



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE FARMACIA**

**DESARROLLO DE UN PROTOCOLO DE
CLONAMIENTO DE LAS PROTEINAS
RECOMBINANTES DEL VIRUS SARS-COV-2
NUCLEOCAPSIDE Y ORF3B PARA AMPLIAR EL
ANALISIS DE LA RESPUESTA HUMORAL EN
COVID-19**

POR KAREN ESTEFANIA ROMERO CORREA

Plan de trabajo de Tesis presentado(a) a la Facultad de Farmacia de la
Universidad de Concepción para optar al título profesional de Bioquímico

Profesor guía: Dr. Felipe Zúñiga Arbalti
Profesor patrocinante: Dra. Estefanía Nova Lamperti
Departamento de Bioquímica clínica e inmunología
Facultad de Farmacia
Universidad de Concepción

Noviembre, 2022

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

“...Jehová alce sobre ti su rostro, y ponga en ti paz”

Números 6:26

Dedicado a mi familia, amigos y en especial a esa persona que paso por nuestras vidas como una estrella fugaz, pero su brillo vivirá siempre en nuestros corazones.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios por su gran amor y misericordia, por nunca dejarme caer y tenderme su mano cuando quería dejar todo atrás después de haber dado la batalla, por enseñarme que la batalla solo es una parte de la gran guerra, por día a día moldearme y hacerme entender que para todo hay tiempo, pero que soy pésima administradora y porque me permitió apreciar más su guía sin la cual jamás podría ser quien soy en este preciso momento.

En segundo, quisiera agradecer a mi familia, en los casi 19-20 años de formación académica, me apoyaron para seguir creciendo como persona y profesional; jamás me presionaron por ser mejor que otros, sino que siempre me instaron a ser la mejor versión de mí misma dándome una palabra de aliento cuando las cosas no salían como esperaba, y por no pedir demasiado de mí cuando estaba tan cansada y solo quería llegar a dormir. Gracias a mi madre por esforzarse hasta mas no poder por conseguir los materiales y libros que necesitaba para el colegio, liceo y universidad; por siempre mostrarme que cuando pido las cosas temprano, lo mas probable es que encuentre un lugar abierto que las tenga, y porque día a día podía aprender tenacidad, esfuerzo y muchas otras cualidades que me faltaban. Gracias a mi padre por las muchas veces que me corregía porque en los muchos sentimientos que me inundaban todo se volvía negro, pero él siempre veía blanco y la luz al final del túnel. El poder de los padres.

Y finalmente, gracias a mi hermana, porque cuando entendimos que no podemos vivir la una sin la otra, llegamos a un equilibrio en el que ella hacía el aseo y yo el almuerzo para que no nos regañaran; y por ser mi público fiel cuando tenía que practicar mis presentaciones.

También, quisiera destacar el gran apoyo de todas esas personas que conocí en el camino y que, en estos momentos, puedo llamar amigos/as: Mati Mati (*the real*), Dany, Gloria, Carlos, Javier, Vale y muchos otros que han contribuido con un granito de arena con el solo preguntar ¿cómo estás? y por acompañarme en el peor momento; gracias por ir al cine conmigo a ver estrenos de Marvel o por acompañarme cuando estaba demasiado estresada y quería comer papitas del assuan, y en general, por el gran privilegio de conocerlos, cada paso no tendría el mismo significado sin ninguno de ustedes.

Gracias a mi profesor tutor que, desde la bioquímica clínica experimental, me ha guiado y brindado conocimientos para desarrollarme como profesional y que junto a la profesora Estefanía a lo largo de este proceso, me ayudaron a descubrir que profesionalmente mi lugar vacío si tiene un título destacado en negrita y cursiva que me permitió cerrar un capítulo importante en este viaje.

Y finalmente, gracias porque entiendo que aún soy demasiado joven para entender que las cosas serán mejor, pero a pesar de ello, siempre puedo brillar, soñar y sonreír.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	xii
1. INTRODUCCION	1
1.1. Genoma del SARS-CoV-2	1
1.2. Proteínas del SARS-CoV-2.....	3
1.2.1. Proteína de membrana (M)	3
1.2.2. Proteína de envoltura (E)	4
1.2.3. Proteína de nucleocápside (N)	4
1.2.4. Proteína <i>spike</i> (S).....	5
1.2.5. Proteínas Accesorias	6
1.2.5.1 Proteína accesoria de marco de lectura abierto 3b (ORF3b)	7
1.3. Detección de antígenos virales.....	9
1.3.1. Ensayo LIPS (Luciferase Immunoprecipitation System)	9
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	17
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
HIPÓTESIS.....	17
OBJETIVOS.....	18
Objetivo general	18
Objetivos específicos	18
2. MÉTODOS.....	19
2.1. Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR)	19
2.1.1. Electroforesis	20
2.2. Ligación con TOPO	21

2.2.1. Obtención de bacterias electrocompetentes	21
2.2.2. Transformación en bacterias electrocompetentes	22
2.2.3. Inoculo bacteriano.....	24
2.2.4. PCR con colonias bacterianas.....	24
2.3. Purificación del plásmido con ADN de ORF3b y NP	25
2.3.1. <i>Stock</i> de ADN de ORF3b y NP en TOPO	26
2.4. Digestión enzimática	27
2.4.1. Purificación productos de digestión enzimática	28
2.4.2. Concentración del producto purificado de digestión enzimática	28
2.5. Subclonamiento de los insertos NP y ORF3b en plásmido puro pNLF1-N	29
2.5.1. Desfosforilación plásmido pNLF1-N.....	29
2.5.2. Ligación de insertos de ORF3b y NP al plásmido pNLF1-N	30
2.5.4. Stock purificación producto ligado	30
2.5.5. Digestión enzimática del Stock purificación producto ligado de NP y ORF3b	31
2.6. Transfección de productos obtenidos por subclonamiento en células HEK293	31
3. RESULTADOS	32
3.1 RT-PCR.....	32
3.2. Ligación con TOPO	36
3.3. Purificación del plásmido TOPO con insertos de ADN de NP y ORF3b.	39
3.4. Digestión enzimática	40
3.5. Ligación al plásmido pNLF1-N	42
3.5.1. Selección de inóculo por PCR de colonias	45
3.5.2. Concentración de NP, ORF3b y controles GFP y GLUT-1 GFP	48
3.5.3. Digestión stock de purificación de NP y ORF3b	49
3.6. Transfección de los productos subclonados en células HEK293	52
4. DISCUSION.....	54
5. CONCLUSION.....	61

BIBLIOGRAFÍA.....	62
ANEXOS.....	65
Manejo de residuos.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Resumen de las características de las principales proteínas del virus SARS-CoV-2.....	8
TABLA 2. Respuesta de anticuerpos en una cohorte de pacientes COVID-19 positivo (n=15)	12
TABLA 3. Presencia de anticuerpos en niños y adultos frente a distintos antígenos virales del virus SARS-CoV-2.	14
TABLA 4. Antígenos identificados por anticuerpos de clase IgM, IgG e IgA en niños con COVID-19 confirmado leve/moderado o grave/severo.	15
TABLA 5. Pareja de partidores para la amplificación de las proteínas virales NP y OR3b.....	20
TABLA 6. Programa de RT-PCR utilizado para NP y ORF3b	20
TABLA 7. Enzimas de restricción y sitios de cortes en primers	28
TABLA 8. Gradiente de temperatura de alineamiento de primers para ORF3b y NP utilizando <i>Taq</i> polimerasa.	34
TABLA 9. Concentraciones NP y ORF3b-Vector TOPO	39
TABLA 10. Concentraciones ADN para NP y ORF3b.....	42
TABLA 11. Concentraciones ADN para NP y ORF3b-Vector pNLF1-N y de los controles GFP y GLUT-1 GFP.	49

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

FIGURA 1. Genoma del virus SARS-CoV-2	2
FIGURA 2. Pasos de un ensayo LIPS.	11
FIGURA 3. Flujo de trabajo para el PCR de colonias	25
FIGURA 4 Producto de PCR de NP en gel de agarosa 2%.....	33
FIGURA 5. Producto de PCR de ORF3b a 55°C en gel de agarosa 2%	35
FIGURA 6. Colonias con producto de ligación TOPO de NP y ORF3b.	37
FIGURA 7. PCR de colonias de NP y ORF3b.	38
FIGURA 8. Producto de digestión enzimática del plásmido con luciferasa, NP y ORF3b con SacII y NotI.	41
FIGURA 9. Colonias con producto de ligación NP-Vector pNLF1-N en relación 1:3 y 1:5 con inserto.....	43
FIGURA 10. Colonias con producto de ligación ORF3b-Vector pNLF1-N en relación 1:3 y 1:5 con inserto.	44
FIGURA 11. PCR colonias con producto de ligación NP-Vector pNLF1-N en relación 1:3 y 1:5 con inserto NP.	46
FIGURA 12. PCR colonias con producto de ligación ORF3b-Vector pNLF1-N en relación 1:3 y 1:5 con inserto	47

FIGURA 13.1. Producto de la digestión de NP con SacII y NotI	50
FIGURA 13.2. Producto de la digestión de ORF3b con SacII y NotI	51
FIGURA 14. Producto de la transfección del control GFP en células HEK 293. Se observa la coloración clásica de la proteína fluorescente verde en la totalidad de la muestra, pero con mayor intensidad en el centro de esta.....	53

RESUMEN

La respuesta inmune generada por el virus SARS-CoV-2 asociado a la patología mundialmente conocida COVID-19, es identificada clínicamente a través de spike (S). Debido a las constantes mutaciones genéticas de la proteína viral, nace la necesidad de identificar nuevos antígenos que cubran la misma necesidad.

Hipótesis: Al desarrollar un protocolo de clonamiento para las proteínas recombinantes NP y ORF3b del virus SARS-CoV-2 en vectores plasmidiales, se generan productos de ligación adecuados para un posterior uso en el sistema de inmunoprecipitación por luciferasa (LIPS). **Objetivo:** Desarrollar un protocolo de clonamiento de las proteínas recombinantes del virus SARS-CoV-2 NP y ORF3b en vectores plasmidiales adecuados para su uso en el sistema de inmunoprecipitación por luciferasa (LIPS). **Metodología:** Uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, transformación de bacterias electrocompetentes y digestión con enzimas de restricción.

Resultados: Se desarrolló un protocolo para la obtención de productos clonados de NP y ORF3b en un plásmido eucarionte pNLF1-N. **Conclusión:** Hay presencia de producto de ligación de las proteínas recombinantes NP y ORF3b con el plásmido eucarionte pNLF1-N, estandarizando el paso inicial para realización de LIPS que permitiría posteriormente, determinar la respuesta humoral en COVID-19 frente a estos antígenos.

1. INTRODUCCION

El SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*) es un virus de origen zoonótico perteneciente a la familia de los *Coronaviridae* y al género *betacoronavirus* (Cui, Li, & Shi, 2019). Este género incluye al coronavirus del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV) que surgió en China en el 2002, con el cual comparten 79% de similitud de secuencias y al síndrome respiratorio de medio oriente (MERS-CoV) del 2012 donde la similitud de secuencias es de un 53% (Wu, Wu, Liu, & Yang, 2020). El SARS-CoV-2 surgió en China en el 2019 y es el causante principal de la pandemia por enfermedad de Coronavirus 2019 (COVID-19). En cuanto a su material genético, el SARS-CoV-2 es un virus de ARN de sentido positivo de una sola hebra (+ ssRNA) y cuatro proteínas estructurales relevantes denominadas membrana (M), envoltura (E), nucleocápside (N) y spike (S) siendo esta última la más inmunogénica.

1.1. Genoma del SARS-CoV-2

El genoma del virus se compone de 14 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican para 31 proteínas. Las poliproteína ORF1a y ORF1b representan casi el 70% del genoma del virus y forman 16 proteínas no estructurales (nsps) (Natalia Redondo, Sara Zaldívar-López, Juan J Garrido, & Maria Montoya, 2021; A. Wu et al., 2020); los ORF restantes ubicados hacia la región terminal 3'

codifican para cuatro proteínas estructurales: membrana (M), envoltura (E), spike (S) y nucleocápside (N), además de once proteínas accesorias (3a, 3b, 3c, 3d, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c y ORF10) (Bakhiet & Taurin, 2021; Lam et al., 2020; Jingzhe Shang et al., 2021; A. Wu et al., 2020).

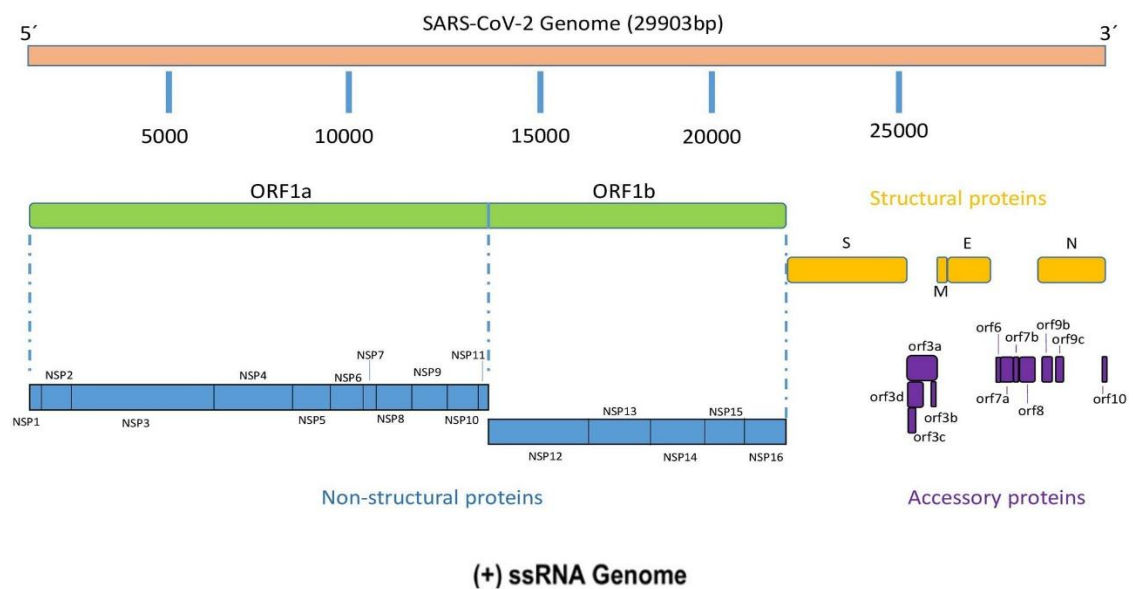


FIGURA 1. Genoma del virus SARS-CoV-2

Secuencia genómica de 29903 pb de SARS-CoV-2. Se observan los ORF: marco de lectura abierto, proteína S-Spike, proteína M-Membrana, proteína E-Envoltura y proteína N-Nucleocápside. Adaptado desde (Naqvi et al., 2020; Raskin, 2020; Natalia Redondo et al., 2021).

1.2. Proteínas del SARS-CoV-2

1.2.1. Proteína de membrana (M)

La proteína M es una proteína estructural glicosilada de 222 aminoácidos con tres dominios N-terminal (NTD) que atraviesan la membrana y uno C-terminal (CTD) (Fu et al., 2021). Se presenta con mayor abundancia en la estructura del virus y conforma la membrana de este. Su principal función es organizar el ensamblaje de partículas virales a través de la unión a la proteína S como al complejo formado entre proteína N/ARN viral a través de un dominio CTD soluble de la proteína N (Lu et al., 2021).

Esta proteína tiene la capacidad de inhibir la producción de interferón (IFN) de tipo I y III, generando una inhibición en la transcripción de genes antivirales sin afectar la replicación viral (Arya et al., 2021) por otro lado, afecta la formación del complejo de múltiples proteínas RIG-I (proteína citoplásmica inducible por el ácido retinoico I), MAVS (adaptador mitocondrial de señalización antiviral), TRAF3 (factor 3 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), TBK1 (proteínas efectoras TANK) y la posterior fosforilación del factor regulador 3 de IFN (IRF3) facilitando la replicación del virus. Esto último, convierte a este antígeno en el de menor uso diagnóstico, además, presenta una similitud muy alta con otras variantes de SARS-CoV generando reacciones cruzadas que debilitarían una identificación certera de SARS-CoV-2 en pacientes (J. Zhang, Zhao, & Zhao, 2021).

1.2.2. Proteína de envoltura (E)

La proteína E es la proteína estructural más pequeña presente en la membrana del virus SARS-CoV-2. Tiene 75 aminoácidos que comprenden 3 dominios: un ectodominio hidrófilo N-terminal, transmembrana hidrófobo (TMD) seguido de uno endo-terminal C-terminal hidrófilo largo (Benzigar, Bhattacharjee, Baharfar, & Liu, 2021). En cuanto a su función, esta desempeña un papel fundamental en la patogénesis, ensamblaje y liberación del virus, a su vez, ayuda a la proteína M a generar la curvatura de la membrana del virus (Yadav et al., 2021).

Esta proteína al igual que M, no es utilizada con fines diagnósticos dada su conservación limitada de su secuencia genómica por lo que la probabilidad de generar reacciones cruzadas con otros coronavirus es alta impidiendo así, realizar un diagnóstico certero de SARS-CoV-2 (Rahman, Hoque, et al., 2021).

1.2.3. Proteína de nucleocápside (N)

La proteína N se destaca por regular la transcripción del ARN viral durante la replicación (Rahman, Islam, et al., 2021), promoviendo la síntesis de sus propias proteínas mientras interfiere con el metabolismo, traducción de proteínas y la proliferación de la célula infectada. De esta forma, se genera una abundante expresión de anticuerpos produciendo así, una mejor respuesta inmunitaria

durante la infección viral lo cual se condice con el hecho de que esta proteína es la segunda más inmunogénica en el virus (Ni et al., 2020; Rahman, Islam, et al., 2021; Zeng et al., 2020).

1.2.4. Proteína *spike* (S)

En relación con las proteínas de mayor relevancia en la infección por SARS-CoV-2, la proteína S se caracteriza por ser de mayor tamaño en comparación con las otras; estructuralmente, es una proteína de fusión homotrimérica (Hansen et al., 2021) codificada por el genoma del virus que presenta un dominio S1 de unión al receptor (RBD), otro de fusión denominado S2 y uno transmembranoso (Pillay, 2020; Xu et al., 2021; C. Zhang et al., 2020). Debido a su carácter inmunogénico, la proteína S se ha convertido en uno de los principales objetivos para el desarrollo de vacunas o tratamientos médicos específicos y, esto porque los anticuerpos neutralizantes que se dirigen al antígeno podrían evitar que el virus se una al receptor de entrada hACE2 y, por lo tanto, en la célula huésped (Shajahan, Supekar, Gleinich, & Azadi, 2020).

1.2.5. Proteínas Accesorias

En el genoma de SARS-CoV-2 existen once proteínas accesorias (ORF3a, 3b, 3c, 3d, 6, 7a, 7b, 8, 9b, 9c y 10) ubicadas principalmente hacia la región 3'UTR (FIGURA 1). Estos marcos de lectura pueden codificar un número diferente de proteínas accesorias, lo que da como resultado una enorme complejidad de proteínas (Natalia Redondo et al., 2021; J. Shang et al., 2021). Estas proteínas son codificadas por el virus principalmente en el citosol y no participan en la replicación viral, pero de su totalidad siete de ellas (3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8 y 9b) contribuyen en la modulación de la inmunidad innata del huésped, y en la adaptación del virus al hospedador interviniendo en la patogenicidad del virus a través de diferentes estrategias (Abdalla et al., 2021; Padhan, Parvez, & Al-Dosari, 2021).

Las proteínas accesorias son propias de cada tipo de SARS-CoV, por ende, su codificación varía entre los tipos de coronavirus en número de pares de bases, ubicación en el genoma y presentan una baja similitud entre secuencias. Por otro lado, las proteínas accesorias se diferencian de las proteínas no estructurales dado que no mantienen una homología con proteínas de otros grupos de virus y, generalmente, son pequeños y su rol es indirecto a la función del virus (Gorkhali et al., 2021; Zinzula, 2021)

1.2.5.1 Proteína accesoria de marco de lectura abierto 3b (ORF3b)

El marco de lectura abierto 3b (ORF3b) presenta genes altamente conservados para el virus SARS-CoV-2. Su síntesis se realiza en el citosol a partir de la secuencia genómica de ORF3a, y codifica una proteína conservada del virus de 22 aminoácidos cuya función la destaca por su participación potente y activa como antagonista de la activación del IFN-I humano (Konno et al., 2020; Lam et al., 2020; N. Redondo, S. Zaldívar-López, J. J. Garrido, & M. Montoya, 2021).

TABLA 1. Resumen de las características de las principales proteínas del virus SARS-CoV-2

Proteína	Características	Función	Localización	Inmunogenicidad
S	- Única proteína que se une a hACE2 - Consta de 2 subunidades: S1 y S2 ^a	Participa en la unión del virus a las células hACE2 ^a	Envoltura viral ^a	Si ^b
N	- Proteína de 419 aa 1 NTC y CTD - Forma un complejo con el ARN viral ^c	Regular la transcripción de ARN para promover la formación de las proteínas estructurales ^c	Cápside viral ^c	Si ^b
E	- Proteína de 75 aa 1 NTC, CTD y TMD - Más pequeña de las proteínas estructurales ^d	Participa en la patogénesis, ensamblaje y liberación de la partícula viral ^d	Envoltura viral ^d	No ^{e, f, i}
M	- Proteína glicosilada de 222 aa 3 NTD y 1 CTD - Mayor abundancia en la estructura viral ^g	Ensamblar a la partícula viral ^g	Envoltura viral ^g	No ^{e, f, i}
ORF3b	- Proteína de 22 aa - Fuerte antagonista de INF-I - Genera anticuerpos durante la fase temprana de la infección ^{h, d}	Suprimir la inducción del INF-I ^{h, d}	Citosol ^h	Si ^{e, f, i}

hACE2: Enzima convertidora de angiotensina 2 humana; aa: aminoácidos; NTD: Dominio N-terminal; CTD: Dominio C-terminal; TMD: Dominio transmembranoso; INF-I: Interferón de tipo I.

Nota. ^a(Shajahan et al., 2020). ^b(Haljasmägi et al., 2020). ^c(Rahman, Islam, et al., 2021; Zeng et al., 2020). ^d(Rahman, Hoque, et al., 2021). ^{e,f,i}(Asmaa Hachim et al., 2021; A. Hachim et al., 2020; Ravichandran, Tang, et al., 2021). ^g(J. Zhang et al., 2021). ^h(Konno et al., 2020; Lam et al., 2020; N. Redondo et al., 2021).

1.3. Detección de antígenos virales

La detección de antígenos virales de SARS-CoV-2 consiste en la determinación y presencia de antígenos cuando el virus se encuentra en el proceso de replicación. La muestra utilizada suele ser de tracto respiratorio (OMS). Estos antígenos presentes son capturados por un anticuerpo adherido a una base la cual se encuentra dentro de un casete plástico cuando se encuentran en altas concentraciones (test rápidos). A su vez, la presencia de esta reacción antígeno-anticuerpo permite determinar el progreso del paciente durante el cuadro infeccioso (agudo o temprano) al identificar los anticuerpos generados de clase IgM o IgG y también, para prevenir la propagación del virus en la población (Kevadiya et al., 2021).

1.3.1. Ensayo LIPS (Luciferase Immunoprecipitation System)

Inmunoensayo cuantitativo en fase líquida que permite la detección serológica de alto rendimiento de anticuerpos específicos dirigidos contra uno o grupos de antígenos en su forma nativa, y en una sola reacción. Dado que es un ensayo cuantitativo, permite medir los niveles de anticuerpos en un periodo de tiempo para una patología o para determinar la efectividad de un tratamiento determinado. Este inmunoensayo se caracteriza por presentar una alta sensibilidad, rapidez, ejecución simple y por utilizar baja cantidad de muestra y

reactivos. Su ejecución comienza con la obtención de un antígeno recombinante unido a la enzima bioluminiscente luciferasa (aproximadamente 20 kDa) a través de la transfección en células eucariontes. Seguido de ello, se puede realizar la cuantificación de los anticuerpos midiendo la bioluminiscencia emitida por la enzima renilla luciferasa (Ruc). La proteína de fusión Ruc-antígeno es reconocida por anticuerpos específicos del antígeno, y los complejos antígeno-anticuerpo son capturados por perlas de proteína A/G que reconocen la región Fc del anticuerpo IgG (Tin, C. M. *et al.* 2017). Con la integración de colenteracina al complejo y en presencia de oxígeno, es posible medir la luz emitida por la Renilla, a una longitud de onda de 480 nm con un luminómetro (P. D. Burbelo, Ching, Klimavicz, & Iadarola, 2009; Haljasmägi *et al.*, 2020).

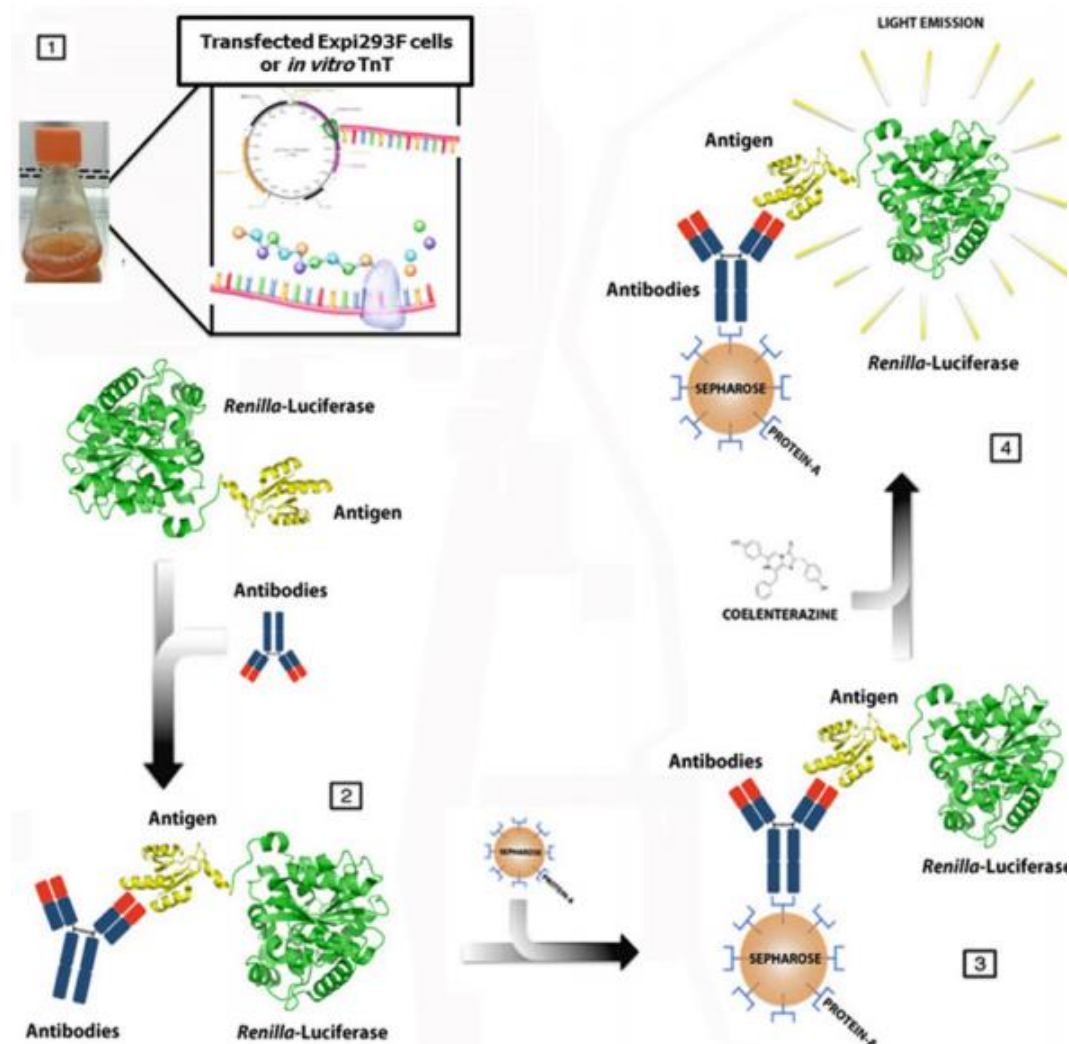


FIGURA 2. Pasos de un ensayo LIPS. Paso 1 expresión del antígeno etiquetado con luciferasa recombinante; paso 2 formación de complejos inmunes después de la incubación del suero con antígeno marcado con luciferasa; paso 3 recuperación de inmunocomplejos con proteína A sefarosa y paso 4, detección de antígeno marcado con luciferasa unido a perlas de proteína A sefarosa (Lahner et al., 2019).

Para la detección del virus, la mayoría de las pruebas serológicas disponibles se basan en anticuerpos neutralizantes o en la detección de estos mismos, aunque están dirigidos a las proteínas S o N. Sin embargo, existen otras proteínas que bien podrían generar el mismo efecto y contribuir en la detección de la patología.

En base a ello, muchos investigadores se han desafiado y detectado anticuerpos dirigidos contra otras proteínas del virus que no correspondan a las antes mencionadas. Uno de estos casos, es lo realizado por Hachim A y colaboradores los cuales realizaron un estudio en adultos para evaluar la respuesta de anticuerpos frente a un panel de 15 antígenos del virus SARS-CoV-2. La cohorte analizada correspondía a n=30 donde 15 eran pacientes con COVID-19 confirmado y 15 controles negativos prepandémicos. Los resultados de este estudio se pueden encontrar en la siguiente tabla.

TABLA 2. Respuesta de anticuerpos en una cohorte de pacientes COVID-19 positivo (n=15)

Tipo de proteínas	Proteínas objetivo	Respuesta de anticuerpos con LIPS
Estructurales	S (S1, S2 y S2') N*, M y E	S1, S2', N ↑↑ S2 ↑
Accesorias	ORF3a, ORF3b* , ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8* y ORF10	↑↑
No estructurales	NSP1	↑↑

↑: Significativamente altas; ↑↑: Significativamente más altas;
*: Mayor señal de anticuerpos comparado a los controles negativos

Este estudio detectó una alta especificidad frente a los antígenos S, S1, S2', N, M, NSP1, ORF3a, ORF3b, ORF7a, ORF7b y ORF8; y una baja sensibilidad (<75%) en los antígenos M, S, S1, S2', NSP1, ORF3a, ORF7a y ORF7b. En conclusión, los investigadores demostraron a través de un ensayo de inmunoprecipitación (LIPS), que pacientes COVID-19 positivo en población adulta, generaban una mayor señal de anticuerpos contra los antígenos N, ORF3b y ORF8 esto a pesar, de la alta especificidad detectada con los otros antígenos (A. Hachim et al., 2020).

Otro estudio dirigido por el mismo investigador y colaboradores se realizó en plasma de niños y adultos, con el fin de comparar los niveles de anticuerpos que presentaban frente un panel de 14 proteínas estructurales y accesorias mediante el uso del ensayo LIPS. Ellos analizaron 254 plasmas de 122 niños con infecciones por SARS-CoV-2 sintomáticas y asintomáticas en Hong Kong hasta 206 días después del inicio de los síntomas, y 146 muestras longitudinales de 58 niños. Se incluyeron 36 pacientes adultos con COVID-19 y controles previos a la pandemia para comparar. Los resultados de este estudio se pueden observar en la siguiente tabla.

TABLA 3. Presencia de anticuerpos en niños y adultos frente a distintos antígenos virales del virus SARS-CoV-2.

Antígenos	Anticuerpos en NIÑOS	Anticuerpos en ADULTOS
S1 y S2'	↓↓	↑
S2	=	
N	↑	↑↑
M	↓↓	↓
E	↑↑	↓
ORF3a, ORF7a y ORF7b	↓↓	↑↑
NSP1, ORF3b y ORF8	↑↑	
ORF6 y ORF10	X	

↓: niveles significativamente bajos de anticuerpos; ↓↓: niveles significativamente más bajos de anticuerpos; ↑: niveles significativamente altos de anticuerpos; ↑↑: niveles significativamente más altos de anticuerpos; =: no se observan diferencias significativas de anticuerpos; X: anticuerpos no detectados

Estos datos evidencian que las respuesta de anticuerpos detectadas mediante el ensayo LIPS, suelen estar aumentadas frente a las proteínas accesorias y lo contrario con las proteínas estructurales, principalmente en niños. En cuanto a los adultos estos hallazgos junto a los anteriores realizados por el mismo investigador y colaboradores, indican que las respuestas de anticuerpos son elevadas para las principales proteínas estructurales, pero específica para algunas proteínas accesorias (Asmaa Hachim et al., 2021).

Un estudio similar también realizado en población pediátrica con una cohorte de pacientes n=35, donde 20 son pacientes moderados y 15 severos, se realizó con

la finalidad de identificar un repertorio de antígenos a los cuales se dirigen los anticuerpos de clase IgG, IgM e IgA. Esta investigación demostró, de forma inversa a la anterior, que los anticuerpos de pacientes COVID-19 confirmados, reconocen varios sitios antigénicos en proteínas no estructurales, accesorias y en nucleocápside; determinado así, que es posible encontrar anticuerpos en suero de pacientes para alguna de estas proteínas. En la siguiente tabla, se pueden encontrar los antígenos identificados por los anticuerpos específicos (Ravichandran, Tang, et al., 2021).

TABLA 4. Antígenos identificados por anticuerpos de clase IgM, IgG e IgA en niños con COVID-19 confirmado leve/moderado o grave/severo.

Anticuerpo	Tipo de paciente	Antígenos identificados
IgM	Leve/Moderado	Nsp2 ↑ Nsp3 ↓ Nsp12, N, ORF5, ORF8 y ORF9b ↑↑ S1 ↓↓
	Grave/Severo	S1 ↑↑ Nsp12 ↓↓
IgG	Leve/Moderado	NSP3, NSP12, NSP14, ORF3a, ORF8 ↓↓ S y N ↑
	Grave/Severo	NSP3, NSP12, NSP14, ORF3a, ORF8 ↑↑ S y N ↓
IgA	Leve/Moderado Grave/Severo	NSP3, NSP12, S y N ↑↑

IgM: Inmunoglobulina M; IgG: Inmunoglobulina G; IgA: Inmunoglobulina A; ↑: Reconocido; ↑↑: Preferentemente reconocido; ↓: Bajo reconocimiento; ↓↓: Muy bajo reconocimiento

Dentro de este panel de antígenos, los investigadores destacan de forma específica S, ORF3a y ORF9a indicando que la aidez entre estos antígenos y los anticuerpos sería un punto clave en la clasificación de la gravedad de los pacientes pediátricos frente a la infección. Algo parecido observaron con respecto a la proteína S, en un estudio realizado por el mismo investigador y otros colaboradores con pacientes de avanzada edad con diagnóstico positivo. Este indicaba que el aumento en la maduración de la afinidad entre el anticuerpo específico y la proteína S, fue seguido de forma inmediata por una considerable disminución en la gravedad de los síntomas y, por ende, en la severidad del paciente (Ravichandran, Lee, et al., 2021).

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El análisis de la respuesta inmune en pacientes que padecieron COVID-19 en la investigación clínica contempla principalmente el estudio de la proteína S, lo cual limita la comprensión de la respuesta humoral y frente al SARS-CoV-2. A modo de ampliar este análisis es que se requieren proteínas recombinantes como lo son NP y ORF3b para su posterior uso en el sistema de inmunoprecipitación por luciferasa para detección de anticuerpos. Sin embargo, los protocolos de clonamiento en base a técnicas moleculares no han sido ampliamente estandarizados ni validados para este tipo de ensayo.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué protocolo de clonamiento en base a técnicas moleculares permite la obtención de proteínas recombinantes NP y ORF3b del virus SARS-CoV-2 para su posterior uso en el sistema de inmunoprecipitación por luciferasa?

HIPÓTESIS

El desarrollo de un protocolo de clonamiento de las proteínas recombinantes del virus SARS-CoV-2 NP y ORF3b en vectores plasmidiales permite la generación de productos de ligación adecuados para su posterior uso en el sistema de inmunoprecipitación por luciferasa.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar un protocolo de clonamiento de las proteínas recombinantes del virus SARS-CoV-2 NP y ORF3b en vectores plasmidiales adecuados para su uso en el sistema de inmunoprecipitación por luciferasa.

Objetivos específicos

1. Estandarizar la temperatura de alineamiento de *primers* para la obtención de producto de PCR para NP y ORF3b del virus SARS-CoV-2.
2. Desarrollar un producto de ligación TOPO-ADN de NP y ORF3b del virus SARS-CoV-2.
3. Estandarizar el método de digestión enzimática de NP y ORF3b del virus SARS-CoV-2.
4. Desarrollar un producto de ligación del plásmido puro pNLF1-N con NP y ORF3b del virus SARS-CoV-2.
5. Transfectar productos de ligación (pNLF1-N)-ORF3b y NP en células HEK 293.

2. MÉTODOS

2.1. Reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa (RT-PCR)

Se realizó la RT-PCR con ARN viral proporcionado por el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Proteómico del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia. El kit utilizado fue SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen, ThermoFischer Scientific). Este kit se caracteriza por presentar entre sus reactivos una Platinum™ Taq la cual es una ADN polimerasa recombinante que bloquea la actividad de la polimerasa a temperaturas ambiente. La actividad se restaura después del paso de desnaturalización del ciclo de PCR a 94 °C, proporcionando así un sistema automático de inicio a altas temperaturas en la PCR para mayor sensibilidad, especificidad y rendimiento (ThermoFisherScientific). Las parejas de *primers* utilizadas para este proceso se entregan en la tabla 5. Se utilizó el programa de PCR estándar para NP y en el caso de ORF3b, se realizó una estandarización a la temperatura de alineamiento de *primers* como se observa en la tabla 6. Los ciclos de la PCR fueron 40X (veces) desde la denaturación hasta la elongación.

TABLA 5. Pareja de partidores para la amplificación de las proteínas virales NP y ORF3b.

ADN	Pareja de partidores
NP	NPF 5'-CTGAGCCCGCGGATGTCTGATAATGGACC-3' NPR 5'-CTGAGCGGCCGCTTAGGCCTGAGTTGAGTCAG-3'
ORF3b	ORF3BF 5'-CTGAGCCCGCGGATGGCTTATTGTTGGCG-3' ORF3BR 5'-CTGAGCGGCCGCGAGGCCAGCAGCAACGAG-3'

F: Primer Forward; R: Primer Reverse

TABLA 6. Programa de RT-PCR utilizado para NP y ORF3b

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo
RT	55	30 min
Inactivar RT	94	2 min
Denaturación	94	15 seg
Alineación	60 (NP) y 55 (ORF3b)	30 seg
Elongación	68	1 min/kb
Final	68	5 min

2.1.1. Electroforesis

Se utilizó geles de agarosa al 2% un *label* de marcación para ácidos nucleicos SafeView Plus (Fermelo Biotec), y una cámara de electroforesis la cual fue provista por el departamento de Bioquímica clínica e Inmunología. Para la observación de las bandas correspondientes, se utilizaron dos marcadores de peso molecular: 1 kb y 100 pb (New England Biolabs, NEB). El voltaje de corrida fue de 80 V por 45 min.

2.2. Ligación con TOPO

El proceso de clonación se realizó utilizando el kit TOPO TA cloning siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen, ThermoFischer Scientific). Este kit consta de un vector pCRTM2.1 activado con topoisomerasa I al cual se ligan los productos de PCR amplificados por *Taq*, un caldo súper óptimo con medio de represión de catabolitos (SOC), plásmido de control superhelicoidal pUC19 y *E. coli* químicamente competente One ShotTM o ElectrocompTM.

2.2.1. Obtención de bacterias electrocompetentes

Utilizando bacterias *E. coli* del kit de ligación TOPO, se hizo crecer un inóculo en 5 mL de medio LB durante toda la noche a 37°C luego, se llevó a un matraz con 500 mL de medio LB autoclavado sin antibiótico y se observó durante 4-5 horas el crecimiento de las bacterias a través del cambio en la densidad óptica (D.O), generado durante el proceso de crecimiento de las bacterias. Esta medición se realizó utilizando el equipo Bioter y una placa de 96 pocillos transparente. Se registró la absorbancia cada 30 minutos a 600 nm. El proceso se realizó hasta obtener una D.O entre 0,4 – 0,6 Abs (absorbancia) que representa la fase exponencial del crecimiento bacteriano.

Obtenida la D.O ideal se incubó el matraz por 30 min a 4°C seguido de este paso, se traspasó el contenido del matraz a tubos falcon de 50 mL y se centrifugaron por 15 min a 4°C y 5000 rpm; se eliminó los sobrenadantes. Los *pellet* generados se resuspendieron en 500 mL de glicerol al 10% (agua-glicerol a 4°C) y centrifugaron bajo las mismas condiciones. Este ciclo se repitió hasta que el *pellet* fue resuspendido en volúmenes de glicerol 10% de 250, 20 y 2 mL. Finalizados estos pasos, se alicuotó el volumen final en *stock* de 50 uL que luego se almacenaron a -80°C.

2.2.2. Transformación en bacterias electrocompetentes

Utilizando el producto de ligación obtenido a través del uso del kit TOPO se traspasa el contenido a los tubos con bacterias y se incuba junto a las cubetas de electroporación (anteriormente lavadas con agua destilada y alcohol 70°) por 30 minutos a 4°C. Utilizando las cubetas de electroporación se traspasa el volumen del tubo que contiene a las bacterias y el producto de ligación TOPO para darles un pulso utilizando el equipo MicroPulser Electroporator (BIO-RAD). Rápidamente, se añade con pipeta pasteur y un pipeteador eléctrico 1 mL de medio LB sin antibiótico; se incorpora el medio al contenido de bacterias y luego se traspasa a un tubo nuevo de 1,5 mL y se incuba a 37°C en agitación de 200 rpm por 1 hora con el fin de darle tiempo a las bacterias a que se recuperen del

pulso. De forma paralela se acondicionan las placas de agar con kanamicina en la estufa a 37°C (agar hacia arriba).

Finalizado el paso anterior, se centrifugaron los tubos por 5 min a 5000 rpm y se descartó el 70% del sobrenadante siendo el restante el utilizado para resuspender el pellet formado. Se limpió con alcohol 70° la superficie de trabajo y con el asa Drigalsky (esterilizada en alcohol al 70° y luego por la llama del mechero), se siembra el resuspendido del vial sobre la agarosa para luego, incubar en la estufa a 37°C durante 24 horas.

2.2.2.1. Diálisis

Considerando que los productos de ligación tienen un alto contenido salino, se realizó el proceso de diálisis a las muestras. Para ello, se utilizó una placa de 6 pocillos y se completó la mitad de su volumen con agua destilada. Flotando se añadió $\frac{1}{4}$ de una membrana de nitrocelulosa para finalmente incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalizada la incubación se toma con sumo cuidado el producto y se devuelve al eppendorf de 1,5 mL. Seguido de ello, se realizó la transformación del producto ligado en bacterias electrocompetentes. De este proceso se obtuvieron productos sembrados en placas de agar con ampicilina las cuales fueron incubadas a 37°C en la estufa por 24 horas.

2.2.3. Inoculo bacteriano

Los inóculos bacterianos se realizaron con las colonias obtenidas en las placas luego de 24 horas. Para este proceso, se limpió la zona de trabajo con alcohol 70° y utilizando una punta esterilizada a la flama, se incorpora en un tubo falcon de 15 mL con 2 mL de medio LB con antibiótico de kanamicina. Luego, se incubó por 24 horas a 37°C y 200 rpm en *shaker*.

2.2.3.1. Lisis alcalina

Siguiendo el protocolo para obtener ADN plasmidial desde los inóculos, se realizó la lisis utilizando las soluciones de resuspensión (P1), lisis (P2) y neutralización (P3). Se precipita el ADN plasmidial con isopropanol, se añade un volumen de etanol 70° y se centrifuga descartando el sobrenadante para dejar secando los tubos a temperatura ambiente de forma invertida.

2.2.4. PCR con colonias bacterianas

Se realizó un PCR tomando colonias de las placas con agar utilizando el reactivo Sapphire Amp Fast PCR Master Mix (2x) y partidores correspondientes a NP y ORF3b. Para este procedimiento, se utilizó el protocolo entregado por el fabricante (Takara Bio). El flujo de trabajo se puede observar en la FIGURA 3.

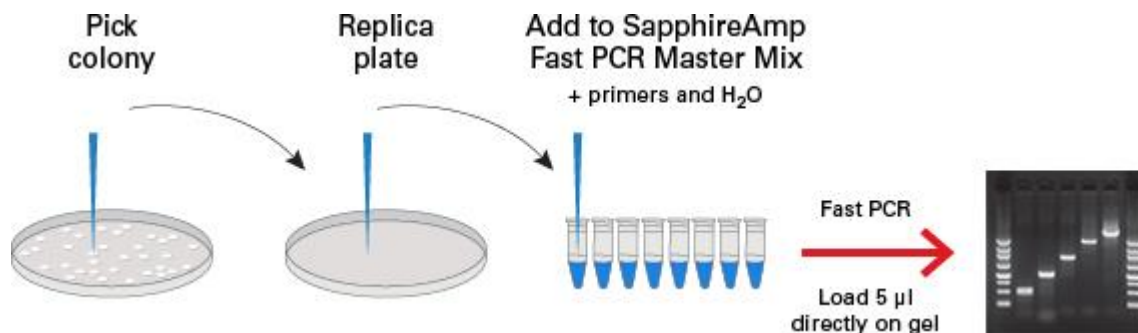


FIGURA 3. Flujo de trabajo para el PCR de colonias

La colonia se toma con una punta de micropipeta amarilla esterilizada en la llama del mechero, luego es incorporada a la reacción de PCR en un tubo de 0,2. El tiempo de PCR es de 55 min con un producto que puede ser cargado directamente a un gel de agarosa.

2.3. Purificación del plásmido con ADN de ORF3b y NP

Luego de seleccionado el inóculo con PCR de colonias (ver 2.2.7.) se procedió a purificar el producto de ligación TOPO más ADN de NP y ORF3b. Para ello, 24 horas antes se añadieron 2 mL de medio LB con kanamicina al inóculo para finalmente, incorporar el contenido del tubo falcon a un matraz con medio LB y kanamicina de 300 mL previamente autoclavado. Este matraz se incubó en *shaker* por 24 horas a 37°C / 200 rpm. Finalizado el tiempo de incubación, se purificó por columna utilizando el kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) siguiendo el protocolo del fabricante.

De este proceso se obtuvieron 8 tubos eppendorf de 1,5 mL por matraz de plásmido-ADN los cuales fueron secados por 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente almacenados -20°C.

2.3.1. Stock de ADN de ORF3b y NP en TOPO

El stock de ADN de las proteínas se obtuvo resuspendiendo el contenido de 4 de los tubos resultantes del paso anterior 50 uL de agua de grado de biología molecular, luego se agitaron manualmente por 10 minutos; el volumen se incorporó a los 4 tubos restantes, y se agitó bajo las mismas condiciones utilizadas anteriormente. Finalmente, el volumen es concentrado en un solo tubo obteniendo 200 uL de concentrado de ADN de NP y ORF3b (*Stock de purificación*).

2.3.2. Concentración de ADN (ORF3b y NP)

Para la cuantificación por espectrofotometría, se diluyó la muestra del stock de purificación 5/100 (agua grado biología molecular) y se le realizó un *spin* de 5 segundos. Se configuró el equipo a una longitud de onda de 260 nm y se pasó el blanco (agua grado biología molecular) utilizando una cubeta de 10 mm.

Se realizó un auto-zero y usando la misma cubeta, se añadió la dilución efectuada a los 5 uL de la muestra y se registró la absorbancia. Para determinar la concentración, se utilizó la siguiente formula:

$$[\text{ADN}] = \text{ABS } 260 \text{ nm} \times \text{FD (20)} \times \text{FC (50 ug/mL)}$$

Donde:

[ADN]: Concentración de ADN en el stock de purificación

ABS: Absorbancia a la longitud de onda deseada

FD: Factor de dilución

FC: Factor de conversión

2.4. Digestión enzimática

Con el fin de separar los insertos de ADN de NP y ORF3b del plásmido procarionte pCR2.1 proveniente del kit TOPO TA cloning (Invitrogen, ThermoFischer Scientific), y obtener al vector puro pNLF1-N cortado, se realizó una doble digestión con enzima de restricción SacII y una digestión simple con NotI-HF. La reacción se realizó con 10 uL del stock de purificación para NP y ORF3b y 3 uL para el plásmido pNLF1-N; el volumen final de la reacción fue de 50 uL y se incubó por 8 h a 37°C (4 horas con SacII-NotI y 4 horas con SacII).

Con este producto de digestión se corrió un gel al 2% y se aislaron las bandas correspondientes para luego, purificarlas por columna usando el kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel)

TABLA 7. Enzimas de restricción y sitios de cortes en primers

ADN	Enzima	SITIO DE CORTE
NP	SacII NotI	FP: CTGAGCccgcggATGTCTGATAATGGACC RP: CTGAG <u>CGGCCG</u> CTTAGGCCTGAGTTGAGTCAG
ORF3b		FP: CTGAGCccgcggATGGCTTATTGTTGGCG RP: CTGAG <u>CGGCCG</u> CAGGCCAGCAGCAACGAG

FP: Primer forward; RP: Primer reverse

2.4.1. Purificación productos de digestión enzimática

Siguiendo el protocolo del kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), se realizó la purificación de los productos obtenidos por digestión enzimática eluyendo en 20 uL.

2.4.2. Concentración del producto purificado de digestión enzimática

Utilizando fluorómetro Quibit se realizó la cuantificación siguiendo el protocolo del fabricante con una dilución de los productos digeridos de 1/200.

2.5. Subclonamiento de los insertos NP y ORF3b en plásmido puro pNLF1-N

Para obtener un producto subclonado del ADN de NP y ORF3b en el plásmido pNLF1-N (Promega) se realizó la desfosforilación del vector, cuantificación de este producto y posterior ligación de los insertos en relación 1:3 y 1:5. Estos productos de ligación, fueron transformados en bacterias electrocompetentes y luego sembradas en placas de agar con antibiótico de ampicilina.

2.5.1. Desfosforilación plásmido pNLF1-N

La desfosforilación del vector se realizó en tubos eppendorf de 1,5 mL utilizando el kit rápido Quick CIP siguiendo las instrucciones del fabricante, y el reactivo Antarctic Phosphatase donde el protocolo de incubación constaba de 15 min a 37°C seguido de 5 min a 65°C para inactivar a la enzima en un volumen final de 10 μ L. En ambos caso se cuantificó el producto utilizando el fluorímetro (Quibit) siguiendo las instrucciones del equipo.

2.5.2. Ligación de insertos de ORF3b y NP al plásmido pNLF1-N

La ligación se realizó en relación vector-inserto 1:3 y 1:5 en tubos eppendorf de 1,5 mL utilizando el Quick ligation kit donde se siguió el protocolo de fabricante y una T4 DNA ligase. Para este último método, se utilizaron dos tipos de incubaciones: protocolo acotado que contempla 30 min a T° ambiente, 30 min a 37°C y 10 min a 65°C; protocolo estandarizado donde las incubaciones son de 4 h a T° ambiente, 4 horas a 37°C y 10 min a 65°. Ambas incubaciones a 65°C se usan para inactivar a la enzima. Finalizado el proceso los tubos fueron llevados al hielo.

2.5.4. Stock purificación producto ligado

Siguiendo el protocolo descrito en el punto 2.3 y 2.3.1 se obtuvo un stock de purificación para los productos de ligación NP y ORF3b-Vector pNLF1-N. La cuantificación se realizó utilizando el fluorímetro Qubit en una dilución 1/200 de la muestra con el buffer. La determinación de la concentración se obtuvo utilizando tubos especiales transparentes.

2.5.5. Digestión enzimática del Stock purificación producto ligado de NP y ORF3b

Siguiendo el protocolo descrito en el punto 2.4 se realizó la digestión enzimática de los productos de NP y ORF3b con las enzimas de corte SacII y NotI-HF. El volumen final de la reacción se cargó en un gel de agarosa al 2%.

2.6. Transfección de productos obtenidos por subclonamiento en células HEK293

Se realizó el proceso de transfección de los productos obtenidos en el punto 2.5.4 junto a un control de GFP. Para ello, se requirió de una cámara de bioseguridad de nivel 2 (BSL2) y el kit Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen, ThermoFischer Scientific). Para el uso de este, se siguió el protocolo proporcionado por el fabricante.

3. RESULTADOS

3.1 RT-PCR

El primer paso del protocolo de clonamiento se basa en la obtención de un producto de PCR a partir de ARN viral, partidores específicos, una polimerasa y posteriormente, la unión de este en un vector procarionte. Para esta estandarización se requiere evaluar distintas temperaturas de alineamiento de primers con el fin de generar un producto de PCR específico.

Se obtuvo un producto de PCR para NP (FIGURA 4) con una temperatura de alineamiento de primers de 60°C (TABLA 8). Por otro lado, el gradiente de temperatura del alineamiento de primers específica para ORF3b (TABLA 8) dió como resultado un producto de PCR positivo a los 55°C (FIGURA 5).

Los tamaños esperados para los productos NP y ORF3b son de 1260 y 171 pb, respectivamente; por otro lado, de acuerdo con lo observado en las figuras, los productos de PCR para ambas proteínas corresponden a los tamaños esperados reportados por la literatura.

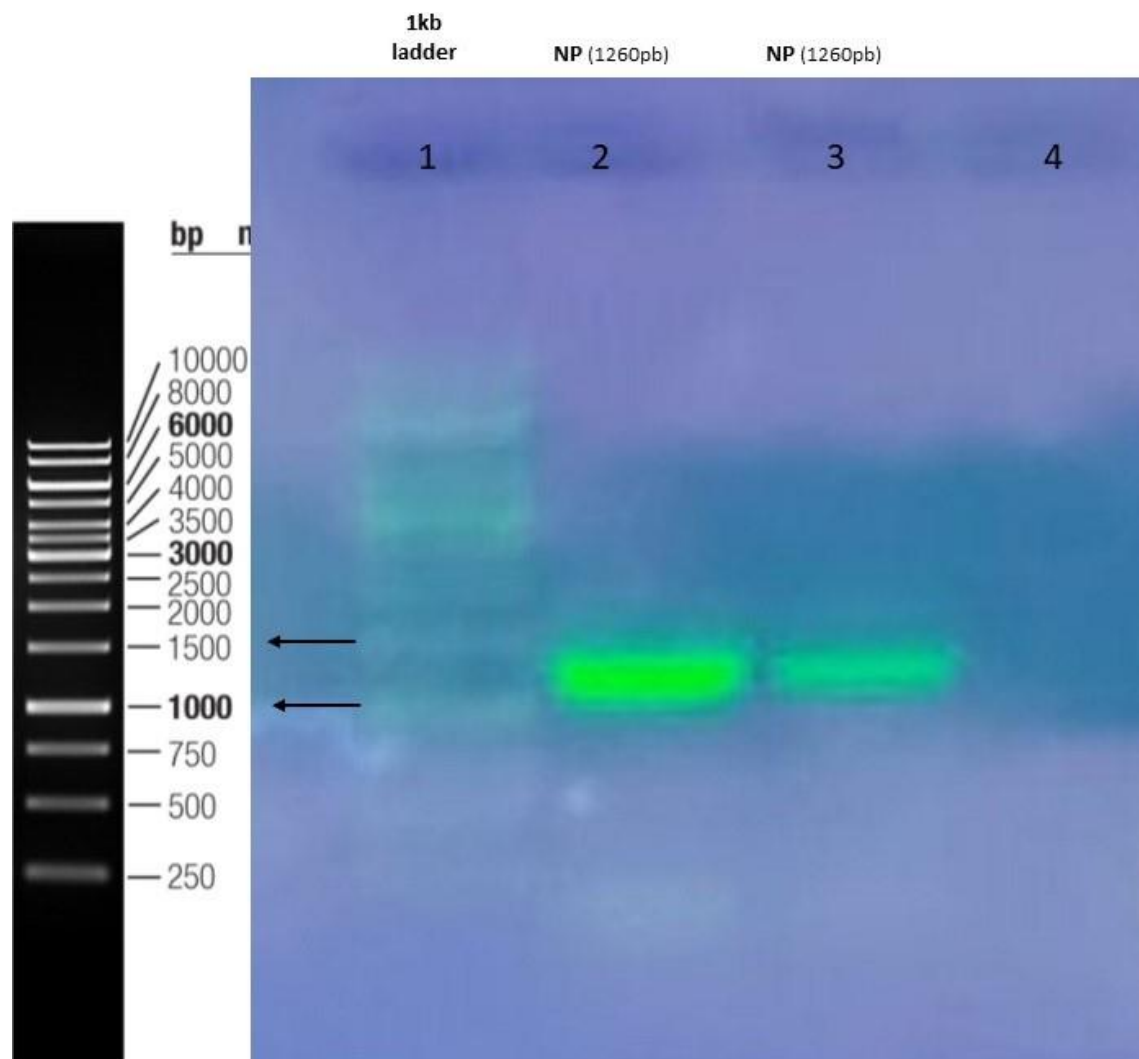


FIGURA 4 Producto de PCR de NP en gel de agarosa 2%. El producto de PCR de NP se observa entre las bandas de 1000 pb y 1500 pb el cual, coincide con la ubicación del producto de acuerdo con la bibliografía de 1260 pb.

TABLA 8. Gradiente de temperatura de alineamiento de primers para ORF3b y NP utilizando *Taq* polimerasa.

T° alineamiento primers	60°C	57°C	55°C
ORF3b	-	-	+
NP	+	-	-

Ausencia de producto de PCR (-), Presencia de producto de PCR (+)

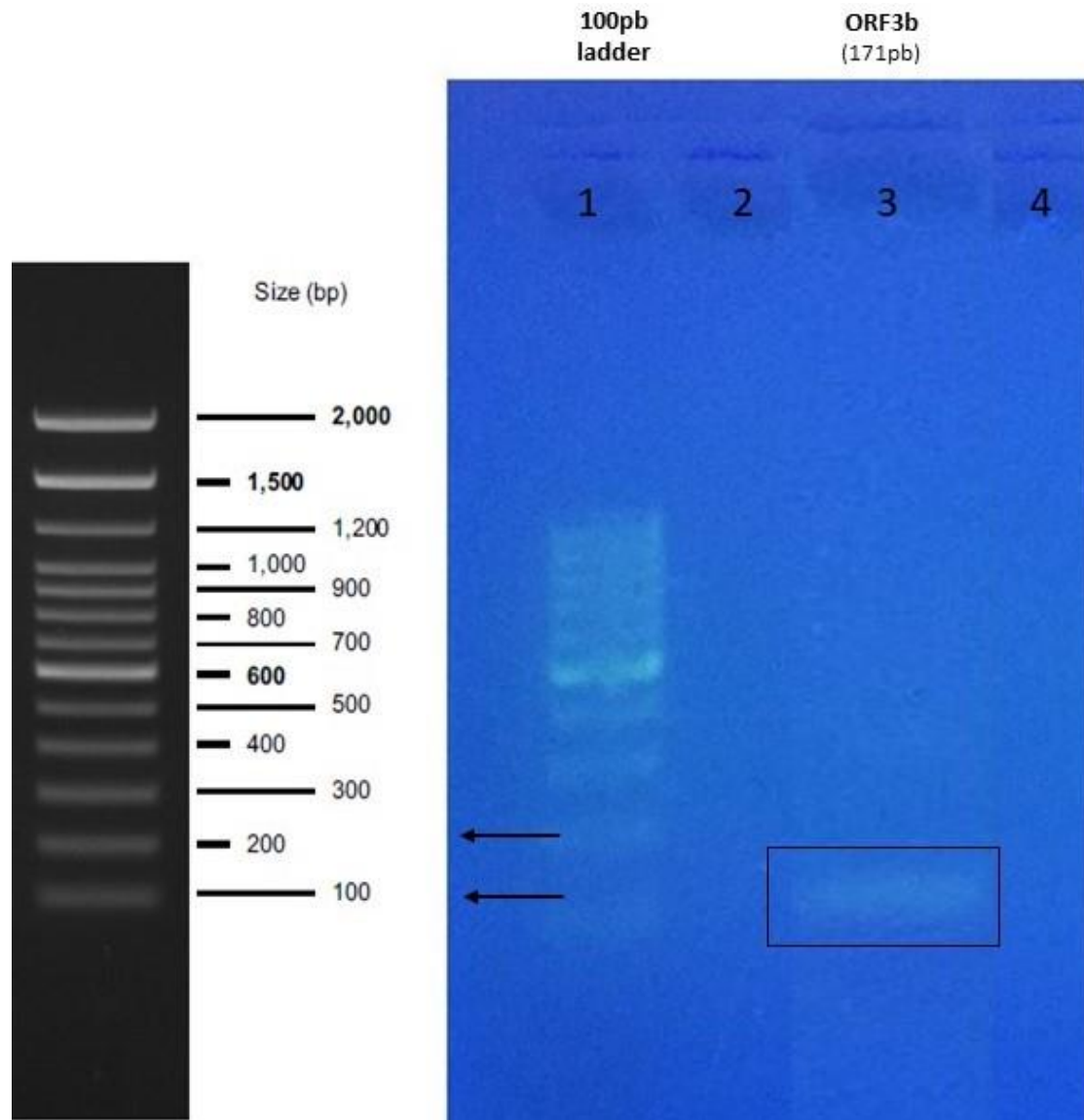


FIGURA 5. Producto de PCR de ORF3b a 55°C en gel de agarosa 2%.
El producto de PCR de ORF3b se observa entre las bandas de 100 pb y 200 pb siendo más cercana a la superior dado el largo del producto (171 pb).

3.2. Ligación con TOPO

Luego de la obtención del producto de PCR se realiza una ligación con TOPO la cual consiste en la clonación de fragmentos de ADN que han sido obtenidos por PCR y amplificados con polimerasa Taq. Este método sirve para insertar de forma directa, a temperatura ambiente y en poco tiempo productos de PCR que presentan salientes de adenina (A) en un plásmido procarionte (pCR 2.1) con salientes de timina (T).

