

CLONACIÓN DEL GEN CAF1 DE YERSINIA PESTIS EN EL CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Silvia Seraylán Ormachea¹, Cleidy Osorio-Mogollón², Carlos Padilla-Rojas²

Resumen

Objetivo. Amplificar mediante PCR y clonar la secuencia del gen *caf1*, que codifica el antígeno capsular F1 de *Yersinia pestis*, en el plásmido pET 32a (+) de *E. coli* Top 10 y BL21DE3. **Materiales y métodos.** Se utilizó material genético de una cepa nativa de *Yersinia pestis* para estandarizar la amplificación del gen *caf1* mediante PCR, empleando oligonucleótidos iniciadores previamente reportados. El producto de amplificación del gen *caf1* se clonó en el vector pET 32a (+) y se transformaron células competentes de *E. coli* Top 10 y *E. coli* BL21DE3. Se extrajo el plásmido mediante miniprep, se amplificó el gen *caf1* por PCR y se secuenció el inserto. Finalmente, se compararon los resultados del secuenciamiento con la secuencia del gen *caf1* reportado en el GenBank, utilizando la herramienta bioinformática BLAST. **Resultados.** El gen *caf1* se amplificó mediante PCR, obteniendo un fragmento de aproximadamente 506 pb. El producto de amplificación se clonó en el vector pET 32a (+) y se transformaron cepas de *E. coli* Top 10 y BL21DE3. La correcta clonación se confirmó mediante secuenciación del producto de amplificación, que podría usarse para la detección de anticuerpos contra la peste.

Palabras clave: *Yersinia pestis*, antígeno F1, gen *caf1*, pET 32a (+)

Introducción

La peste es una enfermedad zoonótica causada por la bacteria *Yersinia pestis*, un bacilo gramnegativo que ha sido responsable de grandes epidemias a lo largo de la historia. Afecta principalmente a roedores y, de manera accidental, a humanos a través de la picadura de pulgas¹. Este patógeno posee una dosis infecciosa extremadamente baja, estimada entre 1 y 10 organismos, lo que lo convierte en una de las bacterias más virulentas identificadas². La peste neumónica es una de las principales enfermedades infecciosas con potencial epidémico y alta letalidad. La peste pulmonar primaria, aunque rara, tiene una tasa de mortalidad del 100% si no se trata y más del 50% con tratamiento antimicrobiano³.

La mayoría de las pruebas desarrolladas se basa en la detección de anticuerpos anti-F1 o antígeno F1^{4,5,6,7}, que es un componente de cápsula específico para *Yersinia pestis* y está presente en grandes cantidades en muestras sanguíneas y en bubones de personas infectadas con *Yersinia*⁴.

¹ Centro Nacional de Productos Biológicos, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

² Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

Citar como: Seraylán S, Osorio-Mogollón C, Padilla-Rojas C. Clonación del gen *Caf1* de *Yersinia pestis*. Bol Inst Nac Salud. 2023;29(2):23-9. DOI: <https://doi.org/10.17843/bins.2023.29N2.03>

El laboratorio de Reactivos de Diagnóstico del Centro Nacional de Productos Biológicos (CNPB) del Instituto Nacional de Salud (INS), utiliza la fracción antigénica F1 de *Y. pestis* para producir kits de diagnóstico de peste. Esta fracción se purifica a partir de cultivos masivos de biomasa de *Y. pestis*, empleando métodos de precipitación con sales y diálisis⁸. El bajo rendimiento de obtención del antígeno y el riesgo para el personal al manipular los cultivos masivos del agente patógeno son los principales inconvenientes de esta tecnología. Por ello, se llevó a cabo el presente proyecto para amplificar la secuencia codificante del antígeno F1 mediante PCR y clonar el gen *caf1* de *Yersinia pestis*.

Material y métodos

El material genético se obtuvo de una cepa de *Yersinia pestis* aislada durante el brote de Trujillo en el año 2010, utilizando el Kit de extracción de ADN "PureLink® Genomic DNA Kit".

Estandarización de PCR para amplificación del GEN CAF 1

La amplificación del gen *caf1* se llevó a cabo empleando oligonucleótidos iniciadores previamente reportados por Wang Peng⁹ los cuales fueron sintetizados comercialmente. Las secuencias de los iniciadores Forward y Reverse son las siguientes: 5-ATTTGCGGCCGCTTGGTTAGATACGGTTACGGTTACA-3' y 5-CGCGCATCCGCGGCAGATTTAACTGCAAGCA-3' respectivamente. El producto de amplificación se analizó en geles de agarosa y se visualizó mediante la coloración con bromuro de etidio.

Clonación del GEN CAF1

El producto de amplificación del gen *caf1* se clonó en el vector pET 32a (+). Para ello, el amplicón se purificó utilizando el Kit Invitrogen™ y luego se digirió tanto el inserto como el vector con las enzimas de restricción NotI y BamHI. Los productos de ambas reacciones se purificaron y, finalmente, el inserto se ligó al plásmido pET 32a (+), utilizando la enzima T4 DNA ligasa. Con el producto de ligación, se transformaron células competentes de *E. coli* Top 10 mediante el método de cloruro de calcio¹⁰. Las cepas transformadas se plaquearon en placas de Agar LB con 100 µg/mL de ampicilina e incubaron a 37° C durante 18 horas. Se seleccionaron algunas colonias y se cultivaron toda la noche en caldo LB-ampicilina a 37° C con agitación para extracción del ADN plasmídico (miniprep). El ADN plasmídico obtenido se visualizó en geles de agarosa al 1.5% y se seleccionaron las colonias recombinantes con fragmentos de mayor peso molecular. Se verificó la clonación realizando PCR para amplificación del gen *caf1* en los miniprep seleccionados.

Posteriormente, se subclonó en células competentes de *E. coli* BL21DE3. Las colonias obtenidas se cultivaron cada una en caldo LB-ampicilina y se realizó un PCR para comprobar la presencia del inserto en las colonias de BL21DE3 transformadas. Finalmente, se seleccionó una colonia que mostró resultados positivos al PCR para amplificación del gen *caf1* y se secuenció el inserto. Los resultados del secuenciamiento se compararon con la secuencia del gen *caf1* reportado en el GenBank mediante la herramienta bioinformática BLAST del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Resultados

1. Amplificación del GEN CAF1 de *Yersinia pestis*

El volumen de reacción fue de 50 µL, las condiciones de la mezcla fueron: Buffer tampón 1X, 0,8 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 1 µM *caf1*-F1A, 1 µM *caf1*-F1S, 2 U/µL de Amplitaq ADN polimerasa, 5 µL DNA. Se empleó una denaturación inicial de 95 °C por cinco minutos, 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, este ciclo se repitió 30 veces, se hizo una extensión final a 72 °C por 5 minutos en un termociclador Bioer LifeEco. En un gel de agarosa al 1%, se observó un fragmento con un tamaño aproximado de 506 pb. (Figura 1).

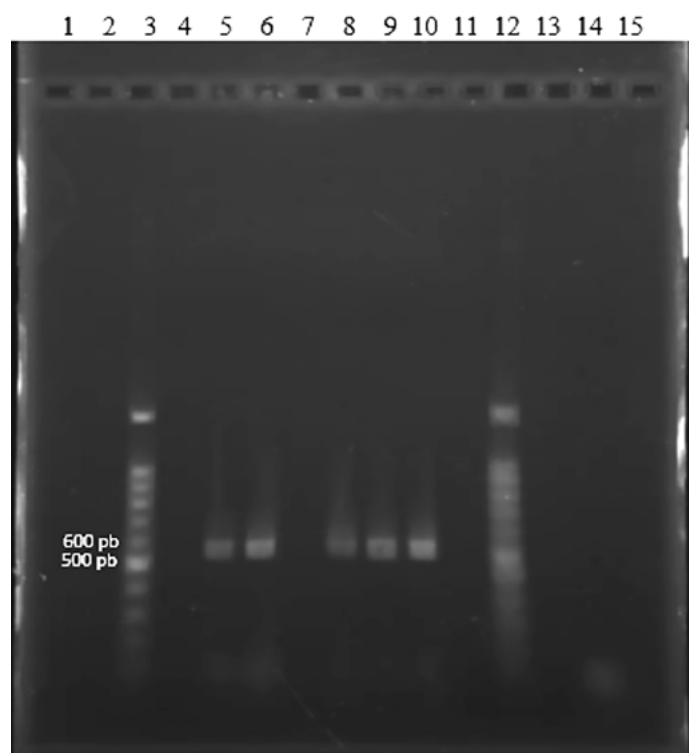


Figura 1. Amplificación del gen *caf 1* agarosa al 1%. En el carril 3 y 12 marcador de 100 pb, en los carriles 5,6,8,9 y 10 amplificados del PCR, en el carril 11 control negativo.

2. Clonación del GEN CAF1

2.1. Digestión enzimática de inserto

El primer forward y reverse tienen las secuencias de reconocimiento para las enzimas *NotI* y *BamHI*.

Caf1-F1A: 5'ATTT**GCGGCCGC**TTGGTTAGATATACGGTTACA-3' **NotI**

Caf1-F1S:5'CGCG**GATCC**GCGGCAGATTTAACTGCAAGCA-3' **BamHI**

El volumen de la reacción fue de 100 μ L: 50 μ L de Inserto purificado, 10 μ L de Buffer D 10 X, 5 μ L de *BamHI* (10U/ μ L), 2 μ L de *NotI* (50 μ g/ μ L), 10 μ L de BSA 1/10 y 23 μ L de Agua de PCR, la reacción se incubó a 37°C por 4 horas.

2.2 Digestión enzimática del plásmido pET32a

La digestión del plásmido se realizó primero con la enzima *NotI*, se incubó a 37°C hasta el día siguiente, el volumen de la reacción fue de 50 μ L: 30 μ L de plásmido purificado, 5 μ L de Buffer D 10 X, 5 μ L de *NotI* (50 μ g/ μ L), 5 μ L de BSA 1/10 y 5 μ L de Agua de PCR. La elución se realizó en 30 μ L. Seguidamente, se procedió a digerir con la enzima *BamHI*: 30 μ L del producto de la primera digestión, 5 μ L de Buffer D 10 X, 5 μ L de *BamHI* (10U/ μ L) 5 μ L de BSA 1/10 y 5 μ L de Agua de PCR. La elución se realizó en 50 μ L. Se incubó a 37°C hasta el día siguiente.

2.3 Ligación enzimática de pET32a con CAF1

Se midió la concentración de DNA del plásmido y del inserto en el equipo NanoDrop™ 8000 Spectrophotometer: pET 32 a = 15 ng/ μ L y *caf1* = 8.837 ng/ μ L. Para calcular el volumen de inserto *caf1* para añadir en la reacción se utilizó la herramienta NeBioCalculator v1.9.0 (disponible en <https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>). La reacción se realizó a 4°C por 24 horas.

2.4 transformación bacteriana

Células competentes *E. coli* Top 10 fueron transformadas con el plásmido recombinante obtenido, por el método de choque térmico. Se obtuvieron 226 colonias en la placa con plásmido AUTOLIGADO y 495 colonias con plásmido LIGADO (Figura 2).

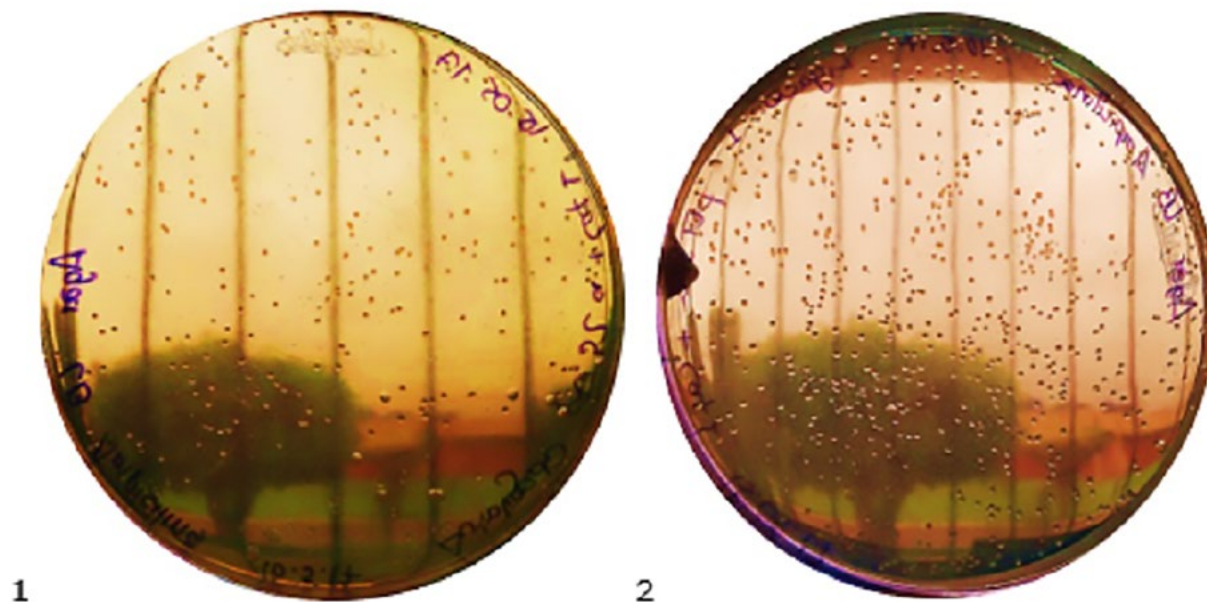


Figura 2. Placas Agar-LB Ampicilina 100 mg/mL **1:** placa con colonias de plásmido AUTOLIGADO. **2:** Placas con colonias de plásmidos LIGADO

Se seleccionaron 11 colonias de la transformación con el plásmido recombinante y 1 colonia de la transformación con el plásmido autoligado para ser sembradas en caldo LB-ampicilina y extraer los plásmidos por Miniprep. Se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1.5% y las clonas 1.1, 1.3, 1.5, 1.6, 1.7, 1.9, 1.10 mostraron un mayor tamaño y son candidatas a portar el inserto. (Figura 3).

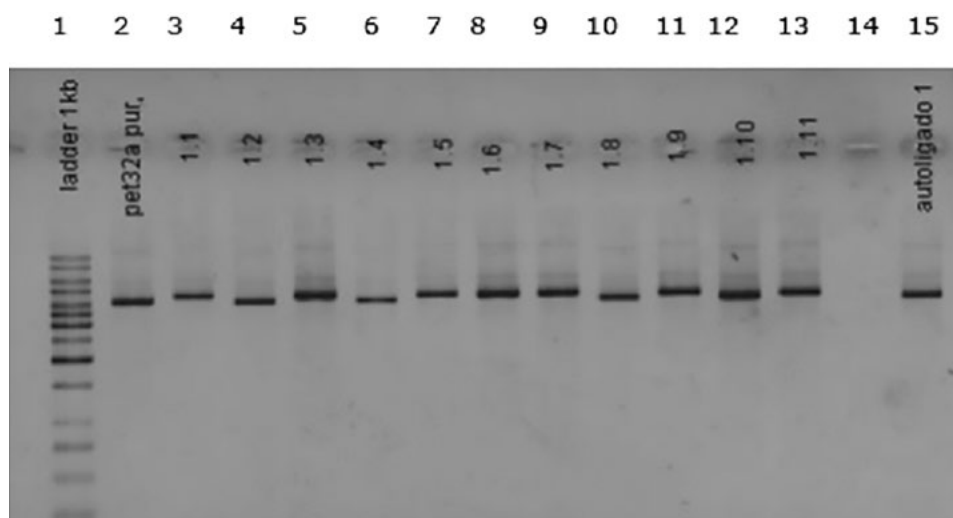


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Carril 1: ladder 1 kb. 2: pET32 purificado, CARRIL 3 AL 13: colonias obtenidas en placa con plásmido ligado, carril 15 plásmido autoligado.

Seguidamente se realizó la transformación bacteriana de células competentes de *E. coli* BL21(DE3) utilizando 5 μ L de plásmido recombinante (clona 1.3) para expresión de proteínas. Se cultivó una colonia de cada placa de transformación en caldo LB-ampicilina para realizar un PCR colonia con el fin de comprobar la presencia del inserto en las colonias de BL21DE3 y todas mostraron productos de amplificación en el tamaño esperado de 506 pb (Figura 4).

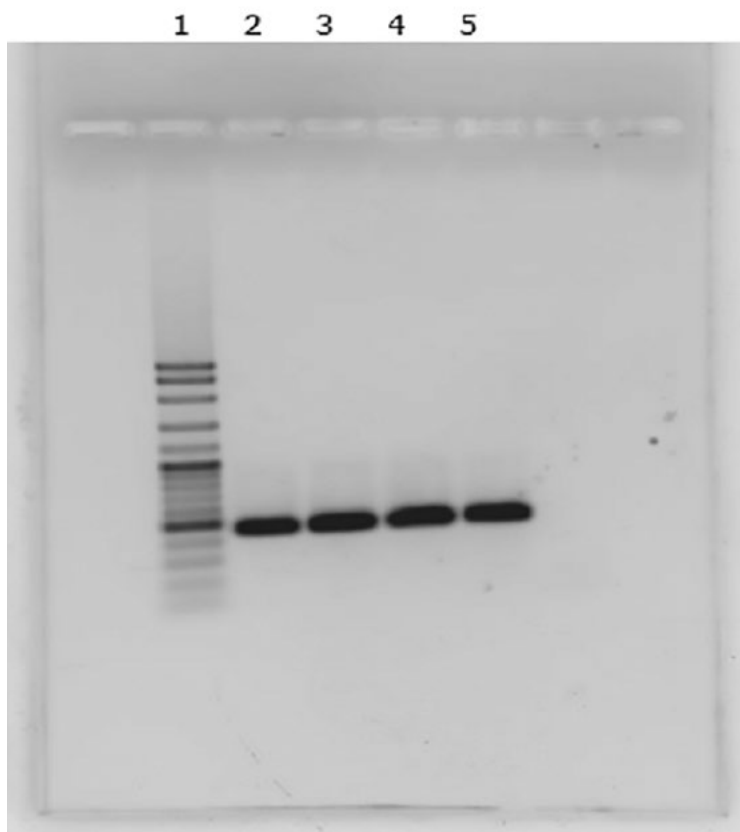


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. de los productos del PCR colonia. Carril 1: ladder 1 kb. 2: Amplificación de la clona 1.3. 3: Amplificación de la clona 1.6. 4: Amplificación de la clona 1.7. 5: Amplificación de la clona 1.9.

3. Secuenciamiento del inserto

Se realizó el secuenciamiento del plásmido recombinante de la clona 1.3 por el método de Sanger *et al.* (1977) para ello se utilizó los primers forward y reverse del gen *caf1* recombinante y adicional a estos el primer T7 forward, el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), el secuenciador ABI, y el programa Chromas 1.0 para su respectivo análisis.

Discusión

Estudios previos han demostrado que la alta virulencia de la bacteria se debe a factores codificados tanto por el cromosoma como por tres plásmidos bien caracterizados: (1) pFra/pMT1 de 90-110kb, que codifica a la fracción antigénica F1 y a una fosfolipasa D conocida como Toxina Murina; (2) pYV/pCD de 170 kb, que codifica al antígeno V, y al sistema de secreción tipo III; (3) pPst/pPCP1/pPla de 9.5 kb, que codifica una colección de proteínas que facilitan la diseminación de la bacteria en el hospedero mamífero, como la pesticina, la coagulasa y el activador del plasminógeno ¹¹.

El objetivo del presente trabajo fue amplificar y clonar la secuencia codificante del gen *caf1* de *Yersinia pestis* en el plásmido pET32a (+). Para esta investigación, se empleó una cepa nativa *Y. pestis* INS, que cuenta con la secuenciación del genoma completo de la cepa *Y. pestis* INS¹². Los resultados de la clonación del gen *caf1*, que codifica a la proteína F1, fueron comparados con la secuencia reportada en el GenBank mediante la herramienta bioinformática BLAST del NCBI.

El laboratorio de Reactivos de Diagnóstico del CNPB emplea para producir kits de diagnóstico de peste la fracción antigénica F1 de *Y. pestis* como principal insumo. Esta fracción se obtiene a partir de cultivos masivos de *Yersinia pestis*. Por ello, es necesario verificar la presencia de la secuencia que codifica la "Proteína F1". La estandarización de la reacción de PCR para amplificación de gen *caf1* es de especial importancia para nuestros procesos de control de calidad del material de partida biológico empleado en el proceso de producción del antígeno mencionado.

Por otro lado, la obtención de las clones recombinantes de *Escherichia coli* BL21 DE3 portando el gen *caf1* nos permitirá expresar de manera recombinante la proteína F1 de *Yersinia pestis*. Esto facilitará la obtención de anticuerpos específicos contra esta proteína y, posteriormente, el desarrollo y diseño de reactivos de diagnóstico para detección del patógeno.

Referencias bibliográficas

1. Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, Carniel E, Nato F. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet*. 2003 Jan 18;361(9353):211-6. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12270-2. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(03\)12270-2/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(03)12270-2/fulltext)
2. Perry RD, Fetherston JD. *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev*. 1997 Jan;10(1):35-66. doi: 10.1128/CMR.10.1.35. Disponible en: https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.10.1.35?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
3. Ratsitorahina M, Chanteau S, Rahalison L, Ratsifasoamanana L, Boisier P. Epidemiological and diagnostic aspects of the outbreak of pneumonic plague in Madagascar. *Lancet*. 2000 Jan 8;355(9198):111-3. doi: 10.1016/S0140-6736(99)05163-6. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(99\)05163-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(99)05163-6/fulltext)
4. Simpson WJ, Thomas RE, Schwan TG. Recombinant capsular antigen (fraction 1) from *Yersinia pestis* induces a protective antibody response in BALB/c mice. *Am J Trop Med Hyg*. 1990 Oct;43(4):389-96. doi: 10.4269/ajtmh.1990.43.389. Disponible en: <https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/43/4/article-p389.xml>
5. Chanteau S, Rabarijaona L, O'Brien T, Rahalison L, Hager J, Boisier P, Burans J, Rasolomaharo M. F1 antigenaemia in bubonic plague patients, a marker of gravity and efficacy of therapy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998 Sep-Oct;92(5):572-3. doi: 10.1016/s0035-9203(98)90923-3. Disponible en: <https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/92/5/572/1910575?redirectedFrom=fulltext&login=false>
6. Rahalison L, Vololonirina E, Ratsitorahina M, Chanteau S. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. *J Clin Microbiol*. 2000 Jan;38(1):260-3. doi: 10.1128/JCM.38.1.260-263.2000. Disponible en: https://journals.asm.org/doi/10.1128/JCM.38.1.260-263.2000?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed
7. Esamaelli S, Azadmanesh K, Naddaf SR, Rajerison M, Carniel E, Mostafavi E. Serologic survey of plague in animals, Western Iran. *Emerg Infect Dis*. 2013;19(9):1549-51. doi: 10.3201/eid1909.121829. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3810907/>
8. Seraylán S, Vargas L. Purificación y control de calidad de la fracción antigénica F1 de *Yersinia pestis*. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 1999;16(1-2):48-50. Disponible en: <https://rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/739>
9. Wang P, Shi GX, Wang HB, Yu DZ, Zhang JZ. [Clone expression of the *caf1* gene of *Yersinia pestis* and

immunological evaluation on recombinant F1 antigen]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*. 2010;31(1):69-72. Chinese. Disponible en: <https://rs.yiigle.com/CN112338201001/593502.htm>

10. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990 Nov 30;96(1):23-8. doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-p.

Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/037811199090336P?via%3Dihub>

11. Williamson ED, Oyston PC. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine. *Clin Exp Immunol*. 2013 Apr;172(1):1-8. doi: 10.1111/cei.12044.

Disponible en: <https://academic.oup.com/cei/article/172/1/1/6421067?login=false>

12. Cáceres O, Montenegro J, Padilla C, Tarazona D, Bailón H, García P, Céspedes M, Valencia P, Guio H. Whole-Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Yersinia pestis*, the Causative Agent of a Plague Outbreak in Northern Peru. *Genome Announc*. 2013 Jan;1(1):e00249-12. doi: 10.1128/genomeA.00249-12. Disponible en: https://journals.asm.org/doi/10.1128/genomeA.00249-12?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed