



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA**

Producción de ADN polimerasa I 'Bsu' y la proteína de unión a hebra simple 'gp32' como componentes para una reacción de amplificación isotérmica RPA

**Tesis para optar el título de Licenciado en Biología**

Lucero Nancy Mascaro Rivera

Asesor

Dr. Daniel Guerra Giraldez

Co-asesora

PhD. Mónica Pajuelo Travezaño

Lima-Perú

2023

*Dedicado a los que perdimos  
durante los años de pandemia*

## **Agradecimientos**

Me gustara agradecer a mis asesores, el Dr. Daniel Guerra y la Dra. Mónica Pajuelo, quienes me estuvieron apoyando y guiando durante el transcurso y desarrollo del proyecto. Gracias.

En segundo lugar, quisiera agradecer a los miembros de los grupos de investigación por el apoyo, la enseñanza y los consejos. Estaré siempre agradecida con el laboratorio de Moléculas individuales y laboratorio de Microbiología Molecular, en especial con Lucero Merino, Keren Espinoza, Pamela Obando, Anderson Castilla y Nicolas Arias.

Entercer lugar, quisiera agradecer al Dr. Fernán Federici y el Dr. César Ramirez y a sus miembros del grupo de investigación. Así mismo, agradezco el grupo ReClone por la donación y los consejos.

Quisiera agradecer a mis padres y familia por la comprensión y paciencia en el trabajo de investigación. También quisiera agradecer a mis amigas y amigos de la universidad por el inmenso apoyo y respaldo que me han dado, Lucero Merino, Stefany Quiñonez, Angela Ríos, Luis Gonzalez, Leo Hostos, David Castañeda y Neiza Vargas.

Este trabajo fue financiado por el CONCYTEC-PROCIENCIA en el marco de la convocatoria E041-2020-04 – Contrato N° 170-2020.

¡Gracias a todos!

# Producción de ADN polimerasa I 'Bsu' y la proteína de unión a hebra simple 'gp32' como componentes para una reacción de amplificación isotérmica RPA

## INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>7</b> %	<b>6</b> %	<b>3</b> %	<b>1</b> %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>patents.google.com</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>2</b>	<b>hdl.handle.net</b> Fuente de Internet	<b>1</b> %
<b>3</b>	<b>elifesciences.org</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>4</b>	<b>www.jove.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>5</b>	<b>Submitted to UTEC Universidad de Ingeniería &amp; Tecnología</b> Trabajo del estudiante	<b>&lt;1</b> %
<b>6</b>	<b>www.biorxiv.org</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>7</b>	<b>repositorioinstitucional.uabc.mx</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %
<b>8</b>	<b>www.elpisbio.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1</b> %

# Tabla de contenido

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
1.1. HERRAMIENTAS DE DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	3
1.2. BUSCANDO ALTERNATIVAS AL PCR .....	4
1.3. LA REACCIÓN ISOTÉRMICA RPA.....	4
1.3.1. <i>ADN polimerasa I de Bacillus subtilis (Bsu)</i> .....	7
1.3.2. <i>Proteína de unión a hebra simple: T4 gp32</i> .....	8
1.4. TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE .....	7
2. OBJETIVOS E IMPORTANCIA.....	11
2.1. OBJETIVO GENERAL: .....	11
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	11
3. METODOLOGÍA.....	11
3.1. SECUENCIAS DEL VECTOR DE EXPRESIÓN Y ENZIMAS .....	11
3.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS .....	12
3.2.1. <i>Condiciones de inducción de cultivo</i> .....	14
3.2.2. <i>Producción de proteínas a mediana escala</i> .....	15
3.2.3. <i>Purificación de proteínas</i> .....	16
3.3. ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS .....	18
3.3.1. <i>ADN polimerasa I Bsu</i> .....	18
3.3.2. <i>Proteína de unión a hebra simple, gp32</i> .....	19
4. RESULTADOS .....	22

<b>4.1.</b>	<b>PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1.1.</b>	<b><i>Producción de ADN polimerasa I Bsu</i></b> .....	<b>23</b>
<b>4.1.2.</b>	<b><i>Producción de Gp32</i></b> .....	<b>24</b>
<b>4.2.</b>	<b>ACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2.1.</b>	<b><i>Actividad de Polimerización de la ADN polimerasa I Bsu</i></b> .....	<b>26</b>
<b>4.2.2.</b>	<b><i>Ausencia de inhibidores de amplificación</i></b> .....	<b>28</b>
<b>4.2.3.</b>	<b><i>Actividad de unión a ssDNA por Gp32</i></b> .....	<b>29</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>43</b>

## Resumen

Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), detectan el material genético de microorganismos. Tienen un rol crucial para el avance de la biología molecular, diagnóstico y estudio de agentes infecciosos. Al afianzarlas, los estudios epidemiológicos locales y nacionales conducirán al desarrollo de estrategias de salud pública. La pandemia del COVID-19 ha demostrado la importancia de potenciar la producción local de técnicas de bajo costo e implementarlas en zonas de difícil acceso y bajos recursos. Las reacciones isotérmicas son alternativas que podrían cubrir esas necesidades locales, entre ellas está la reacción RPA (*recombinase polymerase amplification*). El RPA es más rápido, menos costoso y requiere de equipamiento más sencillo en comparación con el PCR.

El objetivo de este estudio fue producir dos proteínas recombinantes que forman parte del RPA, la ADN polimerasa *Bsu* y la gp32; y evaluar la actividad de cada proteína de forma independiente. Se evaluaron las condiciones de tiempo y temperatura para inducción, después se purificaron por cromatografía de afinidad a níquel. Se produjo 1.13 mg de polimerasa *Bsu* y 32 mg de gp32. La producción de la polimerasa no arrastró inhibidores de RPA y la actividad fue de 4.92 U/uL, cercano a la actividad de la polimerasa *Bsu* comercializada (5 U/uL). Se midió la unión a ADN hebra simple de la gp32 como la disminución de fluorescencia intrínseca de la proteína. La gp32 producida tuvo una actividad ~93% similar a la distribuida comercialmente.

**Palabras claves:** ADN polimerasa *Bsu*, gp32, producción enzimas recombinantes, polimerización, unión hebra simple.

## **Abstract**

Nucleic acids amplification assays as PCR (polymerase chain reaction), detect genes from microorganisms. These techniques have a crucial role on molecular biology, diagnosis and study of infectious agents. Innovations and growth of this area helps local and national epidemiological studies to improve strategies to secure public health. The COVID-19 pandemic has shown us the importance to boost up the local production of low-cost detection techniques and implement them in remote and low-income regions. The RPA (*recombinase polymerase amplification*) is an isothermal amplification technique that could aid to satisfy local necessities because it is faster, less expensive and it requires simple equipment in comparison to PCR.

The objective of this study was to efficiently produce two recombinant proteins that are part of the RPA reaction: *Bsu* DNA polymerase and the single stranded binding protein, gp32. Furthermore, each protein specific activity was calculated. The protein expression parameters of time and temperature induction were factors evaluated and improved, then the proteins were purified by affinity chromatography using a nickel column. It was produced 1.13 mg of *Bsu* DNA polymerase and 32 mg of protein gp32. Polymerase purification didn't drag RPA inhibitors and the activity of 0.027 ug polymerase was equal to 4.92 U, almost as the commercial *Bsu* DNA polymerase activity, which is presented at a concentration of 5U/uL. The binding to single stranded DNA by gp32 protein was registered by the reduction of the intrinsic fluorescence of the protein. Protein gp32 locally produced had an activity ~93% identical to the commercial gp32.

**Keywords:** *Bsu* DNA polymerase, gp32, recombinant protein production, polymerization, single stranded DNA binding.



## **1. Introducción**

### **1.1. Herramientas de detección de ácidos nucleicos**

La amplificación de ácidos nucleicos es el principio detrás de diversas técnicas para la detección de microorganismos y el diagnóstico y tratamiento contra infecciones (Li et al., 2019). En el contexto de la pandemia del COVID-19, las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos -llamadas comúnmente pruebas moleculares- constituyen herramientas importantes dentro de las estrategias de salud pública. El detectar el material genético del virus SARS-Cov-2, durante la infección activa dentro de una población, permite planear estrategias para el control y reducción de la transmisión del virus en dicha región (Grassly et al., 2020; Vandenberg et al., 2021).

En los inicios de la pandemia del COVID-19 se percibió un aumento drástico en la demanda mundial de productos de laboratorio y de equipo médico; incluyendo reactivos y kits de detección por parte de gobiernos y grupos de investigación de diferentes países (Bradley, J., 2020; Jayamohan et al., 2021; Vandenberg et al., 2021). En consecuencia, temporalmente las fábricas no pudieron cubrir tal demanda, lo que ocasionó escasez de reactivos que impidieron el realizar pruebas, viéndose afectados principalmente los países que importan estos productos (Jayamohan et al., 2021; Vandenberg et al., 2021). Por esta razón algunos grupos de investigación, por ejemplo, como el del Dr. Moratorio en Uruguay, empezaron a producir pruebas moleculares de forma local, ayudando a la respuesta nacional contra la pandemia (Cyranoski, D. et al., 2020).

El Perú es un país vulnerable debido a la gran diversidad de su terreno – el cual dificulta la accesibilidad en algunas regiones-, el gran número de brotes como el del dengue o zika, así como la gran dependencia de la manufactura internacional para el acceso a pruebas moleculares. Estas razones demuestran la importancia de invertir en la capacidad local para producir dispositivos de detección, así como investigar en el desarrollo de nuevos métodos que cubran las necesidades de cada región. En definitiva, la autosuficiencia biotecnológica contribuiría a asegurar una pronta respuesta a brotes infecciosos.

## **1.2. Buscando alternativas al PCR**

Las reacciones de amplificación más conocidas y usadas para la detección de infecciones son las de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y sus variantes, como la PCR a tiempo real (qPCR). Estas reacciones presentan la necesidad de equipamiento sofisticado que no está al alcance de laboratorios en regiones de bajos recursos, como por ejemplo, un termociclador para programar un gradiente de temperatura. Otras limitaciones provienen de la complejidad del proceso, que puede requerir estandarizaciones en cada sitio de aplicación según -por ejemplo- el modelo de termociclador disponible, y posibles largas esperas hasta la detección deseada (Jayamohan et al., 2021; Li et al., 2019). Estas limitaciones impiden y/o retrasan el acceso de esta técnica para que sea usado como parte del proceso de diagnóstico de enfermedades en regiones aisladas o más alejadas de las ciudades.

Por otro lado, el gran número de mecanismos naturales de manipulación de ácidos nucleicos y la actual flexibilidad en técnicas moleculares ha permitido la implementación de nuevas estrategias de amplificación que superarían las limitaciones del PCR. Entre las nuevas estrategias de la amplificación se encuentran las amplificaciones isotérmicas como la reacción de RPA (*recombinase polymerase amplification*) (Li et al., 2019; Piepenburg et al., 2006). Este tipo de reacciones se desarrolla a una misma temperatura, lo cual superaría la necesidad de un termociclador para ser reemplazado por un equipo con una sola temperatura, el cual es más asequible. Asimismo, como todos los procesos se realizan bajo la misma temperatura, las reacciones intermedias diferentes se desarrollan simultáneamente, por lo que la amplificación de secuencias ocurre más rápido (Li et al., 2019).

## **1.3. La reacción isotérmica RPA**

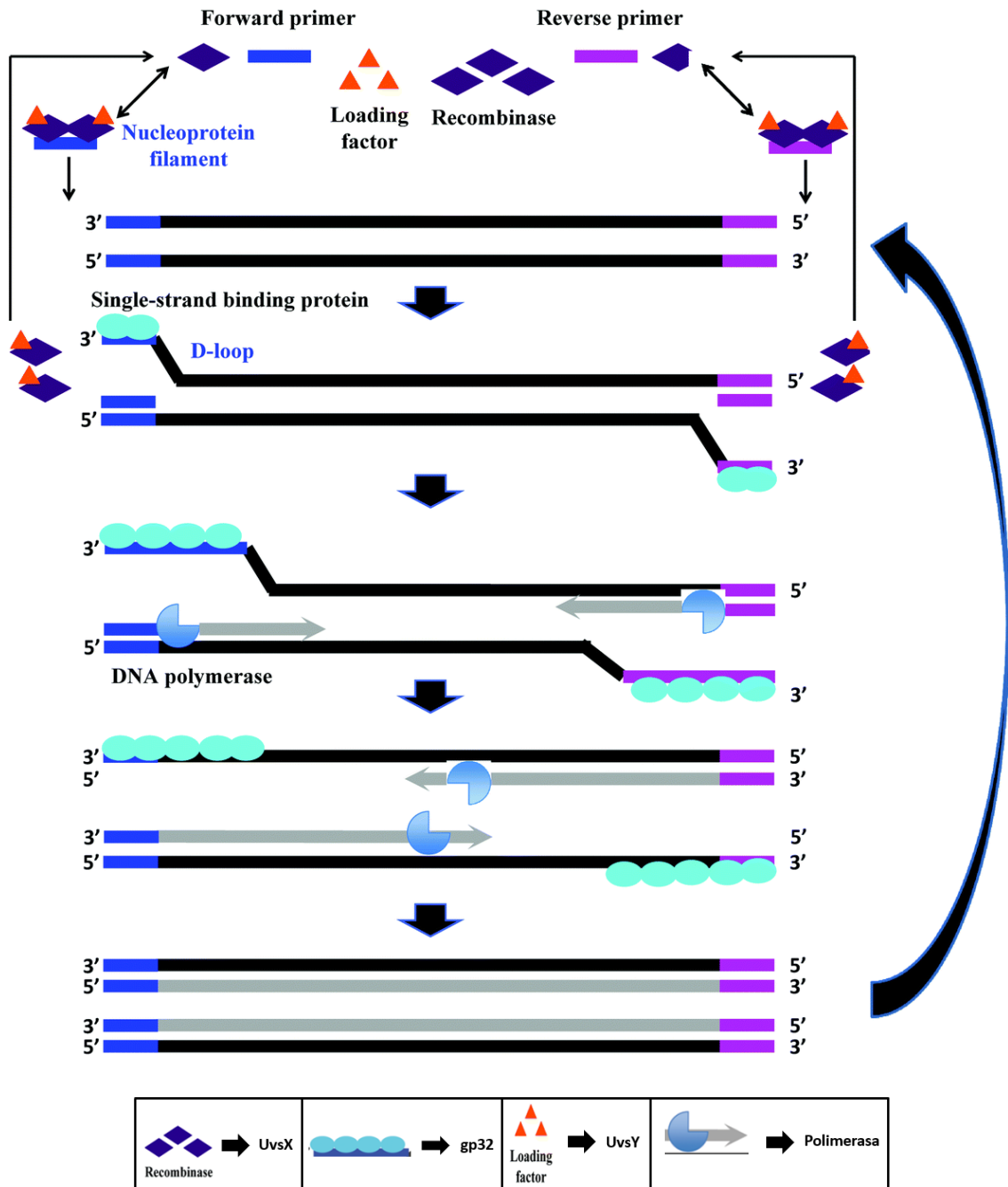
La reacción de RPA fue introducida en el 2006 por el grupo de Niall Armes (Piepenburg et al., 2006), y está basado en el mecanismo de recombinación homóloga, proceso clave para la replicación y reparación del ADN, seguido por la polimerización de las secuencias de interés. Este grupo usó las proteínas encargadas de la recombinación homóloga del bacteriófago T4, un modelo de estudio para este proceso. Las proteínas fueron la *UvsX* - una recombinasa-, la *UvsY* – un intermediario para la actividad de la *UvsX*-, y la *gp32* -

una proteína de unión a hebra simple. Para la polimerización, se usó el ADN polimerasa I de *Bacillus subtilis* (Bsu) (Li et al., 2019; Piepenburg et al., 2006).

En la primera parte de la reacción, la recombinación homóloga, un complejo nucleoproteico (ADN de hebra simple + proteínas) busca y reconoce una secuencia homóloga a la secuencia que posee (Ito et al., 2020; Liu & Morrical, 2010). Posterior al reconocimiento, el complejo invade la hebra complementaria, forma una horquilla (o *D-loop*) al separar la doble cadena de ADN para permitir el acceso de la polimerasa, y usa el ADN del complejo como cebador para empezar la polimerización (Ito et al., 2020; Li et al., 2019; Liu & Morrical, 2010).

La proteína gp32 se une con gran afinidad a secuencias no específicas de hebra simple (ssDNA o *single stranded DNA*, en inglés) por lo que se une a los cebadores de la reacción. A este complejo se le une la uvsY, el cual facilita la afinidad del uvsX a la ssDNA mientras que reemplaza a la gp32 en el complejo. Los cebadores son los que confieren la especificidad de la reacción de RPA; como parte del complejo, la uvsX busca una secuencia complementaria a la del cebador en el ADN (de doble hebra) de la 'muestra'. Una vez encontrada, el complejo separa la doble cadena y se intercala entre ellas. La horquilla que se forma permite el acceso a la hebra complementaria, la cual se polimeriza con el cebador; y a la hebra no complementaria, a la cual se le une las proteínas gp32 para estabilizar la horquilla y mantener las cadenas separadas mientras avanza la polimerización (Ito et al., 2020; Li et al., 2019; Liu & Morrical, 2010; Piepenburg et al., 2006) (**Figura1**).

En la reacción de RPA, la apertura de la doble hebra de ADN y el mantenerlo estable en este estado es el rol de las proteínas y no de una temperatura de desnaturalización, como en el caso del PCR. Esta característica permite que la reacción se independice de los ciclos de cambios de temperatura para la apertura de la hebra y la función de las proteínas. Mientras las proteínas se liberan con el paso del proceso, estas son reclutadas para formar un nuevo complejo nucleoproteico y empezar el proceso con otra hebra de ADN dentro de la misma muestra (Li et al., 2019). De esta manera, la reacción de RPA amplifica secuencias de entre 80-500 bp, a una misma temperatura entre 37-42°C, en un tiempo de 20-30 minutos (Li et al., 2019; Piepenburg et al., 2006).



**Figura1. Mecanismo de RPA.** Se observa la polimerización de una secuencia de interés flanqueada en los extremos por cebadores (*primers*) que confieren especificidad al complejo nucleoproteico de uvsX-uvsY-cebadores. Dicho complejo invade y abre la doble hebra formando una horquilla (*D-loop*) estabilizada por la proteína gp32. Previo al proceso observado en la imagen, la reacción presenta reacciones intermedias en donde se estabiliza el complejo nucleoproteico, interviniendo las proteínas gp32, uvsX y uvsY (Li et al., 2019; Piepenburg et al., 2006).

En una prueba de RT-RPA para detectar SARS-CoV-2, se calculó que la especificidad de fue de 100% (90-100, 95% CI) y la sensibilidad fue de 98.7% (93.1-99.9, 95%) (Lau et al., 2021). En otro estudio se comparó PCR y RPA para detectar *Fasciola hepatica* en heces humanas. La especificidad de ambas pruebas fue de 100%, mientras que la sensibilidad fue de 87.8% y 65.9% para RPA y PCR, respectivamente (Cabada et al., 2017). Por lo que el RPA tiene la capacidad de tener mayor sensibilidad que el PCR.

### **1.3.1. ADN polimerasa I de *Bacillus subtilis* (Bsu)**

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva altamente estudiado por sus aplicaciones en agricultura, medicina e industria para la producción de enzimas; este último debido a su gran actividad de polimerización (Okazaki & Kornberg, 1964; Su et al., 2020). Este organismo presenta 3 tipos de ADN polimerasas: la I, II y III (Gass & Cozzarelli, 1973). La ADN polimerasa I (mencionado en este documento como *Bsu*) fue purificada por primera vez por el grupo del Dr. Okazaki y Dr. Kornberg en 1963 desde un extracto de la cepa wild type SB19 (Okazaki & Kornberg, 1964), y es codificada por el gen *polA* (Gass & Cozzarelli, 1973; Lapidus et al., 1997; Perego et al., 1987) (Figura 2).

Las actividades principales de la polimerasa *Bsu* son la reparación de ADN, recombinación y polimerización (Gass & Cozzarelli, 1973; Okazaki & Kornberg, 1964). La *Bsu* mantiene su actividad en un rango de temperatura 37-50°C, por lo que suele usarse a 37°C. Su actividad es óptima en buffers con altas concentraciones de sales, por ejemplo, entre el rango 250-350 mM de KCl. La *Bsu* no es inhibida por hebras simples de ADN y, a diferencia de las otras polimerasas del *Bacillus subtilis*, la ADN polimerasa I es más resistente a sulfhidrilos como al  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) o al ditioneitol (DTT), reactivos presentes en los buffers de purificación de enzimas (Gass & Cozzarelli, 1973).

La polimerasa *Bsu* también tiene una actividad nativa de invasión a doble hebra (en inglés "strand displacement"), lo que le hizo ser candidata como polimerasa de reacciones isotérmicas (Milligan et al., 2018; Piepenburg et al., 2006). La *Bsu* comienza a polimerizar una hebra a medida que avanza y separa la doble hebra sin necesidad de una gradiente de temperatura. Es así que fue usada en 2006 por el Dr. Armes para la reacción de RPA (Piepenburg et al., 2006).

### 1.3.2. Proteína de unión a hebra simple: T4 gp32

La proteína del *gen32* o T4 gp32 es una proteína de unión a hebra simple (ssDNA) que forma parte de la maquinaria de replicación, reparación y recombinación del bacteriófago T4 (Blevins et al., 2021). Fue obtenida en 1970 por el grupo de Bruce Alberts y Linda Frey desde un cultivo de *E. coli* infectado con una variante del bacteriófago T4 que no expresaba lisozima (Alberts, Bruce M. & Frey, Linda, 1970; Blevins et al., 2021). Como proteína de unión a hebra simple, protege a hebras simples de nucleasas y ayuda a estabilizar el complejo formado durante la replicación y recombinación (Blevins et al., 2021; Jordan & Morrical, 2015).

La estructura de la gp32 se divide en 3 partes: subdominio I, subdominio II y el centro (Pant et al., 2018; Shamoo, Y. et al., 1995). En el subdominio I se encuentra el extremo C-terminal. Esta región es la encargada de interactuar con otras proteínas, diferentes a gp32, para las diferentes funciones que cumple. Así mismo, la gp32 pasa por un cambio conformacional a una forma 'abierta' para formar el complejo gp32-ssDNA, siendo el extremo C-terminal el que libera la zona de unión a ssDNA (Blevins et al., 2021; Pant et al., 2018; Weitzel et al., 2015). En el subdominio II se encuentra el extremo N-terminal. Esta región es la encargada de interactuar con otras proteínas de gp32 para una unión cooperativa. Lo último significa que mientras va aumentando el número de unidades de proteínas en el complejo, aumenta también la afinidad hacia proteínas gp32 libres y la estabilidad del complejo mismo (Pant et al., 2018; Weitzel et al., 2015). El centro es la región de la proteína que une a los dos subdominios ya mencionados. Además, es la zona de la gp32 que se libera (al desplazarse el C-terminal) y se une con el ssDNA (Shamoo, Y. et al., 1995) (Figura 3).

La gp32 se une a hebras simples de ADN y ARN, siendo más afín a las hebras de ADN (ssDNA) (Newport et al., 1981). Cada unidad de gp32 se une a 7 nucleótidos (nt) independientemente de la secuencia y esta unión es cooperativa cuando el tamaño de la hebra disponible es >7 nt (Jose et al., 2015; Lee et al., 2016). El complejo núcleo-proteico que se forma es transitorio y la estabilidad aumenta según el tamaño de la hebra que se une ya que se van agregando más unidades de gp32, adyacentes entre ellos (Lee et al., 2016; Weitzel et al., 2015).

La gp32 mantiene su actividad óptima en un rango de 37-48°C, siendo desnaturizada de 50 a 55°C (Zhang & Tanner, 2017). Su temperatura de actividad la hace compatible con la reacción RPA (Li et al., 2019; Piepenburg et al., 2006).



**Figura2. ADN polimerasa I de *Bacillus subtilis*.** Estructura de la polimerasa generada por predicción y homología de secuencias. Uniprot: O34996 · DPO1\_BACSU.



**Figura3. Estructura de la proteína Gp32 del bacteriófago T4.** Sección central de la gp32 une a dominios I y II y es la encargada de unirse al ssDNA. En verde fluorescente se ha resaltado los triptófanos de la región. PDB: 1GPC.

#### **1.4. Tecnología de proteínas recombinantes**

El método más común para producir proteínas en gran cantidad involucra la sobreexpresión a través de la tecnología de ADN recombinante. Esta consiste en la inserción de la secuencia de ADN de la proteína interés en un vector de expresión para su producción usando la maquinaria de un organismo diferente (Rosano & Ceccarelli, 2014).

La primera elección es el hospedero del vector para la producción de las proteínas deseadas. El sistema más estudiado y usado para expresar proteínas son las bacterias

*Escherichia coli*. Hay varios tipos de *E. coli* cuyos genomas han sido modificados para otorgarles características que mejoren la sobreexpresión de proteínas heterólogas, así como la compatibilidad con los vectores de expresión, entre ellos se encuentran los *E. coli* BL21, *E. coli* BLR y sus variantes con el sistema (DE3) (Daegelen et al., 2009; Goffin & Dehottay, 2017; Rosano & Ceccarelli, 2014; Studier & Moffatt, 1986).

Para escoger un vector de expresión se tiene que considerar varios componentes, entre ellos, un origen de replicación compatible con la célula hospedera que conduzca a un número de copias adecuado, el tipo de promotor que conduzca a una expresión adecuada, un marcador de selección que permita asegurar la preservación del vector en la célula, y el posible uso de una etiqueta de afinidad fusionada a la proteína de interés para facilitar su purificación (Rosano & Ceccarelli, 2014; Shilling et al., 2020).

Los vectores pET28a(+) tienen un origen de replicación pBR322 (o pMB1), el cual presenta una estructura similar al ColE1, de *E. coli*. Es un ori de 'baja o media copia', 15-20 copias (Shilling et al., 2020). Tienen promotor T7, por lo tanto, el gen de interés no será transcrito por la maquinaria nativa de *E. coli*, sino por la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (T7RNAP) (Studier & Moffatt, 1986). El gen de esta polimerasa se encuentra codificado en el inserto DE3, presente en las cepas de producción *E. coli* BL21(DE3) y BLR(DE3). El operador *lac* (*lacO*), está presente en el inserto DE3, controlando la expresión de T7RNAP. Además, los vectores pET también poseen el operador *lacO* controlando la expresión del gen de interés. Esta doble represión permite el control del momento de la expresión del gen de interés al agregar a un cultivo un análogo de alolactosa, el inductor isopropil  $\beta$ -d-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Al agregar el inductor IPTG, este empieza la cascada de expresión de T7 ARN polimerasa por la bacteria y su posterior unión a su promotor T7 presente en el vector pET28a(+). El IPTG tiene afinidad con el represor *lacI*, por lo que, al agregarlo al cultivo, se unen y queda liberada la secuencia *lacO*, permitiendo la actividad del promotor *lac* y expresando la T7 ARN polimerasa por la BL21(DE3). La adición de IPTG también libera la *lacO* del vector pET28a(+), permitiendo la actividad de la T7 ARN polimerasa con el promotor T7 y expresando la secuencia de interés.



## 2. Objetivos e importancia

Este estudio busca expresar y purificar dos proteínas involucradas en la reacción RPA, la ADN polimerasa I *Bsu* y la gp32. Se realizó el proceso de purificación para medir la concentración y pureza de la Bsu y la gp32; asimismo, se evaluó la actividad de polimerización y de unión a hebra simple, respectivamente.

El estudiar la actividad de cada proteína de forma independiente permite cuantificar el rendimiento real de cada parte del proceso. Además, la información de actividad específica permitirá al potencial usuario el realizar ajustes en función de la actividad total, de manera semejante a lo que se realiza con proteínas activas disponibles en el mercado.

De esta manera se busca elaborar un protocolo para la obtención de proteínas que realicen la reacción RPA a nivel de laboratorio, evaluar su actividad y que dicho protocolo sea accesible para que sea implementado por cualquier laboratorio.

### 2.1. Objetivo general:

- Producir las proteínas recombinantes de la polimerasa Bsu y la proteína gp32 y evaluar sus actividades individualmente para que RPA sea más accesibles a laboratorios de diagnóstico

### 2.2. Objetivos específicos

- Expresar y purificar la ADN polimerasa I '*Bsu*' y la proteína 'gp32'.
- Caracterizar la actividad de polimerización de la ADN polimerasa I '*Bsu*' producida
- Caracterizar la actividad de unión a hebra simple de ADN de la 'gp32' producida

## 3. Metodología

### 3.1. Secuencias del vector de expresión y enzimas

Las secuencias codificando las proteínas están insertadas en vectores pET28a(+) y se encuentran disponibles en un repositorio en línea de acceso libre que forma parte de la organización ReClone (<https://reclone.org>) y Open Bioeconomy Lab

(<https://openbioeconomy.org>), Las secuencias no tienen patentes en la región de Latinoamérica o estas expiraron.

La secuencia de la ADN polimerasa *Bsu* tiene una etiqueta de afinidad de 6 histidinas (6xHis) en el extremo N-terminal. El plásmido que lo contiene tiene un total de 6997 bp (Figura 4). La secuencia de la proteína representa al *Bsu Large fragment*, el cual no contiene el dominio de 5'→3' exonucleasa de la proteína original. La secuencia que expresa la polimerasa contiene 1755 bp, lo que equivale a 585 aminoácidos y 66.1 kDa. La secuencia de la proteína gp32 tiene una etiqueta de afinidad de 6 histidinas (6xHis) en el extremo C-terminal. El plásmido que lo contiene tiene un total de 6121 bp (Figura5). La secuencia codante de la proteína contiene 903 bp y la proteína equivaldría a ~34 kDa.

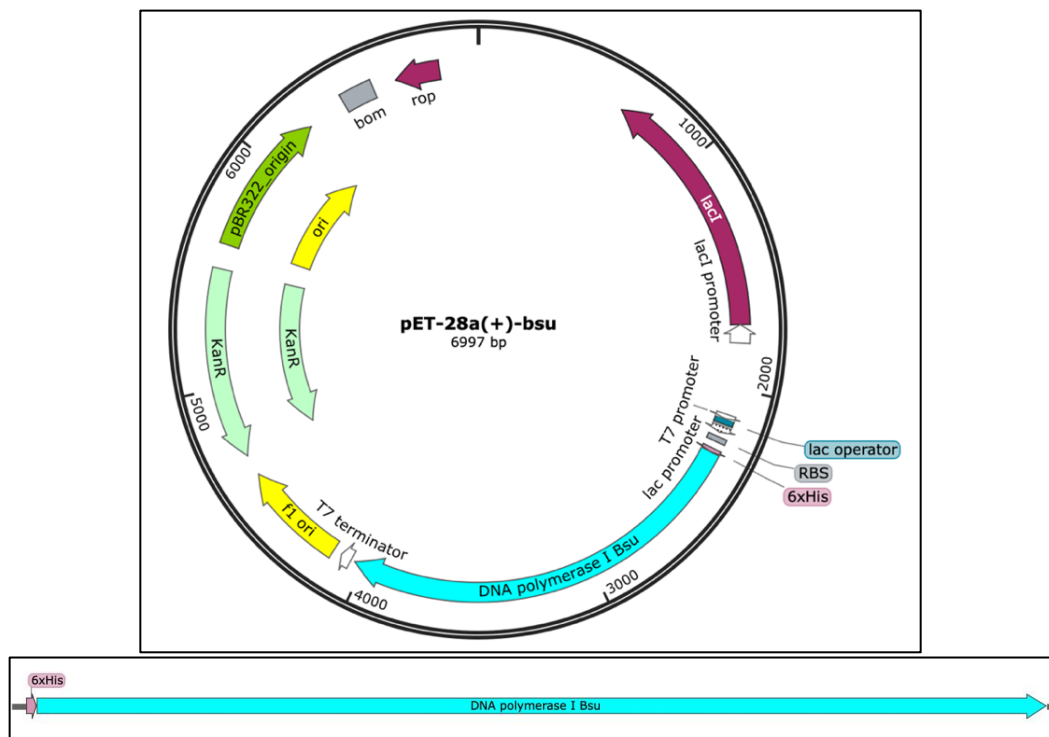
Los plásmidos fueron generosamente entregados en bacterias *E. coli* TOP10 y enviadas por nuestro colaborador de Chile, el Dr. Fernán Federici. Estas bacterias fueron reactivadas en placas de LB agar suplementado con 0.05 mg/mL de kanamicina (Kan). Se inoculó una colonia de la placa en 10 mL de medio LB + 0.05 mg/mL kan y se incubó a 37°C, 220 rpm por toda una noche. Luego se extrajo el plásmido usando el kit GeneJet Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.2. Producción de proteínas

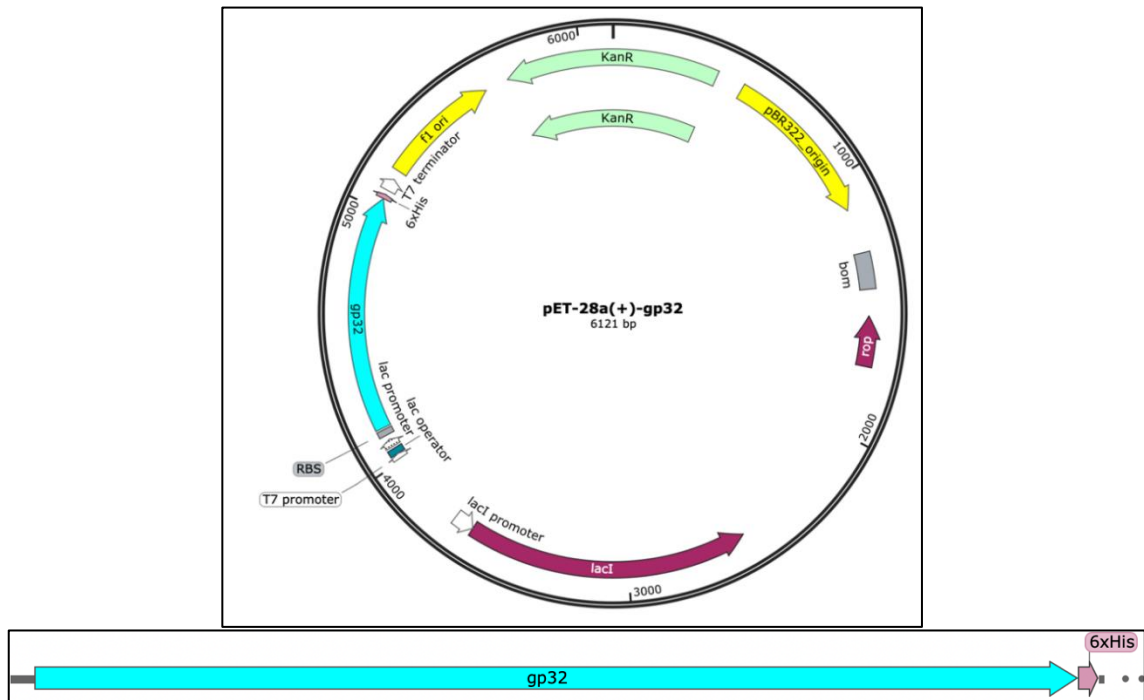
Un cultivo de bacterias BL21(DE3) quimicompetentes, bacterias con membrana permeable para ingreso de plásmido, fue transformado para cada vector de expresión de los dos genes de interés y se sembraron en placas de LB agar con kanamicina (kan) a una concentración final de 0.05 mg/mL. Se realizó PCR de colonias para comprobar que estas tuvieran la secuencia de interés. Para el PCR, se usaron *primers* universales de T7 (promotor y terminador), cuyo producto de amplificación abarcaría la secuencia de las proteínas *Bsu* y gp32. Se realizó el PCR siguiendo los pasos de la **Tabla1**.

**Tabla 1.** Programación del PCR de colonias usando *primers* universales de las secuencias T7

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	3 min	1
Desnaturalización	98	30 seg	25
Polimerización	60	30 seg	
Extensión	72	Bsu: 58 seg gp32: 32 seg	
Extensión final	72	5 min	1
-	4	∞	



**Figura4. Vector de expresión de Bsu.** La secuencia de la ADN polimerasa I Bsu se encuentra inserta en el vector pET-28a(+). El vector tiene un total de 6997 bp. Tiene un gen de resistencia a kanamicina, un ori pBR322 y promotor T7. La secuencia de la polimerasa tiene un extremo de 6 histidinas.



**Figura5. Vector de expresión de gp32.** La secuencia de la gp32 se encuentra inserta en el vector pET-28a(+). El vector tiene un total de 6121 bp. Tiene un gen de resistencia a kanamicina, un ori pBR322 y promotores T7. La secuencia de la polimerasa tiene un extremo de 6 histidinas.

Los productos de amplificación del PCR de colonias fueron observados por gel de agarosa 1% TAE 1X. Se confirmó que las secuencias de interés se encontraron en las colonias y se procedió a inocular medio LB con la bacteria para empezar a expresar las enzimas.

### 3.2.1. Condiciones de inducción de cultivo

Para que el cultivo produzca las proteínas se debe agregar IPTG e incubarlo por un período de tiempo a cierta temperatura. Se evaluaron 4 condiciones diferentes para determinar cuál produciría mayor proteína: 18°C e incubado toda la noche (o/n, 16-19 horas), 18°C por 4 horas, 30°C e incubado toda la noche (16-19 horas), y 37°C por 4 horas.

Para cada proteína, se preparó un pre-inóculo de 10 mL de medio LB con 0.05 mg/mL de kanamicina y se incubó a 37°C de 16-19 horas en 220 rpm de agitación. Se agregó 50 uL de este pre-inóculo en 50 mL de medio de cultivo fresco con 0.05 mg/mL de kanamicina y se incubó a 37°C en 220 rpm de agitación hasta alcanzar un  $OD_{600} = 0.6$ .

Posteriormente se agregó 0.5 mM de IPTG, se homogenizó y se dividió en 4 volúmenes de 12 mL para evaluar las condiciones. Al terminar la incubación de cada condición, se centrifugó el contenido a 8000 rpm, 4°C por 7 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet con 4.5 mL de buffer de lisis [Tris-HCl 50mM, pH 7.9; NaCl 100mM, glicerol 5%]. Se agregó 0.1 ug/uL de lisozima y se homogenizó en 220 rpm de agitación a temperatura ambiente por 15 minutos, después se agregó 1 uL de SDS 10% y aproximadamente 100 uL de *beads* de vidrio. Se agitó fuertemente con vórtex por 20 minutos y se retiró la fracción que no tenía *beads* a un nuevo tubo. Se centrifugó a 13500 rpm por 5 min a 4°C para separar las fases. Se recolectó el sobrenadante (fracción soluble, aproximadamente 4 mL) y el pellet se resuspendió en 400 uL de PBS 1X (fracción insoluble). Los resultados se observaron por electroforesis SDS-PAGE en un gel de 12% y 15% de acrilamida para la polimerasa *Bsu* y la gp32, respectivamente.

Se asumirá que las condiciones evaluadas a pequeña escala puedan extrapolarse a escalas más grandes.

### 3.2.2. Producción de proteínas a mediana escala

Inicialmente se preparó un pre-inóculo de 10 mL de medio LB con 0.05 mg/mL de kanamicina y se incubó a 37°C de 16-19 horas. Posteriormente se inocularon matraces de 250 mL de medio LB (0.05 mg/mL de kanamicina cada uno) con 2.5 mL de pre-inóculo en cada matraz. Se sembró en total 1 L de medio de cultivo en una proporción de 1:100 (pre-inóculo: cultivo) para la proteína gp32, y 500 mL para la proteína ADN polimerasa *Bsu*. Se incubaron los matraces a 37°C, a 220 rpm de agitación y hasta obtener un OD<sub>600</sub> = 0.6, lo que aproximadamente demoró de 4-5 horas de incubación. Una vez que los cultivos llegaron a esta absorbancia, se le agregó IPTG a una concentración final de 0.5 mM a cada matraz y se dejó incubando a 18°C con 220 rpm de agitación por 16-19 horas (*overnight*).

Después de la de inducción, se procedió a lisar las células del cultivo. Primero, se centrifugó el contenido de los matraces 4000 rpm a 4°C por 20 min y se resuspendió el *pellet* con el buffer de lisis correspondiente (ver **Tabla 2**) en una proporción de 1:10 (buffer de lisis: cultivo). Se agregó el inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 0.1 mM y lisozima a una concentración final de 0.1 ug/uL. Se dejó incubar la

suspensión a temperatura ambiente por 20 min a 220 rpm. Luego, se sonicaron las bacterias para lisarlas completamente y liberar las proteínas producidas. Se usó un poder de 60% en pulso 10 prendido por 15 min, seguido de 15 min de apagado el equipo (OMNI Sonic Ruptor 400, OMNI International).

**Tabla 2.** Buffers de lisis para cada proteína a purificar

Proteína	Buffer de lisis
Gp32	50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1M KCl, 20mM Imidazol, 0.01% BME, 5% glicerol
Bsu	50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1M KCl, 20mM Imidazol, 0.01% BME, 5% glicerol

Teniendo en cuenta que las proteínas de interés se encuentran libres en la matriz intracelular, se centrifugó el lisado 6000 rpm a 4°C por 20 min y se separaron las fracciones soluble (sobrenadante, donde se encontraron las proteínas) e insoluble (pellet). Se recolectaron 200 uL de muestra del lisado, fracción soluble e insoluble para el seguimiento del proceso por electroforesis de SDS-PAGE.

### 3.2.3. Purificación de proteínas

Las proteínas obtenidas fueron purificadas a través de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC, por sus siglas en inglés), utilizando un equipo ÄKTA Start, GE Healthcare. Las fracciones solubles de las proteínas se pasaron por una columna de níquel (HisPur Ni-NTA Chromatography Cartridge, Thermo Scientific). Las proteínas de interés se unieron al níquel de las columnas gracias al extremo de 6 histidinas (6xHis). Posteriormente se lavó el sistema con 5 volúmenes de buffer de lisis (ver Tabla 2) y luego *buffer* de bajo nivel de KCl (ver **Tabla 3**).

**Tabla 3.** Buffers bajo KCl para cada proteína a purificar

Proteína	Buffer bajo KCl
Gp32	50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 20mM Imidazol, 0.01% BME, 5% glicerol
Bsu	50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 100 mM KCl, 20mM Imidazol, 0.01% BME, 5% glicerol

Finalmente se agregó buffer de elución al sistema para aumentar el imidazol del sistema y que este desplazara a la histidina de su unión con el níquel, liberando las enzimas unidas a las columnas y colectándolas (ver **Tabla 4**).

**Tabla 4** Buffers de elución para cada proteína a purificar

Proteína	Buffer de elución
Gp32	50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 500mM Imidazol, 0.01% BME, 5% glicerol
Bsu	50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 100 mM KCl, 500mM Imidazol, 0.01% BME, 5% glicerol

Posteriormente se eluyeron los volúmenes colectados y se agregaron a un concentrador con membrana de 10 kDa (AmiconUltra 15- Centrifugal Filter Unit, Sigma). Se bajó la concentración de imidazol a <20 mM y se lavó con buffer de almacenamiento correspondiente a cada proteína (ver **Tabla 5**).

**Tabla 5.** Buffers de almacenamiento para cada proteína purificada

Proteína	Buffer de almacenamiento
Gp32	10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA
Bsu	25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl, 1mM DTT, 0.1 mM EDTA

Se cuantificó la concentración de las proteínas producidas con el método de Bradford (reactivo de Bradford, Sigma, EE.UU). Se realizó una curva estándar con diluciones de 2 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL y 0.1 mg/mL de la albúmina de suero bovino (BSA). Las enzimas se guardaron con 20% de glicerol y a -70°C.

La pureza de las proteínas se calculó usando el programa ImageJ para analizar las imágenes de los geles de las proteínas (Schneider et al., 2012). El programa diferencia cada pixel de la imagen por la intensidad del color, pudiendo discernir las bandas correspondientes las proteínas. Para calcular la intensidad se analiza una región con la opción *Plot Lanes*. Si dentro de la región seleccionada hay bandas de proteínas con mayor intensidad, entonces se visualiza un espectro con picos en la gráfica, estas corresponden a las bandas de proteínas. Con el programa se selecciona y calcula el área total del espectro, relacionado a la proteína total en el carril, o el correspondiente solo al o los pico(s) (relacionado a la proteína de la banda de mayor intensidad, la proteína de interés). Por lo tanto, para estimar un valor de pureza se calculó el porcentaje de intensidad correspondiente al peso de la banda de interés en comparación a la intensidad total de un carril. El cálculo de porcentaje de pureza se realizó en cada carril del gel con una banda de proteína de interés y se promediaron para estimar un valor de

pureza final. Estos valores no fueron comparados con un control interno en un carril con cantidad conocida de proteína.

### **3.3. Actividad de las enzimas**

#### **3.3.1. ADN polimerasa I *Bsu***

##### **3.3.1.1. Actividad de Polimerización**

Se define a la unidad de la actividad de polimerasas como la cantidad de enzima que incorporará 10 nmol de nucleótidos durante 30 minutos de incubación a la temperatura de actividad de la enzima. En el caso de la polimerasa *Bsu*, se expresará la concentración de la actividad en U/ $\mu$ L, (Olszewski et al., 2017). La actividad de la polimerasa *Bsu* se evaluó con el kit EvaEZ™ Fluorometric Polymerase Activity Assay (Biotium, EE.UU). El reactivo contiene el fluoróforo EvaGreen, el cual se intercala en el ADN y emite fluorescencia. El ensayo consiste en el aumento de fluorescencia debido a la polimerización a través del tiempo.

Se realizó una curva estándar con una polimerasa *Bsu* comercial (5000 U/mL *Bsu DNA polymerase large fragment*, Lot. 10157642, NEB). Se agregó 1  $\mu$ L de *Bsu* comercial a 10  $\mu$ L del reactivo 2X EvaEZ Polymerase Activity Mix y 9  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O. Se monitoreó la fluorescencia por el canal del FAM cada 20 segundos (1 ciclo) por 150 ciclos a una temperatura constante de 37 °C utilizando el termociclador StepOne (Applied Biosystems, EE.UU). Se diluyó la polimerasa *Bsu* comercial y se siguió la actividad como aumento de fluorescencia en el tiempo.

Por cada curva, se calculó la velocidad del incremento de fluorescencia (pendiente de la curva) durante los primeros 20 ciclos usando el programa GraphPad Prism 9.0.0. Estos valores se graficaron para obtener una curva estándar y una ecuación para calcular la unidad de U/ $\mu$ L de la polimerasa producida.

Se realizó el mismo procedimiento con diluciones de la polimerasa *Bsu* producida y con su pendiente se calculó la actividad de la polimerasa producida (U/ $\mu$ L).



### 3.3.1.2. Ausencia de inhibidores de amplificación

Para evaluar la posible presencia de inhibidores de amplificación en nuestros productos de purificación, se realizaron ensayos de RPA utilizando productos comerciales y añadiendo la polimerasa *Bsu* producida. Los productos de amplificación fueron purificados con el kit QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN, EE.UU) a recomendación del manual del TwistAmp® Basic kit (TwistDx, UK). El resultado se observó por electroforesis de 2.5% de agarosa con TBE 1X.

Se utilizó el kit TwistAmp® Basic kit para amplificar una sección de 166 bp del gen de la nucleocápside (N) del SARS-CoV-2. En un volumen final de 50  $\mu$ L, primero se preparó el master mix en el que cada reacción contuvo 2.4  $\mu$ L de *primer forward* (PF) a 10  $\mu$ M, 2.4  $\mu$ L de *primer reverse* (PR) a 10  $\mu$ M, 29.5  $\mu$ L de buffer de rehidratación, 8.2 de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. Del master mix, 41.5  $\mu$ L se agregó a un pellet liofilizado con las enzimas del kit y se homogenizó. Se agregó 1  $\mu$ L *Bsu* comercial o 1  $\mu$ L de una dilución 1:50 de la polimerasa *Bsu* producida o, como control, se agregó 1  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas. A cada tubo de reacción se añadieron 5  $\mu$ L del control positivo 2019-nCoV\_N\_Positive Control (IDT, EE.UU) al 10<sup>4</sup> copias/ $\mu$ L o 5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de nucleasas para el control negativo, y finalmente se agregó 2.5  $\mu$ L de 280 mM de acetato de magnesio (MgOAc). Las secuencias de *primers* usados fueron diseñados por nuestro colaborador en Japón, las secuencias fueron las siguientes:

PF: 5'-GAACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAAT-3',

PR: 5'- GGTAAGGCTTGAGTTTCATCAGCCTTCTTCTTT-3'.

### 3.3.2. Proteína de unión a hebra simple, gp32

#### 3.3.2.1. Modelo de unión a hebra simple

De las 3 regiones del gp32, la del centro es la responsable de la unión a ADN de cadena simple. Se ha reportado que esta región sola mantiene la misma afinidad a ssDNA como si estuviera la proteína completa (Shamoo, Y. et al., 1995). El centro o *core* de la gp32 tiene 5 triptófanos (Figura 3), cuya fluorescencia se reduce significativamente al unirse al ssDNA y formarse el complejo nucleoproteico (gp32+ ssDNA) (Kelly & von Hippel, 1976). Esta reducción se debe a que los cambios conformacionales cambian el grado de

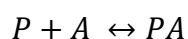
exposición al solvente de los triptofanos, con lo que pueden transferir su energía en modos vibracionales de manera más eficiente, agotándose parcialmente la excitación fluorescente (fenómeno de 'fluorescence quenching') y resultando en una emisión menor.

Para comprobar la actividad de unión de la gp32 a ssDNA se midió la fluorescencia intrínseca de los triptófanos de la proteína. Se barrió un espectro de emisión a una longitud de onda de excitación de 280 nm usando el accesorio NanoQuant del lector de placas Infinite M Plex Pro (TECAN). En los ensayos se utilizó un ssDNA de 20 nt (5'-AAA TTT TGG GGA CCA GGA AC-3'). Considerando que cada gp32 se une a 7 nt, este experimento formará complejos de dos unidades de gp32 interactuando con una hebra de ssDNA. Un complejo estable de proteína-ssDNA requiere esta estequiometría 2:1 como mínimo, ya que si fuera solo una unidad de gp32 no se alcanzaría al equilibrio necesario de formación del complejo (Lee et al., 2016). En esta configuración, la constante de disociación es  $k_d = 0.1 \mu\text{M}$  (Lee et al., 2016). Los ensayos se realizaron en buffer 50 mM de acetato de potasio, 20 mM de Tris-acetato, 10 mM de acetato de magnesio, 1 mM de DTT, pH 7.9.

Se buscó confirmar que hubiera un cambio de fluorescencia detectable por el equipo, por lo que se midió la fluorescencia entre 20 uM de gp32 y se comparó con la detectada por la de 20 uM de gp32 incubado con 40 uM de ssDNA por 10 minutos a 37°C. Posteriormente se detectó la fluorescencia de reacciones con ssDNA constante a 40 uM y diferentes concentraciones de la proteína gp32: 0.17, 0.34, 0.68, 0.88, 1.08, 1.36 mg/mL, equivalentes a 5, 10, 20, 26, 33, 1.36 uM, respectivamente.

Para estimar un modelo de actividad de la gp32 se utilizaron las siguientes ecuaciones (Jarmoskaite et al., 2020):

Ecuación 1:



Siendo P, la proteína gp32; A, el ssDNA; y PA, el complejo formado por ssDNA y gp32.

Ecuación 2:

$$Kd = \frac{[P][A]}{[PA]}$$

Ecuación 3:

$$Kd = \frac{[P_{free}][A_{free}]}{[PA]}$$

Ecuaciones 4:

$$[P_{total}] = [P_{free}] + [PA],$$

$$[P_{free}] = [P_{total}] - [PA],$$

$$[A_{total}] = [A_{free}] + [PA],$$

$$[A_{free}] = [A_{total}] - [PA]$$

Ecuación 5:

$$Kd = \frac{([P_{total}] - [PA])([A_{total}] - [PA])}{[PA]}$$

Ecuación 6:

$$[PA] = \frac{([P_{total}] + [A_{total}] + Kd) - \sqrt{([P_{total}] + [A_{total}] + Kd)^2 - 4[P_{total}][A_{total}]}}{2}$$

Nuestros resultados se encuentran en unidades de fluorescencia, por lo que las concentraciones de los elementos del complejo se verán representados en tales unidades (Jarmoskaite et al., 2020).

Ecuación 7:

$$F_{ssDNA+gp32} =$$

$$F_{buffer} + (F_{max} - F_{buffer}) \frac{([P_{total}] + [A_{total}] + Kd) - \sqrt{([P_{total}] + [A_{total}] + Kd)^2 - 4[P_{total}][A_{total}]}}{2[A_{total}]}$$

Para observar el efecto del *quenching* se calculó la diferencia porcentual entre la fluorescencia de la proteína sola y la del complejo con ssDNA con la siguiente formula:

Ecuación 8:

$$Diferencia\% = \frac{|F_{gp32} - F_{ssDNA+gp32}|}{F_{gp32}} \times 100\%$$

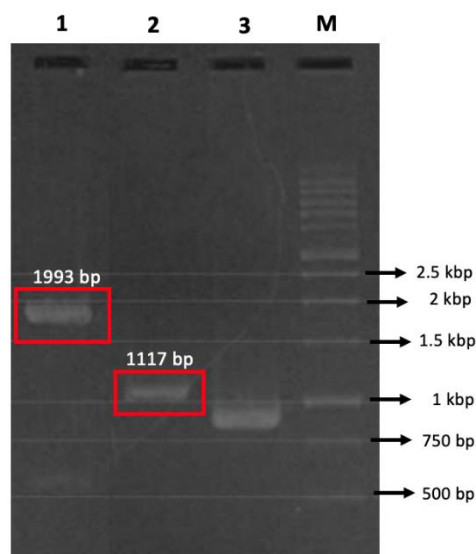
Se calculó la diferencia de estos valores obtenidos con la gp32 comercial y con la producida localmente para medir la similitud porcentual de la proteína local con respecto a la comercial.

## 4. Resultados

### 4.1. Producción de proteínas

Se realizó PCR de colonias utilizando *primers* universales para amplificar las secuencias entre el promotor y terminador T7. Como control positivo, se utilizaron colonias con la secuencia codificante de la proteína GFP. Los productos de amplificación se observaron en electroforesis de 1% agarosa con TAE 1X.

En la Figura 6 se confirma la presencia de la secuencia de la ADN polimerasa *Bsu* entre las secuencias T7 con un producto de 1993 bp. De igual forma se confirma la presencia de la secuencia de gp32 con un producto de 1117 bp.

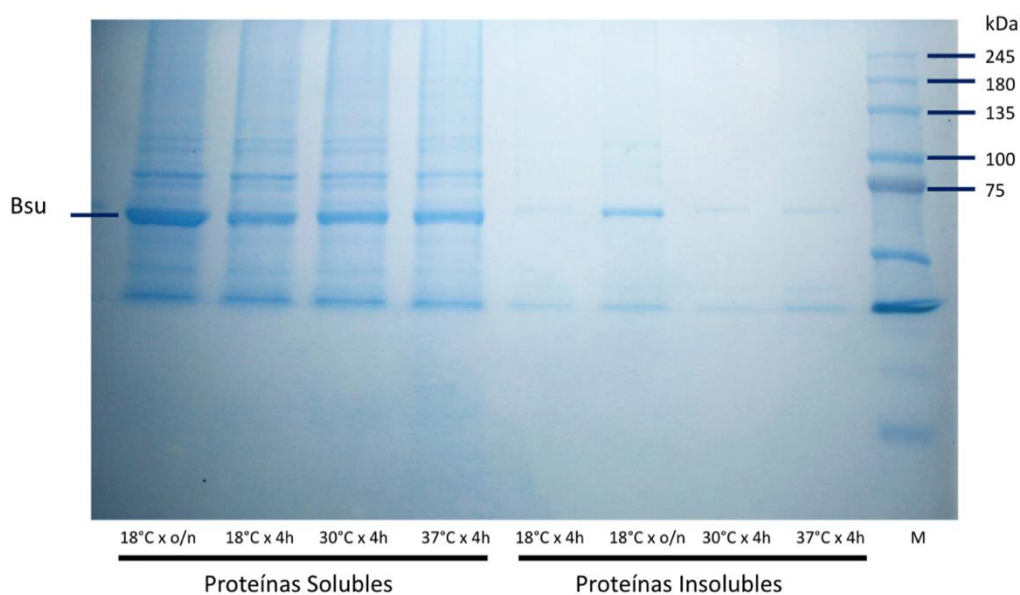


**Figura 6. Gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR de colonias.** 1: Inserto de ADN polimerasa I *Bsu* (1993 bp). 2: Inserto de gp32 (1117 bp). 3: control de PCR GFP. M: 1kb Plus Opti-DNA Marker (Applied Biological Materials Inc., EE. UU). Gel de agarosa 1%, TAE 1X.

#### 4.1.1. Producción de ADN polimerasa I *Bsu*

El protocolo de la producción de la ADN polimerasa I *Bsu* fue publicado en el repositorio de acceso libre protocolos.io: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.x54v9ypkpg3e/v1](https://doi.org/10.17504/protocols.io.x54v9ypkpg3e/v1) .

En la Figura 7 se observa la producción de la ADN polimerasa I *Bsu* tras 4 condiciones de incubación con el inductor IPTG: 18°C e incubado toda la noche (o/n, 16-19 horas), 18°C por 4 horas, 30°C e incubado overnight (16-19 horas), y 37°C por 4 horas. En todas las condiciones se observa que la polimerasa de 66.9 kDa fue producida y encontrada en la fracción soluble. La condición en donde se ve una banda de proteína ligeramente más gruesa es la de 18°C, o/n, sin embargo, también se ve que se presenta en la fracción insoluble bajo esa condición. En las 3 condiciones restantes se ven tenues bandas representantes de la polimerasa *Bsu*.

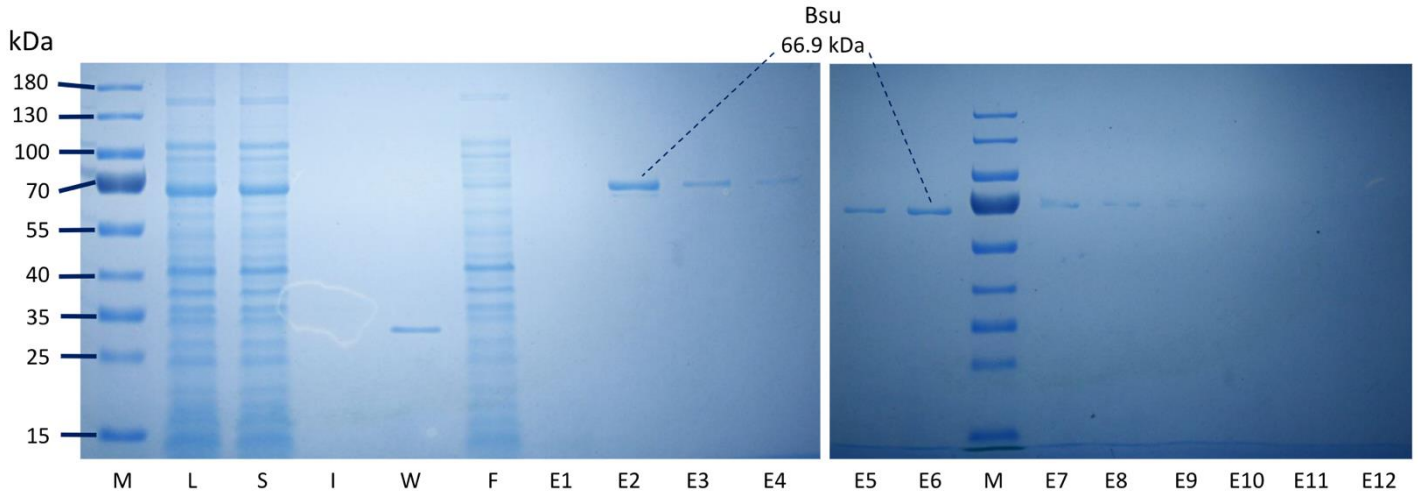


**Figura 7. Condiciones de tiempo y temperatura para la producción de la ADN polimerasa *Bsu*.** Se observan las fracciones solubles e insoluble de las 4 condiciones de incubación con el inductor IPTG. M: CSL-Blue Wide Range Protein Ladder 10-245 kDa (Cleaver Scientific, UK). Electroforesis SDS-PAGE, 12% de acrilamida.

En la figura 8 se observa la purificación con gradiente creciente de imidazol, se observa que la proteína comienza a eluirse con ~77 mM de imidazol y deja de observarse a ~ 180 mM de imidazol. De esta manera, luego de pasar la muestra por la columna de níquel se

decidió lavar el sistema con el mismo buffer de lisis y eluir la proteína con 150 mM de imidazol.

La concentración final de la ADN polimerasa *Bsu* fue de 1.89 mg/mL con un volumen final de 0.6 mL. Se produjo 1.13 mg de polimerasa *Bsu* y una pureza ~96%.

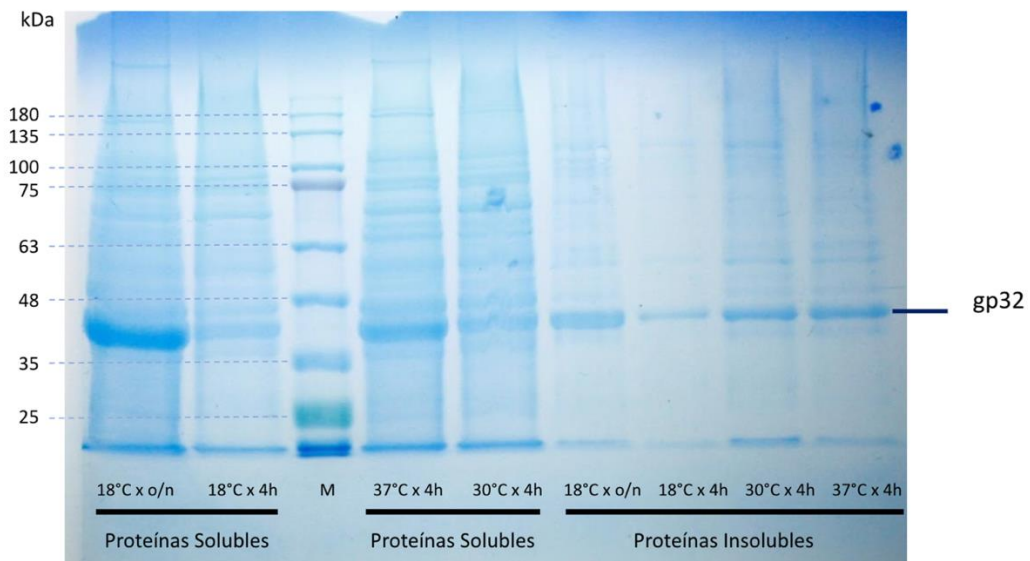


**Figura 8. SDS-PAGE de la producción de la ADN polimerasa *Bsu*.** L: Lisado, S: fracción soluble, I: fracción insoluble, W: lavado, F: flowthrough, E1: imidazol a 29.6 mM (2% B), E2: imidazol a 77.6 mM (12% B), E3: imidazol a 87.2 mM (14% B), E4: imidazol a 96.8 mM (16% B), E5-6: imidazol a 140 mM (25% B), E7-8: imidazole a 188 mM (35% B), E9: imidazol a 284 mM (55% B), E10-11: imidazol a 356 mM (70% B), E12: imidazole a 428 mM (85% B), M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher, EE.UU). Electroforesis SDS-PAGE, 8% de acrilamida.

#### 4.1.2. Producción de Gp32

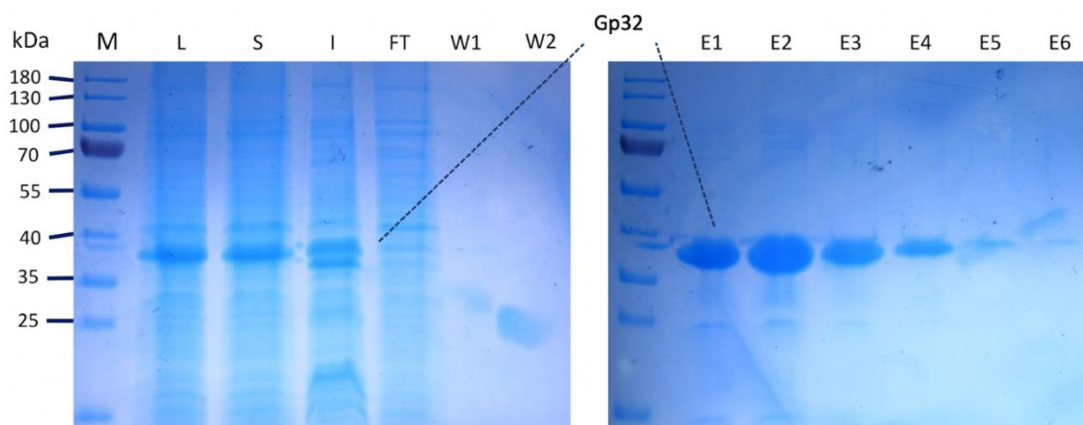
El protocolo de la producción de la proteína gp32 fue publicado en el repositorio de acceso libre protocolos.io: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx957wg8j/v1](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.kxygx957wg8j/v1) .

En la figura 9 se observa la producción de la proteína gp32 tras las 4 condiciones de incubación a evaluar. En todas las condiciones se observa que la proteína fue producida y encontrada en la fracción soluble e insoluble. Después de una inducción a 18° por toda una noche el cultivo produjo más proteína soluble en comparación con las otras 3 condiciones.



**Figura 9. Condiciones de tiempo y temperatura para la producción de la gp32.** Se observan las fracciones solubles e insoluble de las 4 condiciones de incubación con el inductor IPTG. M: CSL-Blue Wide Range Protein Ladder 10-245 kDa (Cleaver Scientific, UK). Electroforesis SDS-PAGE, 15% de acrilamida.

En la figura 10 se observa que la proteína se eluye desde 150 mM de imidazol y sigue obteniéndose a 20 mM de imidazol. De esta manera para purificar la proteína gp32 en este sistema se eluye con 200 mM de imidazol. La concentración final de la gp32 fue de 20.16 mg/mL con un volumen final de 1.6 mL, con un peso  $\sim$ 38kDa. Se produjo 32 mg de gp32, con una pureza de  $\sim$ 90%.



**Figura 10. SDS-PAGE de la purificación de la gp32 por FPLC.** M: PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher, EE.UU), L: lisado completo, S: fracción soluble, I: fracción insoluble, FT: flowthrough, W1: lavado, W2: lavado con 50 mM imidazol, E1-3: elución con buffer con 150 mM imidazol, E4: elución con buffer con 200 mM imidazol, E5-6: elución con buffer con 500 mM imidazol.

## 4.2. Actividad de las proteínas

### 4.2.1. Actividad de Polimerización de la ADN polimerasa I Bsu

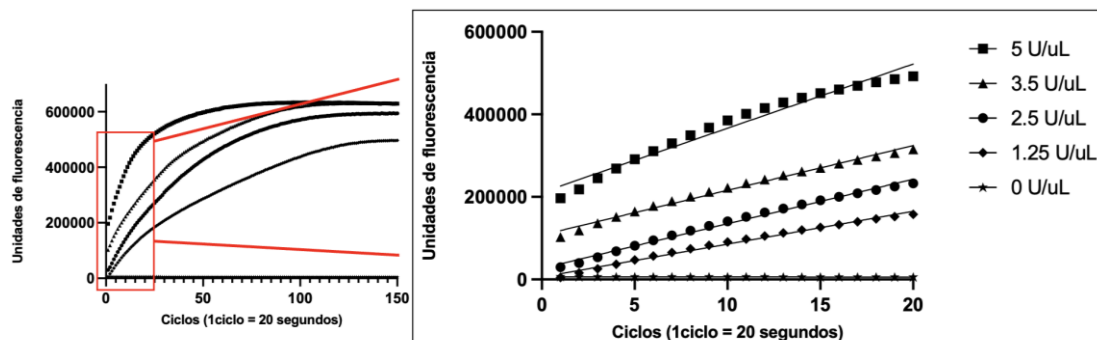
En la figura 11 se sigue el aumento de fluorescencia causado por la polimerasa *Bsu* comercial (NEB, EE.UU) a diferentes diluciones. Se observa que el mayor crecimiento de la fluorescencia se da entre los primeros ciclos, que correspondería a la velocidad inicial de la enzima, por lo que se decidió calcular la pendiente en base a los primeros 20 ciclos. Se graficó la pendiente de cada dilución para obtener una curva estándar cuya ecuación lineal fue:

$$Y = 3218 * X + 1427, R2: 92.73$$

$$X = \frac{Y - 1427}{3218}$$

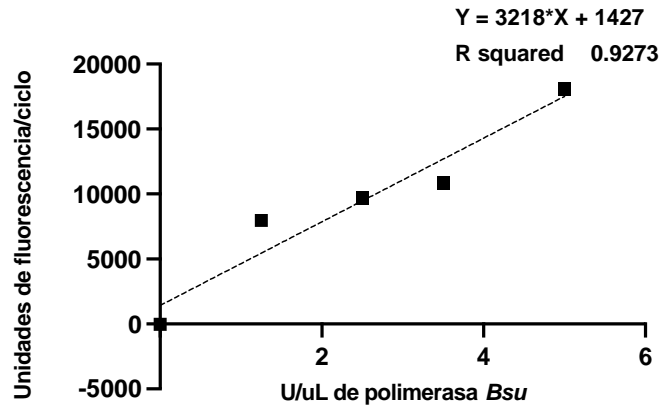
Siendo 'Y' la pendiente o el valor de unidades de fluorescencia por ciclo; y el 'X', el valor de la actividad U (Figura 12).

La polimerasa *Bsu* fue diluida en 1/60, 1/70 y calculada su actividad con el kit EvaEZ™ Fluorometric Polymerase Activity Assay con el mismo procedimiento anteriormente mencionado. En la Figura 13 se observa el aumento de fluorescencia de las diluciones y de las primeras 20 ciclos. Además, para cada dilución, se calcularon y graficaron las pendientes para ser reemplazadas en la ecuación mencionada. La actividad de la dilución 1/60 fue de 6.09 U/μL y el de 1/70 fue de 4.92 U/μL (Tabla 6). La dilución 1/70 representa una concentración de 0.027 mg/mL, por lo que 0.027 μg equivale a 4.92 U. La producción total fue de 1130 ug, por lo que la cantidad de unidades totales producidas fue de 205911 U por 500 mL de medio de cultivo de producción.

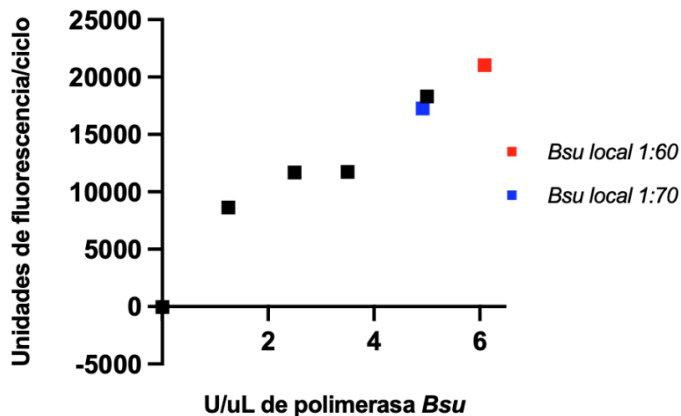
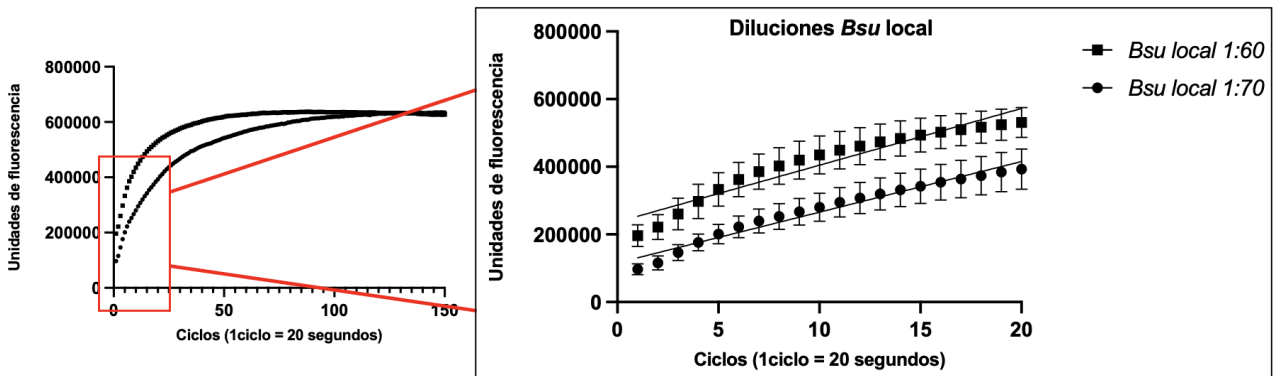




**Figura 11. Fluorescencia de diluciones de polimerasa Bsu comercial.** Con el kit EvaEZ™ Fluorometric Polymerase Activity Assay, se observó el aumento de fluorescencia a través del tiempo a diluciones de 5, 3.5, 2.5, 1.25, 0 U/μL. Cada ciclo fue equivalente a 20 segundos. Se graficaron los primeros 20 ciclos de cada dilución junto con sus pendientes (derecha).



**Figura 12. Curva estándar de polimerasa Bsu.** Se graficó la velocidad del crecimiento de fluorescencia, pendientes de la curva, calculada por cada dilución. Se obtuvo una ecuación lineal en donde X es la actividad en unidades U/μL de la polimerasa:  $y = 3218*X + 1427$ , R2: 92.73.



**Figura 13. Fluorescencia de diluciones de polimerasa *Bsu* local.** Con el kit EvaEZ™ Fluorometric Polymerase Activity Assay se observó el aumento de fluorescencia de las diluciones de 1/60, 1/70 de la polimerasa *Bsu* local. Se calculó la pendiente de los primeros 20 ciclos (arriba). Se ubicó su actividad en la curva estándar de la polimerasa. Se hicieron 3 repeticiones de los ensayos, se graficó el promedio y la desviación estándar.

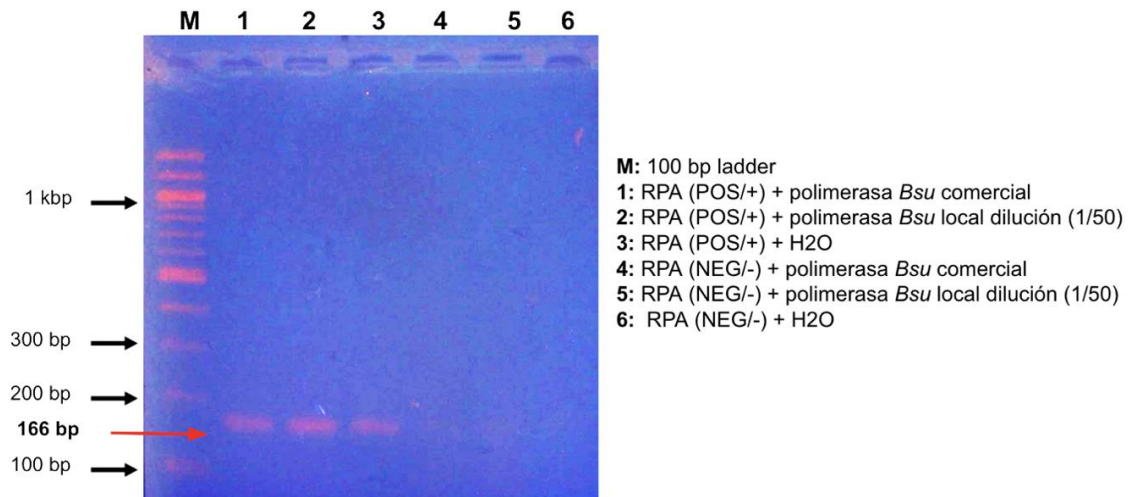
**Tabla 6.** Resultados de cada dilución de polimerasa *Bsu* local

	<b>Bsu local 1/60</b>	<b>Bsu local 1/70</b>
<b>Unidades de fluorescencia/ciclo</b>	21047	17259.33
<b>Actividad (U/uL)</b>	6.09	4.92
<b>Concentración (mg/mL)</b>	0.031	0.027
<b>Actividad (U/ug)</b>	196	182

Se calculó la pendiente (Unidades de fluorescencia/ciclo) y actividades de las diluciones 1/60, 1/70, equivalentes a 0.031, 0.027 mg/mL de polimerasa *Bsu*, respectivamente.

#### **4.2.2. Ausencia de inhibidores de amplificación**

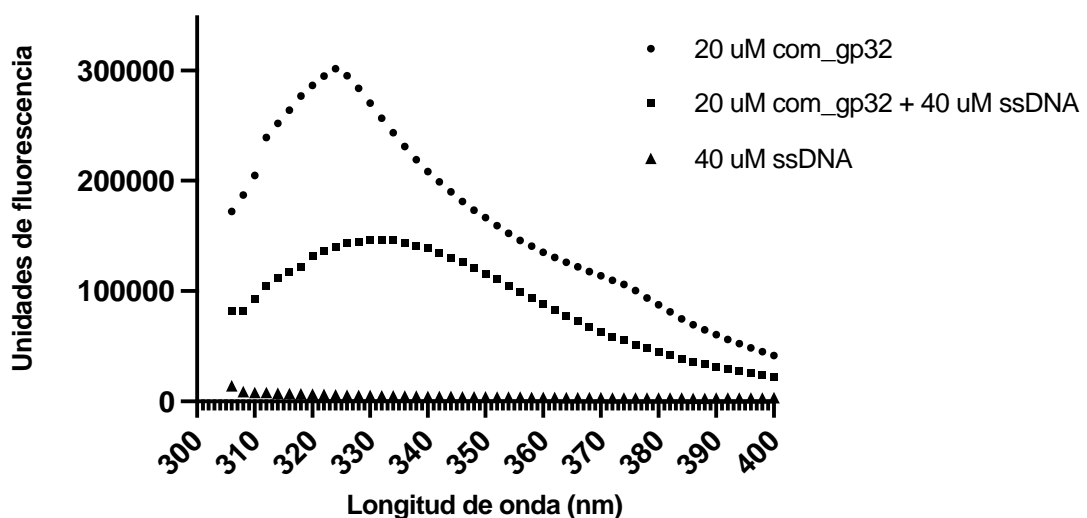
En la Figura 14 se observa el resultado de los productos de amplificación de RPA a los que se les añadió la polimerasa *Bsu*. Se observa en el gel de agarosa bandas correspondientes al producto de amplificación de 166 bp en las reacciones que tuvieron tanto la polimerasa *Bsu* (comercial y la local), como en el control positivo de la reacción RPA sin la polimerasa extra. Es decir, no hubo inhibidores de la amplificación RPA tras el proceso de producción de la polimerasa *Bsu* local.



**Figura 14. Prueba de inhibidores de RPA.** Se realizaron reacciones de RPA con polimerasa *Bsu* comercial y local para comprobar que no hubo inhibidores de amplificación. No hubo inhibición ya que se observan las bandas del producto de amplificación (166 bp). Los resultados se observaron en gel de 2.5% de agarosa con TBE 1X.

#### 4.2.3. Actividad de unión a ssDNA por Gp32

Para comprobar si se observaba un cambio en la señal de fluorescencia intrínseca de la proteína gp32 comercial (com\_gp32) (Lot. 10094856, NEB) cuando se incubara con ADN de hebra simple (ssDNA), se comparó el espectro de emisión de 20  $\mu$ M gp32, 20  $\mu$ M gp32+ 40  $\mu$ M ssDNA, y 40  $\mu$ M ssDNA, a una longitud de onda de excitación de 280 nm. Se observó una disminución en la fluorescencia del complejo nucleoproteico en comparación con la proteína sola (**Figura 15**).



**Figura15. Espectro de emisión de la gp32 y del complejo ssDNA:gp32.** Se observó una disminución en la fluorescencia emitida por los triptófanos de la gp32 al presentarse como complejo nucleoproteico (gp32 + ssDNA). Longitud de onda 280 nm.

La emisión de fluorescencia a la longitud de onda de 314 nm tuvo un valor de:  $F_{(com\_gp32+ssDNA)} = 0.194 \times 10^6$  UF, siendo la concentración [gp32 comercial] = 32 uM y [ssDNA] = 40 uM.

Así que, tomando en cuenta el valor de fluorescencia del buffer  $F_{buffer} = 0.0074 \times 10^6$  UF, se consideró como constante Q al valor de  $(F_{max} - F_{buffer})$  y se reemplazaron los valores en la Ecuación 7:

$$F_{ssDNA+gp32} =$$

$$F_{buffer} + (F_{max} - F_{buffer}) \frac{([P_{total}] + [A_{total}] + Kd) - \sqrt{([P_{total}] + [A_{total}] + Kd)^2 - 4[P_{total}][A_{total}]}}{2[A_{total}]}$$

$$Q = \frac{(0.194 - 0.0074) \times 10^6}{\frac{63.24}{64}}$$

$$Q = 0.189 \times 10^6$$

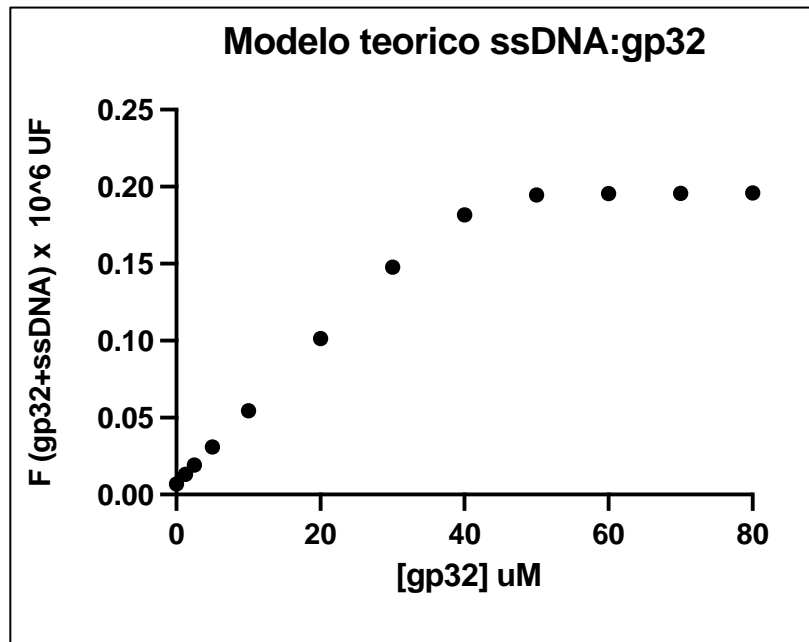
Entonces, manteniendo la concentración de ssDNA constante, se reemplazarían los valores y la ecuación del modelo sería la siguiente:

Ecuación 9:

$$F_{ssDNA+gp32} \times 10^6 =$$

$$(0.0074 \times 10^6) + (0.189 \times 10^6) \frac{(P_{total} + 40 + 0.1) - \sqrt{(P_{total} + 40 + 0.1)^2 - 4(40)[P_{total}]}}{2 * 40}$$

Utilizando estos valores, se graficó el comportamiento esperado de la fluorescencia en función de la concentración de proteína gp32 utilizando el calculador virtual Desmos (<https://www.desmos.com/calculator?lang=es>) (Figura 15).



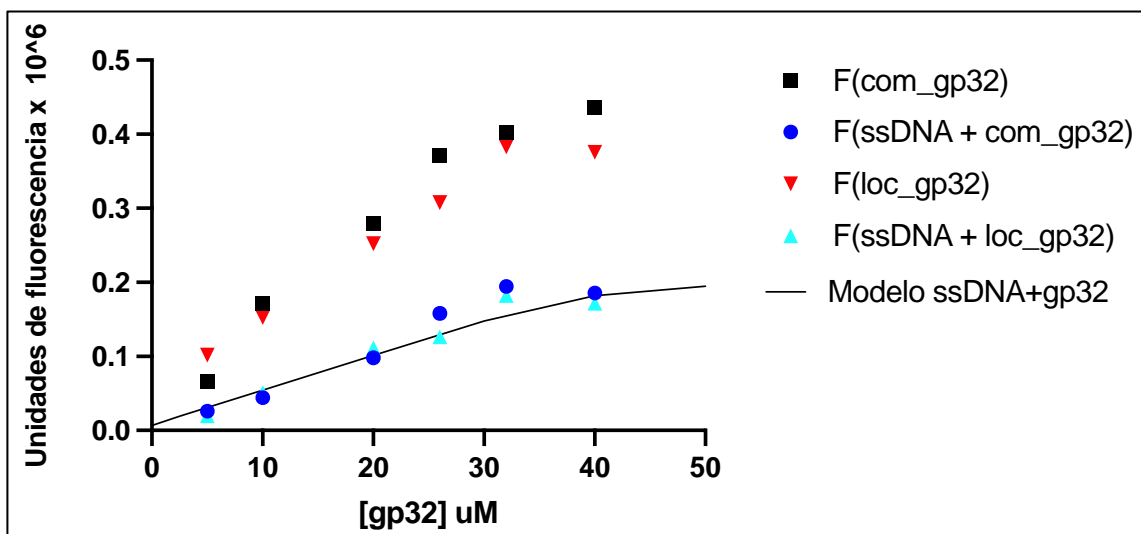
**Figura16.** Modelo teórico del complejo ssDNA:gp32. Representa el incremento de fluorescencia en función de la concentración de proteína, disminuído por el efecto del ssDNA. En concentraciones mayores a 40  $\mu$ M, el modelo solo arroja valores constantes.

Se graficó la fluorescencia a 314 nm en función de la concentración de la proteína gp32, ploteando cuatro curvas: para la proteína sola y en conjunto con ssDNA, tanto de la presentación comercial (com\_gp32), como la gp32 producida localmente (loc\_gp32) (Figura 16). Se observó que, para todos los puntos, la fluorescencia de la combinación ssDNA y proteína es menor que la de la proteína sola. Asimismo, se observó que los puntos del complejo gp32: ssDNA se superponen a la tendencia esperada según el modelo teórico.

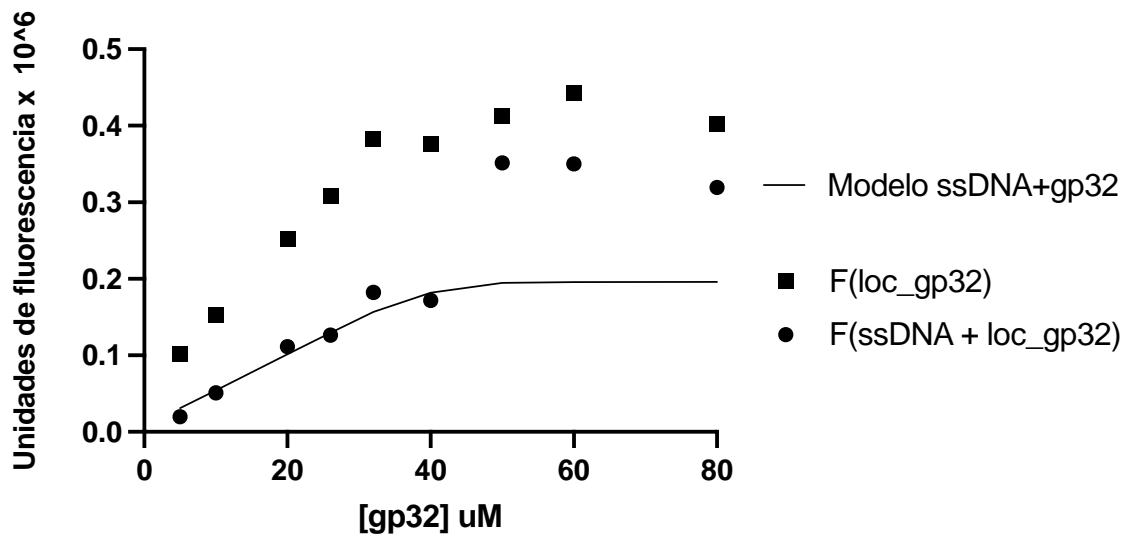
En la Figura 17 se graficó la fluorescencia de la gp32 local como proteína sola y en combinación con ssDNA, incluyendo valores altos de concentración de proteína. La saturación del ssDNA disponible como complejo a una molaridad de proteína estaría en saturación según el complejo (región aplanada de la gráfica). Se observa que a  $> 40 \mu$ M la fluorescencia emitida por el complejo y la proteína sola son similares.

Para obtener un valor normalizado del *quenching* que la gp32 sufre en combinación con ssDNA, se restó la fluorescencia de la proteína sola menos la proteína con ssDNA, y esta

diferencia se dividió sobre la fluorescencia de la proteína sola. En la Figura 18 que la diferencia entre ambas presentaciones (comercial vs local) son cercanas. A mayor concentración de proteína, menor es la diferencia de fluorescencia o efecto *quenching* del ssDNA sobre la fluorescencia. La diferencia porcentual equivaldría a la capacidad de *quenching* de un en un ensayo, es decir, a la capacidad de unirse la gp32 a ssDNA. En la Tabla 7 se comparó la diferencia de fluorescencia entre los complejos de la gp32 comercial y la local, y se observó que el promedio de estas diferencias es de ~7%, por lo que la gp32 que se produjo fue 93% similar a la comercial.



**Figura17. Fluorescencia de gp32 y gp32:ssDNA.** Se ha medido la fluorescencia intrínseca de gp32 y gp32 en combinación con 40  $\mu$ M de ssDNA a una concentración creciente de proteína y ADN constante. Se observa que las fluorescencias de las combinaciones ssDNA:gp32 son menores a las de gp32 solos. com\_gp32, proteína comercial; loc\_gp32, proteína obtenida localmente en este estudio.

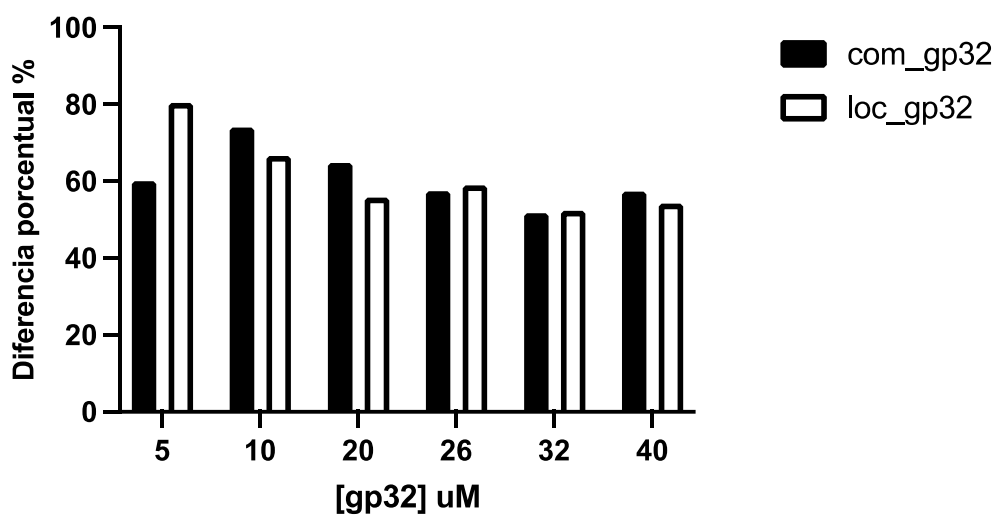


**Figura18. Fluorescencia de loc\_gp32 y ssDNA: loc\_gp32.** Se observa que la combinación ssDNA:gp32 con la proteína local sigue la tendencia del modelo y en la fase saturada del modelo, la fluorescencia se aproxima a la de la proteína sola.

**Tabla 7.** Diferencia porcentual de las fluorescencias de la proteína sola y en complejo de la proteína comercial (com\_gp32) y la local (loc\_gp32)

uM	com_gp32	loc_gp32	Diferencia
5	60	80.4	20.4
10	74	66.6	7.4
20	64.8	55.7	9.1
26	57.4	58.9	1.5
32	51.7	52.3	0.6
40	57.4	54.2	3.2
<b>Promedio</b>			7.03
<b>Similitud a comercial</b>			92.97

Se calculó la diferencia de estos valores para medir la similitud de la proteína local con respecto a la comercial.



**Figura19. Efecto porcentual del quenching del ssDNA sobre gp32.** Se graficó la diferencia porcentual de cada concentración de la proteínas sola y en complejo. Se observa la diferencia entre la proteína comercial y la localmente producida.



## 5. Discusión

En este estudio, la polimerasa *Bsu* y la proteína gp32 fueron producidas exitosamente y se corroboró sus actividades. Los vectores fueron compartidos por miembros de la red de laboratorios ReClone siendo portados por bacterias *E. coli* TOP10. A partir de estos vectores, corroborados y amplificados localmente, pusimos a punto los protocolos óptimos de expresión y purificación de ambas proteínas.

Para escoger el tiempo y temperatura de inducción se tomó en cuenta las recomendaciones para mejorar la producción de una proteína soluble y activa (Rosano & Ceccarelli, 2014). Consideramos que la incubación a baja temperatura (15°C-20°C) y por largos periodos de tiempo disminuyen la precipitación de proteínas y la formación de cuerpos de inclusión. Por lo que se evaluó la incubación a una temperatura de 18°C, comparándola con las condiciones comúnmente usadas (30° o 37° por 4 horas).

En los ensayos de inducción, se recuperó más proteína gp32 en la fracción soluble después de la incubación a 18°C por toda la noche. Por otro lado, bajo todas las condiciones se vio proteína gp32 en las fracciones insolubles. La que tuvo menos proteína fue la incubación a 18°C por 4 horas, pero tuvo muy poca proteína en la fracción soluble, por lo que se atribuye a que se produjo poca proteína total. Lo último siendo comprensible ya que las temperaturas bajas ralentizan el metabolismo de las bacterias y en consecuencia la producción de proteínas (Rosano & Ceccarelli, 2014).

La incubación de 18°C por toda la noche también tuvo una banda de gp32 en la fracción insoluble la cual fue similar a las otras 3 condiciones. Sin embargo, esto se compensó por la cantidad de proteína que se observó en la fracción soluble. Es así que la inducción a 18°C por toda la noche se escogió para continuar la producción a una mayor escala.

Se consideró que la purificación de la proteína gp32 se vería dificultada por la formación de complejos con ADN de hebra simple proveniente del cultivo. Durante el proceso de lisis, los componentes intracelulares están expuestos y aumenta la probabilidad de que se formen complejos gp32:ssDNA. Al formarse estos complejos, la proteína cambia su estructura, lo que podría precipitarla en la fracción insoluble u ocultar el extremo de 6xHis y disminuir la afinidad con la columna de níquel, lo que ocasionaría que se perdiera la

proteína en la fracción insoluble. Por esta razón, se aumentó la concentración de sal hasta 1M de KCl en el buffer de lisis para mejorar la recuperación final de gp32 en la purificación para la producción a mediana escala a partir de 1 L de cultivo inicial, a diferencia de otras rondas de purificación, en las que se utilizó tan solo 100 mM de KCl. En presencia de 1 M KCl no se perdió gp32 en las fracciones eluidas durante la fase de unión a la columna de afinidad (fracciones de eluido flowthrough y lavado).

En los ensayos de inducción, se encontró la polimerasa *Bsu* en las fracciones solubles de las 4 condiciones, y después de la inducción a 18°C por toda la noche se ve una banda de proteína ligeramente más gruesa. Sin embargo, bajo esa condición se encontró la proteína también más abundante en la fracción insoluble. Durante esta etapa del estudio se usaba un buffer con 100 mM de NaCl, una concentración comunmente usada. Posteriormente a aumentar el cultivo inicial a 500 mL se usó un buffer con 1 M de KCl. En el gel de la Figura 8 se puede ver que se recuperó la polimerasa *Bsu* en la fracción soluble, sin perderla significativamente en la fracción insoluble o en el *flowthrough*. Probablemente, la alta salinidad permitió evitar complejos con ADN que evitaban la unión a la columna de afinidad.

Cabe mencionar que la polimerasa *Bsu* comenzaba a eluir desde ~70 mM de imidazol, lo que es una concentración relativamente baja. Esto da a entender que el extremo de 6xHis de la polimerasa tiene una afinidad débil a la columna de níquel, y posiblemente su estructura este interfiriendo en esta interacción. De esta manera, poca concentración de imidazol es suficiente para desplazar a las histidinas y unirse al níquel de la columna, liberando a la proteína recombinante. Con el protocolo de nuestro estudio, un buffer inicial (de lisis) de 20 mM y un lavado de ~30 mM imidazol no se perdió proteína. Si esto presentara un inconveniente durante la purificación de proteínas fusionadas con 6xHisTag, las alternativas para el proceso sería el uso de buffer de lisis con 5-10 mM de imidazol o la reposición de la 6xHisTag al extremo opuesto de la proteína (Rosano & Ceccarelli, 2014).

En la purificación de la ADN polimerasa I *Bsu* desde 500 mL de medio de cultivo se purificó la cantidad de 1.13 mg con una pureza aproximadamente ~ 96%, siendo el peso

final de la proteína 66.9 kDa, los que incluía los 66.1 kDa de la proteína y 0.84 kDa de la etiqueta 6xHis (Rosano & Ceccarelli, 2014; Young et al., 2012).

La cantidad final de la polimerasa producida fue muy baja en comparación con la gp32 obtenida, sin embargo, la actividad de la dilución 1/70 fue de 4.92 U/uL, comparable con la presentación comercial de 5 U/uL. Para evaluar la actividad de la polimerasa cada ensayo utilizó 1 uL de la dilución, por lo que  $0.027 \mu\text{g}$  polimerasa *Bsu* = 4.92 U, es decir, una actividad específica de 182 U/ $\mu\text{g}$  (siendo 'U' la cantidad de polimerasa que incorpora 10 nmol de nucleótidos durante 30 minutos a 37°C).

Se observó de forma indirecta la actividad de la gp32 al medir la fluorescencia de la proteína sola y su complejo nucleoproteico al unirse con el ssDNA. La fluorescencia del complejo ssDNA:gp32, tanto de la comercial como la producida localmente siguen la tendencia del modelo teórico propuesto en este estudio. A partir de 40 uM de gp32, la fluorescencia del complejo es similar a la de la proteína sola, y esto coincide con la fase de meseta del modelo. Esto da a entender que, a partir de este punto, el ssDNA ya no influye en la fluorescencia detectada, es decir, ya no hay más ssDNA disponible y la fluorescencia mediría la proteína libre que se va agregando. Esto tomando en cuenta en que los ensayos se han usado 40 uM de ssDNA, el cual tiene 20 nt y, por lo tanto, tiene la capacidad de unirse con 2 proteínas de gp32. El gp32 se une a 7 nt, si la hebra simple tuviera la longitud para unirse con más unidades de la proteína probablemente se necesitaría una mayor concentración de gp32 para llegar a una fase de saturación, asimismo, el modelo cambiaría ya que la Kd cambiaría al ser dependiente de la afinidad de la gp32 con el ssDNA (Lee et al., 2016).

No se evaluó la estabilidad de las proteínas, ni la gp32 ni la polimerasa *Bsu*, a través del tiempo.

Una limitación de este estudio es que no se pudo evaluar la actividad de amplificación de la polimerasa a productos de amplificación de diferentes longitudes; sin embargo, el tamaño recomendado para la reacción de RPA es menor a 500 bp y mayor a 80 bp (TwistDx, 2018). Hay estudios en los que se han amplificado con éxito productos de entre 100-250 bp (Lau et al., 2021; J. Wang et al., 2017), y hasta 1500 bp (Piepenburg et al., 2006). Los kits comerciales de RPA (TwistDx, UK) están optimizados para que la

amplificación se realice en un periodo de 20-30 minutos a una temperatura constante de 37-42°C (Li et al., 2019), por lo que un amplicón de poco tamaño es preferible. Este tamaño de secuencia es mayor al recomendado para la reacción isotérmica LAMP (Tighe et al., 2021), donde se prefieren productos menores a 200 bp en una incubación de hasta 40 min a 65°C. En un estudio sobre LAMP realizado por Scott W. Tighe en 2021 se amplificaron productos de hasta 945 bp, lográndolo al aumentar el tiempo de incubación hasta 130 min, aumentando concentraciones de *primers* o añadiendo aditivos (Tighe et al., 2021).

Como se mencionó, una secuencia de mayor tamaño requerirá más tiempo de incubación y, probablemente, una temperatura diferente (Li et al., 2019; TwistDx, 2018). Así mismo, al aumentar el tamaño del producto el efecto del *primer noise* incrementa la polimerización de productos inespecíficos. El *primer noise* es consecuencia de interacciones inespecíficas o dimerizaciones entre los *primers* (Munawar et al., 2020; TwistDx, 2018). Estas estructuras de poco tamaño se vuelven fuentes de polimerización y recombinación, por lo que compiten con la secuencia de interés. Consecuentemente, a medida que aumenta el tamaño del producto, la sensibilidad, especificidad y velocidad de polimerización disminuye (Munawar et al., 2020; TwistDx, 2018).

Otra limitante de este estudio es que no se evaluó la procesividad. La procesividad es la habilidad de la polimerasa de añadir un número de nucleótidos (nt) por cada evento de asociación entre la polimerasa y la secuencia de interés (Zhai et al., 2019). Este número de nt insertados es uno de los factores que influye en el desempeño de las polimerasas, con respecto a la velocidad de amplificación y la longitud del producto de amplificación. En sistemas con polimerasas de baja procesividad, por ejemplo la T7 ADN polimerasa, se reclutan proteínas, como la tiorredoxina, para aumentarla (Tran et al., 2012; Zhai et al., 2019). No hay información sobre la procesividad de la ADN polimerasa Bsu, sin embargo, el grupo de Bing Zhai en 2019 estudió la procesividad de la ADN polimerasa de *Staphylococcus aureus* (*Sau*) (Zhai et al., 2019). La ADN polimerasa *Sau* también es utilizada en la reacción de RPA, reemplazando la ADN polimerasa Bsu (Li et al., 2019; Zhai et al., 2019).

En el estudio del 2019 (Zhai et al., 2019), se buscó aumentar la procesividad de la polimerasa al fusionar la proteína nativa con un dominio de unión a ADN (Sso7d) o al fusionarla con un dominio de unión a tiorredoxina (TBD). En un estudio previo, el dominio Sso7d aumentó la procesividad de la polimerasa Taq desde 22 nt a 104 nt (Y. Wang, 2004). La polimerasa *Sau* nativa tuvo una procesividad de 36.4 nt; la de Sau+Sso7d, 52.1 nt, y la de Sau+TBD, 74.2 nt. Por otro lado, la *Sau* nativa y la Sau+TBD amplificaron productos de hasta 900 bp, y la Sau+Sso7d amplificó productos de hasta 600 bp. Las dos polimerasas modificadas presentaron mayor procesividad que la polimerasa nativa, sin embargo, estas modificaciones no posibilitaron que se pudiera amplificar productos de mayor longitud (Zhai et al., 2019). En conclusión, una alta procesividad no es el único parámetro que determina la habilidad de una polimerasa de amplificar secuencias de mayor longitud en una reacción de laboratorio.

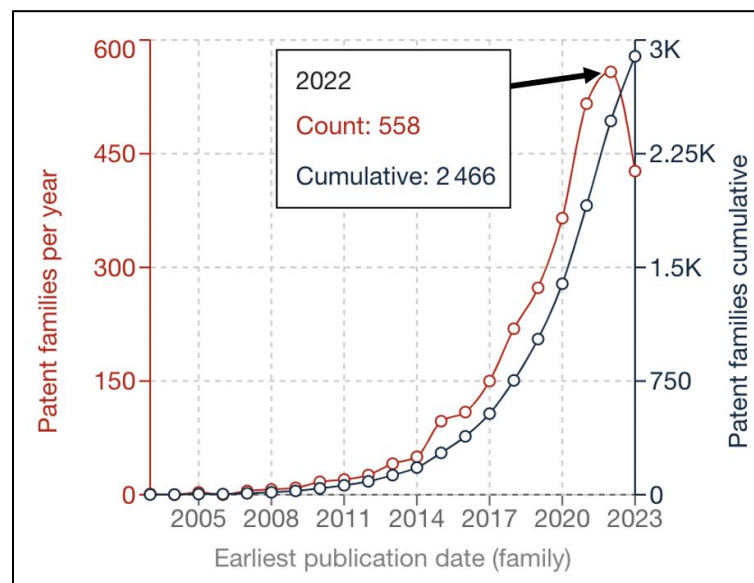
Otro factor importante en el desempeño de la polimerasa es la habilidad de *proofreading* o colección de errores. La polimerasa *Bsu* carece del dominio 3'→5' exonucleasa, por lo que la proteína nativa no tiene actividad de *proofreading* (Piepenburg et al., 2006). Además, no hay información sobre la tasa de error de la polimerasa *Bsu* (Mencionado en 'DNA Polymerase Selection Chart': <https://international.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/dna-polymerase-selection-chart>). La polimerasa isotérmica *Bst*, utilizada para la reacción de LAMP (Tighe et al., 2021), tiene actividad de invasión a doble hebra al igual que la polimerasa *Bsu* y tiene una tasa de error  $62 (\pm 5) \times 10^{-6}$  (Potapov et al., 2018). No se ha analizado si la polimerasa *Bsu* arrojaría resultados similares.

El desarrollo de protocolos para la producción de proteínas sin patentes, así como el desarrollo de pruebas de detección isotérmicas abarcan los esfuerzos para que la tecnología sea transferida y aplicada a condiciones de bajos recursos y beneficie a la salud pública.

Este tipo de estudios tiene el potencial de ser transferido y evaluado en condiciones de mayor escala, lo que permitiría una mayor producción para aumentar su alcance en la sociedad (Sanberg et al., 2014). Debido a esto, es importante la protección legal de estos

procesos a través de patentes o licencias, sobre todo si se busca evitar la comercialización a altos costos por parte de terceros (Sanberg et al., 2014).

Existen antecedentes de patentes de pruebas basadas en RPA. En la base de datos de patentes Espacenet (<https://worldwide.espacenet.com/>) hay 2893 patentes en los último 10 años relacionados a la reacción RPA (Figura 20). De estos resultados, solo 7 solicitudes son de universidades de España y 1 solicitud es de un inventor argentino desde una universidad en Estados Unidos. No hay solicitudes ni patentes de origen latinoamericano.



**Figura20. Patentes registradas en Espacenet entre 2003-2023 relacionadas a RPA.** Se buscaron patentes usando el término "recombinase polymerase amplification" en la base Espacenet. En la figura se muestran los registros del año 2022.

Las secuencias utilizadas en este estudio fueron remitidas por el grupo ReClone y se encuentran registradas bajo el acuerdo legal de transferencia de material OpenMTA (<https://biobricks.org/openmta/>) (Kahl et al., 2018). Estas secuencias no están sujetas a patentes y son de dominio público, lo que permite la protección legal de productos derivadas de ellas, como los protocolos.

Este estudio fue el primero en evaluar las actividades específicas de la ADN polimerasa I de *Bacillus subtilis* y la gp32, ambas siendo producidas como proteínas recombinantes desde el sistema de expresión BL21(DE3). Ya que las actividades de las proteínas locales

son similares a las versiones comerciales, las concentraciones obtenidas permitirán que sean aplicadas a la reacción RPA. Hay 3 publicaciones en donde indican las concentraciones usadas de cada proteína para la reacción de RPA. En el artículo original de RPA (Piepenburg et al., 2006) la reacción contiene 30 ng/uL de la polimerasa *Bsu* y 900 ng/uL de la proteína gp32. En un artículo de revisión (Li et al., 2019) se menciona que la reacción contiene 30 ng/uL de la polimerasa *Bsu* y 600 ng/uL de la proteína gp32. La patente WO 2010/141940A1 (Piepenburg, 2010), basado en el artículo del 2006, indica que en vez de la polimerasa *Bsu* se usa la polimerasa *Sau* en una concentración de 90 ng/uL, y se usa la gp32 a una concentración de 254 ng/uL. En este estudio se produjo 1.89 mg/mL de polimerasa *Bsu*, equivalente a 1890 ng/uL, y se produjo 20.16 mg/mL de proteína gp32, equivalente a 2016 ng/uL. Por lo que, considerando solo la concentración, se recomienda usar los valores en la literatura como indicadores para las concentraciones de la polimerasa *Bsu* y la gp32 en la mezcla de proteínas cuando se realice reacciones de RPA con proteínas producidas localmente. El evaluar estas concentraciones en las mezclas de las proteínas es el siguiente paso para poder implementar el RPA desde proteínas producidas localmente.

Aun así, para que las proteínas producidas de forma local en un laboratorio de investigación se apliquen en ensayos moleculares será necesario determinar con precisión la actividad de cada lote producido con ensayos como los realizados en este estudio y así mantener uniformidad las proporciones de cada componente de una reacción compleja como lo es RPA. Puede suceder que se produzca mucha proteína en un lote, pero que de esta sea poca la fracción activa o viceversa. De esta manera, se podrá corregir la cantidad de cada proteína para alcanzar una actividad uniforme en los ensayos que se las utilice. Evaluar la actividad de cada componente es crucial en las pruebas diagnósticas que dependen de la actividad de varias proteínas. Así mismo, estas actividades podrían replicarse para evaluar modificaciones en las proteínas que tienen el fin de mejorar su rendimiento para la reacción RPA.

## **6. Conclusiones**

En este estudio, la polimerasa *Bsu* y la proteína gp32 fueron producidos exitosamente a 18°C mediante la tecnología de ADN recombinante. Se produjo 1.13 mg de la

polimerasa, los cuales no presentan inhibidores de la reacción y la actividad fue de 4.92 U por 0.027 ug de proteína, en total se produjo 205911 U. Así mismo, se produjo 32 mg de gp32, el cual tuvo una actividad de unión a hebra simple 93% similar a la comercializada en el mercado.



## 7. Referencias

- Alberts, Bruce M. & Frey, Linda. (1970). T4 Bacteriophage Gene 32: A Structural Protein in the Replication and Recombination of DNA. *Nature*, 227, 1313–1318. <https://doi.org/10.1038/2271313a0>
- Blevins, M. S., Walker, J. N., Schaub, J. M., Finkelstein, I. J., & Brodbelt, J. S. (2021). Characterization of the T4 gp32–ssDNA complex by native, cross-linking, and ultraviolet photodissociation mass spectrometry. *Chemical Science*, 12(41), 13764–13776. <https://doi.org/10.1039/D1SC02861H>
- Bradley, J. (2020, April 10). In Scramble for Coronavirus Supplies, Rich Countries Push Poor Aside. *The New York Times*. <https://www.nytimes.com/2020/04/09/world/coronavirus-equipment-rich-poor.html>
- Cabada, M. M., Malaga, J. L., Castellanos-Gonzalez, A., Bagwell, K. A., Naeger, P. A., Rogers, H. K., Maharsi, S., Mbaka, M., & White, A. C. (2017). Recombinase Polymerase Amplification Compared to Real-Time Polymerase Chain Reaction Test for the Detection of *Fasciola hepatica* in Human Stool. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(2), 341–346. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0601>
- Cyranoski, D., Dolgin, E., Gaid, N., & Hall, S. (2020). Nature's 10: Ten people who helped shape science in 2020. *Nature*, 588, 563–576. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-03435-6>
- Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S., & Kim, J. F. (2009). Tracing Ancestors and Relatives of *Escherichia coli* B, and the Derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 634–643. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.022>

- Gass, K. B., & Cozzarelli, N. R. (1973). Further Genetic and Enzymological Characterization of the Three *Bacillus subtilis* Deoxyribonucleic Acid Polymerases. *Journal of Biological Chemistry*, 248(22), 7688–7700. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)43246-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)43246-8)
- Goffin, P., & Dehottay, P. (2017). Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BLR(DE3), a *recA*-Deficient Derivative of *E. coli* BL21(DE3). *Genome Announcements*, 5(22), e00441-17. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00441-17>
- Grassly, N. C., Pons-Salort, M., Parker, E. P. K., White, P. J., Ferguson, N. M., Ainslie, K., Baguelin, M., Bhatt, S., Boonyasiri, A., Brazeau, N., Cattarino, L., Coupland, H., Cucunuba, Z., Cuomo-Dannenburg, G., Dighe, A., Donnelly, C., van Elsland, S. L., FitzJohn, R., Flaxman, S., ... Xi, X. (2020). Comparison of molecular testing strategies for COVID-19 control: A mathematical modelling study. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(12), 1381–1389. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30630-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30630-7)
- Ito, K., Murayama, Y., Kurokawa, Y., Kanamaru, S., Kokabu, Y., Maki, T., Mikawa, T., Argunhan, B., Tsubouchi, H., Ikeguchi, M., Takahashi, M., & Iwasaki, H. (2020). Real-time tracking reveals catalytic roles for the two DNA binding sites of Rad51. *Nature Communications*, 11(1), 2950. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16750-3>
- Jarmoskaite, I., AlSadhan, I., Vaidyanathan, P. P., & Herschlag, D. (2020). How to measure and evaluate binding affinities. *ELife*, 9, e57264. <https://doi.org/10.7554/eLife.57264>
- Jayamohan, H., Lambert, C. J., Sant, H. J., Jafek, A., Patel, D., Feng, H., Beeman, M., Mahmood, T., Nze, U., & Gale, B. K. (2021). SARS-CoV-2 pandemic: A review of molecular diagnostic tools including sample collection and commercial response with associated advantages and limitations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(1), 49–71. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02958-1>

- Jordan, C. S., & Morrical, S. W. (2015). Regulation of the bacteriophage T4 Dda helicase by Gp32 single-stranded DNA-binding protein. *DNA Repair*, 25, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2014.10.002>
- Jose, D., Weitzel, S. E., Baase, W. A., & von Hippel, P. H. (2015). Mapping the interactions of the single-stranded DNA binding protein of bacteriophage T4 (gp32) with DNA lattices at single nucleotide resolution: Gp32 monomer binding. *Nucleic Acids Research*, 43(19), 9276–9290. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv817>
- Kahl, L., Molloy, J., Patron, N., Matthewman, C., Haseloff, J., Grewal, D., Johnson, R., & Endy, D. (2018). Opening options for material transfer. *Nature Biotechnology*, 36(10), 923–927. <https://doi.org/10.1038/nbt.4263>
- Kelly, R. C., & von Hippel, P. H. (1976). DNA “melting” proteins. III. Fluorescence “mapping” of the nucleic acid binding site of bacteriophage T4 gene 32-protein. *Journal of Biological Chemistry*, 251(22), 7229–7239. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32964-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32964-2)
- Lapidus, A., Galleron, N., Sorokin, A., & Ehrlich, S. D. (1997). Sequencing and functional annotation of the *Bacillus subtilis* genes in the 200 kb *rrnB-dnaB* region. *Microbiology*, 143(11), 3431–3441. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-11-3431>
- Lau, Y. L., Ismail, I. B., Mustapa, N. I. B., Lai, M. Y., Tuan Soh, T. S., Haji Hassan, A., Peariasamy, K. M., Lee, Y. L., Abdul Kahar, M. K. B., Chong, J., & Goh, P. P. (2021). Development of a reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid and direct visual detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *PLOS ONE*, 16(1), e0245164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245164>
- Lee, W., Gillies, J. P., Jose, D., Israels, B. A., von Hippel, P. H., & Marcus, A. H. (2016). Single-molecule FRET studies of the cooperative and non-cooperative binding kinetics of the bacteriophage T4 single-stranded DNA binding protein (gp32) to ssDNA lattices at

replication fork junctions. *Nucleic Acids Research*, 44(22), 10691–10710.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw863>

Li, J., Macdonald, J., & von Stetten, F. (2019). Review: A comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *The Analyst*, 144(1), 31–67.  
<https://doi.org/10.1039/C8AN01621F>

Liu, J., & Morrical, S. W. (2010). Assembly and dynamics of the bacteriophage T4 homologous recombination machinery. *Virology Journal*, 7(1), 357. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-357>

Milligan, J. N., Shroff, R., Garry, D. J., & Ellington, A. D. (2018). Evolution of a Thermophilic Strand-Displacing Polymerase Using High-Temperature Isothermal Compartmentalized Self-Replication. *Biochemistry*, 57(31), 4607–4619.  
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.8b00200>

Munawar, M. A., Martin, F., Toljamo, A., Kokko, H., & Oksanen, E. (2020). RPA-PCR couple: An approach to expedite plant diagnostics and overcome PCR inhibitors. *BioTechniques*, 69(4), 270–280. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0065>

Newport, W., Lonberg, N., Kowalczykowski, C., & Hipiw, P. H. Y. (1981). Interactions of Bacteriophage T4-coded Gene 32 Protein with Nucleic Acids. *J. Mol. Biol.*, 145, 105–121.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90336-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90336-3)

Okazaki, T., & Kornberg, A. (1964). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Biological Chemistry*, 239(1), 259–268. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)51776-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)51776-2)

Olszewski, M., Śpibida, M., Bilek, M., & Krawczyk, B. (2017). Fusion of Taq DNA polymerase with single-stranded DNA binding-like protein of Nanoarchaeum equitans—Expression and

- characterization. *PLOS ONE*, 12(9), e0184162.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184162>
- Pant, K., Anderson, B., Perdana, H., Malinowski, M. A., Win, A. T., Pabst, C., Williams, M. C., & Karpel, R. L. (2018). The role of the C-domain of bacteriophage T4 gene 32 protein in ssDNA binding and dsDNA helix-destabilization: Kinetic, single-molecule, and cross-linking studies. *PLOS ONE*, 13(4), e0194357.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194357>
- Perego, M., Ferrari, E., Bassi, M. T., Galizzi, A., & Mazza, P. (1987). Molecular cloning of *Bacillus subtilis* genes involved in DNA metabolism. *Molecular and General Genetics MGG*, 209(1), 8–14. <https://doi.org/10.1007/BF00329829>
- Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., & Armes, N. A. (2006). DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biology*, 4(7), e204.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>
- Piepenburg, O., Armes, N. A. (2010). *Recombinase polymerase amplification reagents and kits*. WO 2010/141940A1.  
<https://patents.google.com/patent/WO2010141940A1/en>
- Potapov, V., Fu, X., Dai, N., Corrêa, I. R., Tanner, N. A., & Ong, J. L. (2018). Base modifications affecting RNA polymerase and reverse transcriptase fidelity. *Nucleic Acids Research*, 46(11), 5753–5763. <https://doi.org/10.1093/nar/gky341>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Sanberg, P. R., Gharib, M., Harker, P. T., Kaler, E. W., Marchase, R. B., Sands, T. D., Arshadi, N., & Sarkar, S. (2014). Changing the academic culture: Valuing patents and commercialization

- toward tenure and career advancement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(18), 6542–6547. <https://doi.org/10.1073/pnas.1404094111>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shamoo, Y., Friedman, A. M., Parsons, M. R., Konigsberg, W. H., & Steitz, T. A. (1995). Crystal structure of a replication fork single-stranded DNA binding protein (T4 gp32) complexed to DNA. *Nature*, *376*, 362–366. <https://doi.org/10.1038/376362a0>
- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications Biology*, *3*(1), 214. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8>
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, *189*(1), 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., & Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, *19*(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
- Tighe, S. W., Hayden, A. F., Kuentzel, M. L., Eckstrom, K. M., Fook, J., Vellone, D. L., Finstad, K. H., Laaguiby, P. K., Hoffman, J. J., & Chittur, S. V. (2021). Molecular Characterization of Increased Amplicon Lengths in SARS-CoV-2 Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, *32*(3), 199–205. <https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-015>
- Tran, N. Q., Lee, S.-J., Akabayov, B., Johnson, D. E., & Richardson, C. C. (2012). Thioredoxin, the Processivity Factor, Sequesters an Exposed Cysteine in the Thumb Domain of

- Bacteriophage T7 DNA Polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), 39732–39741. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409235>
- TwistDx, 2018. TwistAmp® DNA Amplification Kits. Assay Design Manual. <https://www.twistdx.co.uk/support/manuals-and-software/twistamp/>
- Vandenberg, O., Martiny, D., Rochas, O., van Belkum, A., & Kozlakidis, Z. (2021). Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nature Reviews Microbiology*, 19(3), 171–183. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00461-z>
- Wang, J., Wang, J., Geng, Y., & Yuan, W. (2017). A recombinase polymerase amplification-based assay for rapid detection of African swine fever virus. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 81(4), 308–312. <https://doi.org/PMID:29081590>; PMID: PMC5644446.
- Wang, Y. (2004). A novel strategy to engineer DNA polymerases for enhanced processivity and improved performance in vitro. *Nucleic Acids Research*, 32(3), 1197–1207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh271>
- Weitzel, S. E., Baase, W. A., Michael, M. M., von Hippel, P. H., & Jose, Davis. (2015). Mapping the interactions of the single-stranded DNA binding protein of bacteriophage T4 (gp32) with DNA lattices at single nucleotide resolution: Polynucleotide binding and cooperativity. *Nucleic Acids Research*, 43(19), 9291–9305. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv818>
- Young, C. L., Britton, Z. T., & Robinson, A. S. (2012). Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. *Biotechnology Journal*, 7(5), 620–634. <https://doi.org/10.1002/biot.201100155>
- Zhai, B., Chow, J., & Cheng, Q. (2019). Two Approaches to Enhance the Processivity and Salt Tolerance of *Staphylococcus aureus* DNA Polymerase. *The Protein Journal*, 38(2), 190–198. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09818-7>

Zhang, Y., & Tanner, N. A. (2017). Isothermal Amplification of Long, Discrete DNA Fragments Facilitated by Single-Stranded Binding Protein. *Scientific Reports*, 7(1), 8497.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-09063-x>