que se deben mezclar 25 gramos por cada 1000 ml.
2. Pesar la cantidad equivalente de medio Agar bacteriológico considerando que se deben mezclar 15 gramos por cada 1000 ml.
3. Agregar la cantidad correcta de H₂O destilada.
4. Homogenizar y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
5. Si se va a suplementar con antibiótico, agregar la cantidad correcta considerando que del stock de antibióticos se agregan 1µl de antibiótico por cada 1ml de medio hasta que la temperatura del medio sea soportable con la mano.
6. Vaciar en las placas o cajas de Petri estériles (aproximadamente 25-30 ml por cada placa).

8.5 Preparación de Buffer TAE 10X

1. Componentes:

Tris base	48.4 gr
Ácido acético	11.42 mL
EDTA (0.5 M, pH 8)	20 mL

2. Preparación del EDTA (50 mL):

$$PM=372.2 \text{ gr}$$

$$M = \frac{n}{PM} = \frac{gr}{PM(V)} \quad \therefore \quad gr = PM * V * M$$

*PM: Peso molecular del EDTA; **n: peso; ***V: Volumen; ****M: Molaridad

$$\therefore gr = (372.2 \text{ gr}) (0.05 \text{ L}) (0.05)$$

gr = 9.305 gr de EDTA para 50 mL

3. Pesar los 9.305 gr de EDTA y se mezclar con 25 mL de H₂O destilada
4. Agregar 2 cristales de NaOH
5. Disolver y aforar a 50 mL, cuidando el pH.
6. Pesar el Tris base y se medir el Ácido acético.

7. Mezclar y agregar H₂O destilado y el EDTA.
8. Aforar a 1000 mL.

8.6 Preparación de cebadores (líoofilizados)

1. Centrifugar ambos tubos (Fw y Rv) a 14,000 rpm durante 5 minutos.
2. Se agregó H₂O inyectable (la cantidad indicada en el tubo).
3. Se prepararon diluciones 1:10, para una concentración final de 10 pM.

8.7 Composición de Buffers y soluciones

- ❖ Wash membrane buffer: Solución de lavado de membranas (Después de la adición de etanol)
 - Acetato de potasio de 10 mM (milimolar), pH 5,0
 - 80% de etanol
 - EDTA de 16,7 μM (micromolar); pH 8,0

Para preparar esta solución, agregue etanol al 95% a la solución de lavado de membrana suministrada (concentrada)

- ❖ Binding buffer: Solución de unión a membranas
 - Isotiocianato de guanidina 4.5 M (molar)
 - 0,5 M de acetato de potasio (pH 5,0)
- ❖ Solución de lisis celular (CLA):
 - 0,2 M (molar) de NaOH (Hidróxido de sodio)
 - SDS (Dodecilsulfato sódico) al 1%
- ❖ Solución de resuspensión celular (CRA):
 - Tris-HCl de 50 mM (pH 7,5)
 - EDTA de 10 mM
 - 100 μg/ml de ARNasa A

- ❖ Solución de neutralización (NSB):
 - Clorhidrato de guanidina 4,09 M.
 - Acetato de potasio 0,759 M.
 - Ácido acético glacial 2,12 M.

El pH final es de aproximadamente 4,2.

- ❖ Solución de lavado de columna (CWA):
 - Acetato de potasio 162,8 mM.
 - Tris-HCl 22,6 mM (pH 7,5).
 - EDTA 0,109 mM (pH 8,0).

- ❖ GoTaq® Green Master Mix PROMEGA:
 - La ADN polimerasa GoTaq® se suministra en tampón de reacción 2X Green GoTaq® (pH 8,5).
 - dATP (Desoxiadenosina trifosfato), 400 µM
 - dGTP (Desoxiguanosina trifosfato), 400 µM
 - dCTP (Desoxicitidina trifosfato), 400 µM
 - dTTP (Timidina trifosfato), 400 µM
 - MgCl₂ 3 mM.

El verde es un tampón de reacción GoTaq® patentado que contiene un compuesto que aumenta la densidad de la muestra y colorantes amarillos y azules, que funcionan como colorantes de carga cuando los productos de reacción se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa. El tinte azul migra a la misma velocidad que el ADN de fragmentos de 3-5 Kbp, y el colorante amarillo migra a una velocidad más rápida que los cebadores (<50 pb), en un gel de agarosa al 1%.

- ❖ Buffer de ligadura estándar, 10X. Jena Bioscience
 - Tris-HCl 500 mM, pH 7,8 a 25 °C
 - MgCl₂ 100 mM
 - DTT (Ditiotreitol) 100 mM
 - ATP (Adenosín Trifosfato) 10 mM
 - 25 mg/ml de BSA (Albúmina de suero bovino)

❖ Fast ligation Buffer, 2X. Jena Bioscience

- Tris-HCl 60 mM, pH 7.8 a 25 °C
- MgCl₂ 20 mM
- DTT 20 mM
- ATP 2 mM
- 10% de PEG (Polietilenglicol)

❖ Buffer Tango 1X

- Tris-acetato 33 mM (pH 7,9 a 37 °C)
- Acetato de magnesio 10 mM
- Acetato de potasio 66 mM
- 0,1 mg/ml de BSA

8.8 Secuencia completa del CDS del gen CcV1

GenBank: AJ632316.1

>AJ632316.1:c20468-20414,c20016-18638 *Cotesia congregata*
virus complete genome, segment Circle13

```
ATGTCGCTCGTCAAAAGTACGTTTGTGCTGCTCTCAGCTCTCCTGAGTCAATCATGTAC
GCAAGCTTATCCATATCAATACCAATGGGAAAGAATCCGAGATAATCCGTTTGCTGACG
TTGCTCGCCTTAGTCAACAGATCGATAATTCTTTACAAAATCAGATCCCTTAGCCGAG
AGAGTTATGCCACCAACAAACGACTTCGATGAATCTGATAAATACAATAGAGAATCTTT
CATGATTCCAAAGTCTTATTCCTGGGCACCTCCAAAGGGTCCTGCTTTTATGCGTCATC
CAATGCCTGACTATCATATCAGGCCTGAATACAGTACAAGACATAGAGCTCCCTTCACA
ACAAGACCTTTTGTAAAGACCTATTAGTGGATTATCCAGTGGAAGTAGCGGTATCGGTTCG
ACCTGGATCGATCGTTGCAAATGGAATATTTTCAGGACCTGGACGTTTCGTTGGGAATT
TGAAATTTACTCAACCTGAATTGTTTGACACATCCAGAACTCACCAGCATGAATATGAA
TCTGAAACATCTGAAAAACGCCACATTACCCGTGAAGATTTATTTTCTGAACTACATGC
TATTAAGAGGCACTTCAAAAACATAACATCTGCTGTCATTCGGATAGAAAATGAGATCA
GCTTTAAACTTTTACAACCTTACCACAACCTCCAGTTTTGATTGATCCTACCGTCGCA
TCTGACTCGCAACCCAAGGAACCCAACATAGAAGGAGTTACTTATCCAACCTTTTACAAC
CTCACCACAACCTCCAGTTTTGATTGATCCATTGTGGCATCTGACTTGCAACCCAAGG
AACCCAGTAAAGAAGGAGTTACTTATCCAACCTTTTACAACCTCACCACAACCTCCAGTT
```

TTGATTGATCCCATTTGTGGCATCTGACTTGCAACCCAAGGAACCCAGTAAAGAAGGAGT
TACTTATCCAACCTTTTACAACCTCACCACAACCTCCAGTTTTGATTGATCCCATTTGTGG
CATCTGACTTGCAACCCAAGGAACCCAGTAAAGAAGGAGTTACTTATCCAACCTTTTACA
ACCTCACCACAACCTCCAGTTTTGATTGATCCCATTTGTGGCATCTGACTTGCAACCCAA
GGAACCCAGTAAAGAAGGAGTTACTTATCCAACCTTTTACAACCTCAACACAACCTCCAG
TTCTGATTAATTCAGCAGAGCATCTGAACTGGGACCCATAGAAGCTAATAACGAAAAA
GGAGTTAATTATCCCCTGTGACAAGCTCAACAAAACCTCCAGTTTCGATTGATTCCAA
CATGGCATCTGAAATAAACTCAGTAGAGTCTACTTATGAAAGTATGTATAAAAATACTG
CTACAAATGAAGAGCCATTTGTTAATCGACTCCTAGAAAACACACTATCTAAAACCTCAT
TTCTCATCAATTTCTTAG

8.9 Secuencia de aminoácidos de CcV1

>lcl |ORF1

MSLVKSTFVLLSALLSQSCTQAYPYQYQWERIRDNPFADVARLSQQIDNSFTKSDPLAE
RVMPPTNDFDESDKYNRESFMIPKSYSWAPPKGPAPMRHPMPDYHIRPEYSTRHRAPFT
TRPFVVRPISGLSSGSSGIGRPGSIVANGIFSGPGRFVGNLKFTQPELFDTSRTHQHEYE
SETSEKRHITREDLFSSELHAIKEALQKLTSAVIRIENEISFKTFTTLPQPPVLIDPTVA
SDSQPKEPNIEGVITYPTFTTSPQPPVLIDPIVASDLQPKEPSKEGVITYPTFTTSPQPPV
LIDPIVASDLQPKEPSKEGVITYPTFTTSPQPPVLIDPIVASDLQPKEPSKEGVITYPTFT
TSPQPPVLIDPIVASDLQPKEPSKEGVITYPTFTTSTQPPVLINSSRASELGPIEANNEK
GVNYPTVTSSTKPPVSIDSNMASEINVESTYESMYKNTATNEEPFVNRLLENTLSKTH
FSSIS

8.10 Secuencia completa del vector pQE30

TCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCA
ATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAACATGAG
AGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGCATGCGAGCTCGGTACCCCGGGTTCGAC
CTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCT
CAGAACTCCATCTGGATTTGTTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGGCGTTTTTTATTGGT
GAGAATCCAAGCTAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAA
AAATCACTGGATATAACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAG
GCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGC
CTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTC

TTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTG
GTGATATGGGATAGTGTTACCCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTT
TTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATATTCGC
AAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTTATTGAGAAT
ATGTTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGC
CAATATGGACAACTTCTTCGCCCCCGTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCG
ACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTGAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTCCAT
GTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTA
ATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGGGTAATGACTCTCTAGCTTG
AGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTG
TTTGTCCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCCTCTAGAGCTGCCTCGCGCG
TTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTT
GTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGC
GGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTT
AACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACC
GCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTCCTCGCTCACTG
ACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTA
ATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA
GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCC
CCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGA
CTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGAC
CCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTC
ATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT
GTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGA
GTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTA
GCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCCTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGC
TACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAA
AAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTG
TTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT
TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTTGGTCATGAG
ATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTTAAATTA AAAATGAAGTTTTAAATCAA
TCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA
CCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTA
GATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAG

ACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAG
CGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGA
AGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAG
GCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGA
TCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCC
TCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCAC
TGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTAC
TCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTC
AATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAAC
GTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAA
CCCCTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTG
AGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTT
GAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTC
ATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCAC
ATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCT
ATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAC