

Expresión soluble de la proteína RmS-3 de garrapata *Rhipicephalus microplus* en *Escherichia coli*.

María Guadalupe Flores Estrada, Gerardo Reséndiz Cardiel, Yosehandy Palma Leal, Jaime Ortega López.
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Ciudad de México, 07360. mariag.flores@cinvestav.mx.

Palabras clave: Rhipicephalus microplus, RmS-3, vacunas

Introducción. *Rhipicephalus microplus* es la garrapata que tiene un mayor impacto económico en México, Centroamérica, Suramérica y Australia que conducen a pérdidas económicas estimadas en miles de millones de dólares en todo el mundo (1). Actualmente los métodos de control de garrapatas dependen de acaricidas químicos. Sin embargo, la creciente preocupación de la población por los riesgos de contaminación por residuos de químicos en productos lácteos y cárnicos y el surgimiento de poblaciones de garrapatas resistentes a los acaricidas (2-5) han motivado la búsqueda de antígenos que induzcan la respuesta inmune, entre las que se encuentran proteínas de las secreciones salivales de las garrapatas como las serpinas. Una de estas proteínas, la serpina RmS-3, inhibe la quimotripsina y la catepsina G y es reconocida por anticuerpos de ganado resistente a garrapata. Además, RmS-3 de *R. microplus* fue reconocida por anticuerpos producidos por la saliva de *A. americanum*, *I. scapularis* y *Rhipicephalus sanguineus*, sugiriendo un posible uso de esta proteína para el desarrollo de una vacuna universal contra garrapatas (6-7)

El objetivo de este trabajo es clonar y expresar la serpina RmS-3 en distintos vectores y cepas de *E. coli* para obtenerla en forma soluble.

Metodología. La secuencia de ADN (1.2 kb) que codificada la proteína RmS-3 se sometió a una optimización de codones para su expresión en *E. coli*, se sintetizó químicamente con los sitios de restricción *Nde1* y *Xho1* en los extremos 5' y 3' respectivamente (GenScript®). La secuencia optimizada se subclonó de manera dirigida en los vectores de expresión pCri-8b y pCri-1b los cuáles tienen un gen de resistencia a Kanamicina, y una etiqueta de poli-histidinas, además para el caso de pCri-1b tiene un módulo de unión a maltosa (MBP) (8). Se transformó la cepa *E. coli* DH5 α para propagación de los plásmidos y se comprobó la presencia del gen *rms-3* en clonas seleccionada mediante un análisis de doble restricción. Para la expresión de la proteína, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) y SoluBL21 (DE3) con las construcciones pCri-8b/*rms-3* y pCri-1b/*rms-3* y se realizaron pruebas de expresión a 20 y/o 37°C. La expresión de la proteína recombinante RmS-3 se analizó por SDS-PAGE.

Resultados. En la Fig. 1 se puede observar que la doble digestión de ambas construcciones libera una banda de 1.2 kb, correspondiente al inserto *rms-3*. En la Fig. 2 se muestra el perfil de expresión proteico, donde se observa que a 37°C la cepa de *E. coli* BL21 (D3) expresa tanto la proteína RmS-3 (pCri-8b/*rms-3*) como la proteína MBP-RmS-3 (pCri-1b/*rms-3*) solo en cuerpos de inclusión. Sin embargo, al bajar la temperatura a 20°C, se observa expresión de la proteína RmS-3 en la fracción soluble y aumenta considerablemente la proteína MBP-RmS3 soluble. El

perfil de expresión a 20 °C en la cepa SoluBL21 revela que la expresión de proteína soluble con ambas construcciones, siendo más evidente en la construcción pCri-1b/*rms-3*, indicando que fusión al módulo MBP, la cepa y la temperatura ayuda significativamente a la expresión de la proteína en forma soluble.

Fig. 1. Análisis de doble restricción en gel de agarosa 1% de las construcciones pCri-8b/*rms-3* y pCri-1b/*rms-3*.

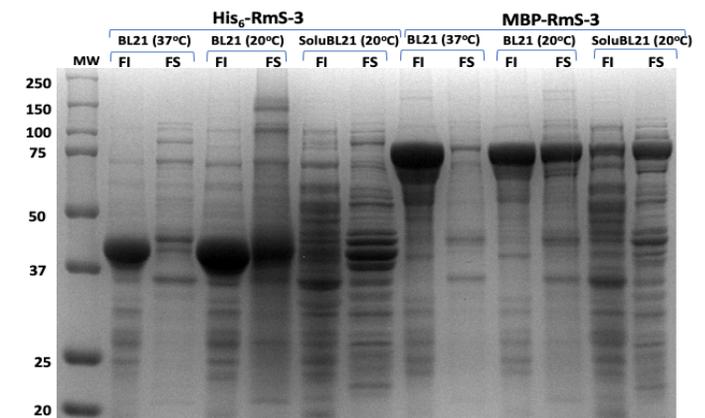
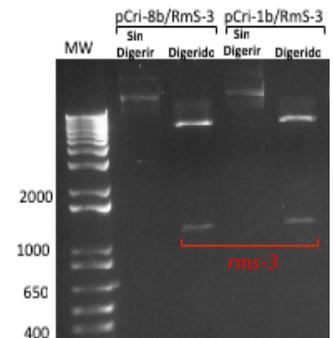


Fig. 2. Expresión de la proteína RmS-3 analizada por SDS-PAGE.

Conclusiones. Se logró expresar la proteína RmS-3 de *R. microplus* en *E. coli* de forma soluble lo que facilitaría su uso como antígeno para el desarrollo de una vacuna contra garrapata.

Agradecimientos. Por el apoyo de CINVESTAV-IPN y de CONACyT; donativo INFR-2016-269657 a JOL y beca 635866 a MGFE para estudios de maestría.

Bibliografía.

- Guerrero *et al* (2006) Journal of Medical Entomology 43: 9-16.
- Graf *et al* (2004) Parasitology 129: S427-S442.
- De la Fuente, J., Kocan, K.M. (2006) Parasite Immunol. 28: 275-283.
- Bissinger, B.W., Roe, R.M. (2010) Pestic. Biochem. Physiol. 96: 63-79.
- Ghosh, P. Azhahianambi, M.P. Yadav. (2007) J Vector Borne Dis. 44:79-89
- Rodriguez-Valle *et al* (2012) Tick Tick Borne Dis. 3: 159-169.
- Tirloni *et al* (2016). Insect Biochem. Mol. Biol. 71: 12-28.
- Goulas *et al* (2014) PLoS One. 9: 1-10