







Obtención de proteínas recombinantes de *Neospora caninum* expresadas en *Escherichia coli*

Antonio J. Vallecillo¹  , Jaime E. Maldonado-Rivera  

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Cuenca, Cuenca. Ecuador

Obtaining recombinant proteins from *Neospora caninum* expressed in *Escherichia coli*

Introducción

Neosporosis es una enfermedad parasitaria con un impacto negativo en la reproducción bovina. En Ecuador se han reportado seroprevalencias del 22,3 y 23,4 % en hatos de producción lechera (Maldonado-Rivera *et al.*, 2020; Román-Cárdenas y Chávez-Valdivieso, 2016). El control de esta enfermedad requiere de la identificación de las hembras expuestas-infectadas, a fin de eliminarlas y con ellas el riesgo de transmisión vertical. Para el diagnóstico indirecto se han empleado varias proteínas antigénicas, entre las que destacan el antígeno de superficie 4 (SAG4 por sus siglas en Inglés) y el antígeno de gránulos densos 7

(GRA7 por sus siglas en Inglés), expresadas en *Escherichia coli* (*E. coli*) y usadas como antígeno de captura en ensayos de ELISA indirecto (Aguado-Martínez *et al.*, 2008). Sin embargo, en el país no se cuenta con la experiencia en la producción de este tipo de insumos necesarios para el desarrollo local de herramientas de diagnóstico indirecto, que en la actualidad deben ser importadas con un alto costo, limitando su disponibilidad para el control de la Neosporosis bovina. Por ello, se planteó producir las proteínas rNcSAG4 y rNcGRA7 para su uso en el desarrollo de ensayos inmunodiagnósticos.

Palabras clave: Neosporosis, ELISA, proteínas antigénicas

Materiales y Métodos

Las secuencias codificantes de NcSAG4 y NcGRA7 fueron amplificadas por PCR a partir de gDNA (Donado por el Dr. Dadin Prando Moore) de una cepa de *Neospora caninum* (*N. caninum*), clonadas en el vector de expresión pET15b. Las construcciones fueron introducidas en la cepa Rosetta 2 (DE3), para la selección de las clonas se usó agar LB-Miller con 1 % de Glucosa, 34 µg/ml de Cloranfenicol y 100 µg/ml de Carbenicilina. Para la expresión de las proteínas, las cepas recombinantes fueron cultivadas en agitación constante (200 r.p.m.) a 37°C durante 3h en caldo LB-Miller con 100 µg/ml de Carbenicilina e inducidas por 5 h con una concentración final de 100 µM de IPTG. La biomasa inducida fue colectada por centrifugación y congelada a - 80°C hasta su procesamiento. Posteriormente se procedió a la lisis por sonicación

previo tratamiento con Lisozima (5 ml/g de biomasa, peso húmedo con 1 mg/ml de Lisozima), el lisado obtenido fue centrifugado a 20 000 x g, por 10 min a 4°C para obtener la fracción soluble e insoluble. La fracción con la proteína recombinante fue sometida a purificación por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC por sus siglas en Inglés) con el uso de la resina HisPur™ Ni-NTA Superflow Agarose, las fracciones con las proteínas recombinantes fueron dializadas para eliminar el Imidazol y la Urea. La cantidad de proteína obtenida fue estimada mediante análisis densitométrico (Biorad Gel Doc XR+ Imaging System y Image Lab software versión 5.2.1 con el uso de una curva de calibración de Albúmina sérica bovina fracción V.

¹ Autor para la correspondencia: E-mail: antonio.vallecillo@ucuenca.edu.ec



Resultados y Discusión

Para ambos casos (Figura 1), fue posible expresar las proteínas rNcSAG4 y rNcGRA7 en *E. coli*, la proteína rNcSAG4 se recuperó de la fracción insoluble, por lo que fue necesario purificarla en condiciones desnaturalizantes y dializarse en soluciones con concentraciones decrecientes de Urea hasta eliminarla por completo, como fue previamente descrito (Fernández-García *et al.*, 2006). Para el caso de rNcGRA7, la proteína fue recuperada de la fracción soluble, manera similar a lo reportado (Álvarez-García *et al.*, 2007). Una vez dializadas las fracciones eluidas de ambas proteínas, estas fueron resueltas en SDS-PAGE, en donde se observó la presencia de proteínas contaminantes de alto y bajo peso molecular, por lo que se deberá modificar la composición de las soluciones de lavado de la IMAC para eliminarlos y contar con proteínas de mayor pureza a fin de evaluar su utilidad como antígenos de captura en ensayos de ELISA indirecto *in house*, adaptando a las condiciones locales lo descrito por Aguado-Martínez y colaboradores (2008). Finalmente, al estimar la cantidad de las proteínas purificadas por volumen de cultivo, se observó mayor rendimiento de la rNcSAG4 en contraste a lo obtenido para rNcGRA7.

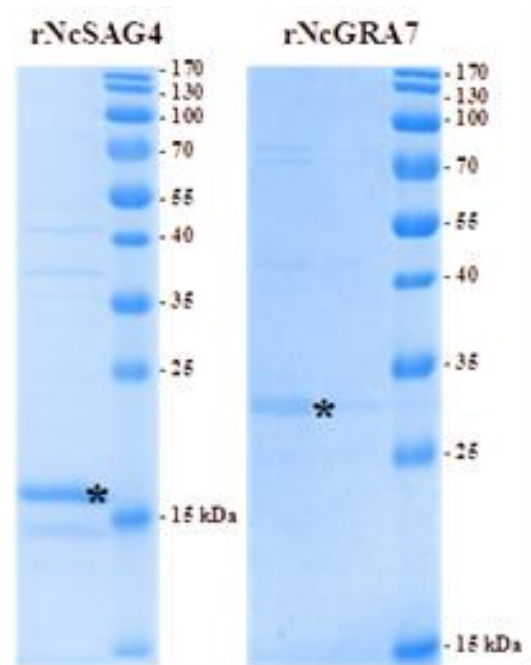


Figura 1. Proteínas rNcSAG4 y NcGRA7. Imagen de las fracciones dializadas de la purificación IMAC con las proteínas rNcSAG4 ($\pm 19,5$ kDa) y rNcGRA7 ($\pm 33,0$ kDa) resueltas en SDS-PAGE y teñidas con azul de Coomassie G-250. * Proteínas con los tamaños esperados.

Conclusiones

Se logró la expresión de ambas proteínas recombinantes de *N. caninum* en *E. coli*, para el caso de

rNcSAG4 se obtuvo con mayor rendimiento volumétrico en comparación al conseguido con rNcGRA7.

Literatura Citada

- Aguado-Martínez, A., G. Álvarez-García, A. Fernández-García, V. Risco-Castillo, I. Arnaiz-Seco, X. Rebordosa-Trigueros, V. Navarro-Lozano y L. M. Ortega-Mora. 2008. Usefulness of rNcGRA7 and rNcSAG4-based ELISA tests for distinguishing primo-infection, recrudescence, and chronic bovine neosporosis. *Vet Parasitol*, 157(3-4):182-195. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.002>
- Álvarez-García, G., A. Pitarch, A. Zaballos, A. Fernández-García, C. Gil, M. Gómez-Bautista, A. Aguado-Martínez y L. M. Ortega-Mora. 2007. The NcGRA7 gene encodes the immunodominant 17 kDa antigen of *Neospora caninum*. *Parasitology*, 134(Pt 1):41-50. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001284>
- Fernández-García, A., V. Risco-Castillo, A. Zaballos, G. Álvarez-García y L. M. Ortega-Mora. 2006. Identification and molecular cloning of the *Neospora caninum* SAG4 gene specifically expressed at bradyzoite stage. *Mol Biochem Parasitol*, 146(1):89-97. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.019>
- Maldonado-Rivera, J. E., A. J. Vallecillo, C. L. Pérez, K. M. Cirone, M. A. Dorsch, E. L. Morrell, V. Scioli, Y. P. Hecker, F. Fiorani, G. J. Cantón y D. P. Moore. 2020. Bovine neosporosis in dairy cattle from the southern highlands of Ecuador. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, 20:100377. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100377>
- Román-Cárdenas, F. y R. Chávez-Valdivieso. 2016. Prevalencia de enfermedades que afectan la reproducción en ganado bovino lechero del cantón Loja. CEDAMAZ, 6:83-90. <http://192.188.49.30/index.php/cedamaz/article/view/65/64>