

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



**Identificación y síntesis *in vitro* de proteínas inmunogénicas de membrana externa de *Histophilus somni* y evaluación como antígenos vacúnales en un chip de diagnóstico.**

**Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias presenta:**

**Marco Antonio Flores Rodríguez**

**Director:** Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez

**Co-Director:** Dr. Miguel Juan Beltrán García

**Mexicali, B. C.**

**JULIO 2013**

## Índice.

<b>Temas.</b>	<b>Pagina</b>
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Antecedentes.....	6
Infecciones respiratorias del ganado bovino.....	8
Factores de anatomía y fisiología.....	8
La pasteurolysis neumónica bovina.....	9
Manifestaciones clínicas.....	10
Diagnostico.....	11
Tratamiento y control.....	11
Vacunas.....	12
<i>Histophilus Somni</i> .....	14
Las herramientas de la biotecnología.....	15
Justificación e Hipótesis.....	18
Objetivo General y específicos.....	19
Esquema general metodología.....	20
<b>Materiales y métodos.</b>	
Cultivo Bacteriano de <i>H. Somni</i> y extracción de proteínas de membrana externa por método de Sarcosil.....	21
Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE), Ensayos de Western Blot y electrotransferencia.....	22
Western blot.....	23
Espectrometría de masas de Maldi-TOF MS y Análisis <i>in Silico</i> .....	24
Reglas para el diseño de los primers.....	25
Extracción de ADN Genómico .....	27
Secuencia del gen de la Porina de 41.8 kDas .....	28

Ensayos de PCR.....	29
Secuencia del gen de la OMP 0520 25.0 kDas .....	31
Secuencia del gen de la OMP6 de 14.85 kDas.....	33
Clonación.....	36
Inducción de síntesis de proteínas recombinantes .....	39
Purificación de las recombinantes.....	41
Inmunización de ratones .. ..	43
Cuantificación de anticuerpos por ensayo tipo ELISA .....	44
CHIP de Diagnostico.....	47

## Resultados

Electroforesis y Western blot con proteínas de membrana externa (OMPs) de <i>H.somni</i> .....	49
Secuencias de las proteínas de membrana identificadas.....	50
Proteína Porina.....	51
Proteína OMP 0520.....	52
Evaluación de sueros de la proteína OMP 0520.....	53
Ensayos de Elisa de la proteína OMP 0520.....	54
Proteína OMP6.....	58
Evaluación de sueros de la proteína OMP6.....	59
Ensayos de Elisa de la proteína OMP6.....	60
Chip de diagnostico.....	64
Discusiones.....	65
Conclusiones.....	68
Apéndice	
Protocolos	
Preparación de muestras y soluciones, uso de Kits.....	70
Agradecimientos.....	82
Bibliografía.....	83

## Resumen

Existe un gran número de enfermedades respiratorias que se presentan en el ganado bovino y afectan significativamente su producción y explotación comercial, una de estas enfermedades es el Complejo Respiratorio Bovino (CRB). El CRB es responsable de cuantiosas pérdidas económicas en la industria ganadera lechera y de engorda de ganado bovino (Griffin, 1997). La falta de un método eficiente para la prevención de la enfermedad, particularmente vacunas efectivas contra los patógenos causantes del CRB han motivado la búsqueda de nuevas vacunas o el mejoramiento de las existentes para hacerlas más eficaces. La identificación de nuevos antígenos como los identificados en el presente trabajo podrían contribuir de manera importante al desarrollo de nuevas vacunas más eficientes basadas en estos antígenos. En el presente trabajo se realizó con un enfoque inmunoproteómico con el objetivo de identificar proteínas inmunogénicas de membrana externa de *Histophilus somni*, realizar la síntesis *in vitro* de dichas proteínas y evaluarlas en ratones como antígenos vacúnales y en un chip de diagnóstico para la detección de la infección por *H. somni*, los resultados muestran datos no antes publicados con la identificación de tres proteínas inmunogénicas de membrana externa (OMP) nombradas e identificadas como Porina, OMP0520 y OMP6 los genes de estas proteínas fueron amplificados y clonados, expresados en forma recombinante y las proteínas purificadas fueron evaluadas como antígenos en ratones, las OMP 0520 y OMP6 presentaron la propiedad de inducir una respuesta inmune de tipo humoral en los ratones y se demostró que son capaces de identificar en un chip de diagnóstico.

## Abstract

There are a number of respiratory diseases that occur in cattle and significantly affect their production and commercial exploitation of these diseases is the Bovine Respiratory Disease Complex (CRB). The CRB is responsible for economic losses in the livestock industry of dairy and feedlot cattle (Griffin, 1997). The lack of an efficient method for the prevention of disease, particularly effective vaccines against the pathogens causing the CRB have motivated the search for new vaccines or improving existing ones to make them more effective. The identification of new antigens such as those identified in this study could contribute significantly to the development of new more efficient vaccines based on these antigens. The present study was conducted with a focus inmunoproteómico with the goal of identifying immunogenic outer membrane proteins of *H. somni*, the synthesis of these proteins in vitro and evaluated in mice as vaccine antigens and diagnostic chip for detection of infection by *H. somni*, the results show no previously published data with the identification of three immunogenic outer membrane proteins (OMP) named and identified as Porina, OMP6 OMP0520 and genes of these proteins were amplified and cloned, recombinantly expressed and purified proteins were evaluated as antigens in mice, submitted OMP6 OMP 0520 and property of inducing a humoral immune response in mice and shown to be capable of being identified in a diagnostic chip.

## Antecedentes

El CRB es una enfermedad que puede ser ocasionada por varios agentes infecciosos, ya sean virus o bacterias y que en combinación con el estrés desencadenan un conjunto de síntomas que caracterizan a esta enfermedad (Frank, 1989). Las enfermedades respiratorias del ganado son la principal causa de morbilidad y mortandad en las explotaciones bovinas (Contreras, 2005; Piojan y col., 1999; Edwards, 1996; Vogel y Parrott, 1994). El CRB es una de las enfermedades que provoca mayores pérdidas económicas tanto en México como a nivel mundial (Trigo y González, 2002; NASS, 1992). En 2003 se estimaron pérdidas aproximadamente de 800 millones de dólares anuales para el sector de producción bovina y para el sector veterinario de Estados Unidos de Norte América (Trigo y González, 2002; Griffin, 1997). Dentro de estas enfermedades se encuentra el complejo respiratorio bovino (CRB) o "fiebre de embarque", término general para la neumonía que se presenta en el ganado recientemente transportado o estresado. También se debe de considerar que hay otros tipos de eventos estresantes como son: el destete, descorné, hacinamiento y cualquier movimiento en el ganado que comprometan al sistema inmune del animal, lo cual puede presentarse en diversas patologías como: afecciones respiratorias, conjuntivitis, cefaleas e incluso ocasionar abortos, lo cual puede presentarse de forma aislada o en combinaciones (Frank, 1989; Trigo, 1987). Muchos animales desarrollan la enfermedad pero no pueden ser identificados como enfermos y se consideran en estado subclínico. Sin embargo, este grupo de animales no se desarrollan normalmente en peso y talla en comparación con los animales sanos (Bateman y col., 1990). El contagio proviene de animales infectados subclínicamente, la transmisión es por aerosoles y contacto directo, ya que se elimina por descargas nasales y penetra por respiración.

El CRB puede ser ocasionado por varios agentes infecciosos, ya sean virus o bacterias, que en combinación con el estrés desencadenan un conjunto de síntomas que caracterizan a esta enfermedad (Frank, 1989).

Dentro de los algunos agentes etiológicos causales de la enfermedad, se encuentran cuatro virus claves: 1) DVB (diarrea viral bovina), 2) IBR (rinotraqueitis infecciosa bovina), 3) VRSB (virus respiratorio sincital bovino) y 4) PI3 (parainfluenza-3). Además de tres bacterias que son las que producen las principales lesiones pulmonares: 1) *Mannheimia haemolytica* serotipo A1, 2) *Pasteurella multocida* y 3) *Histophilus somni* (Trigo, 1987; Yates, 1982). *H. somni* y *P. multocida* son bacterias que se encuentran presentes en el tracto respiratorio sin causar enfermedad alguna y se consideran como habitantes normales del mismo. Sin embargo, cuando existe una combinación de estrés o infección viral se convierten en agentes terminales de la enfermedad y llegan a causar la muerte del ganado (Trigo, 1987). *H. somni* es un bacteria gram-negativa, en forma de bacilos inmóviles y no forma esporas [www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomía]. Se diferencia bioquímicamente de la *P. multocida* porque no produce indol, pero sí una zona estrecha de hemólisis.

Aunque los papeles de los diferentes agentes etiológicos y los factores de estrés como causantes de la enfermedad no se conocen lo suficientemente bien, se sabe que las especies de los géneros *Pasteurella* y *Manheimia* son parte de la flora normal del tracto respiratorio superior, pero en condiciones favorables descienden hasta los bronquiolos terminales y alveolos donde producen las lesiones; y como resultado se presenta una bronconeumonía fibrinosupurante y necrotizante (Wang *et. al.*, 1999). Pero en condiciones normales el pulmón se encuentra relativamente libre de estas bacterias (Gilka *et al.*, 1974). Una explicación es que una combinación de infecciones virales de las vías respiratorias e influencias desvitalizantes provocadas por el transporte, ayuno temporal, destete, descorné, hacinamiento, infecciones virales, rápidas fluctuaciones en el clima, la mezcla de ganado de diversos orígenes y el molestar a los animales en exceso tras la llegada de los nuevos lotes, en conjunto pueden favorecer al aumento de la virulencia y la cantidad total de *Pasteurella/Mannheimia* en la nasofaringe. Después es inhalada, y llega a los alveolos pulmonares, y no es eliminada con eficacia donde puede causar la enfermedad (Blood & Radostits, 1992).

## **Infecciones respiratorias en el ganado bovino.**

Las infecciones respiratorias en el ganado pueden ser divididas en tres principales categorías (Bagley, 1997):

1.-Infecciones de tracto respiratorio superior. Este tipo de infecciones causan inflamación de garganta (faringe), fosas nasales, y tráquea. Los signos clínicos incluyen secreción nasal, tos moderada, fiebre y reducción de apetito.

2.-Difterias. Esta infección se desarrolla en la laringe e involucra la caja vocal del animal, puede presentarse por sí sola o acompañada de otras infecciones respiratorias. Normalmente se escuchan ruidos durante la respiración y la inflamación de la laringe llega a ser tan severa, que restringe el flujo de aire y puede causar la muerte.

3.-Neumonías. Son infecciones del tracto respiratorio inferior (pulmones), normalmente debidas a una prolongada infección de los tractos respiratorios superiores o a una falla en los mecanismos de defensa encargados de proteger los pulmones del animal. Causa síntomas más severos que las ya mencionadas infecciones de tracto respiratorio superior. El Complejo Respiratorio Bovino (CRB) es una de las más representativas de este grupo de infecciones.

### **Factores de anatomía y fisiología.**

Los bovinos están en total desventaja comparativamente con otras especies animales en cuanto a su capacidad respiratoria. Se han determinado una serie de diferencias que predisponen al bovino a padecer con mayor facilidad las neumonías y una mayor dificultad para corregirlas. Entre estos factores predisponentes se encuentran:

1.- La pleura del pulmón del bovino es más gruesa que la de otras especies animales, lo que la hace menos distensible y por lo tanto se requiere de un mayor esfuerzo para captar un volumen determinado de aire.



2.- La proporción del tamaño del pulmón con relación al peso corporal del bovino es menor comparativamente que la que se obtiene en otras especies, lo que hace, esfuerzo extra para oxigenar el mismo volumen corporal.

3.- Angulo traqueo bronquial, la unión de la tráquea con los bronquios en el caso del bovino es casi en ángulo recto, lo que ocasiona que las secreciones se acumulen en este punto, ocasionando una obstrucción y dificultad tanto para respirar como para expectorar. Es común observar en animales que murieron de neumonía un tapón de secreción en esta zona anatómica.

4.- Menor número de macrófagos alveolares Comparativamente con otras especies existe un menor número de macrófagos alveolares/mm<sup>3</sup> en el pulmón del bovino, lo que representa una menor capacidad defensiva ante el ataque de gérmenes patógenos.

5.- Menor presión para el intercambio gaseoso. A nivel alveolar para el intercambio de oxigenación en la mayoría de las especies la presión gaseosa es de 95 mm de Hg, mientras que en el bovino es de 85 mm, es decir 10 mm menos que son necesarios para una mejor oxigenación.

### **La Pasteurelosis Neumónica Bovina**

La Pasteurelosis Neumónica Bovina (PNB), una de las enfermedades causantes del CRB, es la mayor causa de mortalidad en vacuno de engorda en Norteamérica (Blood y Radostits, 1992). La PNB es una enfermedad que se caracteriza por la aparición de bronconeumonía grave y pleuritis, y se manifiesta principalmente en bovinos jóvenes a las pocas semanas de ser sometidos a un estrés grave (Quinn *et al.*, 2005). Sin embargo, puede atacar a animales de todas las edades (Blood y Radostits, 1992). La PNB se relaciona por lo general con *Manheimia haemolytica* e *Histophilus somni*, aunque también se ha aislado *Pasteurellosis multocida* a partir de los pulmones de bovinos infectados (McVey, 2007; Yates, 1982; Purdy *et al.*, 1997). Como *M. haemolytica*, *P. multocida* e *Histophilus somni* son los

principales agentes etiológicos asociados al CRB en los lotes de engorda bovina (McVey, 2007) se entiende que la pasteurelosis neumónica bovina es la principal enfermedad responsable del CRB en tales situaciones. Por ello, la mayoría de los autores utiliza los términos Complejo Respiratorio Bovino (CRB), Pasteurelosis Neumónica Bovina (PNB) y fiebre de embarque como sinónimos de una enfermedad respiratoria mediada por el estrés que resulta en un bronconeumonía.

### **Manifestaciones Clínicas**

El estrés provoca una inmunodepresión que vuelve al animal más susceptible a enfermedades bacterianas y virales, desencadenando así la enfermedad. Entre los síntomas clínicos de la PNB se incluye una aparición súbita de fiebre, depresión, anorexia, taquipnea (aumento de la frecuencia respiratoria) y descarga nasal serosa; normalmente en las infecciones mixtas se produce tos y descarga ocular (Dagleish, 1990). La enfermedad suele aparecer en los bovinos entre 10 y 14 días después de sufrir estrés. Las muertes súbitas sin signos previos, puede ser el primer síntoma de un brote. Durante un brote, los animales en etapas tempranas no parecen enfermos cuando se examinan a distancia, pero si cada animal se examina cuidadosamente, hasta un 10% tendrá fiebre sin ningún otro síntoma aparente. A estos animales, que no muestran síntomas clínicos pero que presentan la enfermedad, se les conoce como enfermos subclínicos (Blood y Radostits, 1992). El curso de la enfermedad suele ser corto, de 2 a 4 días. Si se tratan rápido, se recuperarán en un plazo de 24 a 48 horas, pero los casos graves y aquellos que hayan estado enfermos durante varios días antes de iniciarse el tratamiento, puede morir o convertirse en enfermos crónicos a pesar de que se haga un tratamiento prolongado. Los brotes de los establos pueden durar 2 o 3 semanas o más después de la aparición del primer caso (Blood & Radostits, 1992).

## Diagnóstico

La diferenciación de las enfermedades que componen el CRB es difícil e imprecisa, por lo que la respuesta al tratamiento puede ser variable. La principal dificultad con que se enfrenta el clínico es hacer un diagnóstico etiológico, basado en datos clínicos epidemiológicos. Idealmente el tratamiento y el control deben ser específicos, pero dada la dificultad de un diagnóstico preciso se toman medidas provisionales hasta que un análisis de laboratorio determine el agente causal (Blood y Radostits, 1992). Los principales datos clínicos de referencia para realizar un diagnóstico de la CRB son: una historia clínica de exposiciones a factores estresantes y el comienzo repentino de una sintomatología respiratoria, hallazgos anatopatológicos macroscópicos, preparaciones con citosporina obtenidas a partir de lavados bronco alveolares que normalmente revelan grandes cantidades de neutrófilos y el aislamiento de *M. haemolytica* con frecuencia en asociación con otros patógenos (Quinn *et al.*, 2005).

## Tratamiento y Control

El tratamiento de la CRB se basa en la experiencia clínica ya que no se dispone de ninguna información publicada que se base en pruebas clínicas de campo (Blood & Radostits, 1992). Existe información, aunque limitada, sobre la eficacia de algunos antibióticos en la enfermedad inducida experimentalmente. Si el ganado afectado se trata con un antimicrobiano como la oxitetraciclina, trimetoprim-sulfamidas, cloranfenicol y penicilina, un 85-95% se recuperará antes de las primeras 24 horas (Janzen *et al.*, 1984). Usualmente un único tratamiento es suficiente, pero animales muy enfermos requerirán de hasta tres veces al día durante tres a cinco días. La elección del antibiótico dependerá de la economía y del éxito obtenido anteriormente. El control exitoso de un brote de CRB depende de un buen manejo y del uso de productos biológicos (como vacunas) y de antibióticos de forma profiláctica. En un lote donde muchos bovinos están involucrados, un paso importante en el tratamiento es la identificación temprana y

efectiva de los animales afectados. Se deben separar del establo, examinar, tratar e identificar con una marca adecuada. Cada animal afectado debe tratarse clínicamente de forma individual, lo cual es útil para controlar un brote. Si el número de casos nuevos cada día fluctúa, una medicación en grupo tratará casos durante las etapas subclínicas y puede prevenir nuevas infecciones (Blood y Radostits, 1992).

### **Vacunas**

Aunque algunos autores han concluido que existen pocos datos documentados que justifiquen la utilización de vacunas contra la enfermedad bajo condiciones de engorda (Martin, 1983), el uso de vacunas contra *Histophilus somni* han sido utilizados numerosos datos experimentales han corroborado el efecto inmunoprotector de antígenos *Histophilus somni* (Pandher *et al.*, 1998; Nardini *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2008; Weldon *et al.*, 1994; Morton *et al.*, 1995). Sin embargo no han sido completamente satisfactorias (Martin, 1983), estudios de vacunas comerciales concluyen que no confieren una óptima protección contra CRB (Srinand *et al.*, 1996).

Algunos ejemplos de vacunas comerciales que se venden en nuestro país son de la compañía mexicana Biozoo S.A de C.V. (Guadalajara, Jal.) llamada BIOVAC-11 vías compuesta por bacterias inactivadas de *M. haemolytica*, *Clostridium*, *P. multocida* e *H. somni*, que se utilizan para prevenir enfermedades del CRB, pasteurellosis, clostridiasis y hemofiliosis; Otra empresa michoacana (LAPISA) comercializa otra vacuna también preparada con bacterias inactivadas y recomendada contra este complejo; Presponse® MH es una vacuna que contiene extractos de cultivo de *P. multocida* y toxoides (leukotoxina) de *M. Haemolytica*. Otras compañías comercializan vacunas virales contra el herpes virus bovino-1 para combatir el CRB, como Rhinogard (Qvax Pty Ltd) y Pestigard (Pfizer).

Las proteínas de membrana externa y antígenos de superficie son importantes para una protección contra la enfermedad. Numerosos reportes han indicado que proteínas de membrana externa (OMP) de *M. Haemolytica* son antígenos importantes para una respuesta inmune y confieren protección contra la PNB

(Confer *et al.*, 1990; Morton *et al.*, 1995; Sreevatsan *et al.*, 1996). Análisis estadísticos revelan que vacunas compuestas de OMP y otros antígenos de superficie confieren la mejor protección, inclusive igual que con vacunas vivas, al retar bovinos con *M. haemolytica* (Srinand *et al.*, 1995). Al menos para una proteína, el mecanismo por el cual las OMP expuestas inducen protección, es por muerte mediante la activación del complemento mediada por anticuerpos contra antígenos de superficie (Pandher *et al.*, 1998). Otros estudios (en *P. multocida*) señalan la importancia de muerte cuando se trata de antígenos de superficie (LPS y OMP), por medio de opsonización de anticuerpos y fagocitosis de macrófagos (Adler, 1996).

La administración de antibióticos como la oxitetraciclina, la clorotetraciclina acompañados o no de sulfametacina, lo cual reduce de manera significativa la mortalidad causada por el CRB; sin embargo, no ha demostrado ser un profiláctico efectivo (Van Donkersgoed *et al.*, 1994<sup>1</sup>; Reeks *et al.*, 2005).

Los esfuerzos realizados para evitar trastornos derivados de la presencia de *H. somni* se centran en desarrollar una vacuna bacteriana a partir de organismos muertos o vivos atenuados. Aunque se han logrado desarrollar detoxificaciones del lípido A (que produce choque anafiláctico en el ganado), preparaciones exclusivamente hechas a base de antígenos de membrana como la MOMP (Major Outer Membrane Protein) de 40 kDa y su respuesta antigénica ha sido aceptable, ninguna ha demostrado conferir una protección suficientemente efectiva como para garantizar la prevención de la enfermedad a gran escala (Groom y Little, 1988; Silva y Little, 1990; Inzana y Todd, 1992; Van Donkersgoed *et al.*, 1994<sup>1</sup>; Van Donkersgoed *et al.*, 1995). Actualmente existen dos tipos de vacunas que se utilizan en el ganado de engorda contra el CRB; vivas (atenuadas) y muertas (no infecciosas), las desventajas que tienen las vacunas vivas son: pueden revertir la virulencia y causar enfermedad y abortos. Las vacunas muertas requieren de una dosis grande, inmunizaciones múltiples y el uso de adyuvantes que pueden causar irritación en el sitio de inyección, además de generar una respuesta inmune pobre de corta duración. Por lo que es necesario desarrollar nuevas vacunas que

confieran protección por largos periodos de tiempos, una vacuna unitaria constituida por un solo antígeno podría ser un buen candidato, considerando que cuando se utilizan células completas vivas (atenuadas) o muertas algunos antígenos pueden actuar como inmunosupresores de la respuesta inmune (Martin, 1983).

### ***Histophilus somni.***

Las especies pertenecientes al género *Haemophilus*, han sido descritas como bacilos gram-negativos, oxidasa positivas y pleomórficos. Este género alberga especies patógenas tanto para humanos (*H. influenzae*) como para animales e incluso organismos comensales sin asociación a alguna enfermedad (Harris y Janzen, 1989; Kwiecien y Little, 1991).

Algunos de los factores de virulencia de *H. somni* han sido descritos, incluyendo una familia de receptores de tipo fc (fracción cristalizable de anticuerpos) periféricas de alto peso molecular que les permite evadir la respuesta inmunológica del animal (Corbeil *et al*, 1997; Siddaramppa e Inzana, 2004). Estas proteínas de unión a inmunoglobulinas (IgBP's, del inglés Inmunoglobulin-binding proteins), tienen una fuerte afinidad hacia las IgM, IgA e IgG de los bovinos (Batista *et al*, 1999; Yarnall *et al*, 1988; Corbeil, 2007), la importancia de estas proteínas en la patogénesis de esta bacteria, está demostrada por su ausencia en aislados de sueros de animales subclínicos/portadores (presentan desarrollo bacteriano, mas no los síntomas característicos de dicho proceso), (Cole *et al*, 1992; Cole *et al*, 1993). Otra propiedad de *H. somni* que contribuye a su virulencia es la habilidad para sobrevivir a los sistemas de defensa de los macrófagos bovinos, se ha aislado *H. somni* de vacuolas unidas a membrana de macrófagos alveolares de ganado infectado experimentalmente. La estimulación de estos macrófagos por medio de Lipopolisacarido (LPS) o citocinas bovinas como el IFN- $\gamma$ , la IL-1 $\beta$ , y el TNF- $\alpha$ , disminuyó pero no erradicó la población intracelular (Gomis *et al*, 1998). Esto se comprueba "*in vitro*" (en cultivo) observando cómo *H. somni* inhibe la producción de oxido nítrico y el anión superóxido por parte de

macrófagos alveolares (Gomis *et al*, 1997; Howard *et al*, 2004). Finalmente, el análisis de la interacción de *H. somni* con leucocitos polimorfonucleares de bovino “in vitro” sugiere que puede inhibir la fagocitosis de neutrófilos (Pfieffer *et al*, 1992; Yang *et al*, 1998).

Las vacunas comerciales contra *Histophilus somni* utilizadas para proteger al ganado de la enfermedad de la PNB que está muy asociada al CRB han demostrado tener cierto grado de eficacia, sin embargo su efectividad no ha sido completamente satisfactoria (Martin, 1983; Srinand *et al.*, 1996). Por ello aún se trabaja en el diseño de nuevas y desarrollo de nuevas vacunas compuestas exclusivamente por antígenos de protección que sean más eficaces.

Las proteínas inmunodominantes de membrana externa de *Histophilus somni* son buenas candidatas para evaluarse como vacunas unitarias y se podría comparar su eficiencia contra bacterianas comerciales que actualmente se comercializan en nuestro país. Análisis estadísticos revelan que vacunas compuestas de OMP y otros antígenos de superficie confieren la mejor protección, inclusive igual que con vacunas vivas, al retar bovinos con *M. haemolytica* (Srinand *et al.*, 1995).

### **Las herramientas de la biotecnología**

Durante la segunda mitad del siglo XX se lograron importantes avances en la biología, que fueron esenciales para el desarrollo de la biotecnología. Uno de los más importantes fue la determinación de la estructura de doble hélice del ADN.

Este hecho, que les valió a los investigadores James Watson y Francis Crick el premio Nobel de medicina en 1962, permitió comprender cómo el ADN determina los caracteres de un individuo y cómo se transmiten de una generación a la siguiente. A partir de este hecho se pudo conocer que todos los organismos, desde los más simples hasta los más complejos, tienen un código genético común. Esto significa que el ADN de un organismo está “escrito” en un código que puede ser interpretado y traducido por las células de otros organismos. Se conoció que la información genética en todas las células se traduce a proteínas,

componentes fundamentales que desempeñan una gran diversidad de funciones. Entre ellas las enzimas, que son proteínas que catalizan (aceleran) reacciones químicas en los seres vivos. A comienzos de los años 70 se descubrieron diversas enzimas en bacterias y virus, que fueron de gran ayuda para la biotecnología. En ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante, se utilizan estas enzimas para cortar y aislar un gen determinado -que tiene información para fabricar una proteína particular- e introducirlo en las células de un organismo distinto del inicial. En consecuencia, este organismo tendrá ADN recombinante a partir del cual fabricará una nueva proteína. A la cual se le denomina proteína recombinante. La recombinación de genes en el ADN de bacterias es una de las posibilidades que ofrece la biotecnología, y que posibilita obtener proteínas recombinantes con fines terapéuticos. Por ejemplo, insulina humana obtenida a partir de la bacteria *Escherichia coli*. Esta técnica es de gran valor porque las bacterias se reproducen rápidamente y pueden duplicar su número cada 20 minutos. De esta forma se pueden obtener en poco tiempo muchas copias del gen humano inserto en el ADN bacteriano, y producir grandes cantidades de proteínas recombinantes.

A escala industrial, la producción de proteínas recombinantes involucra las siguientes etapas:

- **Fermentación:** las bacterias son cultivadas en tanques sellados (fermentadores) que contienen un medio de cultivo nutritivo.
- **Extracción:** las células son centrifugadas para recuperar las proteínas de su interior.
- **Purificación:** se separa la proteína recombinante de las otras proteínas bacterianas.
- **Formulación:** la proteína recombinante es modificada para conseguir una forma estable y estéril que puede administrarse terapéuticamente.

Cada una de las fases de la elaboración implica un manejo muy cuidadoso de los materiales y un estricto control de calidad para optimizar la extracción, la pureza, la actividad y la estabilidad de la proteína.

Dependiendo del producto y del tipo de célula utilizada, la producción de proteínas



recombinantes puede ser un proceso simple o más complejo. Aunque la complejidad del proceso aumentaría el costo final del producto, el valor nunca sobrepasará al gasto de aislar el compuesto desde su fuente original (por ejemplo, obtención de insulina a partir de páncreas de porcinos o bovinos) para llegar a cantidades medicinales. La ingeniería genética permite que numerosas proteínas potencialmente terapéuticas, que antes se producían solo en pequeñas cantidades, puedan elaborarse en grandes cantidades. En la actualidad existen más de 30 proteínas aprobadas para su uso clínico, y cientos de genes de proteínas terapéuticas que se han expresado a nivel de laboratorio y que están intentando demostrar su uso en el área clínica.

## Justificación

El CRB es una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria ganadera. Afecta de forma importante al ganado bovino ya que es una de las tres principales causas de muerte en la etapa de lactancia. Por lo que su diagnóstico y tratamiento oportuno tiene gran relevancia, para evitar la diseminación y prolongación de la enfermedad, la disminución en la producción de los animales, los gastos en medicamentos y médicos veterinarios, así como la muerte de animales.

La identificación y caracterización de proteínas inmunodominantes de la bacteria *H. somni*, permitirá realizar la amplificación, clonación, expresión y purificación de las proteínas identificadas como antígenos útiles para evaluarlas en la detección de la infección de bovinos por esta bacteria. Además, las proteínas recombinantes obtenidas podrán constituirse como candidatas a vacunas una vez que se evalúen en ratones y demuestren que funcionan en la inducción de una respuesta inmune humoral, por lo tanto, podría coadyuvar al desarrollo de una vacuna efectiva contra *H. somni* uno de los principales agentes etiológicos causantes de la enfermedad CRB.

## Hipótesis

Existen OMPs inmunogénicas de *H. somni* que no han sido estudiadas, como moléculas útiles en el diagnóstico de la enfermedad estas proteínas pueden mediante ingeniería genética en forma recombinante y pueden ser evaluadas como antígenos vacunales.

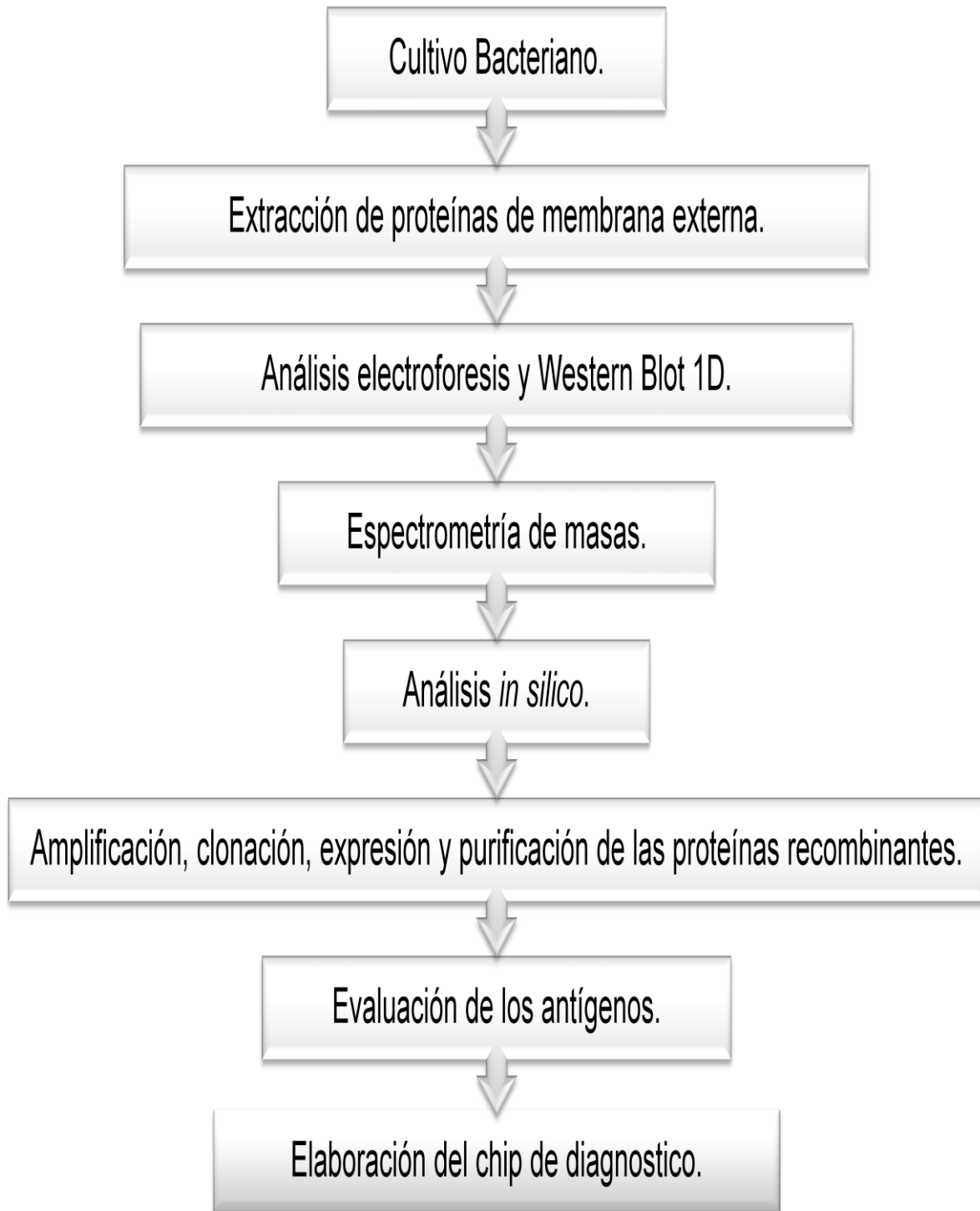
### **Objetivo general:**

Identificar, caracterizar y sintetizar *in vitro* proteínas inmunogénicas de membrana externa de *H. somni* y evaluarlas como vacuna y en un chip de proteínas para la detección de anticuerpos específicos contra *H. somni*.

### **Objetivos específicos**

1. Identificar y caracterizar los perfiles de proteínas inmunogénicas de membrana externa de *H. somni* por medio de electroforesis y Western blot en una dimensión (1D) y mediante Espectrometría de masas (MS).
2. Identificar los genes que codifican para dichas proteínas mediante análisis *in silico*, amplificar y clonar los genes identificados, expresar y purificar las proteínas recombinantes.
3. Evaluar como vacunas en ratones BalbC las proteínas recombinantes sintetizadas *in vitro*.
4. Construcción del chip de proteínas recombinantes.
5. Evaluación del chip para la detección de anticuerpos contra *H. somni*.

# Metodología



## **Materiales y métodos**

### **Cultivo bacteriano *H. somni*.**

Viales congelados de *Histophilus somni* (**ATCC 43626**), se cultivaron en medio BHI (infusión de cerebro corazón) líquido a 37°C en una atmósfera con 10% de CO<sub>2</sub>. Después de 48 horas, las pastillas bacterianas fueron recuperadas por centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos. Una vez obtenidas las pastillas, se lavaron con amortiguador PBS y se utilizaron en el momento o bien se congelaron a -72°C.

### **Extracción de proteínas de membrana externa (sarcosil)**

Se llevo a cabo un protocolo de extracción de proteínas de membrana externa con N-laurilsarcosinato de sodio (sarcosil), previamente descrito (Newton et al., 1990) con algunas modificaciones. Las pastillas celulares se lavaron tres veces con PBS y una vez con amortiguador Hepes 10 mM pH (7.4) Las células se centrifugaron a 12000 x g durante 20 min. Y se resuspendio la pastilla en Hepes 10 mM pH (7.4). La pastilla resuspendida se llevo a ultrasonicacion durante 40 min con diez pulsos de intensidad con lapsos de 30 segundos y 30 segundos de descansó en hielo.. Después se centrifugo a 10000 x g durante 15 min. A 4° C. El sobrenadante se conservo y se centrifugo a 120000 x g durante 45 min a 4° C. Después de este paso el sobrenadante se desecho y la pastilla se resuspendio en 1 ml de Hepes 10 mM de N-lauril sarcosinato de sodio al 2 % (P/V). Después se incubo las muestras a temperatura ambiente durante 30 min, y nuevamente se centrifugo a 120000 x g por 45 min. A 4° C. Finalmente se descarto el sobrenadante y la pastilla de proteínas de membrana externa se resuspendieron en un 1 ml de agua destilada de la marca (Bio-rad ultra pura libre de RNAs).

## **Electroforesis de proteínas en geles de poliacilamida (SDS-PAGE)**

La electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) se llevo a cabo con sistema Mini-Proteam tetra cell de (Bio-rad). Se prepararon geles de poliacrilamida de 7 cm de ancho por 8 cm de largo y 1.0 mm de espesor, en diferentes concentraciones de poliacrilamida (10-12%). Las muestras cultivos bacterianos se trataron con un buffer muestra 1X con BME (betamercapto etanol) ver apendice a una dilución 1-1 (V-V). Y se calentó a 100° C durante 5 min. También se puso un marcador de peso molecular de amplio rango de marca (Bio-Rad Laboratorios # cat1610309) y también se calentó como la muestra a 100° C por 5 min. Después los geles se corrieron con buffer de corrida 1X a 120 V constante 65 min. Posteriormente se tiño con azul brillante de coomasie, se tomaron fotografías de los resultados y se analizaron en el foto documentador de Bio-Rad® modelo Gel-Doc 2000XR.

## **Ensayos de Western Blot**

El protocolo para los ensayos de western blot que se describe a continuación se baso en (Towin et al, 1978 y Hawkes, 1982) con algunas modificaciones. Este proceso consta de tres pasos: la electroforesis de proteínas (descrita previamente), la electrotransferencia y los ensayos de inmunoblot.

## **Electrotransferencia**

A partir de geles SDS-PAGE de 1D en los que se separaron las proteínas de membrana (OMP) de *H. somni*, se llevo a cabo una la electrotransferencia para transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (NC). Se utilizo un equipo Mini-trans-blot (Bio-Rad laboratorios). La electrotransferencia se llevo a cabo a 120 V durante 60 min.

## Inmunoblot

Las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se bloquearon con amortiguador PBS tween 20 al 0.05 % V/V y leche en polvo descremada al 5 % P/V toda la noche a 4° C en agitación constante. Se lavaron con PBS-tween 20 al 0.1% 5 veces a temperatura ambiente con agitación manual vigorosa. Después del lavado, se incubaron toda la noche a 4° C y en agitación constante con suero (anticuerpo primario) de bovino inmunizado con bacterias de *histophilus somni* en dilución 1:250 en leche al 2.5 % en PBS Tween al 0.05 %. Se lavo con PBS Tween 20 al 0.1 % 3 veces a temperatura ambiente con agitación manual vigorosa. Se dejó incubando 3 hrs a temperatura ambiente en agitación constante con el anticuerpo secundario ratón anti IgG bovino acoplados a peroxidasa de rábano picante HRP (marca Jantzen), a una dilución de 1:2000 (WB-1D), en leche al 2.5 % en PBS tween 20 al 0.05 %. Se lavaron con PBS tween 20 al 0.01 % 5 veces a temperatura ambiente con agitación vigorosa. Se revelaron por el método de peroxidasa (ver apéndice). Finalmente las membranas se revelaron por quimioluminiscencia durante un periodo de entre 5-30 min.

En los ensayos de Western blot, para obtener el perfil de proteínas inmunogénicas de membrana externa se probaron sueros de animales vacunados o inmunizados con *H. somni*, para cada uno de los ensayos, siempre se realizaron dos geles en las mismas condiciones de porcentaje de gel y cantidad de muestra de proteínas corridas en cada uno de los pozos de los geles. Las proteínas inmunogénicas de membrana externa se seleccionaron en los ensayos de Western blot de 1D con su respectiva réplica teñida con azul de coomassie. Para calcular el peso aproximado de las proteínas se utilizó marcadores de peso molecular. Después se cortaron para ser identificadas por mapeo peptídico y análisis Maldi-TOF.

## **Espectrometría de masas de Maldi-TOF MS**

La espectrometría de Maldi-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-time-Of-Flight Mass spectrometry) se utilizó para realizar un análisis mediante un mapeo peptídico o huella de péptidos que se generan al digerir una proteína en particular, después de un proceso de digestión con (tripsina). El mapeo peptídico se utilizó como patrón para identificar a qué proteína conocida corresponde, al ser comparada con una base de datos. Esta técnica analítica requiere de un espectrómetro de masas, equipo con el cual no contamos, por tal motivo las proteínas cortadas de los geles se enviaron para su análisis en la universidad de Nueva York en USA.

### ***Análisis in Silico***

La base de datos del center of Biotechnology Information (NCBI) es de libre acceso y contiene, entre otra información, todas las secuencias nucleotídicas (genes, marcos de lectura abiertos, genomas completos ARN mensajero y cDNA) y aminoacídicas (de proteínas) que han sido publicadas. También contiene programas como BLAST, que permite comparar secuencias de interés contra las secuencias de la base de datos para encontrar homologías y dominios conservados. Los espectros de cada proteína, obtenidos con Maldi TOF MS, se compararon con los reportados en la base de datos NCBI para identificar a qué proteína pertenecen.



## Reglas para el diseño de los primers.

Reglas o consideraciones para el diseño de los primers

- 1) Que los iniciadores no tuvieran ninguna diferencia con respecto a la secuencia, a excepción de los utilizados para mutagénesis.
- 2) Que no hubiera algún sitio alternativo en la secuencia molde donde el oligonucleótido pudiera hibridarse.
- 3) Evitar secuencias que pudieran formar estructuras secundarias por sí mismas, pues esto dificultaría la unión de los oligonucleótidos al DNA muestra y podría ocurrir una auto amplificación.
- 4) Diseñar oligonucleótidos con longitud de 20 a 24 bases para reducir al mínimo la posibilidad de hibridación en sitios secundarios en el vector o inserto.
- 5) Evaluar la temperatura de fusión ( $T_m$ ) para tener una idea de temperatura de alineamiento que podría ser la mejor para nuestros oligos, podemos calcular la  $T_m$  de cada oligo que utiliza.  $T_m$  significa en ingles melting temperatura y se refiere a la que temperatura a la que se hibridan o se pegan los oligonucleótidos en los sitios que son complementarios. Este proceso dependerá principalmente del tipo de uniones (dobles o triples enlaces de hidrogeno) que formaran sus bases, y por eso la secuencia de cada oligo es la que se toma en cuenta para conocer cuál es la temperatura óptima para su alineamiento. La  $T_m$  de alineamiento es el mínimo de 55°C o más, de manera que este por arriba de la temperatura de anillamiento o hibridación.
- 6) Comprobar en las bases de datos que las secuencias de oligonucleótidos elegidas no se encontrara en algún otro lugar del genoma, lo que podría generar amplificaciones de regiones no deseadas.
- 7) Que los oligonucleótidos tuvieran un contenido de C/G entre 40 y 60%. Para oligonucleótidos con contenido menor al 50% de C/G, sería necesario incrementar la secuencia de los mismos para llevar la  $T_m$  sobre la temperatura de alineamiento.

- 8) Comprobar que los oligonucleótidos, fueran complementarios al DNA molde al menos en el extremo 3', por ser este el lugar de unión de la *Tag* polimerasa.

Además de considerar los puntos anteriormente mencionados también se utilizó el programa CLC MainWorkbench como ya se había mencionado antes para corroborar mejor diseño de los primers.

Basados en este programa se evaluaron las secuencias que fueron introducidas y se evaluaron para un correcto diseño de la secuencia iniciadora del gen y corroborando *in silico* el correcto diseño. A continuación las secuencias de los genes y el diseño de los primers los cuales se amplificaron por medio de ensayos tipo PCR (reacción de la cadena polimerasa) por sus siglas en ingles.

Los ensayos tipo PCR fueron realizados de manera individual para cada fragmento pero siguiendo la mismas condiciones de trabajo.

## Extracción de ADN Genómico.

La extracción de ADN (ácidos desoxirribonucleicos) que se uso como templado de *H. somni* fue extraído siguiendo el protocolo del fabricante del kit windzar Genomic DNA purificación (Promega) descrito en apéndice de este documento. Al finalizar la extracción del ADN, este se cuantifico en el equipo nano drop (ND 1000) y de acuerdo con las condiciones para realizar ensayos de PCR dio un rango aceptable de concentración (260.4 ng/μl) requerida para estos ensayos, posteriormente se llevo a cabo la reacción de PCR de forma individual para cada gen con las siguientes cantidades y diferentes condiciones del termociclador en las cuales se tuvieron que estandarizar para obtener buenos productos amplificados para después ser purificados y clonados . Cabe mencionar que a los primers o iniciadores se les agrega una secuencia adicional de 4 bases solo con el objetivo de hibridar perfectamente en el vector de clonación el cual no varía en nada la expresión de la proteína y de esta manera nuestro gen se pueda direccionar y tener la certeza que se respeta el marco de lectura del gen, y la secuencia mencionada es (CACC).

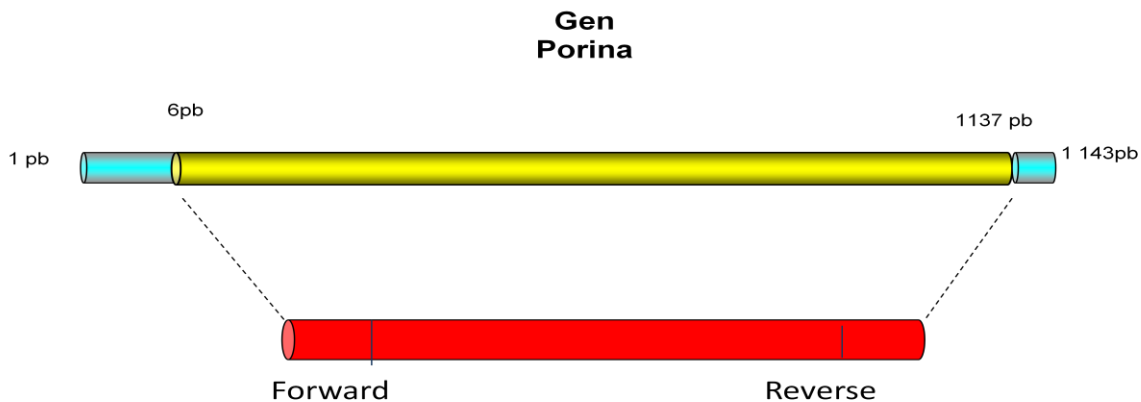
El gen de la proteína Porina tiene un tamaño de 1143 pb, se selecciono un fragmento de dicho gen del la base 6 a la base 1137 que da como resultado un amplicón de 1131 pb.

## Secuencia del gen Porina de 41.8 kDas

**ATG**AAAAAG**ACATTAGTAGCATTAGCGGTAGCG**GCAGTTGCGGCATCAGCAAACGCAACAACCTGTTTATAATC  
 AAAACGGTACCAAAGTAGATGTTGGCGGTTCGTATTGATGTAATGTTAGGTAAATTCGGTGATGCTCAACGTAC  
 CGATTTACGTAATAACAGCTCTCGTGTGGAGTTTAAAGCGGAGCATGAAGTACAAAACGGCTTAAAAGCAATC  
 GGTGCGGTTTCGTTTCGGGTTAGGTGATGCTGAAAAAGAAGATACATCTTTTAAACGACATCAAACCTTTCTAAAT  
 TATGGTTAGGCTTAAAACATAACGATATCGGTAAAGTAACTTTTCGGTAAACAAAATACCACTGCGGATGATGT  
 GCAATTAAATGATCATACTATATCTTTGGCGGTAACAACAACCTTGGTTACTTCCGGTGATAAAGTGGTGTCT  
 TTCCGTACAGCAGATATCCAATTAGCGGAAGGGCAAACCTTTAGGTTTTGGTGCTGATTATGGCTTCGGTGAAG  
 CACATAAAAAAGATATTCAAGGAAAGGATTTCAGACAAAAAACATGTTAAATTAAAAAATACTTACGGATTGTC  
 TCGGTTCTATACAGGTAATTTTGGTGATGTTAAGGTAAATGCCAATGCGGGTTATACAGTTCGTAACGAAAAAT  
 ACCAAAGTTGGTGTATTGCTTCTAAAACCTGATAATCAACAACAAGCTTGGCGTTTAGCAACGCAAGTAGAAT  
 TCGGACCGGCATCTTTTCGGTATTGAATACGGTCAAACAGTGTATCAATCTAAAGTTCAACACGAATTTCAAGG  
 TTCTGCTCGCTTTGTTGAAGTCGGTGCAAAAATATGCAGTATTACCGGATGTCTTAAATGTCTATACACAATGG  
 CAACGTAATAGTTTAAAGAAGTGCTAGTGATACTAGTGCTAAAAAATTTGAACAGCCTTTTGCACCTTTCTTATG  
 TAAAATTAGCTGACTTAGAGTTAGAAGAACATCAAAAAGCAGTACAAAACGTATTTATCGTCGGTGCTGACTA  
 TGCTTTTAAACAAAAATTTATTAGCCTATGCAGAATTTGCTAATAGCCGTGTTAAAGCACCTACAAAAGATAAA  
 AACGTGAGAGAAAGTTTCTAC**GCAGCAGGTTTACGTGTTTAC**TTC**TAA**

FORWARD: **CACC ATG**ACATTAGTAGCATTAGCGGTAGC

REVERSE: GTAAACACGTAAACCTGCTGC



**1131 pb**

En el esquema se muestra la secuencia del gen amplificado y en color rojo (extremos) la secuencia de los primers y el fragmento que se amplificó del gen.

## Ensayos de PCR

En todos los casos de ensayos tipo PCR se respetan las mismas cantidades de componentes, lo único que varía es el par de primers (forward y Reverse) específicos respectivamente para cada gen que se amplifica y las condiciones del termociclador.

En un tubo para PCR se colocan las siguientes cantidades de compuestos para realizar la mezcla para su respectivo gen.

Mezcla para la amplificación del gen PORINA con ensayos tipo PCR.

1 .0 µl DNA polimerasa. Enzima de alta fidelidad.

5.0 µl de buffer DNA polimerasa.

2.0 µl DNTP's 5mM

1.5 µl DNA genómico templado *H. somni*

1.5 µl primer forward. Gen Porina.

1.5 µl primer reverse. Gen Porina.

37.5 µl H<sub>2</sub>O Mili Q para alcanzar un volumen total de reacción de 50 µl.

Condiciones de termociclador para la gen PORINA.

Programa de reacción PCR

1 paso 5 min ----- 95°C

30 seg ----- 95° C

2 pasó 45 seg ----- 53.0°C TM 40 ciclos.

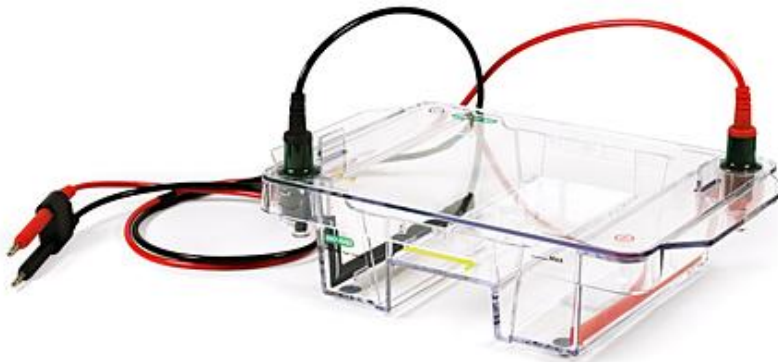
60 seg ----- 72 °C

3 paso 5 min ----- 72 °C

Sin tiempo ----- 4°C

Terminado el tiempo del termociclador nos dispusimos a preparar un gel de Agarosa al 1% con .4grs de agarosa en 40 ml de buffer TAE 1X calentándolo en horno de microondas unos 45 seg en agitación cada 15 segundos y al final agregar 4  $\mu$ l de colorante para ácidos nucleicos Sybr Safe y se dejara a temperatura ambiente hasta que esté listo y se cargara marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb plus de invitrogen y producto de PCR en relación 10:1 con buffer de Muestra (BM) en cada pozo del gel para observar si amplifico el gen.

La corrida del gel se llevara a cabo en cámara para electroforesis del geles de agarosa de la marca bio rad laboratorios con peine de 8 pozos la cual fue llenada de buffer TAE 1X nuevo para la corrida de electroforesis que se llevo a cabo a 80V constantes por periodo de 1Hr aproximadamente, ya terminada la corrida nos dispusimos analizar el gel en el analizador de imágenes de Bio rad laboratorios y tomamos la impresiones de los resultados.



La figura corresponde a la cámara utilizada para correr los geles de agarosa para los ensayos tipo PCR, de la marca Bio-Rad laboratorios.

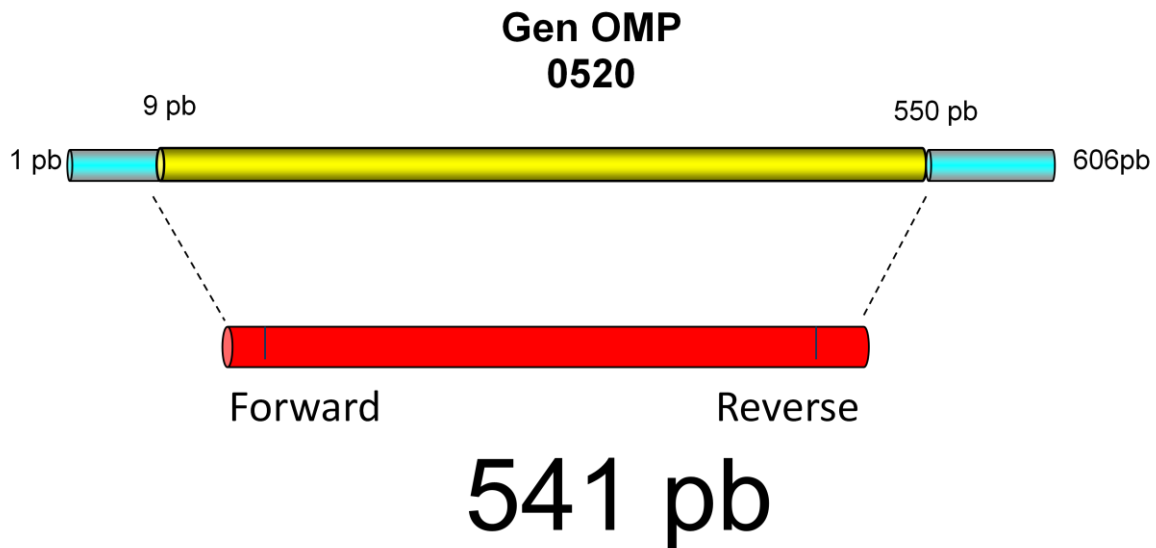
El gen de la proteína OMP0520 tiene un tamaño de 606 pb, se selecciono un fragmento de dicho gen del la base 9 a la base 550 que da como resultado un amplicón de 541 pb.

## Secuencia del gen OMP 0520 25.0 kDas

ATGAAAAAATA TCTATCGCTGCAACGGTATT ATTATCTTGCATGGCAAGTGGTGAATGGCACAAGATACTT  
TCACTGGCTTTTTTATGGGTGGAGAAGTTCATCATTCAAAACATGGTTATGAGGGTACGCTTTCTCAAACAGC  
AAAAAGCGAAACCCAAAAAATCAGGCAAAATAGGCTTTGGTTTATTCGGTGGTTACGGCTTTAATTTTGGT  
GACAGTAATTTTGTAGGT CAGGCAGAAGTAAAATTACGTACCGGCGGTTCAAAAATCACTTCTAATAACGAAC  
TACTATCCAAAGAAAAATTTCTTT CAGTGTGGCTATCTTCAAGGCTATCGCATTAGTAACAATTTTCATGCC  
GTATCTTAAAGTGAGTTTAAATAGTCATTTTTTATGATCTTAATGCCAAGAAAAATTTGTGATAGTTGCACCATA  
AAAGGAAACTCTGTTGTCGGTATTGGTGCTGCTGTAGGGGTAAAATATGCCGTAACGGATAAATTTGATGTGG  
GTGTTGAATATCAAA AAGTCTTCCTCCGCAATATAAAGG GCGATATTCGCTTCAAACCACAAAGCTTGTCATT  
GAGTGCAAGTTATTACTTCTAA

Forward: CACC ATGTCTATCGCTGCAACGGTATT

Reverse: CCTTTATATTGCGGAGGAAGACTT



En el esquema se muestra la secuencia del gen amplificado y en color rojo (extremos) la secuencia de los primers y el fragmento que se amplifico del gen.

Mezcla para la amplificación del gen OMP 0520 con ensayos tipo PCR.

1 .0 µl DNA polimerasa. Enzima de alta fidelidad.

5.0 µl de buffer DNA polimerasa.

2.0 µl DNTP's 5mM

1.5 µl DNA genómico templado *H. somni*

1.5 µl primer forward. Gen 0520

1.5 µl primer reverse. Gen 0520

37.5 µl H2O Mili Q para alcanzar un volumen total de reacción de 50 µl.

Condiciones de termociclador para la gen 0520.

Programa de reacción PCR

1 paso 5 min ----- 95°C

30 seg ----- 95° C

2 pasó 45 seg ----- 55.5°C TM 40 ciclos.

45 seg ----- 72 °C

3 paso 5 min ----- 72 °C

Sin tiempo ----- 4°C

Terminado el tiempo del termociclador nos dispusimos a preparar un gel de Agarosa al 1% con .4grs de agarosa en 40 ml de buffer TAE 1X calentándolo en horno de microondas unos 45 seg en agitación cada 15 segundos y al final agregar 4 µl de colorante para ácidos nucleídos Sybr Safe y se dejara a temperatura ambiente hasta que esté listo y se cargara marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb plus de invitrogen y producto de PCR en relación 10:1 con buffer de Muestra (BM) en cada poso del gel para observar si amplifico el gen.

La corrida del gel se llevo a cabo en cámara para electroforesis del geles de agarosa de la marca (Bio Rad) laboratorios para 8 pozos la cual se fue llenada de de buffer TAE 1X nuevo para la corrida de la electroforesis que se llevo a cabo a 80V constantes por periodo de 1h aproximadamente, ya terminada la corrida nos dispusimos analizar el gel en el analizador de imágenes de Bio rad laboratorios y tomamos la impresiones de los resultados.



El gen de la proteína OMP6 tiene un tamaño de 408 pb, se selecciono un fragmento de dicho gen del la base 22 a la base 405 que da como resultado un amplicón de 386 pb.

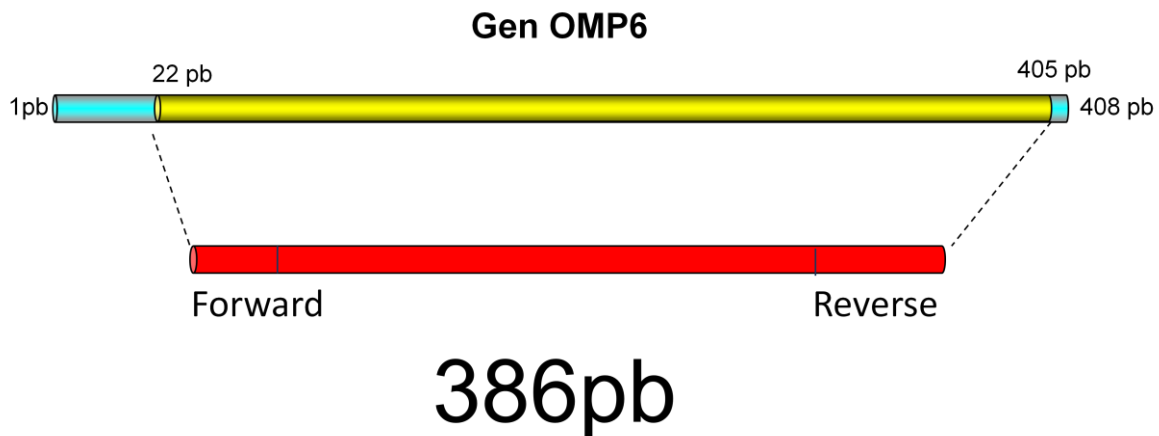
### Secuencia del gen OMP6 de 14.85 kDas

```

TTGGCAGCTTGTAGCTCATCT GATAACGCATCTAAAACAAATGCTCAAATGTTTGGCGGTTATTCTGTAA
CTGACTTACAACAACGTTATAATACAGTGTATTTTGAATTTGATAGTTATGATGTGCAGGGCGAATACGC
TCAAATCTTAGATGCACACTCAGCATACTTAAAGTCAACACCAGCTTCTAAAGTTCTTGTTGAAGGTCAT
GCTGATGAACGTGGTACTCCGGAGTATAACATGGCATTAGGTTTACGTCTGTGCTGATGCAGTAAAAAACT
TTTTATTAAATAAGGGTGTTCAGCTAGTCAACTTTCAACCCCTTCTTATGGTGAAGAGAAACCGGCAGA
GTTAGGTCATAATGAAGCTGCATATTCTAAGAACCGTCGTGCTGTATTAGCATACTAA
    
```

FORWARD CACC GATAACGCATCTAAAACAAATGCT

REVERSE: GTA TGC TAA TAC AGC ACG ACG



En el esquema se muestra la secuencia del gen amplificado y en color rojo (extremos) la secuencia de los primers y el fragmento que se amplifico del gen.

Mezcla para la amplificación del gen OMP6 con ensayos tipo PCR.

1 .0 µl DNA polimerasa. Enzima de alta fidelidad.

5.0 µl de buffer DNA polimerasa.  
2.0 µl DNTP's 5mM  
1.5 µl DNA genómico templado *H. somni*  
1.5 µl primer forward. Gen OMP6  
1.5 µl primer reverse. Gen OMP6  
37.5 µl H2O Mili Q para alcanzar un volumen total de reacción de 50 µl.

Condiciones de termociclador para la gen OMP6.

Programa de reacción PCR

1 paso 5 min ----- 95°C

30 seg ----- 95° C

2 pasó 45 seg ----- 56.5°C TM 40 ciclos.

60 seg ----- 72 °C

3 paso 5 min ----- 72 °C

Sin tiempo ----- 4°C

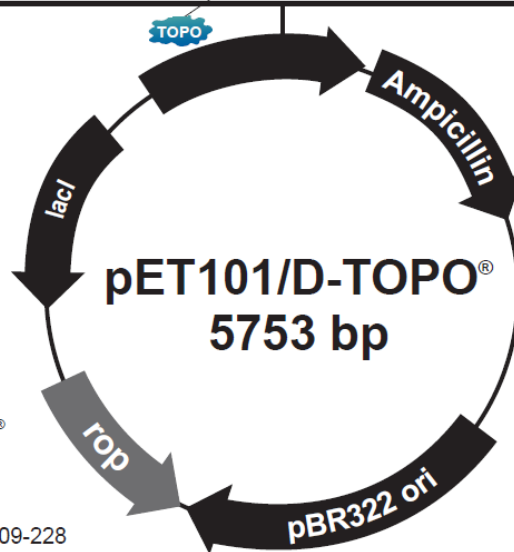
Terminado el tiempo del termociclador nos dispusimos a preparar un gel de Agarosa al 1% con .4grs de agarosa en 40 ml de buffer TAE 1X calentándolo en horno de microondas unos 45 seg en agitación cada 15 segundos y al final agregar 4 µl de colorante para ácidos nucleicos Sybr Safe y se dejara a temperatura ambiente hasta que esté listo y se cargara marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb plus de invitrogen y producto de PCR en relación 10:1 con buffer de Muestra (BM) en cada poso del gel para observar si amplifico el gen.

La corrida del gel se llevo a cabo en cámara para electroforesis del geles de agarosa de la marca bio rad laboratorios para 8 pozos la cual se fue llenada de de buffer TAE 1X nuevo para la corrida de la electroforesis que se llevo a cabo a 80V constantes por periodo de 1h aproximadamente, ya terminada la corrida nos disponemos analizar el gel en el analizador de imágenes de Bio rad laboratorios en el rango de luz ultravioleta y tomamos la impresiones de los resultados.

Una vez amplificados los segmentos de los genes por separado nos disponemos a purificarlos los productos de PCR mediante un kit Minielute PCR purificación de (Quiagen) protocolo descrito en el apéndice de este documento, se llevaron a cabo bajo las condiciones del fabricante y al termino del protocolo nos disponemos a cuantificar la concentración del producto de PCR en Nano drop espectrofotómetro de (ND 1000) laboratorios para determinar la cantidad que debemos de agregar a la reacción de clonación .

Cada gen amplificado (Porina, OMP 0520 y OMP6) se clonaron por separado en diferentes tiempos en el vector de clonación PET-101-D topo de 5753 pb de la marca invitrogen, los ensayos de clonación se prepararon según las condiciones del fabricante (manual del kit) que consiste en realizar una mezcla con los siguientes compuestos.

Mapa del vector Pet 101-D topo de 5753 pb.



**Comments for pET101/D-TOPO®  
5753 nucleotides**

- T7 promoter: bases 209-225
- T7 promoter priming site: bases 209-228
- lac* operator (*lacO*): bases 228-252
- Ribosome binding site (RBS): bases 282-288, 292-296
- TOPO® cloning site (directional): bases 297-310
- V5 epitope: bases 333-374
- Polyhistidine (6xHis) region: bases 384-401
- T7 reverse priming site: bases 455-474
- T7 transcription termination region: bases 416-544
- bla* promoter: bases 845-943
- Ampicillin (*bla*) resistance gene (ORF): bases 944-1804
- pBR322 origin: bases 1949-2622
- ROP* ORF: bases 2990-3181 (complementary strand)
- lacI* ORF: bases 4493-5584 (complementary strand)

## Clonación

Mezcla para la reacción de clonación en un tubo para PCR.

Producto de PCR purificado se agreda entre 0.5  $\mu$ l a 4  $\mu$ l con una concentración entre 15 y 30 ng/ $\mu$ l según las condiciones del fabricante necesaria para llevar a cabo la reacción.

Disolución de sales diluidas 1:4  $\mu$ l agregar 1  $\mu$ l para células quimio competentes incluidas en el kit del fabricante o 1  $\mu$ l de sales concentradas para células electrocompetentes preparadas manualmente mediante un protocolo reportado según la literatura citada.

Vector Pet-101-d topo agregar entre 0.5  $\mu$ l y 1  $\mu$ l para cada reacción.

Agregar agua MiliQ (libre de RNAsas) hasta 6  $\mu$ l si la reacción no pasa de los 6  $\mu$ l totales de la reacción.

Espera a temperatura ambiente un rango de tiempo entre 15 y 30 min según el protocolo del fabricante y al término del tiempo se dispuso a transformar las bacterias de *E. coli* TOP-10 quimiocompetentes comerciales incluidas en el kit, las cuales tienen la característica de guardar el plásmido por un largo periodo de tiempo, (entre 6 meses y 2 años) según el fabricante.

La transformación de bacterias *E.coli* consiste en inducir un choque térmico de temperatura a 42 °C por 30 seg. con el objeto de abrir poros en la membrana de la bacteria y de esta manera se metió el plásmido transformado en la bacteria y se cerró mediante la contracción de dichos poros por medio de agua helada por un lapso de 5 seg según las recomendaciones del fabricante, terminado el tiempo las células se recuperan en 250  $\mu$ l de medio SOC y se pusieron a recuperarlas células en agitación orbital a 250 rpm (revoluciones por minuto) a 37°C por un lapso de 1 hrs con el objeto de la expresión del gen de resistencia en este caso ampicilina el cual no das la particularidad de tener un método de selectividad a la hora de crecer nuestras bacterias transformadas y tener la certeza que lo que sembramos tenga nuestras células transformadas.

Al término de la recuperación de las bacterias nos disponemos a plaquear en caja de LB (Luria Bertani composición en el apéndice), con ampicilina, el ensayo consistió en recuperar la células transformadas por medio de centrifugación a 13000 rpm por 1 min y resuspender las células en 50  $\mu$ l del medio y realizar el plaqueo en caja según la técnica recomendada en la literatura, terminado este paso se dejó en incubadora a 37 °C toda la noche y al día siguiente se observó el crecimiento y las células crecidas se rayan en placa de forma individual para

realizar un ensayo de PCR colonia (mas adelante la descripción del ensayo) para tener la certeza que fueron transformadas y continuar si el resultado es positivo para la transformación de células *E. coli* BL21 Star de expresión para la inducción de la proteína recombinante.

Sin embargo también existe otra técnica similar de transformación que conlleva los mismo pasos de transformación con la diferencia de que no se realiza el choque térmico sino se realiza mediante electroporación que básicamente es el mismo principio pero con un choque eléctrico (condiciones aquí abajo) y células *E. coli* electrocompetentes pero todos los pasos son similares para las clonaciones de cada uno de los genes (Porina, OMP0520 y OMP6) se realizaron ambas transformaciones (Choque térmico y electroporación) teniendo los mismos resultados positivos.

Condiciones del electroporador:

2.5 kV kilo volts

2.5  $\mu$  F microfaradios

200 Ohms Ohmios

1.5 raise

Una vez obtenidas la colonias transformadas y aisladas con las construcciones de cada uno de los genes se procedió a realizar ensayos de PCR colonia para corroborar si en verdad tenemos células positivas transformadas con el gen de interés. El ensayo se realizo con perlas (Hamberchamp de GE) que contienen todos los componentes necesarios para PCR solo basto con poner los primers y ADN de templado, para este caso fueron las colonias transformadas de cada gen respectivamente. Las mezclas de primers y ADN de templado (colonias) se realizaron bajo campana de flujo laminar para evitar alguna contaminación y evitar falsos positivos además de conservar las células en las mejores condiciones posibles. Cabe mencionar que las condiciones de corrida del termociclador para la amplificación del gen son las mismas antes mencionadas en este documento para cada gen respectivamente y de igual manera para el análisis de electroforesis por medio de gel de agarosa. De esta forma corroboramos que los genes están bien clonados y se almacenaron a 4°C para su uso posterior. A continuación, se procedió a crecer los cultivos de 5 ml de LB c/ampicilina con el objeto de congelar clonas a -80°C, esta clonas nos servirán como cepario para en un futuro tenerlas disponibles para cualquier ensayo y además lo que sobro del cultivo se utilizo para extraer DNA plasmidico mediante el kit de Extracción de DNA plasmidico MINIprep

de Quiagen (aéndice) y transformar células de *E.coli* BL21 mediante la electroporación y/o choque térmico antes mencionadas en este documento pero en esta ocasión con células de expresión para inducir la síntesis de cada una de las proteínas recombinantes (Porina, OMP 0520 y OMP6).

La transformación de las células TOP-10 a Células de expresión BL21-Star se llevó a cabo por medio de electroporación que consistió en tomar el DNA plasmídico purificado e introducirlo por electroporación en las células antes descritas a las cuales se dio un choque eléctrico en las mismas condiciones del electroporador antes mencionadas cuando fueron transformadas las células Top 10, después se recuperan en 500 µl medio SOC y se dejan en agitación orbital a 37°C a 250 rpm por una hora para la expresión del gen de resistencia y después se plaquean en campana en condiciones de esterilidad en cajas con medio LB con ampicilina y al termino se dejaron incubando a 37°C en agitación constante a 250 RPM por 18h o 24h, las colonias obtenidas se rayaron en una nueva caja y bajo las mismas condiciones de esterilidad y se realizaron un ensayos de PCR colonia, tal y como se ha descrito previamente para las células Top-10 pero en esta ocasión para células BL21-Star, esto consistió en realizar una mezcla de cada par de primers con perlitas que contienen los compuestos necesarios para llevar a cabo la reacción de PCR y el ADN de templado, en este caso será el ADN contenido ó insertado en el plásmido que se encuentra en las células transformadas, solo si en este caso serian positivas, lo que sí es importante recalcar es que una vez clonado el gen en el vector es muy difícil que no se lleve a cabo la transformación este paso es solo con el objeto de corroborar si esta el inserto en las células de expresión en este caso las células BL21. Después de realizar la mezcla y poner las mismas condiciones en el termociclador para cada transformación respectivamente ya mencionados nos disponemos a correr los productos de PCR en geles de agarosa.

Se preparo un gel de Agarosa al 1% con .4grs de agarosa en 40 ml de buffer TAE 1X calentándolo en horno de microondas unos 45 seg en agitación cada 15 segundos y al final agregar 4 µl de colorante para ácidos nucleicos Sybr Safe y se dejó a temperatura ambiente hasta que esté listo y se cargara marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb plus de invitrogen y producto de PCR en relación 10:1 con buffer de Muestra (BM) en cada poso del gel para observar si amplifico el gen.

La corrida del gel se realizó en cámara para electroforesis del geles de agarosa (Bio Rad) para 8 pozos la cual se fue llenada de de buffer TAE 1X nuevo para la corrida de la electroforesis que se llevo a cabo a 80V constantes por periodo de 1Hr aproximadamente, ya terminada la corrida nos disponemos analizar el gel en el analizador de imágenes de Bio rad laboratorios en el rango de luz ultravioleta y tomamos la impresiones de los resultados.

Después de corroborar que las células BL21-Star contenían los plásmidos transformados de cada construcción respectivamente se procedió a realizar las inducciones de las síntesis de las proteínas recombinantes.

### **Síntesis de proteínas recombinantes**

Para realizar la inducción de las proteínas recombinantes (Porina, OMP 0520 y OMP6) se utilizaron las células BL21 transformadas con cada uno de los insertos respectivamente y correspondientes a cada una de las proteínas. Se partió de las colonias rayadas en cajas de medio LB con ampicilina. Cada inducción se preparó a diferentes tiempos, lo que se hizo fue crecer en 5 ml de LB con ampicilina una colonia positiva por PCR colonia una para cada célula transformada (Porina, OMP 0520 y OMP6) y se incubaron por periodos de entre 16-20 hrs en agitación orbital a 37 °C y 250 rpm, al término del periodo de incubación se inocularon 1ml del cultivo ( pre-inoculo) en 5 ml de medio LB nuevo con ampicilina en campana de flujo para evitar cualquier contaminación y incubó en agitación orbital a 250 rpm a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica entre 0.5-0.7 (DO) según lo recomendado en la literatura, una vez alcanzada la densidad óptica deseada se agregó el inductor IPTG (isopropil de tiogalactosamina) a una concentración de 100 mM la cual se prepara a partir de 0.002383 gr de IPTG equivalentes a 100 µl de solución y se agrega 10µl de la solución por cada 1ml de cultivo a inducir según sea el caso. Después de agregar el inductor, el cultivo se incubó en agitación orbital constante a 37°C a 250 rpm durante 4 hrs, tiempo necesario para que se lleve a cabo la síntesis de la proteína en cada caso, terminado el tiempo de incubación se cosechan las células en tubos falcón de 50 ml, los cultivos se sometieron a centrifugación a 5000 rpm durante 10 min a 4°C y se toma una alícuota para realizarle un análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida y un ensayo tipo “western blot” para corroborar que si efectivamente se llevo a cabo la síntesis de la proteína recombinante. Las proteínas recombinantes son sintetizadas con una etiqueta de 6 histidinas y se utiliza un anticuerpo anti-histidina para detectar la presencia de las recombinantes.

Para el análisis de electroforesis y “Western blot” de cada inducción (porina, OMP 0520 y OMP6) se prepararon geles de poliacrilamida al 10%, de la manera indicada en el apéndice de este documento, se realizó lo siguiente: en un gel de 10 pozos, se colocaron los marcadores de peso molecular (MPM) en el primer carril y en los carriles subsecuentes se cargaron las muestras de *E. coli* conteniendo las proteínas recombinantes según el caso, las muestras de proteínas se prepararon como se describe a continuación: Una alícuota de células inducidas 1ml de cultivo se centrifugo a 3000 rpm por 1 min se descarto el sobrenadante, se lavaron 2 veces con PBS y posteriormente y las células fueron resuspendidas con 65 µl BM1X con beta-mercaptoetanol y posteriormente se hirvieron por 5 min para

desnaturalizar las proteínas contenidas en el citosol de las células bacterianas y al finalizar el tiempo, las muestras se centrifugaron por 1 min a 5000 rpm para sedimentar restos de membranas no solubilizadas y cargar solo sobrenadante de acuerdo a la estandarización de la técnica. En otro de los carriles del gel carril se cargó el control negativo, el cual es una muestra tratada igual que la positiva con la particularidad que esta no se le agregó ITPG. Una vez realizado lo anterior, se llevó a cabo el montaje de la cámara de electroforesis en el sistema Tetracell (Bio Rad), para lo cual se llenó la cámara con buffer de corrida 1X (apéndice) y se realizó una pre corrida a 160 Volts (V) constantes por 5 min y luego una corrida de 120 V constantes por 1 hora (h) aproximadamente, considerando tener cuidado de que no se salgan las proteínas del gel. Una vez terminada la corrida del gel o lectroforesis, los geles se recuperaron de la cámara y se tiñeron por 20 min con azul brillante de Coomassie, una vez terminada la tinción, los geles se sometieron se incubaron en agitación contante con solución decolorante (apéndice) para eliminar de los geles el exceso de colorante.

Para el análisis de las proteínas mediante ensayos tipo “Western blot”, se realizaron replicas de los geles (mencionados arriba) y se corrieron de manera simultánea, para transferir las proteínas separadas en el gel a membrana de nitrocelulosa, se utilizó la cámara (nombre del equipo) para electrotransferencia Tetracell (Bio Rad), este equipo consta de un casete tipo sándwich donde se colocaron los geles y las membranas de NC, las proteínas se transfirieron con aplicación de corriente eléctrica por 1 h a 120 V constantes y al termino de la corrida se desmontó la cámara, las membrana de NC conteniendo las proteínas transferidas se bloquearon con PBS-Tween 0,1% leche al 5% durante 18 horas en agitación constante 4°C, al término de la incubación las membrana se lavaron con 3 veces por 5 minutos con PBS-Tween 0.1%, al termino del lavado las membranas se incubaron con el primer anticuerpo o anticuerpo primario (anticuerpo de conejo anti-histidinas), este se resuspendió en PBS-Tween 0.05% y leche al 2.5% a una dilución de 1:10000, este anticuerpo reconoce las etiquetas de histidinas que se agregaron a la proteínas de interés y que se integra a través del vector de expresión y que nos es útil para identificar nuestras proteínas recombinantes. La incubación del anticuerpo primario se realizó por 18 h en agitación constante a 4°C, al término de la incubación, la membrana se lavó 3 veces por 5 minutos con PBS-Tween 0.1% en agitación vigorosa y constante, después de los lavados las membranas e incubaron con el anticuerpo secundario (Anti IgG de Conejo acoplado a HRP) resuspendido en PBS-Tween 0.05% y leche al 2.5% y a una dilución de 1:2000 acoplado a HRP, se incubaron las membranas a temperatura ambiente durante 4 horas en agitación constante, al término de este tiempo, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.1% por 5 min y se procedió a revelar la membrana con las siguientes soluciones:.



Preparación de solución de revelado:

Solución A	Solución B
12.5 ml de PBS	2.5 ml de Metanol
16 µl de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.0075 gramos de HRP

Procedimiento de revelado; Se mezclan las dos soluciones y se vierten en la membrana y se espera un lapso de 5-30 min para observar el resultado, el cual se aprecia como una banda oscura sobre la membrana, esta mancha nos indica la presencia de las proteínas recombinantes.

El ensayo antes descrito se realizó para identificar la síntesis efectiva de las proteínas recombinantes del presente trabajo: Porina, OMP0520 y OMP 6). Una vez confirmada la expresión de estas recombinantes, se procedió a realizar inducción masiva de las proteínas con volúmenes de entre 250 y 500 ml. Se inicio con estos ensayos con pre-inoculos de 10 ó 20 ml de pre-inoculo en medio LB con ampicilina en un frascos estériles y siguiendo el mismo procedimiento antes descrito de inducción para cada una de las proteínas antes mencionadas. Y en consecuencia también se realizó el análisis de electroforesis y “Western Blot” para corroborar una inducción masiva positiva, después de la comprobación lo que sigue se realizó la purificación de las recombinantes.

### **Purificación de las proteínas recombinantes**

La purificación de las proteínas recombinantes se realizó por cromatografía de afinidad con el uso de columnas de níquel de Bio-Scale (Bio Rad), esto se basa en que las proteínas recombinantes contienen una etiqueta de 6 histidinas proporcionadas por el vector de expresión pET-101/D-TOPO).

Los ensayos de purificación se realizaron a partir de los resultados positivos obtenidos en los “Western blot” que se le realizó a las proteínas (OMP 0520, OMP6 y Porina). Los ensayo de purificación se llevaron a cabo partiendo de las células bacterianas de *E. coli* BL21-Star transformadas con cada una de las construcciones (plasmido+inserto o gen clonado), esta células o clones de células se crecieron en condiciones especiales para la inducción de cada una de nuestras proteínas recombinantes en diferentes tiempos para no afectar las condiciones de la proteína y su posible degradación. Lo primero que se realizó con las pastillas bacterianas fue resuspender en un tubo falcón de 50 ml con 15 ml de buffer de lisis (buffer PBS mas inhibidor de proteasas para evitar degradación de nuestra proteína y tritón (detergente) que nos permite solubilizar las membranas

plasmáticas de las bacterias) el siguiente paso es la ultrasonificación con el equipo de pistón Ultra-Sonic (Bio-Lab) con 10 pulsos de 30 seg y 30 seg de reposo en hielo para no sobre calentar la solución y así evitar la degradación de las proteínas de interés que se estuvieran sonicando. Posteriormente, se procedió a pasar ellas muestras a través de las columnas de purificación (níquel).

Después del proceso de ultrasonificación, se procedió a centrifugar el sobrenadante del lisado en tubos falcón de 50 ml a 5000 rpm por 10 min a 4°C, después de la centrifugación se recuperó el sobrenadante, este sobrenadante se clarificó por medio de filtración de la muestra a través de membrana de 0.22 micras, una vez filtrada la muestra, (aquí se encuentran nuestras proteínas recombinante junto con las proteínas de *E. coli*) se procedió a pasar la muestra a través de la columna, previo a pasar la muestra por la columna, esta se equilibró con el Buffer de lisis”, con 5 volúmenes partiendo de la capacidad de la columna (1 ml) después de realizar este procedimiento comenzamos a pasar nuestro filtrado antes mencionado por la columna a un flujo de (1ml por cada 30 seg) gota a gota con una jeringa de 5ml y recuperándose en un tubo falcón de 15 ml rotulo, las fracciones no unidas, después de este paso, se procedió a lavar la columna con 5 ml “buffer de lavado” a las mismas condiciones de flujo y recuperando en otro tubo rotulado con la leyenda “fracción Lavado 1” después se realizo el paso siguiente en las mismas condiciones pero con el “buffer de lavado 2” y recuperado como “fracción de lavado 2” y el último paso se lleva a cabo con el “buffer de elución” con un volumen de 5 ml y recuperado en un tubo rotulado como “fracción de elución” con el cual se dio por terminada la purificación de la proteína que se purifico en este caso las proteínas (OMP 0520 y OMP6) respectivamente para cada caso se realizo el mismo protocolo por separado y de manera independiente. Una vez obtenidas las fracciones de la columna de purificación, para cada proteína nos dispusimos a realizar un ensayos de electroforesis y “Western blot” para determinar en cuál de las fracciones obtenidas se encuentra las proteínas de interés, cabe mencionar que las fracciones de purificación se prepararon de la siguiente manera para cada proteína por separado antes mencionadas (OMP 0520 y OMP6) se precipitaron 300 µl de cada fracción con 1200 µl de acetona, se incubaron por toda la noche a 4°C y al día siguiente se centrifugaron a 8000 rpm por 5 min, se descartó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron las con 30 µl de BM1X con BME (Beta Mercapto-etanol), las muestras se hirvieron por 5 min y se cargaron en geles de poliacrilamida de 10 pozos, se realizaron replicas de dichos geles y estas replicas de geles se procesaron para realizar ensayo de “Western blot”, estos ensayos se realizaron según lo descrito previamente, los resultados se documentaron con fotografías, y se analizaron posteriormente. Como era de esperarse en los resultados en la fracción de elución estaba contenida la mayor cantidad de las proteínas recombinantes (Porina, OMP 0520 y

OMP6), una vez purificadas las proteínas recombinantes se cuantificaron por método de Bradford como se describe en el apéndice de este documento, el cual consiste en preparar una curva de concentración conocida de albumina sérica bovina y correlacionar nuestra muestra (proteína) con la curva y calcular la concentración.

Una vez purificadas y cuantificadas las proteínas recombinantes (Porina, OMP 0520 y OMP6) se procedió a utilizarlas para realizar los ensayos de inmunización, para esto, se utilizaron ratones machos BalbC de 4 semanas de edad que se inmunizaron de acuerdo a la literatura citada (Antibodies) por vía subcutánea según el protocolo de la siguiente tabla:

### Protocolo de Inmunización

Dosis	# de inmunización	Días	Adyuvante completo Freunds	Adyuvante incompleto Freunds	Grupo
Gpo1 (10µg)					1 y 2
Gpo2 (20µg)					
X	1ra	0	X		X
X	2da	15		X	X
Sangrado	Gpo 1, 2 y controles	Días	Ratones Controles	Ratones Grupo 1	Ratones Grupo 2
	X	0, 14 y 28	2	3	3

Los sueros obtenidos según los sangrados que se marcan en el esquema, se utilizaron para evaluar la capacidad antigénica de las proteínas de inducir una respuesta inmune humoral en los ratones inmunizados, para cada una de las proteínas utilizadas (OMP-0520 y OMP6).

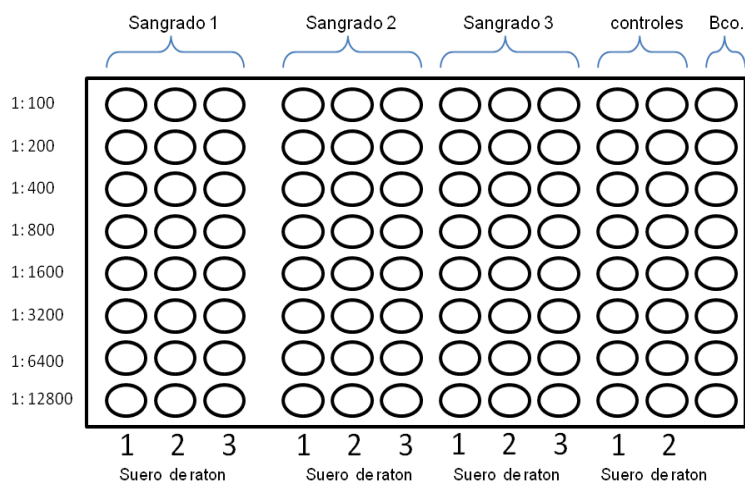
La evaluación de los sueros se realizó por medio de un ensayo tipo “Western blot” (descritos previamente) con geles “preparativos” de poliacrilamida al 10% según la receta del apéndice de un solo pozo de 7 cm de largo del gel y se cargaron las proteínas recombinantes purificadas (OMP-0520 y OMP6)

respectivamente, las membrana de NC preparativas se cortaron en tiras de 0.5 cm de ancho, esta tiras se incubaron con cada uno de los sueros de los ratones, los ensayos se realizaron como se describe a continuación; los sueros se mezclaron con PBS-Tween 0.05% y leche al 2.5% en canaletas especiales, en agitación constante durante 18 h a 4°C, al término de la incubación, se lavaron cada una de las tiras 3 veces con PBS-Tween 0.1% por 5 min y después se incubaron con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón acoplado a HRP en PBS-Tween 0.05% y leche al 2.5% en agitación constante por 2.5 h a temperatura ambiente, al término de la incubación las tiras se lavaron 3 veces con PBS-Tween 0.1% por 5 min, y finalmente se procedió a realizar el revelado de las tiras, esto se realizó con solución de revelado para “Western blot”, tal y como se describió previamente por un lapso de 5 a 30 minutos, se tomaron fotografías de los resultados y se analizaron posteriormente. Estos ensayos se realizaron con todos los sueros de los animales inmunizados con las proteínas recombinantes (OMP 0520 y OMP6).

### **Ensayo tipo ELISA**

La evaluación de los sueros que resultaron positivos en los ensayos tipo “Western blot”, el siguiente paso fue realizar ensayos tipo ELISA indirecta con cada suero obtenido de los ratones inmunizados, esto, con las proteínas (OMP0520 y OMP6), los ensayos se realizaron de la siguiente manera; lo primero fue inmovilizar cada una de las proteínas puras en placas de 96 pozos, tratadas con buffer de carbonatos para adherir las proteínas y que no se despeguen tan fácilmente (apéndice). Las proteínas se agregaron a una concentración de 1µg por pozo, se colocaron un total de 88 microgramos de cada proteína pura fueron necesarios para cada ensayo de ELISA, que fueron inmovilizados con 880 µl de buffer de carbonatos 10 µl por pozo en cámara húmeda a 4°C toda la noche y al día siguiente se lavo 3 veces la placa con 300µl de PBS-Tween 0.1% por pozo, después se bloquearon las placas con 300 µl de PBS-Tween 0.1% y leche al 5% por pozo en cámara húmeda durante 3 hrs a 4°C, pasado el tiempo las placas se lavaron en 3 ocasiones con 300 µl de PBS-Tween 0.1% por pozo, con mucho cuidado para evitar la contaminación de los pozos, después los sueros obtenidos de los ratón inmunizados (OMP 0520 y OMP6) respectivamente, se realizaron una serie de diluciones para incubar los sueros de ratón que se presentan en el siguiente esquema:

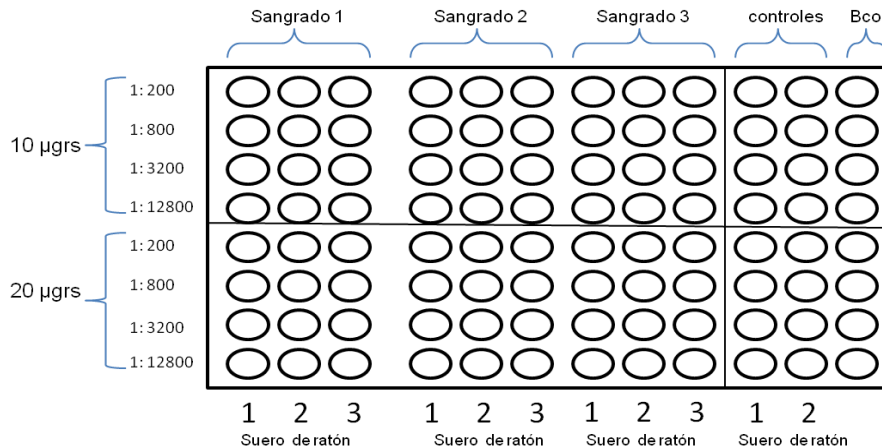
# Ensayo tipo ELISA



Como se observa en el esquema se parte de una dilución 1:100 hasta 1: 12,800 se colocan 3  $\mu$ l de suero en 300  $\mu$ l de PBS tween 0.05% y leche 2.5% en la primera fila del suero de ratón correspondiente a cada pozo según como este marcado cada ratón por sangrado y se pipetea 150  $\mu$ l de la primera fila a cada pozo consecutivamente para alcanzar la dilución de 1: 12,800 cabe mencionar que en cada pozo hay 150  $\mu$ l de PBS tween 0.05% leche al 2.5% para diluir los sueros a la concentración indicada en cada fila y en este paso ya están listos los sueros para ser cargados en la placa que tiene la proteína inmovilizada y bloqueada con leche y PBS tween, cabe mencionar que esta placa solo corresponde a los sueros inmunizados de 10  $\mu$ g otra placa se prepara para los ratones inmunizados con 20  $\mu$ g, respectivamente para cada proteína (OMP 0520 y OMP6).

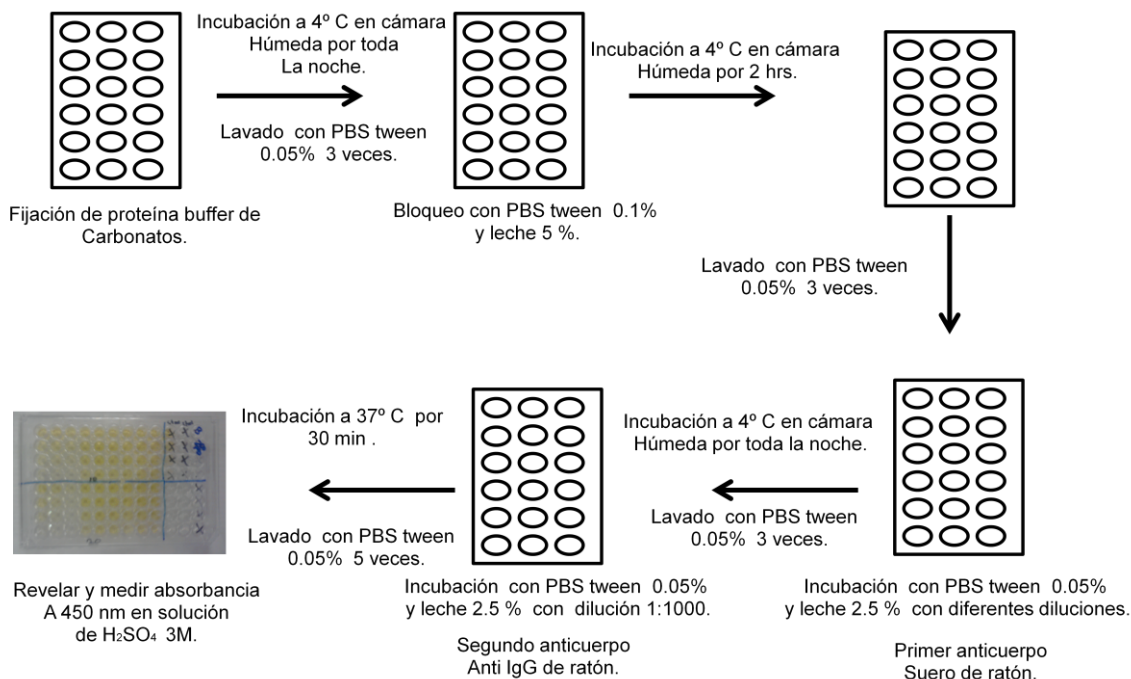
En el siguiente esquema se muestra como queda el tratamiento finalmente para cada proteína en donde no se utilizaron todas las diluciones pero abarca el mismo rango de tratamientos, solo se utilizaron las diluciones que muestra el esquema para los sueros inmunizados con 10 µg y 20 µg .

Ensayo tipo ELISA sueros inmunizados con 10 µgrs y 20 µgrs de proteína



Después de incubar los sueros en la placa como muestra el esquema se coloca en cámara húmeda a 4°C durante toda la noche y al día siguiente se lava la placa en 5 ocasiones con 300 µl por pozo con PBS tween 0.1% teniendo cuidado de no contaminar ningún pozo, al final de los lavados nos disponemos a incubar el segundo anticuerpo en este caso anti IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina como desarrollador de color dilución 1: 10000 en PBS tween 0.05% y leche al 2.5% con 100 µl por pozo y dejando en cámara húmeda 30 min en incubadora a 37 °C y terminado el tiempo se lava en 5 ocasiones la placa con 300 µl por pozo de PBS tween 0.1% y en ese momento esta lista la placa para ser revelada con 50 µl por pozo de TMB (Tetrabenceneacida) dejándolo a temperatura ambiente hasta desarrollar color azul (esto ocurrió como a los 5 min) en ese momento se coloca la solución de paro 10 µl por pozo que en este caso es H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M y tiene un cambio de coloración amarillo y se lleva la placa a leer a 450 nm y los datos se guardaron en una hoja de Excel para su posterior análisis estadístico.

En el siguiente esquema se muestra un panorama general del ensayo.



### CHIP de Diagnostico.

Ya realizado el ensayo de tipo ELISA, se procedió a preparar el “chip” para la detección de anticuerpos contra *H. somni* por medio de la técnica Dot blot. Cabe mencionar que la cámara de incubación o “chip” de diagnóstico es diseñado por el director de esta tesis con el objeto de tener una respuesta rápida y gastar un mínimo de reactivos para economizar en el costo pero también tiene el objeto de evaluar posteriormente el dispositivo y si los resultados son aceptables, tal vez patentar dicho material.

El ensayo consistió en inmovilizar las proteínas puras (OMP 0520 y OMP6) en una sola tira de diagnóstico, por medio de vacío, se utilizó el equipo Dot blot de la marca (Bio Rad) y una bomba de vacío, durante de 30 min según marca el fabricante, la proteína se usó a una concentración 100 ng/μl en H<sub>2</sub>O en un volumen de 50 μl suficientes para que pueda ser reconocida por los anticuerpos de bovinos vacunados (inmunizados) o enfermos por la bacteria *H. somni*, después de ser inmovilizada sobre la membrana de NC, se procedió a bloquear la membrana con PBS-Tween 0.1% y leche 5% durante 18 h en agitación orbital constante, después se lavó en 3 ocasiones con PBS-Tween 0.1% por 5 minutos, y al término de los lavados se incubó la membrana con el primer anticuerpo (suero de bovino inmunizado o enfermo) en dilución 1:50 en PBS-Tween 0.05% en un

volumen de 50 µl en agitación durante 2 hrs y después se volvió a lavar como en el anterior paso y se procedió a incubar el segundo anticuerpo (anti-IgG de Bovino acoplado a HRP) a una dilución de 1:2000 en un volumen de 50 µl de PBS-Tween 0.05% anticuerpo Anti IgG de bovino acoplado a HRP como desarrollador de color durante 2 hrs en agitación a temperatura ambiente y al final se lavó la membrana como en las anteriores ocasiones y se reveló con el 50% de la solución que a continuación se describe por un lapso de tiempo entre 5-30 minutos, al final se tomaron fotografías de los resultados.

Preparación de solución de revelado:

Solución A	Solución B
12.5 ml de PBS	2.5 ml de Metanol
16 µl de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.0075 gramos de HRP

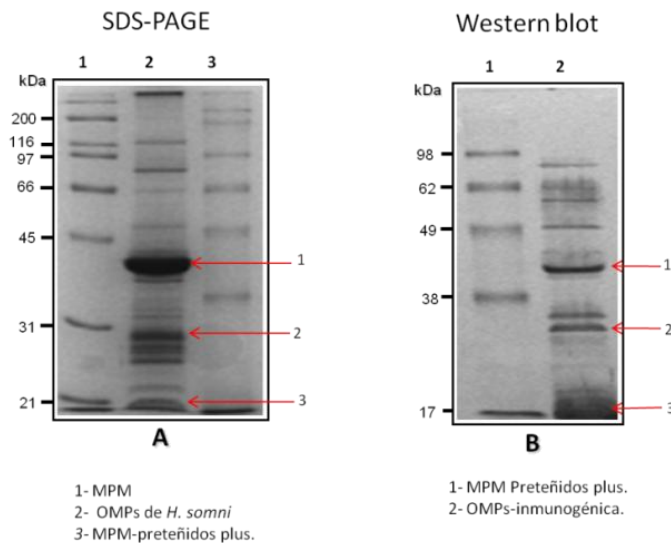


## RESULTADOS

### Electroforesis y “Western blot” con proteínas de membrana externa (OMPs) de *H.somni*.

El análisis de las OMPs de *H. somni* se realizó en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, se logró una buena definición en el perfil con un gel al 10% de acrilamida (Fig. 1A). Se pueden distinguir 15 proteínas, de las cuales las que se encuentran en mayor proporción son de aproximadamente 298, 121, 81, 42, 41, 28, 27, 26 y 17 kDa, el resto se encuentran en concentraciones muy bajas, que apenas son perceptibles con tinción de azul de Coomassie. Para este ensayo de Western blot, se seleccionó el suero de un suero de bovino representativo de un lote de sueros de bovinos vacunados. El suero se utilizó a una dilución 1:250 y el anticuerpo secundario a 1:1500 (anticuerpo de cabra anti-IgG de bovino). Se utilizaron marcadores de peso molecular SeeBlue-plus® (Invitrogen). Se identificaron 8 bandas de proteínas inmunogénicas que revelaron fuertemente de aproximadamente 81, 62, 60, 50, 40, 27, 26 y 17. (Fig.1B). Podemos observar un fenómeno que se repitió constantemente con los diferentes sueros analizados, las proteínas más abundantes no necesariamente son las más inmunogénicas (Fig. 1A y 1B).

### Electroforesis y Western blot OMPs *H. somni*



**Figura 1.-** Panel **A)** Gel de electroforesis SDS-PAGE, Carril 1 y 3 Marcador de peso, carril 2 Perfil de proteínas OMP's. Panel **B)** Membrana de Nitrocelulosa, carril 1 Marcador de peso, carril 2 proteínas OMP's identificadas por anticuerpos presentes en sueros de bovino "posibles candidatas.

### Secuencias de las proteínas de membrana identificadas.

Los resultados del ensayo de mapeo peptídico se muestran a continuación con los números de acceso para la base de datos y sus respectivos pesos moleculares, con los cuales se obtuvieron las secuencias que codifican para los genes amplificados, clonados y posteriormente expresadas y purificadas las proteínas recombinantes que se evaluaron como antígenos vacúnales en un modelo de ratón. Algo que es muy importante aclarar es que del total de proteínas cortadas y mandadas para el ensayo de mapeo peptídico solo estas proteínas nos parecieron interesantes para el desarrollo de las proteínas recombinantes porque las otras no parecían estar relacionadas a membrana externa.

<b>Proteína</b>	<b>Acceso NCBI Gi</b>	<b>Nombre de la proteína</b>	<b>Tamaño Aproximado silvestre</b>
<b>1</b>	<b>170717693</b>	<b>Porina</b>	<b>41.8 kDas.</b>
<b>2</b>	<b>170718670</b>	<b>OMP 0520</b>	<b>22.110 kDas.</b>
<b>3</b>	<b>113460409</b>	<b>OMP 6</b>	<b>14.850 kDas.</b>

**Tabla 1:** Resultado del mapeo peptídico donde se muestra el numero de acceso de los genes que codifican las proteínas recombinantes que se evaluaron como antígenos vacúnales y su tamaño en aproximado en kilodaltones.

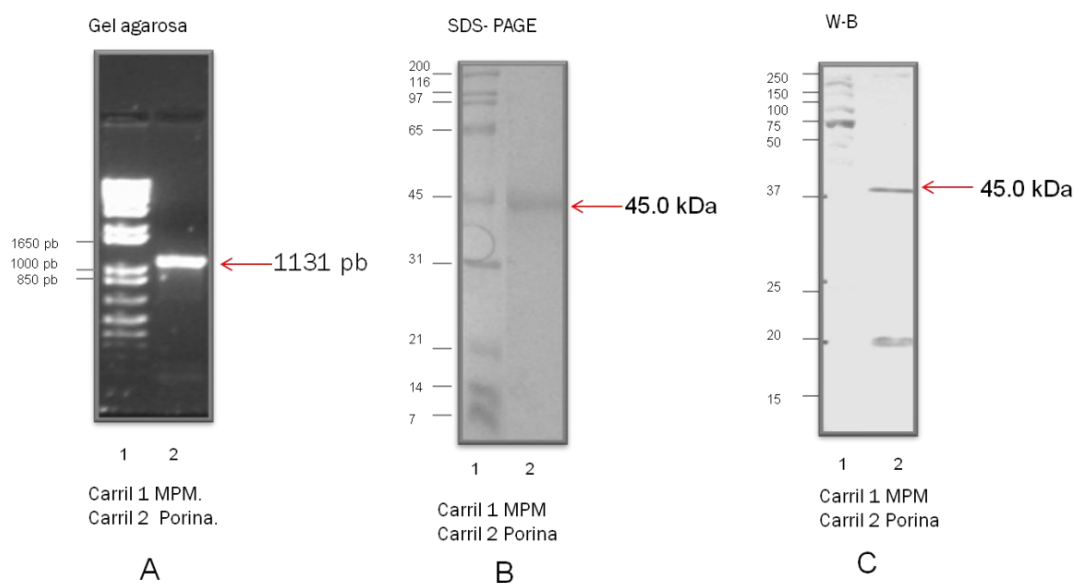
### AMPLIFICACIÓN, CLONACION Y EXPRESION DE GENES.

Para cumplir con el objetivo de diseño los primers y amplificación de los fragmentos de los genes, se utiliza el programa (CLC main workbench) software que diseño los primers a partir de una secuencia basada en reglas que se deben de cumplir para que se amplifiquen sin problemas los fragmentos.

## Proteína Porina

En las siguientes imágenes se observa en el panel A un gel de agarosa donde se observa el amplicón que se obtuvo de ensayos tipo PCR, mismo que fue clonado y transformado en bacterias *E. coli* para inducir la expresión de la proteína y purificarla por cromatografía de afinidad misma que se muestra en el panel B, posteriormente se realizan ensayos tipo western blot para corroborar que es nuestra proteína recombinante porque esta cuenta con una etiqueta de histidinas que es reconocida por un anticuerpo específico y con este ensayo tenemos certeza que nuestra proteína esta lista para ser inmunizada y se muestra en el panel C.

## Porina

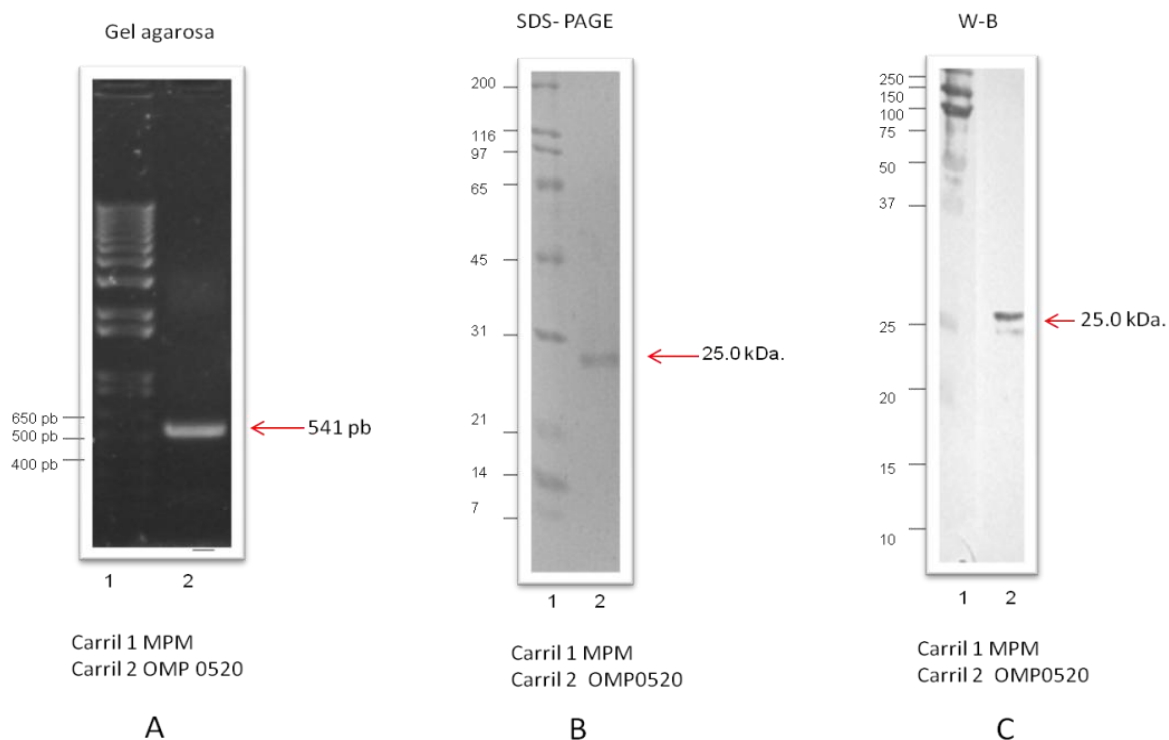


**Figura 2.-** Amplificación clonación, clonación y expresión de la proteína porina. Panel **A**), gel de garosa al 1%, carril 1, marcadores de peso molecular, carril 2 y punta de flecha producto de PCR o amplicon obtenido correspondiente a la proteína Porina de 1131 pares de bases (PB). Panel **B**), Gel de poliacrilamida al 10%, carril1, MPM de amplio rango (Bio Rad), carril 2, proteína purificada Porina de 45.0 kilodaltones (kDas). Panel **C**) Ensayos de “Western blot”, replica del gel del panel B. Carril. Detección de la proteína de 45.0 kDas con el anticuerpo anti-Histidinas.

## Proteína OMP0520

En las siguientes imágenes se observa en el panel A un gel de agarosa donde se observa el amplicón que se obtuvo de ensayos tipo PCR, mismo que fue clonado y transformado en bacterias *E. coli* para inducir la expresión de la proteína y purificarla por cromatografía de afinidad misma que se muestra en el panel B, posteriormente se realizan ensayos tipo western blot para corroborar que es nuestra proteína recombinante porque esta cuenta con una etiqueta de histidinas que es reconocida por un anticuerpo específico y con este ensayo tenemos certeza que nuestra proteína esta lista para ser inmunizada y se muestra en el panel C.

## OMP 0520

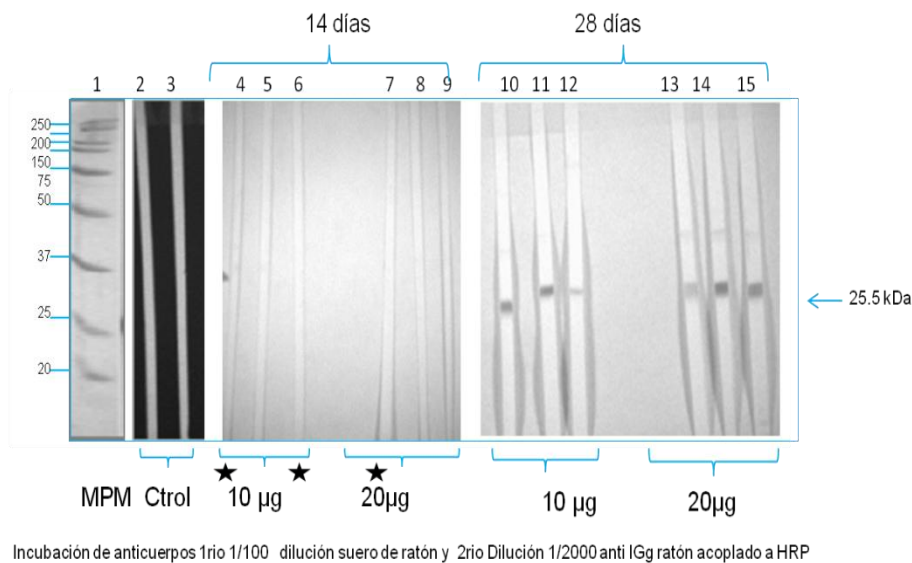


**Figura 3.-** Amplificación clonación, clonación y expresión de la proteína OMP-0520. Panel **A**), gel de garosa al 1%, carril 1, marcadores de peso molecular, carril 2 y punta de flecha producto de PCR o amplicon obtenido correspondiente a la proteína OMP-0520 de 541pares de bases (pb). Panel **B**), Gel de poliacrilamida al 10%, carril1, MPM de amplio rango (Bio Rad), carril 2, proteína purificada OMP-6 de 25 kilodaltones (kDas). Panel **C**) Ensayos de “Western blot”, replica del gel del panel B. Carril. Detección de la proteína de 25.0 kDas con el anticuerpo anti-Histidinas.

## Evaluación de los sueros obtenidos de la inmunización con OMP 0520

La siguiente imagen muestra la evaluación de los sueros que se obtuvieron después de la inmunización de los ratones tipo BalbC machos, con sus respectivas dosis de 10µg, 20µg de proteína y controles con Adyuvante completo e incompleto de freunds, que fueron sangrados a los 0, 14 y 28 días después de la inmunización y se observa a simple vista que los sueros de los 14 días no presentaron anticuerpos excepto algunos casos como los sueros de los carriles 4,6 y 7, pero al día 28 aparentemente todos los sueros fueron positivos, lo que permite proponer como candidata para antígeno a la proteína OMP0520, por su capacidad de inducir un respuesta inmune de tipo humoral.

## OMP 0520 inmunización en ratones Balb/C



**Figura 4.-** Ensayos de “Western blot” con sueros de ratones inmunizados. Ratones inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína OMP 0520 en membranas de nitrocelulosa a los 14 y 28 días después de la inmunización. Carril 1 (MPM) de bio rad. Carriles 2-3 Sueros evaluados de los ratones controles. Carriles 4-9, sueros evaluados a los 14 días post- inmunización con 10 µg y 20 µg de proteína OMP-0520 respectivamente. Carriles 10-15 Sueros evaluados a los 28 días inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína OMP-0520 respectivamente.

## Ensayo de ELISA: cuantificación de anticuerpos

Los gráficos muestran los tratamientos del ensayo tipo ELISA donde se realiza la cuantificación de anticuerpos de los sueros de ratones inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína por grupo respectivamente, en tres diferentes sangrados a los días (0, 14 y 28) en las diluciones que se muestran en el grafico y que se observa cómo va disminuyendo el titulo conforme el suero es mas diluido y se observa el pico más alto en la primera dilución por lo que se concluye que el aumento es más claro y específico conforme pasan los días. Los dos gráficos conservan la misma tendencia de títulos y comparado el tratamiento de 10µg y 20 µg no existe una diferencia muy clara la cual se observa a simple vista.

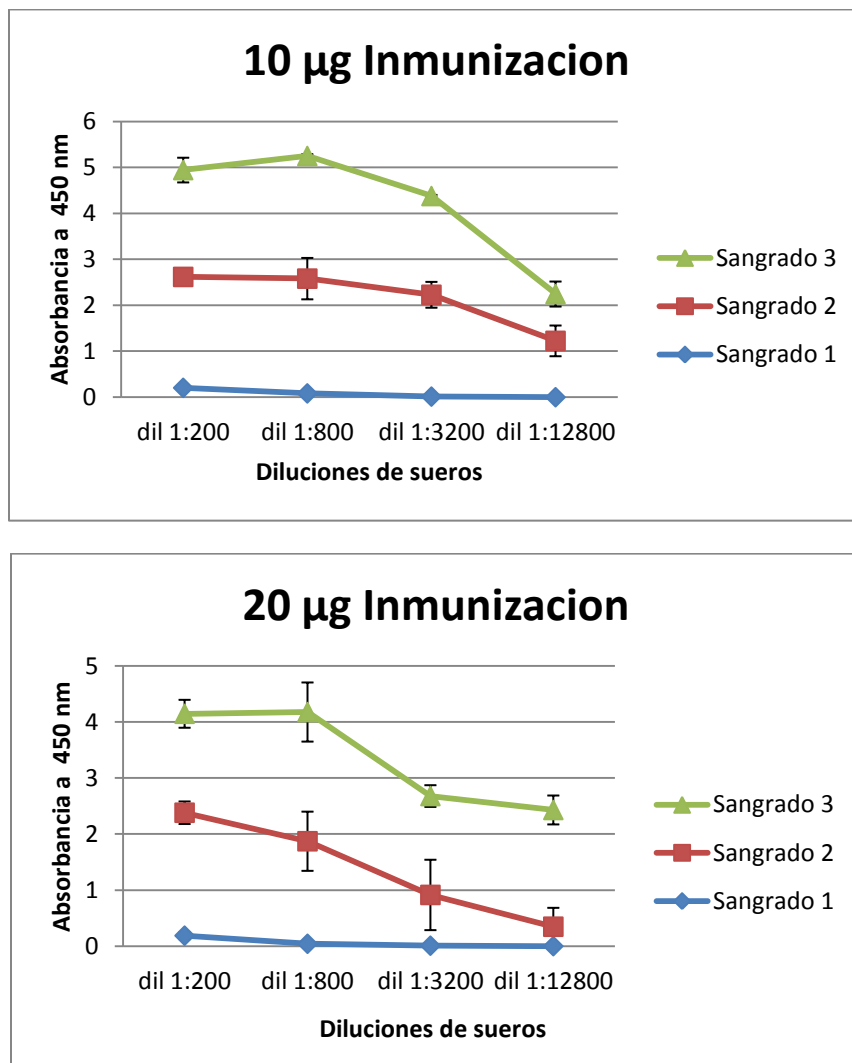


Fig. 5 Que muestra los ensayos tipo Elisa de los sueros de los ratones inmunizados con 10µg y 20 µg respectivamente.

Grafico del ensayo tipo ELISA que muestra el comportamiento de la cuantificación de anticuerpos de los sueros del primer sangrado con respecto al suero control inmunizado con Adyuvante Freund (AF) y los ratones inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína los grupos problemas y que claramente se observa el aumento del título de anticuerpos conforme se realiza la cuantificación, pero se observa que el grupo inmunizado con 10 µg de proteína aumenta en mayor medida el título de anticuerpos solo en la primera dilución y después esta tendencia se observa que no es significativa en los demás diluciones.

## ELISA OMP 0520 cuantificación de anticuerpos

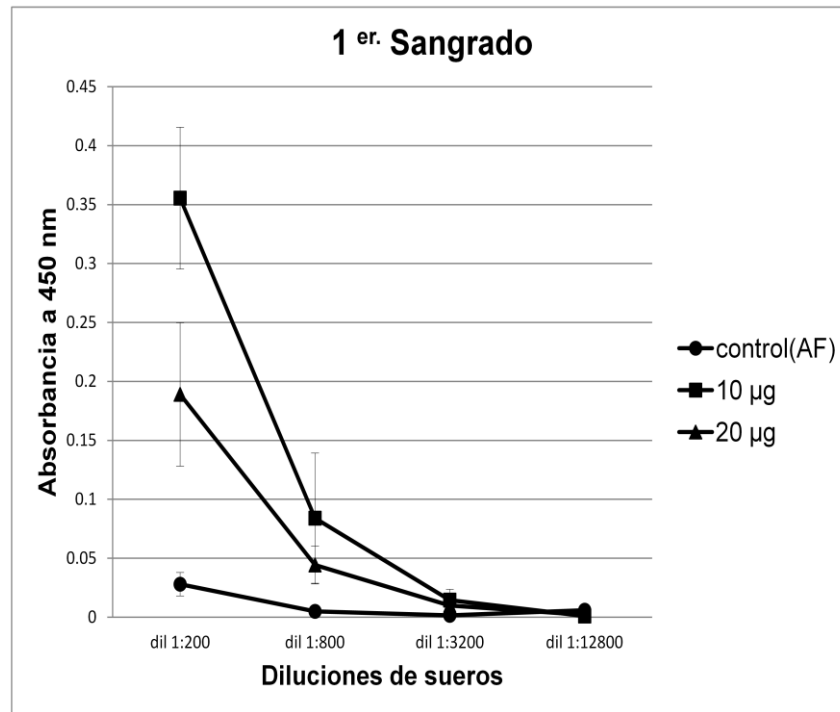


Figura # 6 Que muestra un grafico con los datos del ensayo tipo ELISA comparando en el primer sangrado los sueros de los ratones inmunizados con 10µg y 20 µg de proteína pura respectivamente y los sueros controles solo inmunizados con adyuvante completo e incompleto de freunds (AF).

Grafico del ensayo tipo ELISA que muestra el comportamiento de la cuantificación de anticuerpos de los sueros del segundo sangrado con respecto al suero control inmunizado con Adyuvante Freund (AF) y los ratones inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína los grupos problemas y que se observa una diferencia significativa con respecto al control pero no así difieren significativamente entre los tratamientos de los grupos problemas, se observa claramente un aumento en el pico más alto de anticuerpos con respecto al primer sangrado, pero no se observo una diferencia significativamente marcada en el aumento del título de anticuerpos con respecto a los sueros de 10µg y 20 µg de proteína inmunizada en el segundo sangrado si no que se observa que la mayor tendencia se encuentra en los sueros de ratones inmunizados con 10 µg de proteína con respecto a los títulos.

## ELISA OMP 0520 cuantificación de anticuerpos

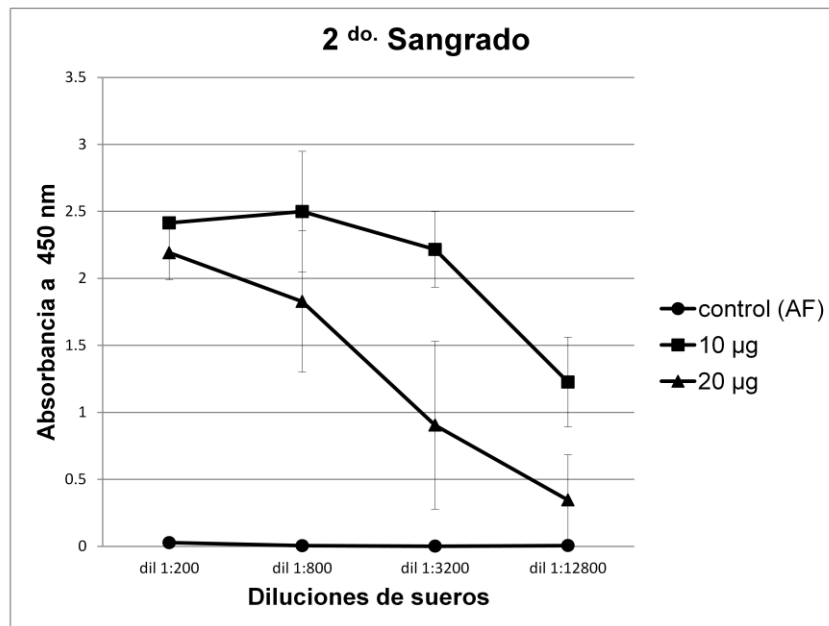


Figura # 7 Que muestra un grafico con los datos del ensayo tipo ELISA comparando en el segundo sangrado los sueros de los ratones inmunizados con 10µg y 20 µg de proteína pura respectivamente y los sueros controles solo inmunizados con adyuvante completo e incompleto de freunds (AF).



Grafico del ensayo tipo ELISA que muestra el comportamiento de la cuantificación de anticuerpos de los sueros del tercer sangrado con respecto al suero control inmunizado con Adyuvante Freund (FA) y los ratones inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína los grupos problemas y que se observa una diferencia significativa con respecto al grupo control pero no difieren significativamente entre los tratamientos, se observa claramente un aumento en el pico más alto de anticuerpos con respecto al segundo sangrado, pero no se observo una diferencia significativa en el aumento del título de anticuerpos con respecto al aumentar la dosis y se observa además un aumento en el titulo al aumentar la dilución de los sueros en el grupo inmunizado con 20 µg de proteína pero esto no es significativamente diferente solo se pudo haber tratado de un error de dedo para este caso en particular lo que permitió que se sesgara.

## ELISA OMP 0520 cuantificación de anticuerpos

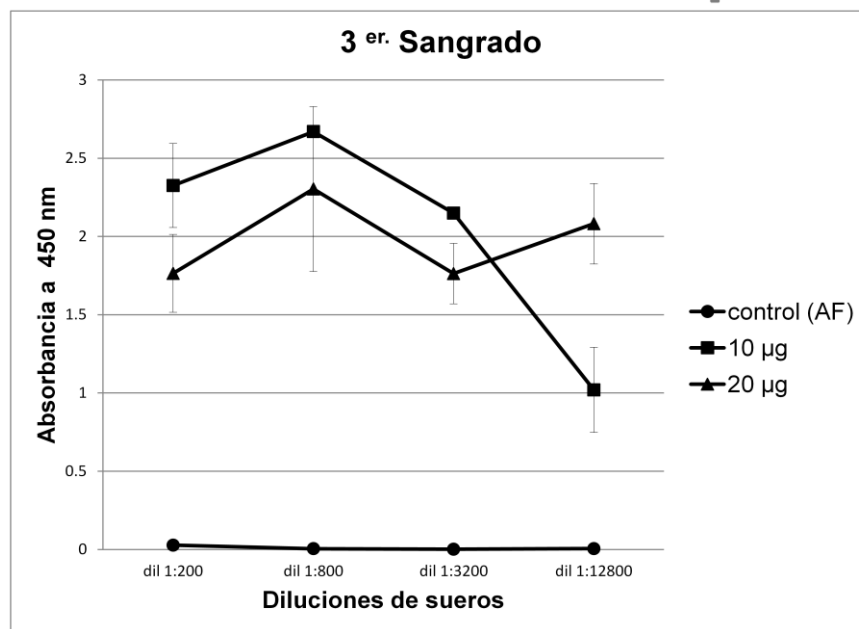
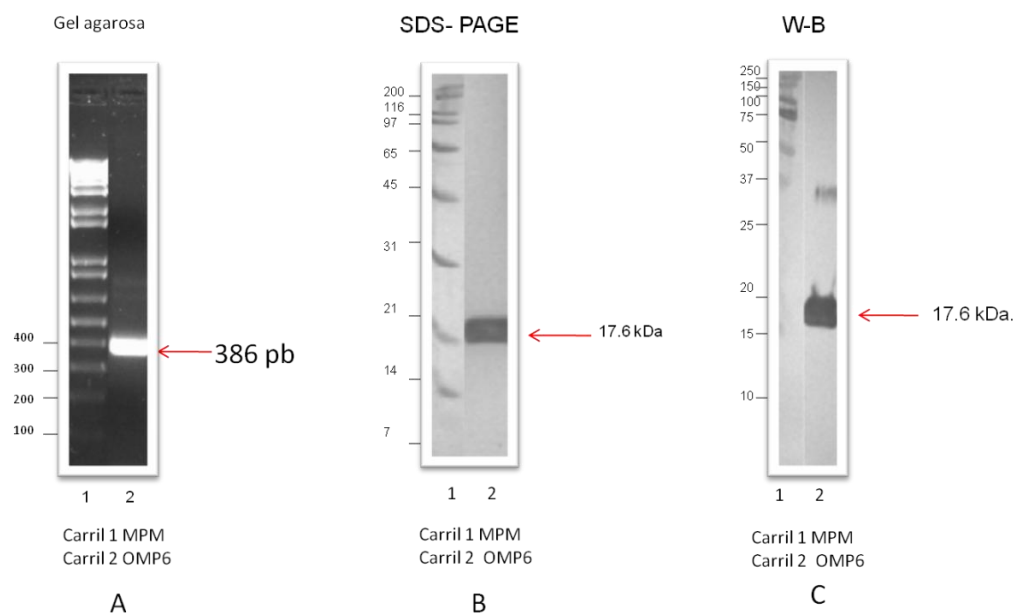


Figura # 8 Que muestra un grafico con los datos del ensayo tipo ELISA comparando en el tercer sangrado los sueros de los ratones inmunizados con 10µg y 20 µg de proteína pura respectivamente y los sueros controles solo inmunizados con adyuvante completo e incompleto de freunds (AF).

## Proteína OMP6

En las siguientes imágenes se observa en el panel A un gel de agarosa donde se observa el amplicón que se obtuvo de ensayos tipo PCR, mismo que fue clonado y transformado en bacterias *E. coli* para inducir la expresión de la proteína y purificarla por cromatografía de afinidad misma que se muestra en el panel B, posteriormente se realizan ensayos tipo western blot para corroborar que es nuestra proteína recombinante porque esta cuenta con una etiqueta de histidinas que es reconocida por un anticuerpo específico y con este ensayo tenemos certeza que nuestra proteína esta lista para ser inmunizada y se muestra en el panel C.

## OMP6

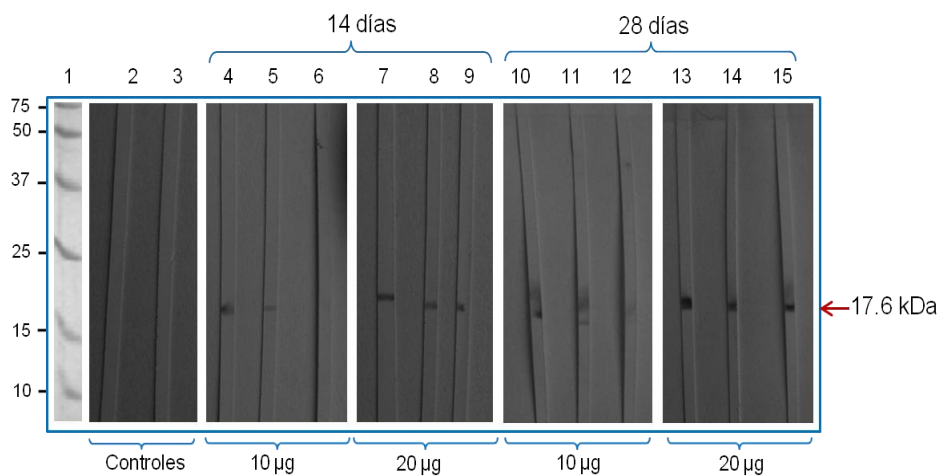


**Figura 9.-** Amplificación clonación, clonación y expresión de la proteína OMP-6. Panel **A**), gel de agarosa al 1%, carril 1, marcadores de peso molecular, carril 2 y punta de flecha producto de PCR o amplicon obtenido correspondiente a la proteína OMP-6 de 386 pares de bases (pb). Panel **B**), Gel de poliacrilamida al 12%, carril1, MPM de amplio rango (Bio Rad), carril 2, proteína purificada OMP-6 de 17.6 kilodaltones (kDas). Panel **C**) Ensayos de “Western blot”, replica del gel del panel B. Carril. Detección de la proteína de 17.6 kDas con el anticuerpo anti-Histidinas.

## Evaluación de los sueros obtenidos de la inmunización con OMP6

La siguiente imagen muestra la evaluación de los sueros que se obtuvieron después de la inmunización de los ratones tipo BalbC machos, con sus respectivas dosis de 10µg, 20µg de proteína y controles con Adyuvante completo e incompleto de freunds, que fueron sangrados a los 0, 14 y 28 días después de la inmunización y se observa a simple vista que los sueros de los 14 días presentaron anticuerpos y al día 28 aparentemente todos los sueros fue positivo el incremento, lo que permite también proponer como candidata para antígeno a la proteína OMP6, por su capacidad de inducir un respuesta inmune de tipo humoral.

## OMP6 inmunización en ratones Balb/C



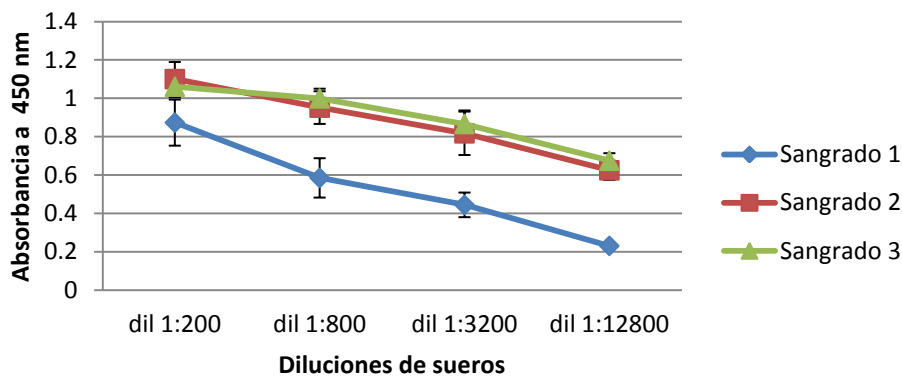
Incubación de anticuerpos 1río 1/50 dilución suero de ratón y 2río Dilución 1/2000 anti IgG ratón acoplado a HRP

Figura # 10 que muestra la evaluación de los sueros por ensayo tipo (WB) de los ratones inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína OMP6 en membranas de nitrocelulosa a los 14 y 28 días después de la inmunización. Carril 1 (MPM) kaleidoscopicos preteñidos de Bio-rad. Carriles 2-3 Sueros evaluados de los ratones controles. Carriles 4-9 Sueros evaluados a los 14 días inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína OMP6 respectivamente. Carriles 10-15 Sueros evaluados a los 28 días inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína OMP6 respectivamente.

# Ensayo de ELISA cuantificación de anticuerpos

Los gráficos muestran los tratamientos del ensayo tipo ELISA donde se realiza la cuantificación de anticuerpos de los sueros de ratones inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína por grupo respectivamente, en tres diferentes sangrados a los días (0, 14 y 28) en las diluciones que se muestran en el grafico y que se observa cómo va disminuyendo el titulo conforme el suero es mas diluido, también se observa el pico más alto en la primera dilución por lo que se concluye que el aumento no es estadísticamente significativo entre los tres sangrados conforme pasan los días, pero existe un aumento evidente entre los sangrados 1 y los sangrados 2 y 3 respectivamente.

## 10 µg inmunizacion



## 20 µg inmunizacion

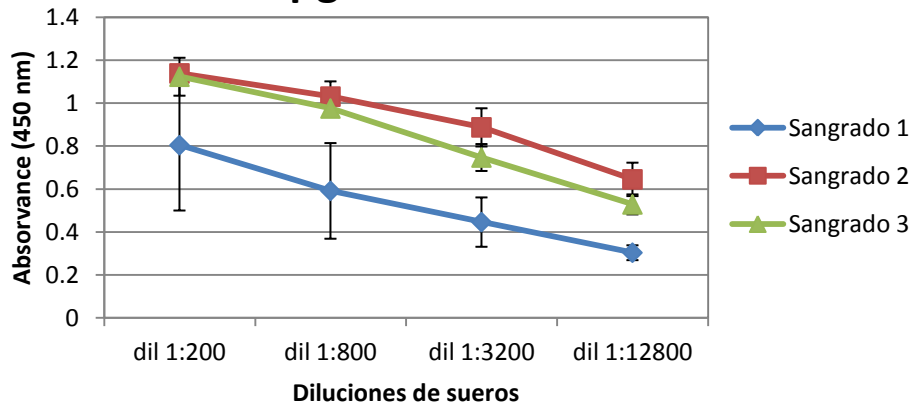


Fig. # 11 Que muestra los ensayos tipo Elisa de los sueros de los ratones inmunizados con 10µg y 20 µg respectivamente.

Grafico del ensayo tipo ELISA que muestra el comportamiento de la cuantificación de anticuerpos de los sueros del primer sangrado con respecto al suero control inmunizado con Adyuvante Freund (FA) de los ratones inmunizados los grupos problemas con 10 µg y 20 µg de proteína y que se observa una diferencia significativa con respecto al control, pero no difieren significativamente entre los tratamientos el aumento del título de anticuerpos al aumentar la dosis de proteína.

## ELISA OMP6 cuantificación de anticuerpos

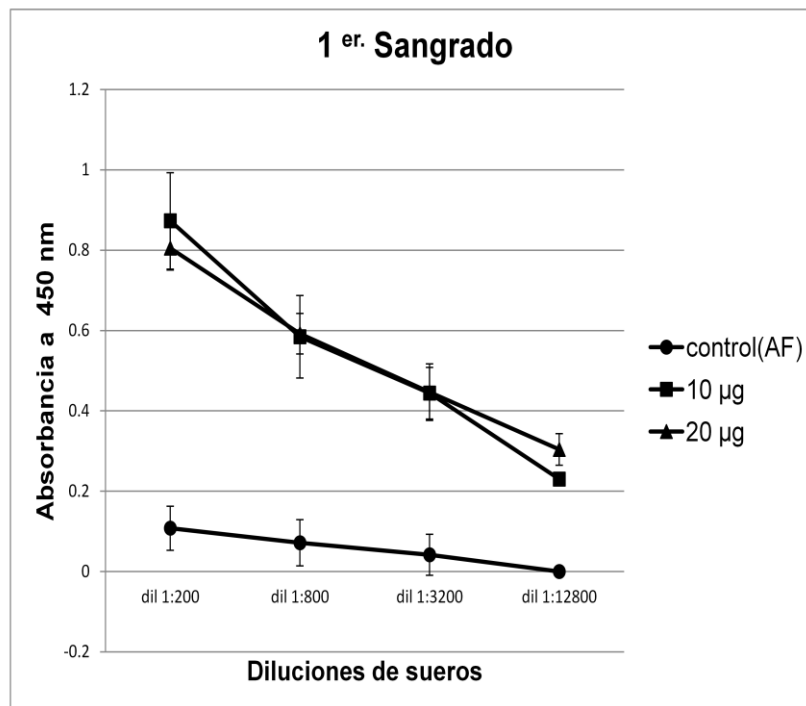


Figura # 12 Que muestra un grafico con los datos del ensayo tipo ELISA comparando en el primer sangrado los sueros de los ratones inmunizados con 10µg y 20 µg de proteína pura respectivamente y los sueros controles solo inmunizados con adyuvante completo e incompleto de freunds (AF).

Grafico del ensayo tipo ELISA que muestra el comportamiento de la cuantificación de anticuerpos de los sueros del segundo sangrado con respecto al suero control inmunizado con Adyuvante Freund (FA) de los ratones inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína los grupos problemas y que se observa una diferencia significativa con respecto al grupo control pero no difieren significativamente entre los tratamientos, se observa claramente un aumento en el pico más alto de anticuerpos con respecto al grafico del primer sangrado (Grafica anterior), pero no se observo una diferencia significativa en el aumento del título de anticuerpos con respecto al aumento de la dosis de proteína inmunizada con 10 µg y 20 µg respectivamente.

## ELISA OMP6 cuantificación de anticuerpos

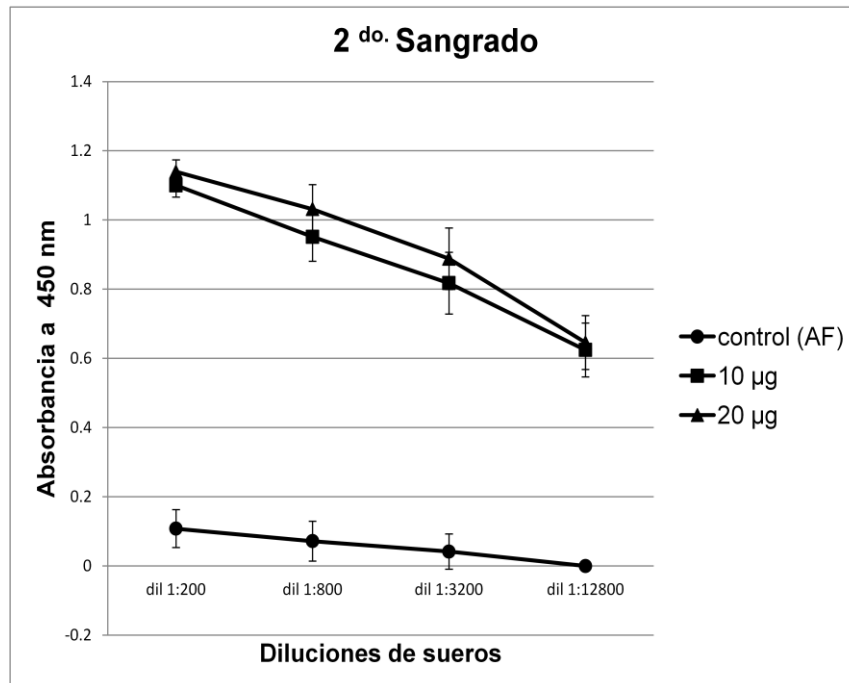


Figura # 13 Que muestra un grafico con los datos del ensayo tipo ELISA comparando en el segundo sangrado los sueros de los ratones inmunizados con 10µg y 20 µg de proteína pura respectivamente y los sueros controles solo inmunizados con adyuvante completo e incompleto de freunds (AF).

Grafico del ensayo tipo ELISA que muestra el comportamiento de la cuantificación de anticuerpos de los sueros del tercer sangrado con respecto al suero control inmunizado con Adyuvante Freund (FA) de los ratones inmunizados con 10 µg y 20 µg de proteína los grupos problemas y que se observa una diferencia con respecto a los resultados del segundo sangrado (grafica anterior) pero no difieren significativamente entre los tratamientos donde se observa claramente un aumento en el pico más alto del título de anticuerpos con respecto al segundo sangrado, pero no se observo una diferencia significativa en el aumento del título de anticuerpos con respecto al aumentar la dosis de proteína inmunizada y se observa además una caída en el titulo de los ratones inmunizados con 20 µg de proteína al aumentar la dilución de los sueros pero esto no marca una caída significativamente diferente.

## ELISA OMP6 cuantificación de anticuerpos

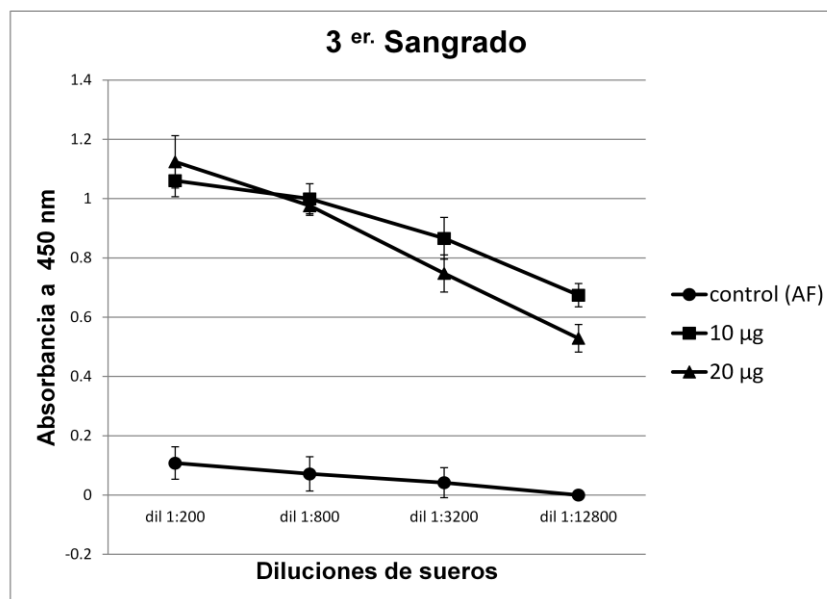
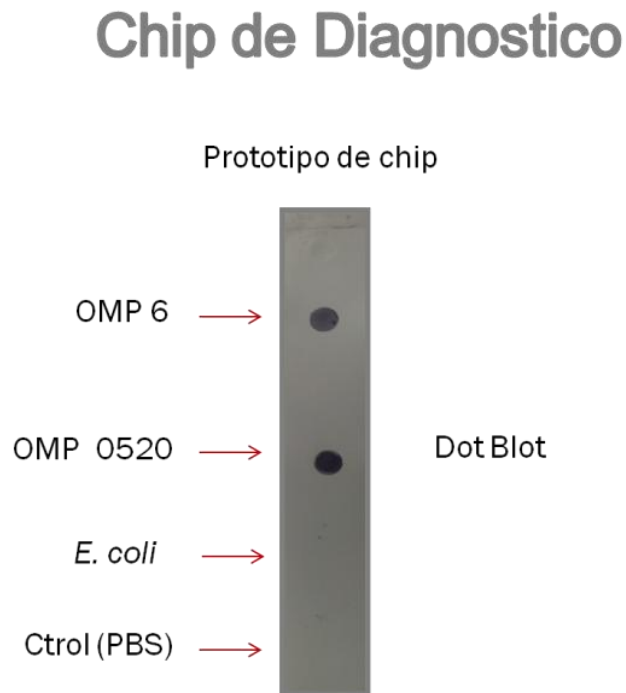


Figura # 14 Que muestra un grafico con los datos del ensayo tipo ELISA comparando en el tercer sangrado los sueros de los ratones inmunizados con 10µg y 20 µg de proteína pura respectivamente y los sueros controles solo inmunizados con adyuvante completo e incompleto de freunds (AF).

## Chip de Diagnostico

La siguiente imagen muestra el ensayo del prototipo de diagnostico por medio de Dot blot e incubado con un suero de Bovino vacunado o infectado por *H. somni* y revelado con HRP como desarrollador de color. Claramente se muestra en el ensayo que solo son reconocidas las proteínas recombinantes (OMP6 y OMP 0520) y que no existe una reactividad cruzada entre anticuerpos al reconocer las proteínas de manera específica (OMP6 y OMP 0520) respectivamente con nuestros controles negativos en este caso proteínas de *E. coli* y PBS. (También comprobado por W-B, datos no mostrados).



Concentración de antígeno 25  $\mu$ l solución (1  $\mu$ g de proteína por punto) respectivamente, anticuerpo primario suero de Bovino infectado o inmunizado con *H. somni* y anticuerpo secundario anti IgG de bovino acoplado a HRP.

Figura # 15 Prototipo de chip de diagnostico.



## DISCUSIÓN

En este trabajo se identificaron varias proteínas mediante métodos inmunoproteómicos. Varias de las cuales fueron identificadas como inmunogénicas. En esta tesis se identificaron unas proteínas denominadas (Porina, OMP 0520 y OMP6). De las proteínas inmunogénicas de *H. somni* identificadas se seleccionaron tres, para posteriormente amplificar sus genes, clonarlos, expresarlos en *E. coli* y analizar su capacidad de ser utilizadas estas proteínas recombinantes como candidatas para vacunas.

Como se mencionó anteriormente, es ampliamente aceptado que la inmunidad contra *H. somni* se obtiene a través de la producción anticuerpos séricos que neutralicen la bacteria y los antígenos de superficie que permiten la adherencia de *H. somni* a la mucosa del hospedero en los pulmones bovinos.

Las proteínas seleccionadas en este estudio podrían estar involucradas en los procesos de adherencia de *H. somni*. Se ha reportado que las proteínas de membrana externa OMP, tienen un papel importante en la adherencia, invasión y también activación de los mecanismos de defensa por medio de neutralización, opsonización de anticuerpos y activación del complemento para muchos patógenos Gram-negativos [23].

Por otro lado Confer y col, (2003) [46], obtuvieron y purificaron la proteína de membrana externa (OMP) recombinante PlpE (rPlpE) para posteriormente utilizarla en combinación con una vacuna comercial, sus resultados mostraron un aumento en la efectividad de la vacuna comercial.

Lo anterior refuerza la idea que las proteínas seleccionadas en esta tesis pueden ser utilizadas como candidatas de antígenos vacúnales en contra de *H. somni*, ya que las proteínas podrían tener gran importancia durante la colonización de la bacteria en las mucosas epiteliales y durante la colonización de la bacteria en el pulmón.

Por lo tanto nuestros antígenos pueden coadyuvar para mejorar vacunas comerciales contra la enfermedad ya que las vacunas comerciales que están en el mercado hoy en día no tiene antígenos de superficie OMPs en sus formulaciones y mucho menos de esta bacteria que está implicada y forma parte de la micro biota del animal.

Los resultados mostrados en esta tesis se demuestra que fue posible amplificar los dos genes respectivos, clonarlos y expresarlos en *E. coli*. Se obtuvo cantidad suficiente de las proteínas puras (OMP 0520 y OMP6) recombinantes para inmunizar ratones Balb/c. Se observó que los animales inmunizados con 10 µg y 20 µg de la proteína recombinante OMP 0520 presentaron una mejor respuesta de anticuerpos que la proteína OMP6 inmunizada con las mismas cantidades y en esta no se observo una diferencia entre inmunizar con 10µg y 20 µg, en los ratones inmunizados.

Algunos autores [44] reportan la inmunización de proteínas recombinantes con 100 µg para sus ensayos de inmunización los cuales confieren entre un 60 y 80 % cuando se reta la enfermedad con 10 veces la dosis letal 50 por lo que nosotros reportamos menor cantidad de proteína inmunizada pero nos faltaría realizar el reto de la infección para corroborar y evaluar el efecto de protección de nuestros antígenos con respecto a los antígenos que reportan estos autores además sería muy importante observar al menos el mismo comportamiento para nuestras proteínas recombinantes en el caso de *H. Somni*.

Por lo que se pudo comprobar que con estas dosis de proteínas, si se logró inducir una respuesta de anticuerpos contra estas proteínas en los ratones inmunizados.

En cuanto al chip de diagnostico logramos implementar un método fácil de identificación de anticuerpos presentes en los animales vacunados o infectados (cabe mencionar que se realizaron varios ensayos tipo w-b y se observo que los animales tanto vacunados como infectados por *H. somni* reconocían el mismo perfil de proteínas inmunogénicas por lo que tomamos la decisión de utilizar un

suero de manera indistinta y este no influiría en el resultado de este ensayo) en donde existe un reconocimiento por los anticuerpos de nuestra bacteria de estudio en este caso *H. Somni* y además trabajamos con un volumen muy pequeño de suero el cual nos reconoce específicamente cada una de nuestras proteínas recombinantes sin ningún problema y con buena señal, estas mismas proteínas se evaluaron en los ensayos de inmunización en ratones y por lo tanto se pudiera utilizar esta herramienta para el rápido diagnóstico de la infección y que nuestros antígenos servirían como proteínas homologas a las nativas para dicho diagnóstico y evaluar los animales para un específico tratamiento de la infección. Hasta el día de hoy no existe o se ha reportado un ensayo semejante con el que se pueda predecir la infección de *H. somni* de forma específica nosotros pretendemos utilizar este prototipo para este fin. Sin embargo se pueden preguntar como con dos antígenos se puede pretender realizar una prueba de diagnóstico, en la bibliografía [50] en este último periodo de la Tesis 2012-B se reporto un par de antígenos mas, diferentes a los reportados en esta tesis que son evaluados y parecen conferir protección contra *H. somni*, lo que se pretende también usar ese par de antígenos para potenciar la respuesta de esta prueba de diagnóstico y aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba sin restar valor a los resultados de dichos autores y coadyuvar los conocimientos para tener una mejor prueba. Además faltaría ser validada la prueba con un numero robusto de animales para afirmar que funciona como método de diagnóstico y así determinar que en realidad se tiene una alternativa para el diagnóstico.

## CONCLUSIONES

Se observaron varias proteínas inmunogénicas con los ensayos inmunoproteómicos. Donde fueron seleccionadas tres proteínas inmunogénicas por sus características e identificadas mediante Espectrometría de masas y análisis *in silico*.

Se Trabajo con las tres proteínas seleccionadas denominadas, (PORINA, OMP 0520 Y OMP6) ordenadas de mayor a menor peso molecular, fue posible amplificar los dos genes respectivos, clonarlos y expresarlos en *E. coli*.

Se obtuvo cantidad suficiente de las proteínas recombinantes excepto la porina que se trato de inducir masivamente pero desafortunadamente no se pudo, pero con las otras dos recombinantes (OMP 0520 y OMP6) se utilizaron para inmunizar ratones Balb/c y evaluar la capacidad de las proteínas para inducir una respuesta humoral y se realizaron ensayos tipo ELISA para cuantificar anticuerpos con resultados no antes publicados o reportados por la literatura.

En la base de datos (NCBI) la proteína OMP 0520 de *H. somni* se encuentra reportada como una proteína hipotética en este trabajo hemos demostrado que esta proteína es expresada por *H. somni* y que además es inmunogénica. Se logro obtener la proteína recombinante y al evaluarla se demostró que tiene la capacidad de inducir una respuesta humoral en ratones.

La proteína OMP6 de *H. somni* no ha sido reportada como inmunogénica, en este trabajo hemos demostrado que esta proteína es inmunogénica y al evaluarla como antígeno, demostró la capacidad de inducir una respuesta de tipo humoral en ratones.

En reportes previos de inmunización de antígenos se utilizan entre 50µg y 100 µg de proteína por ratón nosotros inmunizamos 10µg y 20 µg respectivamente y se observa que inducen la producción de anticuerpos en los ratones con la OMP

0520 y OMP6 lo que representa un menor costo económico en la producción de la recombinante si estos ensayos se llegan a probar en animales (bovinos) para la evaluación de la protección en los animales.

Con respecto a los ensayos tipo ELISA en los dos tratamientos para la cuantificación de los anticuerpos de las proteínas inmunizadas denominadas como (OMP6 y OMP 0520) se obtuvieron resultados buenos y reproducibles y se concluye que todos los tratamientos conservaron una tendencia semejante y que los errores estadísticos no sesgaron los resultados por lo que estos datos pudieran servir para trabajos posteriores en la evaluación de estos antígenos, también es importante recalcar que con respecto a la cantidad inmunizada de la proteína OMP6 no se observó una diferencia entre inmunizar 10µg y 20µg respectivamente y para el caso de la OMP0520 también pasó un efecto similar solo que con diferencias significativas muy levemente marcadas pero que se verán reflejadas realmente cuando en un posible trabajo de doctorado se pruebe con animales (bovinos) para evaluar su verdadero efecto con el Hospedero de la infección causada por *H. somni*.

Por último se logró armar un protocolo de un chip de diagnóstico para la detección de anticuerpos presentes en membrana externa de *H. Somni*. Que además funciona y es un prototipo económico para su reproducción y para su posible utilización como método de diagnóstico.

Con los datos obtenidos se armara un artículo científico y una solicitud de patente como entregables.

## APÉNDICE

### *Protocolos.*

#### ***Separación electroforética de proteínas.***

##### ***Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE .***

Este protocolo es usado para separar proteínas de acuerdo a su peso molecular. Estas migran hacia el ánodo, a través de la malla de poliacrilamida al aplicar una corriente eléctrica.

1. Ensamblar la celda con los vidrios y los espaciadores del equipo de minigeles Mini-PROTEAN® Tetra Electrophoresis System de Bio-Rad y montarlo sobre el contenedor portavidrios para el vaciado de los geles.
2. Preparar la solución del gel separador, con la concentración de acrilamida deseada (tabla 4). Inmediatamente, verter esta solución a la celda de vidrios. Llenar (aprox. 5 ml de solución) hasta dejar un espacio superior de aproximadamente 1 cm dejando espacio suficiente para el gel concentrador.
3. Permitir la polimerización durante 30 minutos aproximadamente.
4. Preparar el gel concentrador (TABLA 3, parte inferior). Inmediatamente transferir la solución a la celda de vidrios. Insertar el peine (según el número de pozos que se requieran o en el caso de no requerir pozos usar un peine preparativo) evitando dejar burbujas entre el peine y el gel.
5. Permitir la polimerización de 5 a 7 minutos aproximadamente.
6. Una vez polimerizado el gel, remover cuidadosamente los peines y montar los porta vidrios en el corazón de los electrodos de la cámara de electroforesis. Adicionar el amortiguador de corrida 1× (en Soluciones), tanto en el compartimiento interno (aprox. 100 ml) como en la parte baja de la cámara (hasta donde indique la marca en la cámara).
7. Preparar las muestras biológicas. Adicionando Amortiguador de muestra 1× o 2×, según sea el caso. En caso de muestras líquidas adicionar Buffer 2× a una proporción 1:1. Para pastillas de proteínas precipitadas, adicionar de 30 a 40 µl de amortiguador de muestra 1× (ver Soluciones). Hervir 5 min y centrifugar antes de cargar el sobrenadante a los pozos del gel de poliacrilamida.
8. Adicionar el marcador de peso molecular en uno de los pozos (Tabla 5).
9. Conectar los electrodos de la cámara de electroforesis a una fuente de poder y correr durante 5 min. a 160 voltios para alinear las proteínas en el límite del gel concentrador (pre-corrída), correr las muestras durante 70 min. a 120 voltios. Desconectar la fuente cuando la marca del azul de bromofenol, contenido en el amortiguador de muestra, cruce prácticamente todo el gel separador.

10. Una vez terminada la corrida, desensamblar la cámara y recuperar los geles. Visualizar las proteínas separadas tiñendo el gel con solución colorante de azul de Coomassie (Tabla de Soluciones).

Gel separador.

Concentración final de acrilamida en geles separadores.										
Soluciones stock (ml)	5%	6%	7%	7.5%	8%	9%	10%	12%	13%	15%
Acrilamida 30%/ bis acrilamida 0.8%	2.50	3.00	3.50	3.75	4.00	4.50	5.00	6.00	6.50	7.50
4× Tris-Cl/SDS pH 8.8	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
Agua destilada	8.75	8.25	7.75	7.50	7.25	6.75	6.25	5.25	4.75	3.75
Persulfato de amonio al 10%	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

Gel concentrador.

Soluciones stock (ml)	
Acrilamida 30% /bis acrilamida 0.8%	0.65 ml
4× Tris-Cl/SDS, pH 6.8	1.25 ml
Agua destilada	3.05 ml
Persulfato amonio 10%	0.025 ml
TEMED	ml
	0.005 ml

Tabla 4. Receta para la preparación de geles de poliacrilamida de concentración y separación de proteínas. Estas recetas equivalen a 15 ml de solución de separación, lo cual es suficiente para 3 minigeles de 1mm de grosor.

	PM (kDa)	Color
Broad Range standard (Bio-Rad laboratorios)	200	sin
	116	sin
	97.4	sin
	66	sin
	45	sin
	31	sin
	21.5	sin
	14.5	sin
	6.5	sin
Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad laboratorios)	250	Azul
	150	Magenta
	100	Verde
	75	Violeta
	50	Naranja
	37	Rojo
	25	Rosa
	20	Azul
	15	Azul
10	Amarillo	
Polipeptides Prestained Standards (Bio-Rad laboratorios)	31	Azul
	25	Rosa
	20	Azul
	15	Azul
	10	Azul

Tabla 5. Marcadores de peso molecular para SDS-PAGE Tris-glicina.



### **Preparación de la muestra (lisados de *H. somni*).**

Este procedimiento está basado en bacterias (*H. somni*) crecidas en medio de cultivo líquido. Las condiciones del cultivo (tamaño del inoculó, temperatura, tiempo, agitación, medio de cultivo y volumen) dependen de la bacteria de estudio. La cantidad de muestra a utilizar depende de la velocidad de crecimiento de la bacteria y, el volumen del amortiguador de lisis depende de la cantidad de muestra. La modulación de estos parámetros tiene que ser probado empíricamente. La tabla 6 muestra una guía de la cantidad de muestra apropiada para su observación con dos diferentes tinciones.

1. Cultivar las bacterias en matraces erlenmeyer con medio de cultivo (caldo BHI) a partir de viales congelados a 37°C y 200rpm en agitación orbital durante 24h.
2. Centrifugar 15mL del cultivo a 7000 por 15 min.
3. Descartar el sobrenadante y lavar 2 veces la pastilla con amortiguador PBS.
4. Agregar 3mL de amortiguador de lisis 2-D.
5. Sonicar con pistón en 6 ciclos de 10seg.
6. Centrifugar a 13,000rpm 5min.
7. Tomar sobrenadante y hacer alícuotas de 100µL
8. Congelar a -70°C hasta el momento de su uso.

### **Extracción de proteínas de membrana externa (con sarcosil).**

Este procedimiento se basó en uno previamente descrito (Newton **et al.**, 1990) con algunas modificaciones.

1. Cultivar bacterias (*H. somni*) en matraces erlenmeyer con medio de cultivo (caldo BHI o Cassoy), a partir de viales congelados, a 37°C y 200rpm en agitación orbital durante 24h y con 5-10% de CO<sub>2</sub>.
2. Centrifugar 100mL del cultivo a 7000 por 15 min, para obtener una pastilla bacteriana.
3. Lavar la pastilla una vez con amortiguador HEPES 10mM (pH 7.4).
4. Centrifugar a 12,000 x g durante 20 min.
5. Resuspender la pastilla en amortiguador HEPES 10mM (pH 7.4)
6. Sónica con un sonicador de baño durante 40min.
7. Centrifugar a 10,000 x g durante 15min. a 4°C.
8. Conservar el sobrenadante y centrifugar a 120,000 x g durante 45min a 4°C.
9. Desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 1mL de HEPES 10mM 1mL de N-lauroyl sarcocinato al 2% (p/v).
10. Dejar incubar a temperatura ambiente durante 30 min.
11. Centrifugar a 120,000 x g por 45 min. a 4°C.
12. Descartar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 1mL de agua destilada.
13. Refrigerar si se va a usar en los próximos días, o congelar a -70°C.

### **Western blot.**

1. Preparar un gel SDS-PAGE con las proteínas deseadas separadas.
2. Cortar un recuadro de membrana de nitrocelulosa del tamaño aproximado del gel, teniendo especial cuidado de no maltratar ni ensuciar la membrana, utilizar guantes y procurar no tocarla.
3. En una cámara fría colocar 1L de buffer de transferencia, previamente enfriado a 4 °C.
4. Montar dentro de la prensa del equipo de electrotransferencia los componentes en el siguiente orden: 1) esponja 2)papel 3)gel 4)membrana 5)papel 6)esponja.
5. Cerrar la prensa asegurándose que no queden burbujas de aire entre el gel y la membrana, y de haber montado el gel de tal manera que los marcadores de peso molecular queden fijados en el lado izquierdo de la membrana.
6. Insertar la prensa en el cassette, dentro de la cámara de electrotransferencia, en tal posición que las proteínas del gel migren hacia el polo positivo situado detrás de la membrana, para que queden fijas en ella.
7. Colocar la unidad de enfriamiento, previamente enfriada a -20°C.
8. Conectar la cámara de electrotransferencia en la fuente de poder y programar la corrida a 100 volts durante 1hora.
9. Terminada la corrida marque la membrana, antes de mover el gel, en los extremos del gel.
10. Bloquear con leche al 5% en PBS-Tween 20 al 0.05% toda la noche a 4°C y, en agitación.
11. Lavar con PBS-Tween 20 al 0.1% 5 veces a temperatura ambiente con agitación vigorosa.
12. Incubar toda la noche, a 4°C y en agitación, con el anticuerpo primario (en nuestro caso, utilizamos sueros de bovino) diluido en leche al 5% en PBS-Tween 20 0.05% (empíricamente se determinó que la relación de volumen adecuada a nuestro caso era de 1:500).
13. Lavar con PBS-Tween 20 al 0.1% 5 veces a temperatura ambiente con agitación vigorosa.
14. Colocar el anticuerpo secundario ratón anti-IgG bovino acoplado a peroxidasa de rábano picante, en dilución 1:3000 (Bio-Rad) en leche al 2.5% en PBS-Tween 20 al 0.05%.
15. Incubar durante 2.5 horas a temperatura ambiente en agitación.

16. Lavar con PBS-Tween 20 al 0.1% 5 veces a temperatura ambiente con agitación vigorosa.
17. Preparar las soluciones por separado, primero la A y luego la B; tienen que ser preparadas al momento del revelado (Tabla 8).
18. Mezclar las soluciones (adicionar la A en la B).
19. Adicionar la mezcla en la membrana de nitrocelulosa
20. Revelar el color entre 5-30 minutos.
21. Parar la reacción lavándola muy bien con agua bidestilada
22. Dejar la secar a temperatura ambiente
23. Almacenar en protección de la luz

Volumen final (mL)	Solución A		Solución B	
	HRP (mg)	Metanol (mL)	PBS (mL)	Perhidrol (µL)
120	60	20	100	120
60	30	10	50	60
30	15	5	25	30
15	7.5	2.5	12.5	15

Tabla 8. Soluciones para el revelado de *western blot* con el método de peroxidasa.

### Protocolo de extracción de ADN Genómico.

- 1.- Se centrifuga los medios de cultivo por 2 minutos a 13000 revoluciones por minutos rpm y al final se descarta el sobrenadante.
- 2.- La pastilla celular se resuspende con 293 µl de EDTA 50 mM.
- 3.- Se adicionan 7.5 µl de buffer de lisis 20mg/ml y se mezcla suavemente.
- 4.- Se centrifuga como en el paso 1 y se descarta el sobrenadante.
- 5.- A la pastilla se resuspende con 300 µl de buffer de lisis nuclear y después se rehidrata el ADN.
- 6.- Centrifugar 13000 rpm por 3 minutos y transferir el sobrenadante en un tubo limpio que contenga 300 µl de isopropanol a temperatura ambiente mezclar por inmersión y centrifugar a las mismas condiciones de este paso.
- 7.- Eliminar el isopropanol y resuspender la pastilla con 300 µl de etanol al 70% como lavado.

8.- Se vuelve a centrifugar a 13000 rpm por 2 min y secar al aire hasta eliminar el etanol.

9.- Por último se agrega 50 µl de Buffer de rehidratación de ADN y se deja incubando a 65 °C por una hora y está listo para ser cuantificado y usado como templado para PCR.

### **Extracción de ADN Plasmidico.**

1.- Se centrifuga el cultivo bacteriano a 5000 rpm por 1 min y se descarta el sobrenadante.

2.- La pastilla celular se resuspende con 350 µl de buffer de resuspension mas 250 µl de buffer de lisis mas 250 µl de buffer de neutralización y se mezcla varias veces por inmersión.

3.- Se centrifuga a 5000 rpm por 1 min separándose en una fase clara u otra blanca, se toma la fase clara y se coloca en una columna con filtro color azul incluido en el kit. (Evitando no arrastrar la fase blanca).

4 Después se centrifuga la columna a 3000 rpm por 1 min hasta pasar el total de la fase clara y se elimina.

5.- La columna se le realiza un lavado con 250 µl de buffer de lavado que contiene etanol y se centrifuga como en el paso anterior.

6.- Al final se le agregan 20 µl de buffer de elución a la columna y se incuba por el lapso de 2 min.

7.- Después se centrifuga como en los pasos anteriores y se recupera en un tubo eppendorf nuevo y está listo para cuantificarse en espectrofotómetro a 350 nm según las recomendaciones del fabricante.

### **Preparación de Geles de agarosa.**

Se pesan 0.4 grs de agarosa y se mezclan con 40 ml de Buffer TAE1X nuevo y se calienta en un matraz elenmeyer 100 ml 45 segundos en horno de microondas y al final se agita y se agregan 4 µl Sybr Safe (colorante entre cruzador de ácidos nucleicos) para luz UV y se coloca en el porta geles y se deja un periodo de 30 min y está listo para ser cargado.

### **Preparación de medio (Luria Bertani LB). Solido y líquido.**

LB solido para placas. Para preparar 1 litro (L) de caldo.

10 grs de Extracto de levadura.

10 grs de Peptona.

10 grs de Agar bacteriológico.

5 grs de NaCl.

Opcional agregar ya estéril y en frio ampicilina 100 mg/ml.

LB Liquido.

10 grs de Extracto de levadura.

10 grs de Peptona.

5 grs de NaCl.

Esterilizar en autoclave y guardar a 4° C.

### **Preparación de Marcador de peso molecular.**

20 µl stock de marcador de peso molecular para geles de agarosa o ADN.

20 µl stock de Buffer de carga 6X.

60 µl de agua desionizada.

## **Soluciones.**

### **1. Solución amortiguadora de PBS pH 7.4 (*Phosphate buffer saline*)**

Por cada 200 mL de amortiguador, disolver una tableta de PBS 7.4 de Invitrogen™.

### **2. Persulfato de amonio al 10%**

10 mg (0.01 g) en 1 ml de agua destilada.  
Almacenar en alícuotas hasta 2 semanas a -20 °C.

### **3. Acrilamida al 30% /bis acrilamida al 0.8%**

Acrilamida (Bio-Rad)	29.2 g
Bis acrilamida (Bio-Rad)	0.8 g

Disolver en 40 ml de agua destilada. Una vez disuelto aforar hasta 100 ml.  
Filtrar a través de papel filtro "Whatman" no. 1.  
Almacenar a 4°C hasta 1 mes, previamente protegido de la luz.

### **4. Tris-Cl/SDS 4x, pH 8.8 (1.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS)**

Trizma-base (Sigma)	9.08g
SDS (Sigma)	0.2 g

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH 8.8 con HCl.  
Aforar a un volumen final de 50 ml con agua destilada.  
Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45 µm.  
Almacenar a 4°C.

### **5. Tris-Cl/SDS 4x, pH 6.8 (0.5 M Tris-Cl, 0.4% SDS)**

Trizma-base (Sigma)	3.025g
SDS (Sigma)	0.2 g

Disolver en 20 ml de agua destilada y ajustar a pH 6.8 con HCl.  
Aforar a un volumen final de 50 ml con agua destilada.  
Filtrar la solución a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ .  
Almacenar a 4°C.

#### 6. SDS-amortiguador 2×

Trizma-base	1.52 g
SDS	2 g

Disolver en 50 ml de agua destilada y ajustar el pH a 6.8.  
Posteriormente adicionar:

Glicerol	20 mL
Agua destilada	(aforar a 100 mL)

#### 7. Amortiguador de muestra 1× (BM 1×) (Muestras sólidas)

SDS-amortiguador 2×	500 $\mu\text{L}$
$\beta$ -mercaptoetanol 5%	50 $\mu\text{L}$
Azul de bromofenol (stock 10 mg/mL)	50 $\mu\text{L}$
Agua desionizada	400 $\mu\text{L}$

#### 8. Amortiguador de muestra 2× (BM 2×) (Muestras líquidas)

SDS-amortiguador 2×	400 $\mu\text{L}$
$\beta$ -mercaptoetanol 5%	50 $\mu\text{L}$
Azul de bromofenol (stock 10 mg/mL)	50 $\mu\text{L}$

#### 9. Amortiguador de corrida para electroforesis 5× (Stock)

Glicina (Sigma)	72 g
Trizma-base (Sigma)	15.1 g
SDS (Sigma)	5.0 g

Aforar con agua destilada a 1 litro

## 10. Amortiguador de corrida para electroforesis 1×.

Amortiguador 5× stock	100 ml
Agua destilada	400 ml

## 11. Solución Colorante de proteínas (Azul brillante de Coomassie)

	0.05%	0.2%
Metanol	500 ml	500 ml
Ácido Acético glacial	100 ml	100 ml
Agua destilada	400 ml	400 ml
Azul de Coomassie	0.5 gr	2 gr

Tapar perfectamente el matraz y disolver toda la noche.  
Proteger de la luz. Almacenar a temperatura ambiente.

## 12. Solución Decolorante de geles de poliacrilamida

	Normal	Fuerte
Metanol	165 ml	500 ml
Ácido Acético glacial	50 ml	125 ml
Agua destilada	785 ml	625 ml

Tapar perfectamente el matraz y disolver.

Almacenar a temperatura ambiente.

## 13. Solución Equilibradora SDS de 2-D

Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 (1.5 gr en 25 ml de agua)	12.5 ml
SDS 10% (10 gr en 100 ml de agua )	23 ml
β-mercaptoetanol	
Glicerol 10%	5 ml
Azul de Bromofenol 0.05% (0.005 gr en 10 ml de agua)	8 ml 2.5 ml
Agua destilada	49 ml



#### 14. Amortiguador de lisis para 2-D

Tris HCl pH 7.8	200µL
EDTA	200µL
Urea	9.6g
DTT	154mg
Glicerol	2mL
Chaps	600mg
Anfolinas	3mL

#### 15. Amortiguador de Transferencia

Trizma-base 25 mM	3.03 gr
Glicina 190 mM	14.25 gr
Metanol 20 %	200 ml

Disolver primeramente el trizma y la glicina. Una vez disuelto agregar el metanol y finalmente, aforar a 1 litro con agua destilada. Enfriar a 4°C, hasta su uso (no es necesario ajustar el pH).

## Agradecimientos

Agradezco a DIOS por darme la oportunidad de tener salud y vida.

Agradezco a la Universidad de Baja California Norte campus Mexicali UABC por darme la oportunidad de cursar una Maestría en Ciencias y a los profesores que nos enseñaron y orientaron para salir adelante.

Le doy mi más sincero reconocimiento y agradezco a mi Tutor el Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez por su apoyo y dirección de esta tesis.

Agradezco también al Dr. Miguel Juan Beltrán García por el apoyo para entrar al posgrado y su ayuda en todo momento para sacar adelante los proyectos.

Agradezco a mis maestros Dr. Anne Chelder, Dr. Rafael Gonzales, Dr. Froylan, Dr. Miguel Beltrán, Dr. Cesar Pedroza, Dr. Abel Gutiérrez y Dr. Moisés Martínez por todo lo que me enseñaron.

Agradezco a mi familia especialmente a mi madre María Antonia Rodríguez Flores por todo su apoyo y por darme la vida, a mis hermanos; Roxana, Laura, Esteban y Julián por todo el apoyo que recibí.

También agradezco a mi novia Mayra que supo comprender lo difícil que es estudiar y su apoyo recibido.

A mis compañeros de Maestría Gloria y Ángel, además de todos los compañeros del laboratorio del CIATEJ que me orientaron e hicieron más amena mi estadía.

Por último agradezco a CONACYT por creer en mí dándome una beca.

## Bibliografía

1. Edwards, A., *Respiratory disease of feedlot cattle in the central USA*. Bovine Practice, 1996. **30**(1): p. 5-7.
2. Vogel, G. and C. Parrot, *Mortality survey in feedyards: the incidence of death from digestive, respiratory, and other causes in feedyards on the Great Plains*. Compendium on continuing education for the practicing veterinarian, 1994. **16**(2): p. 12-23.
3. Frank, G., *Pasteurellosis in cattle*, in *Pasteurella and Pasteurellosis*, C. Adlam and J. Rutter, Editors. 1989, Academic Press: London, UK. p. 197-222.
4. Trigo, F. and C. González, *Avances sobre la patogenia de la neumonía bovina*, in *Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos 2002*: Villahermosa, Tabasco, México.
5. USDA, *Cattle Death Loss*. 2011, National Statistics Service.
6. Griffin, D., *Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 1997. **8**(1): p. 29-56.
7. Ken, G., et al., *An evaluation of antimicrobial therapy for undifferentiated bovine respiratory disease*. The Canadian Veterinary Journal, 1990. **31**(10): p. 689-696.
8. Yates, W., *A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle*. Canadian Journal of Comparative Medicine, 1982. **46**(3): p. 225-263.
9. Pandher, K., A. Confer, and G. Murphy, *Genetic and immunologic analyses of P1pE, a lipoprotein important in complement-mediated killing of Pasteurella haemolytica serotype 1*. Infection and Immunity, 1998. **66**(12): p. 5613-5619.
10. Nardini, P., A. Mellors, and R. Lo, *Characterization of a fourth lipoprotein from Pasteurella haemolytica A1 and its homology to the OmpA family of*

- outer membrane proteins*. FEMS Microbiology Letters, 1998. **165**(1): p. 71-77.
11. Lee, R., et al., *Expression of a modified Mannheimia haemolytica GS60 outer membrane lipoprotein in transgenic alfalfa for the development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis*. Journal of Biotechnology, 2008. **135**(2): p. 224-231.
  12. Morton, R., et al., *Vaccination of cattle with outer membrane protein-enriched fractions of Pasteurella haemolytica and resistance against experimental challenge exposure*. American Journal of Veterinary Research, 1995. **56**(7): p. 875-879.
  13. Confer, A., et al., *Molecular aspects of virulence of Pasteurella haemolytica*. Canadian Journal of Veterinary Research, 1990. **55**(S): p. 48-52.
  14. Sreevatsan, S., et al., *Evaluation of three experimental subunit vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle*. Vaccine, 1996. **14**(2): p. 147-154.
  15. Srinand, S., et al., *Evaluation of efficacy of three commercial vaccines against experimental bovine pneumonic pasteurellosis*. Veterinary Microbiology, 1996. **52**(1-2): p. 81-89.
  16. Adler, B., et al., *Immunity and vaccine development in Pasteurella multocida infections*. Journal of Biotechnology, 1996. **44**(1-3): p. 139-44.
  17. Confer, A.W., et al., *Intranasal vaccination of young Holstein calves with Mannheimia haemolytica chimeric protein PlpE-LKT (SAC89) and cholera toxin*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2009. **132**(2-4): p. 232-236.
  18. Shewen, P. and B. Wilkie, *Vaccination of calves with leukotoxic culture supernatant from Pasteurella haemolytica*. Canadian Journal of Veterinary Research, 1988. **52**(1): p. 30-36.
  19. Confer, A.W., et al., *Immunity of cattle following vaccination with a Mannheimia haemolytica chimeric PlpE-LKT (SAC89) protein*. Vaccine, 2009. **27**(11): p. 1771-1776.

20. Ayalew, S., et al., *Immunoproteomic analyses of outer membrane proteins of Mannheimia haemolytica and identification of potential vaccine candidates*. Proteomics, 2010. **10**(11): p. 2151-2164.
21. Ayalew, S., et al., *Intranasal vaccination of calves with Mannheimia haemolytica chimeric protein containing the major surface epitope of outer membrane lipoprotein PlpE, the neutralizing epitope of leukotoxin, and cholera toxin subunit B*. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2009. **132**(2): p. 295-302.
22. Ayalew, S., et al., *Mannheimia haemolytica chimeric protein vaccine composed of the major surface-exposed epitope of outer membrane lipoprotein PlpE and the neutralizing epitope of leukotoxin*. Vaccine, 2008. **26**(38): p. 4955-4961.
23. Dagmara, I. and C. Czuprynski, *Identification of Mannheimia haemolytica Adhesins Involved in Binding to Bovin Bronchial Epithelial Cells*. Infection and Immunity, 2009. **77**(1): p. 446-455.
24. Blanco, F., et al., *Serotipos de Pasteurella multocida y Pasteurella hamolytica aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos*. Veterinaria México, 1993. **24**(2): p. 107-112.
25. Confer, A., R. Panciera, and D. Mosier, *Bovine pneumonic pasteurellosis: immunity to Pasteurella haemolytica*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1988. **193**(10): p. 1308-1316.
26. McKercher, D., et al., *Viral agents recovered from Ornithodoros coriaceus, a vector of epizootic bovine abortion*. American Journal of Veterinary Research, 1980. **41**(5): p. 803-805.
27. Church, T. and O. Radostits, *A retrospective survey of diseases of feedlot cattle in Alberta*. Canadian Veterinary Journal, 1981. **22**(1): p. 27-30.
28. Jakab, G., *Mechanisms of virus-induced bacterial superinfections of the lung*. Clinical Chest Medicine, 1981. **2**(1): p. 59-69.
29. Loosli, C., *Synergism between respiratory viruses and bacteria*. Yale Journal of Biology and Medicine, 1968. **40**(3): p. 522-540.

30. Trigo, F., *El Complejo Respiratorio Infeccioso de los Bovinos y Ovinos*. Ciencia Veterinaria, 1987. **4**(1): p. 1-37.
31. Dalgleish, R., *Bovine pneumonic pasteurellosis*. In practice, 1990. **12**(6): p. 223-226.
32. Trigo, F., *El virus respiratorio sinicital bovino en las neumonías de bovinos y ovinos*. Veterinaria México, 1983. **14**(2): p. 175-179.
33. Worthen, G., et al., *Lung Vascular injury induced by chemotactic factors*. Federation Proceedings, 1986. **45**(1): p. 7-12.
34. Edwards, T., *Control Methods for Bovine Respiratory Disease for Feedlot Cattle*. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 2010. **26**(2): p. 273-284.
35. Angen, O., et al., *Taxonomic relationships of the [Pasteurella] haemolytica complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of Mannheimia haemolytica gen. nov., comb. nov., Mannheimia granulomatis comb. nov., Mannheimia glucosida sp. nov., Mannheimia ruminalis sp. nov. and Mannheimia varigena sp. nov.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1999. **49**(1): p. 67-86.
36. Younan, M. and L. Fodor, *Characterisation of a new Pasteurella haemolytica serotype (A17)*. Research in Veterinary Science, 1995. **58**(1): p. 98.
37. Jason Gioia, et al., *The Genome Sequence of Mannheimia haemolytica A1: Insights into Virulence, Natural Competence, and Pasteurellaceae Phylogeny*. Journal of Bacteriology, 2006. **188**(20): p. 7257-7266.
38. Conlon, P., et al., *Effects of Pasteurella haemolytica A1 culture supernatant on mechanisms controlling bovine alveolar macrophage oxygen radical production*. Canadian Journal of Veterinary Research, 1990. **54**(2): p. 232-237.
39. Gúzman-Brambila, C., *Formulación de una vacuna polivalente contra el complejo respiratorio bovino, a partir de la expresión heteróloga de proteínas antigénicas de Histophilus somni y Mannheimia haemolytica*, in

*Doctorado en Ciencias Biomédicas*. 2012, Universidad de Guadalajara: Guadalajara.

40. Conlon, J., P. Shewen, and R. Lo, *Efficacy of recombinant leukotoxin in protection against pneumonic challenge with live Pasteurella haemolytica A1*. *Infection and Immunity*, 1991. **59**(2): p. 587-591.
41. Lee, C., et al., *Sialoglycoprotease of Pasteurella haemolytica A1: detection of antisialoglycoprotease antibodies in sera of calves*. *Sialoglycoprotease of Pasteurella haemolytica A1: detection of antisialoglycoprotease antibodies in sera of calves*, 1994. **58**(2): p. 93-98.
42. Shewen, P., et al., *Efficacy of recombinant sialoglycoprotease in protection of cattle against pneumonic challenge with Mannheimia (Pasteurella) haemolytica A1*. *Vaccine*, 2003. **21**(17-18): p. 1901-1906.
43. Oriola, J., *Metodología de la reacción en cadena de la polimerasa*. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 1991. **40**(1): p. 31-34.
44. Briles, D., et al., *Intranasal Immunization of Mice with a Mixture of the Pneumococcal Proteins PsaA and PspA Is Highly Protective against Nasopharyngeal Carriage of Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 2000. **68**(2): p. 796-800.
45. Harlow E and D. Lane, *Antibodies a Laboratory Manual*, ed. C. Press. 1988.
46. Confer, A.W., et al., *Immunogenicity of recombinant Mannheimia haemolytica serotype 1 outer membrane protein PlpE and augmentation of a commercial vaccine*. *Vaccine*, 2003. **21**(21-22): p. 2821-2829.
47. Strathdee, C.A. and R.Y.C. Lo, *Cloning, nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the Pasteurella haemolytica leukotoxin determinant*. *Journal of Bacteriology*, 1989. **171**(2): p. 916-928.
48. Roehrig, S.C., et al., *The response of Mannheimia haemolytica to iron limitation: implications for the acquisition of iron in the bovine lung*. *Veterinary Microbiology*, 2007. **121**(3-4): p. 316-29.

49. Sezer Okay, Erkan Ozcengiz., Immunogenicity and protective efficacy of the recombinant pasteurella lipoprotein E and outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* A:3 in mice. *Veterinary Science*, 2012.
50. Carolina Guzmán-Brambila, Argelia E. Rojas-Mayorquín, Beatriz Flores-Samaniego, and Daniel Ortuño-Sahagúna, Two Outer Membrane Lipoproteins from *Histophilus somni* Are Immunogenic in Rabbits and Sheep and Induce Protection against Bacterial Challenge in Mice, *Clinical vaccine immunology*, 2012.