Se obtuvo como resultado de la clonación 7 colonias pequeñas, redondas y blanquecinas donde 2 de ellas pertenecen a NP y 5 al producto de ligación con ORF3b (FIGURA 6). Por otro lado, se utilizó el PCR de colonias para observar la formación de producto de PCR (FIGURA 7) para las 7 colonias obtenidas donde la totalidad de las muestras presenta una banda positiva e intensa para el producto del ADN de ambas proteínas.

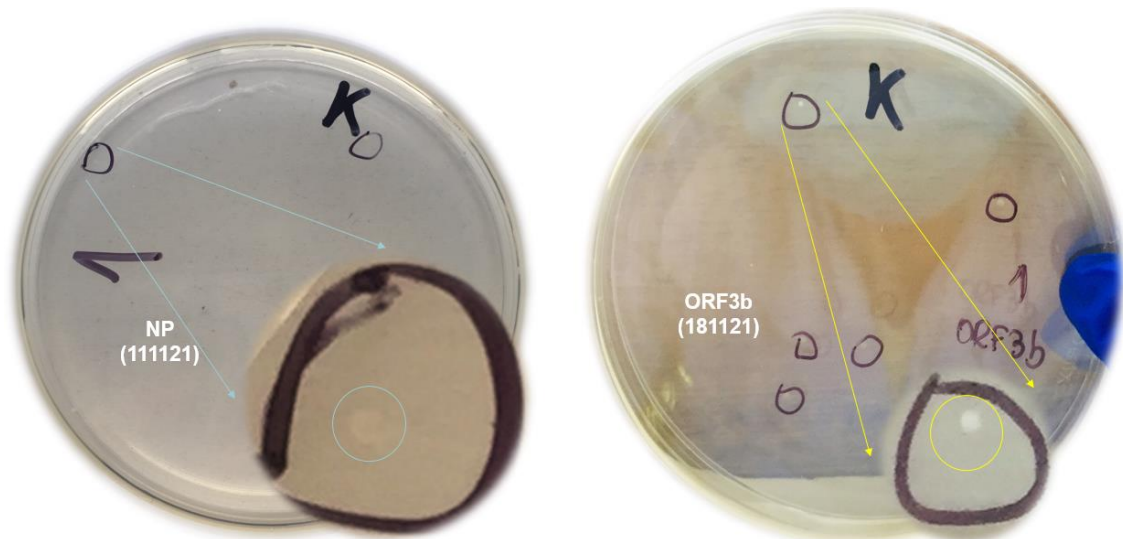


FIGURA 6. Colonias con producto de ligación TOPO de NP y ORF3b.

En negro se destacan las colonias presentes en las placas en estudio de ORF3b y NP.

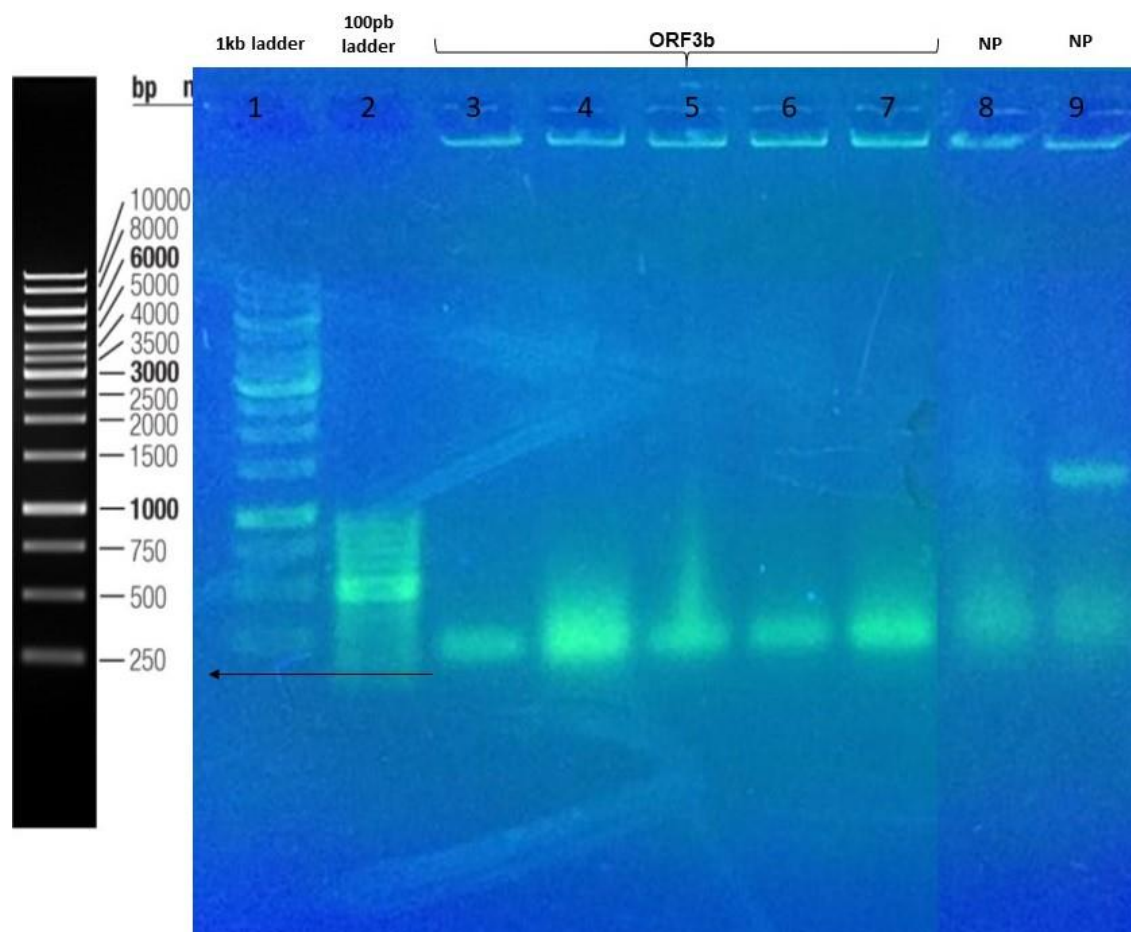


FIGURA 7. PCR de colonias de NP y ORF3b. Se observan 5 bandas para ORF3b bajo el marcador de 250 pb que corresponde con la bibliografía de 171 pb; en cuanto a NP las bandas obtenidas se ubican entre los 1000 y 1500 pb que corresponden a lo registrado en bibliografía de 1260 pb.

3.3. Purificación del plásmido TOPO con insertos de ADN de NP y ORF3b

Posterior a la verificación del producto de PCR de ambas proteínas, se procedió a la purificación de los productos donde se obtuvieron las concentraciones de cada uno de los stock de purificación utilizando espectrofotometría a 260 nm para NP y ORF3b (TABLA 9).

TABLA 9. Concentraciones NP y ORF3b-Vector TOPO

ADN-Vector	Concentración (ug/uL)
NP	2,17
ORF3b	2,48

3.4. Digestión enzimática

Los productos de PCR purificados fueron posteriormente sometidos a digestión enzimática para escindir las porciones de ADN de NP y ORF3b del plásmido TOPO.

La FIGURA 8 presenta el resultado del proceso enzimático con SacII y NotI. En el primer gel los carriles 2-5 corresponden al producto digerido de NP y desde los carriles 7-9 el vector pNLF1-N; en cuanto al segundo gel, los carriles 3-4, 6-7 y 9-10 corresponden a ORF3b. En el caso de NP y ORF3b se observan bandas superiores sobre los 3000 pb, estas corresponden al vector TOPO (pCR2.1) las cuales confirman que ambos insertos de ADN fueron escindidos. Las bandas intensas señaladas en amarillo representan a estos insertos de ADN de NP y ORF3b.

La purificación de los productos Vector-ADN de proteínas dió paso a la obtención de concentraciones por fluorimetría (TABLA 10).

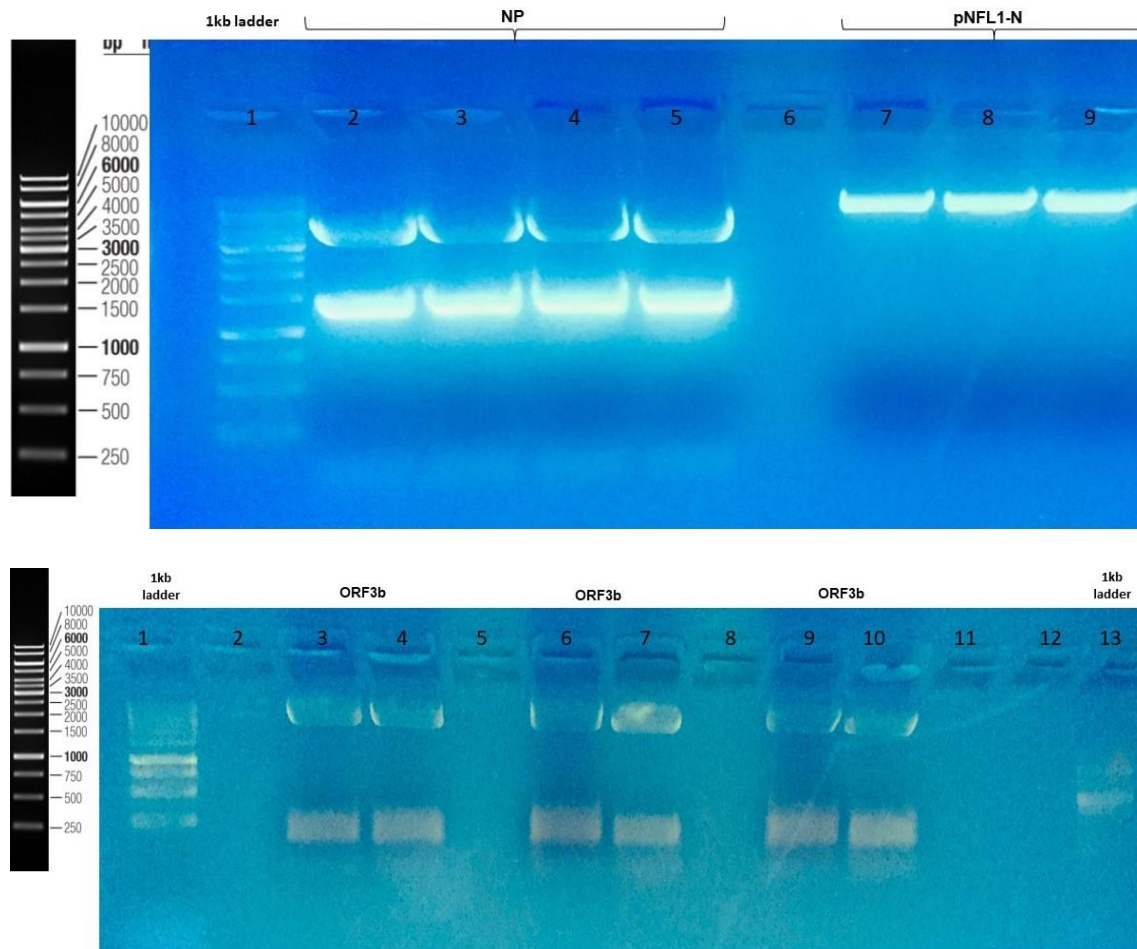


FIGURA 8. Producto de digestión enzimática del plásmido con luciferasa, NP y ORF3b con *SacII* y *NotI*. La figura muestra bandas en la parte superior que corresponden al vector del TOPO (para NP y ORF3b) e inferiores que representan el ADN de las proteínas NP y ORF3b; para el vector pNFL1-N con luciferasa (Luc) se observa una sola banda.

TABLA 10. Concentraciones ADN para NP y ORF3b

ADN-VECTOR pNLF1-N	Concentración (ng/uL)
NP	220
ORF3b	48,4
Luc	61,6

3.5. Ligación al plásmido pNLF1-N

Los productos cuantificados de digestión enzimática fueron posteriormente ligados a un plásmido eucarionte pNLF1-N el cual había sido previamente digerido con enzimas de restricción SacII y NotI (FIGURA 8). Este proceso permite generar un producto de ligación vector-inserto de ADN de proteínas para ser posteriormente introducido en una célula eucarionte.

Los resultados de las placas con producto ligado (inserto-vector) en relación 1:3 y 1:5 para NP (FIGURA 9) registran una alta población de colonias pequeñas, redondas y blanquecinas; esto mismo ocurre con las correspondientes al producto de ligación de ORF3b (FIGURA 10).

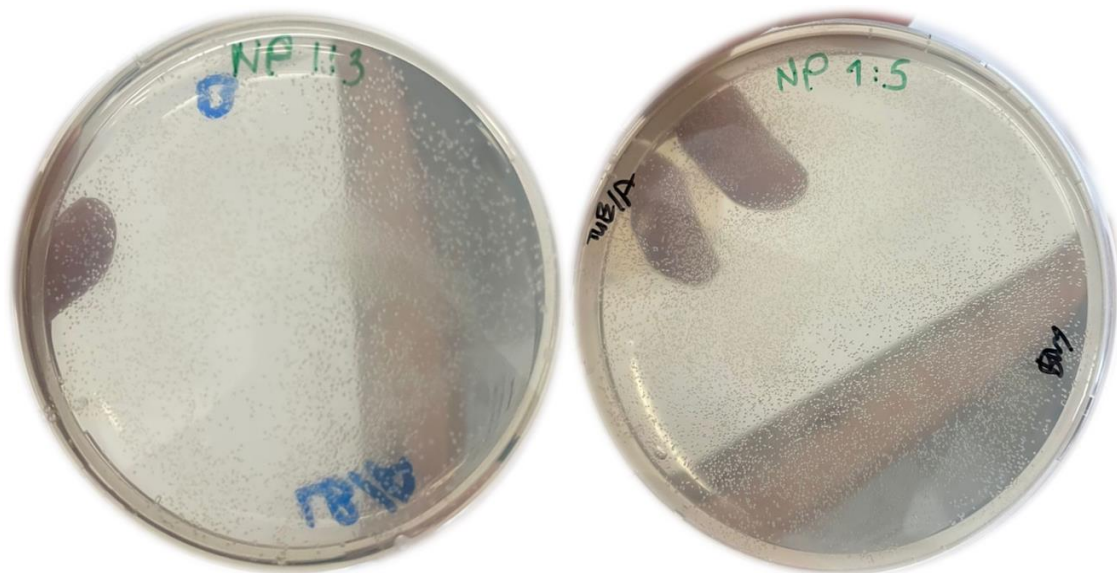


FIGURA 9. Colonias con producto de ligación NP-Vector pNLF1-N en relación 1:3 y 1:5 con inserto.

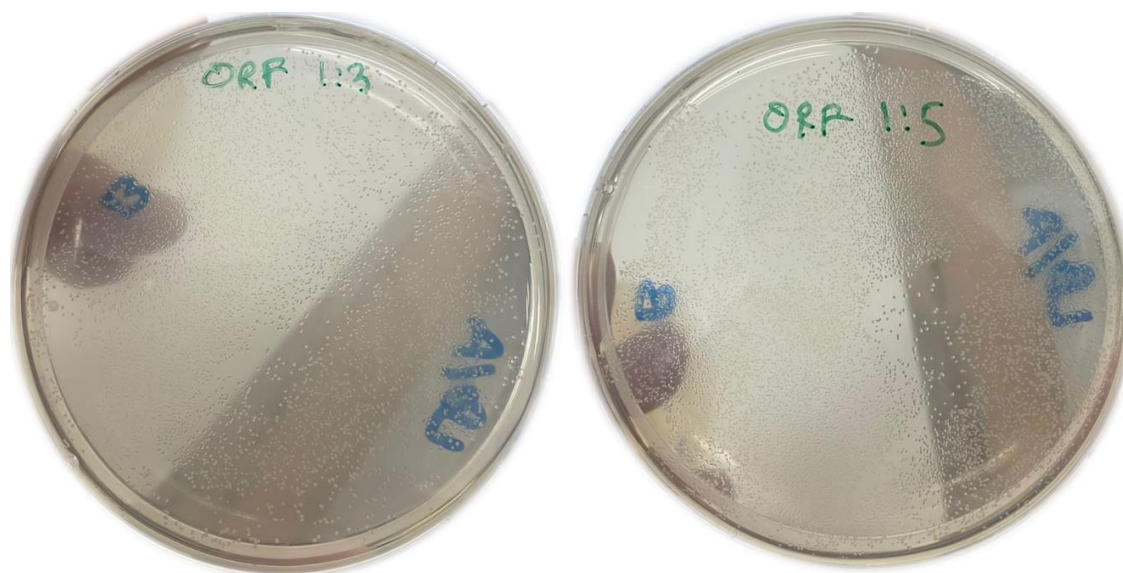


FIGURA 10. Colonias con producto de ligación ORF3b-Vector pNLF1-N en relación 1:3 y 1:5 con inserto.

3.5.1. Selección de inóculo por PCR de colonias

Luego de la ligación de los insertos de ADN en el plásmido pNLF1-N y posterior generación de colonias se procedió a realizar PCR de colonias con Sapphire. Este proceso seleccionó, dentro de la totalidad de colonias presentes en las placas, cuál de ellas había integrado de forma efectiva al vector-inserto de ADN objetivo.

La FIGURA 11 muestra el resultado de un total de 16 PCR con Sapphire donde se observa que el carril 13 del primer gel dió positivo para NP; por otra parte, el gel 2 presenta un producto de PCR positivo para NP en el carril 3 mientras que en el resto de los carriles no se observan bandas dado que no se presentó o generó producto de PCR para NP bajo las condiciones estandarizadas. En cuanto a ORF3b, se observan diferencias dado que la totalidad de las colonias estudiadas, incorporaron correctamente al vector-inserto, pero la mayoría de estas se observa con una menor intensidad (FIGURA 12).

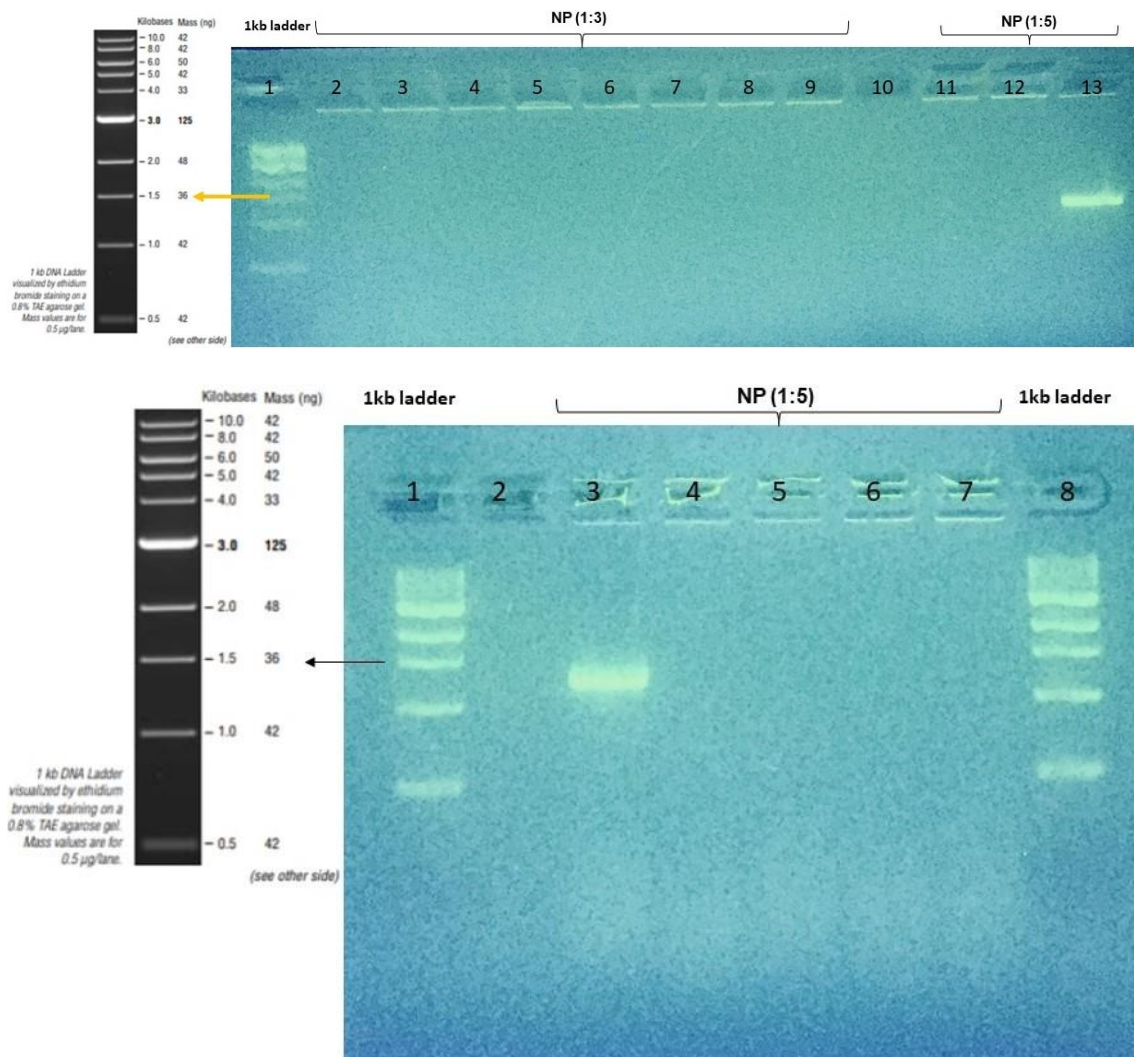


FIGURA 11. PCR colonias con producto de ligación NP-Vector pNLF1-N en relación 1:3 y 1:5 con inserto NP. Los productos deseados se encuentran entre los 1000 y 1500 pb del marcador de 1 kb; también, la positividad de los resultados se observa solo en los inóculos de la relación 1:5.

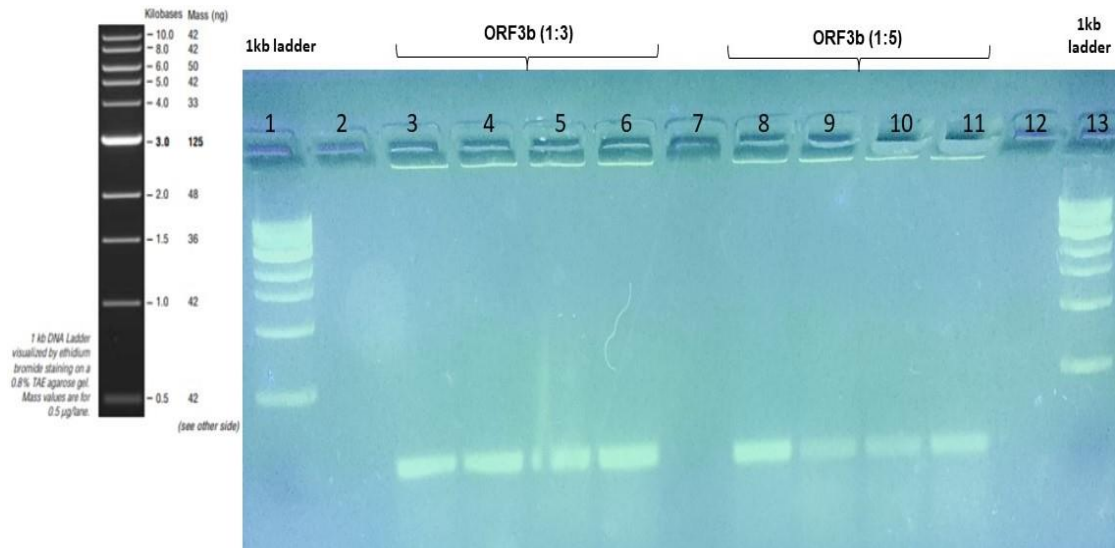


FIGURA 12. PCR colonias con producto de ligación ORF3b-Vector pNLF1-N en relación 1:3 y 1:5 con inserto. Los carriles 3-6 corresponden a inóculos en relación 1:3 vector-inserto mientras que desde los carriles 8-11 la relación vector-inserto es 1:5. Los íconos sobre las bandas destacan los inóculos que presentan una mayor intensidad.

3.5.2. Concentración de NP, ORF3b y controles GFP y GLUT-1 GFP

Posterior a la selección de las colonias con los productos deseados, se procedió a generar stock de purificación que contuviera al vector-inserto de ADN de las proteínas NP y ORF3b. Este paso del procedimiento contribuyó en la determinación de la concentración de los productos deseados.

De forma paralela, se obtuvieron stock de purificación de GFP y GLUT1-GFP los cuales sirvieron como controles para posteriores pasos del procedimiento.

La TABLA 11 muestra los resultados obtenidos por el fluorímetro para NP, ORF3b, GFP y GLUT-1 GFP donde las concentraciones registradas por el equipo se presentan en ng/uL.

TABLA 11. Concentraciones ADN para NP y ORF3b-Vector pNLF1-N y de los controles GFP y GLUT-1 GFP.

ADN-Vector; Controles	Concentración (ng/uL)
NP	1688
ORF3b	2056
GFP	3032
GLUT-1 GFP	1680

3.5.3. Digestión stock de purificación de NP y ORF3b

Los stock de purificación cuantificados por fluorimetría fueron posteriormente digeridos enzimáticamente con las enzimas de restricción SacII y NotI las cuales presentan sitios de corte río abajo de la porción que codifica para la luciferasa. Este paso del procedimiento permitió escindir los insertos de ADN del vector pNLF1-N y así, aislar completamente los productos objetivo.

Los resultados de la digestión de NP muestran la presencia de 2 bandas una superior que corresponde al plásmido pNLF1-N y la inferior al ADN de NP (FIGURA 13.1). Por otra parte, para ORF3b se registraron el mismo número de bandas siendo la superior igual a NP y la inferior la correspondiente al ADN de ORF3b (FIGURA 13.2).

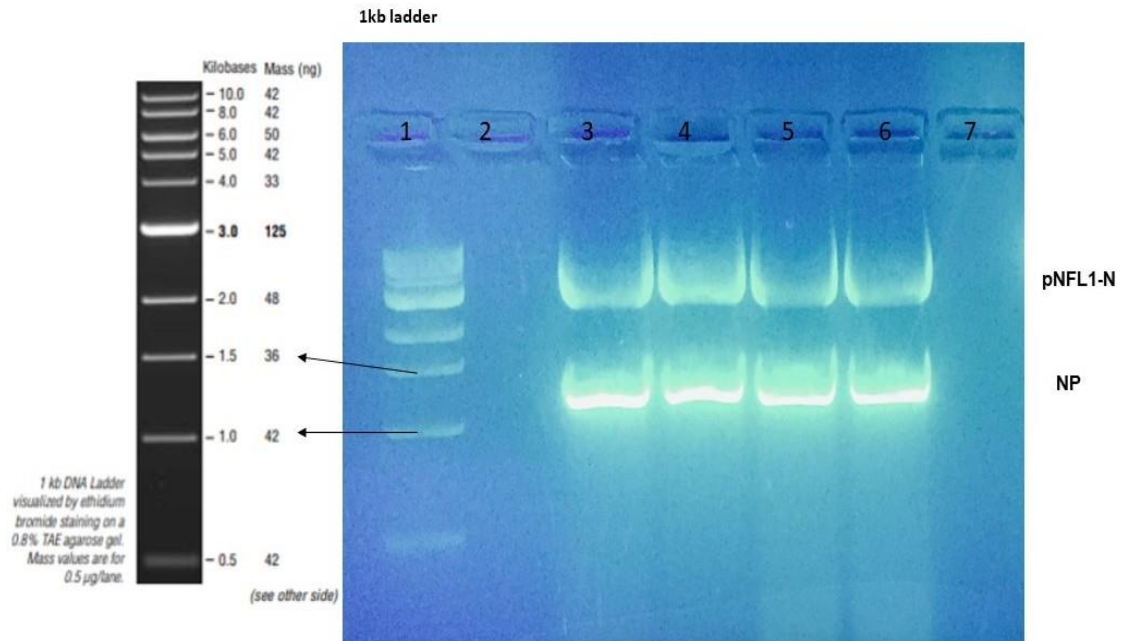


FIGURA 13.1. Producto de la digestión de NP con SacII y NotI. La figura muestra bandas en la parte superior que corresponden al vector de pNFL1-N y la inferior representa la porción escindida NP.

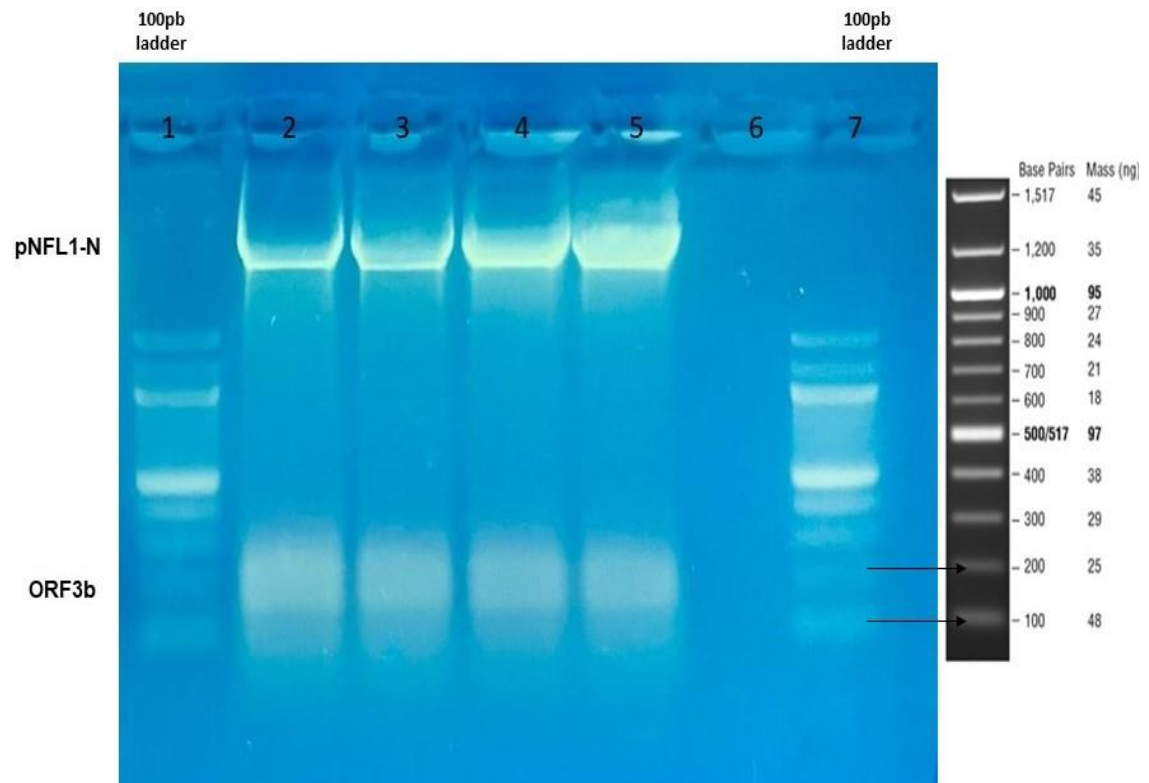


FIGURA 13.2. Producto de la digestión de ORF3b con SacII y NotI. La figura muestra bandas en la parte superior que corresponden al vector de pNFL1-N y la inferior representa la porción escindida ORF3b.

3.6. Transfección de los productos subclonados en células HEK293

Seguido de la digestión enzimática, se realizó la transfección de los insertos de ADN en una línea celular de células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293) la cual se destaca por su fácil crecimiento y transfección. Este proceso permitió introducir el ADN de las proteínas NP y ORF3b en células eucariontes capaces de producir masivamente, a través de la maquinaria celular, las proteínas recombinantes de interés. En paralelo, se realizó el mismo procedimiento utilizando un control de proteína fluorescente verde (GFP) con el fin de identificar la viabilidad de los reactivos y del proceso (FIGURA 14).

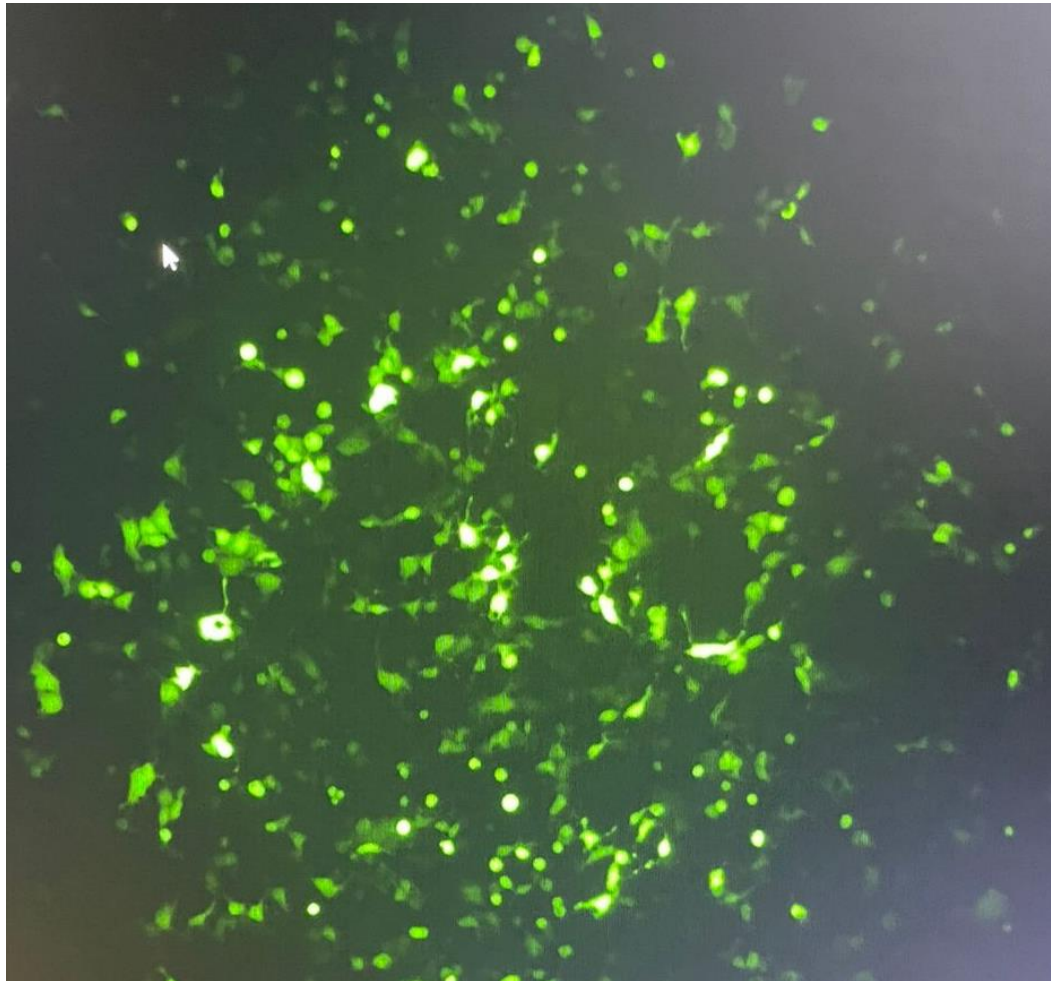


FIGURA 14. Producto de la transfección del control GFP en células **HEK 293**. Se observa la coloración clásica de la proteína fluorescente verde en la totalidad de la muestra, pero con mayor intensidad en el centro de esta.

4. DISCUSION

Para la selección de las proteínas dentro del grupo de las estructurales y accesorias, se consultó en bibliografía basado en resultados de investigadores que hayan abarcado un gran número de antígenos. Dentro de los diversos estudios realizados se destacaron los resultados obtenidos por Hachim A y colaboradores en sus dos versiones (solo adultos - adultos y niños). En estos estudios los investigadores determinaron frente a un amplio panel de antígenos cuál de ellos presentaba una mayor señal de anticuerpos utilizando el sistema LIPS. Sus resultados determinaron que dentro del grupo de las proteínas estructurales spike y nucleocápside presentaban los mejores resultados, y en cuanto a las proteínas accesorias las más destacadas correspondían a ORF3b y ORF8. Por otro lado, el equipo detectó una alta especificidad en un gran número de antígenos del panel, siendo las más destacadas en cuanto a señal de anticuerpos NP, ORF3b y ORF8 (Asmaa Hachim et al., 2021; A. Hachim et al., 2020; Konno et al., 2020). Para determinar cuál de las tres seleccionadas serían las objetivo, se realizó un PCR a un amplio panel de proteínas donde en un principio se logró obtener resultados para NP y luego para ORF3b; entonces de acuerdo con ellos, se seleccionaron estas últimas por la envergadura del trabajo y por este motivo, solo se trabajó con ORF3b y NP.

Las muestras de ARN proporcionadas por el Laboratorio de Diagnóstico Molecular y Proteómico del Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Farmacia, fueron sometidas a RT-PCR determinando en primera instancia, que las regiones genómicas objetivo no compartían temperaturas de alineamiento de primers. Para esto se realizó una estandarización del proceso de PCR donde según lo obtenido experimentalmente, se determinó que para NP esta temperatura corresponde a 60°C y para ORF3b de 55°C lo cual es claramente evidenciado en el resultado obtenido por electroforesis, donde se observa una equivalencia entre el peso del producto de PCR y lo que describe la literatura para NP de 1260 pb y ORF3b de 171 pb (Asmaa Hachim et al., 2021).

Los resultados también muestran con éxito el desarrollo del producto de ligación TOPO (pCR2.1)-ADN de NP y ORF3b del virus SARS-CoV-2, en altas concentraciones luego de hacerlo crecer en medio LB. Este procedimiento no estuvo exento de dificultades dado que el kit utilizado no cumplió las expectativas y se prefirió generar bacterias electrocompetentes con las provistas en el mismo kit de base. La bacteria *E. coli* tanto en el kit utilizado como en la literatura, se especifica que presenta una alta eficiencia de transformación (Moreno Terán, 2018; Serrano-Rivero, Hernández-García, & Fando-Calzada, 2013). En este caso, no se generó una alta población de transformantes, pero si las necesarias para poder obtener un producto de ligación acorde a lo planteado dado que la

totalidad de las colonias encontradas en las placas, habían integrado exitosamente el producto de PCR (peso molecular dentro de lo estimado en literatura, NP 1260 pb y ORF3b 171 pb).

En relación con la escisión de los fragmentos amplificados por PCR insertos en el plásmido TOPO, los resultados evidencian la separación entre ambos. Durante este proceso se produjeron desaciertos en cuanto al uso del kits y, por ende, en la cantidad de reactivo utilizado dado que lo propuesto inicialmente, no generó escisión del producto de PCR en el tiempo estimado de 15 min, por lo tanto, se hizo crucial el estandarizar el uso de estos mismos como indica el objetivo específico tres. Las modificaciones realizadas se concentraron en determinar una cantidad de ADN tal que pudiera ser observada claramente en el gel por eso, en ambos casos la base correspondió a 20000 ng; por otra parte, se estandarizó el tiempo de incubación con las enzimas de restricción para esa gran cantidad de ADN obteniéndose que esto superaban en 30 veces a las sugeridas por el protocolo inicial llevando nuevamente a reconsiderar la procedencia del material genético y, por otro lado, a modificar de forma considerable los volúmenes utilizados y así, obtener los productos visibles a la luz UV que se mostraron en los resultados.

Los resultados confirman lo propuesto de forma inicial con respecto al proceso de ligación al plásmido eucarionte pNLF1-N. Se realizaron modificaciones en cuanto al uso de las bacterias puesto que las utilizadas durante este paso, necesitaban un mayor requerimiento nutricional al ser quimiocompetentes comparadas a las generadas en un comienzo que eran electrocompetentes. He ahí el principal motivo de la abundante población de colonias en las placas dado que con el uso de las electrocompetentes, no se observaron colonias en un seguimiento de 120 h a 37°C. En cuanto a esto último se observa que, a pesar de obtener una alta población, no todas integran con éxito a la porción escindida. Por eso, los resultados (geles de agarosa) en el caso de NP, presentaron varios carriles donde no hay presencia de producto de PCR con Sapphire esto principalmente, porque el plásmido tiende a recircular generando en el proceso varias colonias con ese producto donde del total de las colonias picadas, solo un par dieron positivo para las condiciones expuestas.

Otro punto que considerar en base a los resultados presentados radica en la ausencia de colonias que integran al inserto en la relación plásmido-inserto de 1:3 para el caso de NP dado que las colonias seleccionadas para el crecimiento en medio LB solo resultaron ser de la placa de plásmido-inserto relación 1:5. Este resultado permite identificar que para generar efectivamente un producto de ligación acorde a lo planteado, se requiere de un aumento en la cantidad de ADN de NP añadido a la reacción esto tal vez, por el tamaño que tiene de acuerdo con

la literatura (1260 pb). En el caso de ORF3b, no se observaron diferencias entre ambas placas (relación plásmido-inserto 1:3 y 1:5) dado que la totalidad de las colonias escogidas generaron esta integración de forma exitosa como se observa en los resultados del PCR con Sapphire. A pesar de lo anterior, se obtuvieron algunas colonias que efectivamente habían integrado el inserto de ADN y, a su vez, una alta concentración de este producto subclonado al hacer crecer las colonias positivas en medio LB, por ende, el objetivo planeado a este punto se cumplió en su totalidad.

Para realizar el proceso de subclonamiento, pNFL1-N no es el único vector de expresión con una porción codificante para luciferasa (hachim A); además de este, en la literatura se habla de otros vectores como el utilizado por Burbelo y colaboradores pREN2 el cual dió comienzo al ensayo LIPS (P. D. Burbelo et al., 2009). De acuerdo con la literatura, este es un vector de expresión más pequeño en comparación a pNFL1-N (300 pb), presenta los elementos básicos para un vector y es ampliamente utilizado para ensayos de este tipo (Kumari et al., 2014). Se eligió utilizar este vector pNFL1-N basado en la literatura, dado que su uso completaba el esquema de reactivos y primers seleccionados para la obtención del producto subclonado además, este vector en su estructura presenta dos regiones promotoras y de resistencia antibiótica para ampicilina e higromicina siendo esta última, basado en la literatura, la encargada de seleccionar y generar estabilidad en la línea celular y así, producir las proteínas recombinantes de

ORF3b y NP. Por otro lado, comparando ambos vectores, fue posible observar las diferencias existentes en cuanto a su sitio de multiclonamiento (MCS) dado que pREN2 no presenta sitios de corte para una de las enzimas de restricción utilizadas y esto mismo, ocurría con otros vectores de la misma naturaleza. Basado en estos motivos e influenciados por lo observado en literatura por la estructura del vector y a su vez, por los resultados obtenidos por Hachim A y colaboradores, se determinó hacer uso del mismo vector de expresión (Asmaa Hachim et al., 2021; A. Hachim et al., 2020).

Referente a la transfección de los productos subclonados, los resultados evidencian positivamente la introducción del control de *green fluorescence protein* (GFP), esto a través de la observación de bioluminiscencia producida a 400 nm en la línea celular HEK293 (Remington, 2011; Shi et al., 2018; Shimomura & Tsien); cabe destacar que no se realizaron estandarizaciones en el protocolo utilizado, por lo tanto, se siguieron las instrucciones determinadas por el fabricante. En cuanto al ADN de las proteínas objetivo NP y ORF3b transfectadas, se estima que los resultados obtenidos para este proceso corresponden a los mismos observados por GFP, pero diferenciándose en el tipo de observación por el plásmido eucarionte utilizado para llevar la secuencia genómica de las proteínas en cuestión. Por este motivo, no se observa bioluminiscencia en los productos transfectados de NP y ORF3b y en su lugar,

solo se observan las células con su morfología característica, sin una iluminación determinada bajo las condiciones aplicadas. Cabe mencionar, que el inserto que codifica para la proteína luciferasa, el cual produciría un efecto bioluminiscente, esta insertado rio arriba del MCS donde se ubica el ADN de las proteínas objetivo, por ende, es necesario realizar el ensayo LIPS para identificar de forma correcta la presencia o ausencia de formación de un complejo entre los anticuerpos en suero de pacientes, los antígenos objetivos y las perlas de sefarosa que se unen de forma específica al fragmento cristizable o también conocida como porción Fc de los anticuerpos. Esta reacción de tipo enzima-sustrato posteriormente, se le miden las unidades de luz usando un luminómetro a 480 nm y así, determinar un resultado cualitativo de los antígenos NP y ORF3b como indica la literatura (Peter D Burbelo, Keller, et al., 2015; Peter D Burbelo, Lebovitz, & Notkins, 2015; Asmaa Hachim et al., 2021; A. Hachim et al., 2020).

Lo anteriormente obtenido, cumple con el fin principal proporcionado por el objetivo general que radica en desarrollar un protocolo de clonamiento de las proteínas recombinantes del SARS-CoV-2 NP y ORF3b en vectores plasmidiales adecuados para futuros usos en el ensayo de inmunoprecipitación por luciferasa.

5. CONCLUSION

Lo presentando anteriormente en este proyecto, permite concluir que hay presencia de producto ligado con el plásmido eucarionte pNLF1-N tanto para NP como para ORF3b, logrando estandarizar el paso inicial para la realización de LIPS, y a su vez, desarrollar un protocolo de obtención de productos clonados para las proteínas virales del SARS-CoV-2 en cuestión. Por otra parte, los productos clonados proporcionan resultados de alto valor científico que permitirían potencialmente responder a otras inquietudes clínicas sobre la respuesta inmune generada en la patología COVID-19, y proyectando su uso en inmunoensayos como el sistema de inmunoprecipitación por luciferasa; dando paso a dilucidar nuevas fronteras en el progreso de la enfermedad, y a su vez, ser la base para generar otros productos clonados de proteínas virales producidas por el patógeno mundialmente conocido SARS-CoV-2.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, A. E., Xie, J., Junaid, K., Younas, S., Elsaman, T., Abosalif, K. O. A., . . . Ejaz, H. (2021). Insight into the emerging role of SARS-CoV-2 nonstructural and accessory proteins in modulation of multiple mechanisms of host innate defense. *Bosn J Basic Med Sci*, 21(5), 515-527. doi:10.17305/bjbms.2020.5543
- Arya, R., Kumari, S., Pandey, B., Mistry, H., Bihani, S. C., Das, A., . . . Kumar, M. (2021). Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol*, 433(2), 166725. doi:10.1016/j.jmb.2020.11.024
- Bakhiet, M., & Taurin, S. (2021). SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development. *Cytokine Growth Factor Rev*, 58, 16-29. doi:10.1016/j.cytogfr.2020.11.001
- Benzigar, M. R., Bhattacharjee, R., Baharfar, M., & Liu, G. (2021). Current methods for diagnosis of human coronaviruses: pros and cons. *Anal Bioanal Chem*, 413(9), 2311-2330. doi:10.1007/s00216-020-03046-0
- Burbelo, P. D., Ching, K. H., Klimavicz, C. M., & Iadarola, M. J. (2009). Antibody profiling by Luciferase Immunoprecipitation Systems (LIPS). *J Vis Exp*(32). doi:10.3791/1549
- Burbelo, P. D., Keller, J., Wagner, J., Klimavicz, J. S., Bayat, A., Rhodes, C. S., . . . Kiertiburanakul, S. (2015). Serological diagnosis of pulmonary Mycobacterium tuberculosis infection by LIPS using a multiple antigen mixture. *BMC microbiology*, 15(1), 1-9.
- Burbelo, P. D., Lebovitz, E. E., & Notkins, A. L. (2015). Luciferase immunoprecipitation systems for measuring antibodies in autoimmune and infectious diseases. *Translational Research*, 165(2), 325-335.
- Cui, J., Li, F., & Shi, Z. L. (2019). Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat Rev Microbiol*, 17(3), 181-192. doi:10.1038/s41579-018-0118-9
- Fu, Y. Z., Wang, S. Y., Zheng, Z. Q., Yi, H., Li, W. W., Xu, Z. S., & Wang, Y. Y. (2021). SARS-CoV-2 membrane glycoprotein M antagonizes the MAVS-mediated innate antiviral response. *Cell Mol Immunol*, 18(3), 613-620. doi:10.1038/s41423-020-00571-x
- Gorkhali, R., Koirala, P., Rijal, S., Mainali, A., Baral, A., & Bhattarai, H. K. (2021). Structure and Function of Major SARS-CoV-2 and SARS-CoV Proteins. *Bioinform Biol Insights*, 15, 11779322211025876. doi:10.1177/11779322211025876
- Hachim, A., Gu, H., Kavian, O., Kwan, M. Y., Chan, W.-h., Yau, Y. S., . . . Ma, F. (2021). The SARS-CoV-2 antibody landscape is lower in magnitude for structural proteins, diversified for accessory proteins and stable long-term in children. *Medrxiv*.
- Hachim, A., Kavian, N., Cohen, C. A., Chin, A. W. H., Chu, D. K. W., Mok, C. K. P., . . . Valkenburg, S. A. (2020). ORF8 and ORF3b antibodies are accurate serological markers of early and late SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol*, 21(10), 1293-1301. doi:10.1038/s41590-020-0773-7
- Haljasmägi, L., Remm, A., Rumm, A. P., Krassohhina, E., Sein, H., Tamm, A., . . . Peterson, P. (2020). LIPS method for the detection of SARS-CoV-2 antibodies to spike and nucleocapsid proteins. *Eur J Immunol*, 50(8), 1234-1236. doi:10.1002/eji.202048715
- Hansen, C. B., Jarlhelt, I., Pérez-Alós, L., Hummelshøj Landsy, L., Loftager, M., Rosbjerg, A., . . . Skjoedt, M. O. (2021). SARS-CoV-2 Antibody Responses Are Correlated to Disease Severity in COVID-19 Convalescent Individuals. *J Immunol*, 206(1), 109-117. doi:10.4049/jimmunol.2000898

- Kevadiya, B. D., Machhi, J., Herskovitz, J., Oleynikov, M. D., Blomberg, W. R., Bajwa, N., . . . Patel, M. (2021). Diagnostics for SARS-CoV-2 infections. *Nature materials*, 20(5), 593-605.
- Konno, Y., Kimura, I., Uriu, K., Fukushima, M., Irie, T., Koyanagi, Y., . . . Sato, K. (2020). SARS-CoV-2 ORF3b Is a Potent Interferon Antagonist Whose Activity Is Increased by a Naturally Occurring Elongation Variant. *Cell Rep*, 32(12), 108185. doi:10.1016/j.celrep.2020.108185
- Kumari, S., Crim, R. L., Kulkarni, A., Audet, S. A., Mdluli, T., Murata, H., & Beeler, J. A. (2014). Development of a luciferase immunoprecipitation system assay to detect IgG antibodies against human respiratory syncytial virus nucleoprotein. *Clinical and Vaccine Immunology*, 21(3), 383-390.
- Lahner, E., Marzinotto, I., Brigatti, C., Davidson, H., Wenzlau, J., Piemonti, L., . . . Lampasona, V. (2019). Measurement of Autoantibodies to Gastric H⁺,K⁺-ATPase (ATP4A/B) Using a Luciferase Immunoprecipitation System (LIPS). *Methods Mol Biol*, 1901, 113-131. doi:10.1007/978-1-4939-8949-2_10
- Lam, J. Y., Yuen, C. K., Ip, J. D., Wong, W. M., To, K. K., Yuen, K. Y., & Kok, K. H. (2020). Loss of orf3b in the circulating SARS-CoV-2 strains. *Emerg Microbes Infect*, 9(1), 2685-2696. doi:10.1080/22221751.2020.1852892
- Lu, S., Ye, Q., Singh, D., Cao, Y., Diedrich, J. K., Yates, J. R., 3rd, . . . Corbett, K. D. (2021). The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nat Commun*, 12(1), 502. doi:10.1038/s41467-020-20768-y
- Moreno Terán, J. Y. (2018). *Determinar la eficiencia de transformación genética mediante el método químico y método físico (Electroporación) a través de la bacteria Escherichia coli*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra,
- Naqvi, A. A. T., Fatima, K., Mohammad, T., Fatima, U., Singh, I. K., Singh, A., . . . Hassan, M. I. (2020). Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1866(10), 165878. doi:10.1016/j.bbadis.2020.165878
- Ni, L., Ye, F., Cheng, M.-L., Feng, Y., Deng, Y.-Q., Zhao, H., . . . Li, X. (2020). Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity*, 52(6), 971-977. e973.
- OMS. *Organizacion Mundial de la Salud*.
- Padhan, K., Parvez, M. K., & Al-Dosari, M. S. (2021). Comparative sequence analysis of SARS-CoV-2 suggests its high transmissibility and pathogenicity. *Future Virology*, 16(3), 245-254.
- Pillay, T. S. (2020). Gene of the month: the 2019-nCoV/SARS-CoV-2 novel coronavirus spike protein. *J Clin Pathol*, 73(7), 366-369. doi:10.1136/jclinpath-2020-206658
- Rahman, M. S., Hoque, M. N., Islam, M. R., Islam, I., Mishu, I. D., Rahaman, M. M., . . . Hossain, M. A. (2021). Mutational insights into the envelope protein of SARS-CoV-2. *Gene Rep*, 22, 100997. doi:10.1016/j.genrep.2020.100997
- Rahman, M. S., Islam, M. R., Alam, A., Islam, I., Hoque, M. N., Akter, S., . . . Hossain, M. A. (2021). Evolutionary dynamics of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its consequences. *J Med Virol*, 93(4), 2177-2195. doi:10.1002/jmv.26626
- Raskin, S. (2020). Genetics of COVID-19. *J Pediatr (Rio J)*. doi:10.1016/j.jpmed.2020.09.002
- Ravichandran, S., Lee, Y., Grubbs, G., Coyle, E. M., Klenow, L., Akasaka, O., . . . Nakachi, I. (2021). Longitudinal antibody repertoire in “mild” versus “severe” COVID-19 patients reveals

- immune markers associated with disease severity and resolution. *Science Advances*, 7(10), eabf2467.
- Ravichandran, S., Tang, J., Grubbs, G., Lee, Y., Pourhashemi, S., Hussaini, L., . . . Chahrودي, A. (2021). SARS-CoV-2 immune repertoire in MIS-C and pediatric COVID-19. *Nature immunology*, 22(11), 1452-1464.
- Redondo, N., Zaldívar-López, S., Garrido, J. J., & Montoya, M. (2021). SARS-CoV-2 accessory proteins in viral pathogenesis: knowns and unknowns. *Frontiers in Immunology*, 2698.
- Redondo, N., Zaldívar-López, S., Garrido, J. J., & Montoya, M. (2021). SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns. *Front Immunol*, 12, 708264. doi:10.3389/fimmu.2021.708264
- Remington, S. J. (2011). Green fluorescent protein: a perspective. *Protein Science*, 20(9), 1509-1519.
- Serrano-Rivero, Y., Hernández-García, A., & Fando-Calzada, R. (2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en Escherichia coli. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(2).
- Shajahan, A., Supekar, N. T., Gleinich, A. S., & Azadi, P. (2020). Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*, 30(12), 981-988. doi:10.1093/glycob/cwaa042
- Shang, J., Han, N., Chen, Z., Peng, Y., Li, L., Zhou, H., . . . Wu, A. (2021). Compositional diversity and evolutionary pattern of coronavirus accessory proteins. *Briefings in bioinformatics*, 22(2), 1267-1278.
- Shang, J., Han, N., Chen, Z., Peng, Y., Li, L., Zhou, H., . . . Wu, A. (2021). Compositional diversity and evolutionary pattern of coronavirus accessory proteins. *Brief Bioinform*, 22(2), 1267-1278. doi:10.1093/bib/bbaa262
- Shi, B., Xue, M., Wang, Y., Wang, Y., Li, D., Zhao, X., & Li, X. (2018). An improved method for increasing the efficiency of gene transfection and transduction. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 10(2), 95.
- Shimomura, M. C., & Tsien, R. Y. for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP. The Nobel Prize in Chemistry, 2008. In.
- ThermoFisherScientific. SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase. *ThermoFisherScientific*
- Retrieved from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12574018?SID=srch-srp-12574018>
- Wu, A., Peng, Y., Huang, B., Ding, X., Wang, X., Niu, P., . . . Jiang, T. (2020). Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*, 27(3), 325-328. doi:10.1016/j.chom.2020.02.001
- Wu, D., Wu, T., Liu, Q., & Yang, Z. (2020). The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. *Int J Infect Dis*, 94, 44-48. doi:10.1016/j.ijid.2020.03.004
- Xu, C., Wang, Y., Liu, C., Zhang, C., Han, W., Hong, X., . . . Cong, Y. (2021). Conformational dynamics of SARS-CoV-2 trimeric spike glycoprotein in complex with receptor ACE2 revealed by cryo-EM. *Sci Adv*, 7(1). doi:10.1126/sciadv.abe5575
- Yadav, R., Chaudhary, J. K., Jain, N., Chaudhary, P. K., Khanra, S., Dhamija, P., . . . Handu, S. (2021). Role of Structural and Non-Structural Proteins and Therapeutic Targets of SARS-CoV-2 for COVID-19. *Cells*, 10(4). doi:10.3390/cells10040821

- Zeng, W., Liu, G., Ma, H., Zhao, D., Yang, Y., Liu, M., . . . Jin, T. (2020). Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 527(3), 618-623. doi:10.1016/j.bbrc.2020.04.136
- Zhang, C., Zheng, W., Huang, X., Bell, E. W., Zhou, X., & Zhang, Y. (2020). Protein Structure and Sequence Reanalysis of 2019-nCoV Genome Refutes Snakes as Its Intermediate Host and the Unique Similarity between Its Spike Protein Insertions and HIV-1. *J Proteome Res*, 19(4), 1351-1360. doi:10.1021/acs.jproteome.0c00129
- Zhang, J., Zhao, C., & Zhao, W. (2021). Virus Caused Imbalance of Type I IFN Responses and Inflammation in COVID-19. *Front Immunol*, 12, 633769. doi:10.3389/fimmu.2021.633769
- Zinzula, L. (2021). Lost in deletion: The enigmatic ORF8 protein of SARS-CoV-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 538, 116-124. doi:10.1016/j.bbrc.2020.10.045

ANEXOS

Manejo de residuos

TRATAMIENTO DE DESECHOS BIOLÓGICOS

Se seguirá la normativa vigente según:

Plan de Manejo de Sustancias y Residuos Peligrosos

Vicerrectoría de Asuntos Económicos y Administrativos Universidad de Concepción

www.udec.cl/matpel

Anexo: 7352/3330/1591

email: matpel@udec.cl

6.1.5 Segregación y almacenamiento de residuos biológicos

- Los residuos biológicos deben segregarse en residuo biológico (tipo 1), residuo biológico cortopunzante (tipo 2), residuo bio-inerte (tipo 3), residuo cortopunzante inerte (tipo 4) o residuo microbiológico (tipo 5) (Anexo 8.5).
- Se deben utilizar los envases proporcionados por la Unidad RESPEL según se indica a continuación.
- Los residuos de tipo 1 deben ser almacenados en bolsas amarillas, y los de tipo 2 en cajas amarillas, ambos a temperaturas inferiores a 4°C. El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una

vez a la semana a través de empresa externa y la Unidad RESPEL, de acuerdo al decreto N°6/2009, “Reglamento sobre Manejo de Residuos de Establecimientos de Atención de Salud (REAS)”. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la Unidad RESPEL.

- Los residuos de tipo 3 deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retiradas por la Unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico.
- Los residuos de tipo 4 serán almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como “Cortopunzante inerte”, hasta ser retirados por la Unidad RESPEL para su disposición final.
- Los residuos de tipo 5 deben ser entregados a la Unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La Unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación.

 Universidad de Concepción	INSTRUCTIVO Clasificación y manejo de residuos peligrosos		Código: I-01 v02 Página 19 de 23
--	--	---	---

ANEXO 8.5 Clasificación y manejo de residuos biológicos

Tipo de Residuo	Definición	Almacenamiento y Retiro	Contenedor o bolsa
Residuos biológicos (tipo 1)	Corresponden SOLO a tejidos humanos, restos de tejidos humanos, materiales contaminados con fluidos humanos (sangre, orina) y restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Bolsa de autoclave amarilla 
Residuos cortopunzantes biológicos (tipo 2)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que se han utilizado con fluidos y tejidos humanos o en disecciones de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retirados por la unidad RESPEL o empresa externa*.	Caja cortopunzante amarilla 
Residuos bio-inertes (tipo 3)	Corresponden a animales o restos de animales de experimentación que <u>NO</u> están contaminados con bacterias o virus patógenos u otras sustancias peligrosas.	Deben ser almacenados en bolsas para residuos inertes color negro, resistente al volumen y peso del residuo, a temperaturas inferiores a 4°C hasta ser retiradas por la unidad RESPEL para su disposición final. En caso de que el residuo corresponda a una muestra preservada, se debe separar de la fracción líquida (ej. formalina, alcohol), la que debe ser almacenada como residuo químico.	Bolsa para residuos inertes color negro 
Residuos cortopunzantes inertes (tipo 4)	Corresponden a materiales cortopunzantes (agujas, lancetas, hojas de bisturí, escalpelos) que <u>NO</u> han estado en contacto con tejidos humanos, restos de tejidos humanos, fluidos humanos (sangre, orina), ni restos de animales contaminados con bacterias o virus patógenos.	Deben ser almacenados en contenedores plásticos de 4 u 8 kg, etiquetados como "Cortopunzante inerte", hasta ser retirados por la unidad RESPEL para su disposición final	Contenedor plástico 4 u 8 kg 
Residuos microbiológicos (tipo 5)	Corresponden a materiales de cultivo que han estado en contacto con bacterias no patógenas y que han sido inactivados por esterilización con autoclave o por desinfección en un baño con solución de hipoclorito de sodio.	Deben ser entregados a la unidad RESPEL, SOLO después de ser inertizados mediante autoclave o desinfectados en un baño con solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 hora. En caso contrario, no se procederá con el retiro. La unidad RESPEL entregará bolsas de autoclave solo cuando éste sea el método utilizado de inactivación.	Bolsa de autoclave transparente o blanca (solo para autoclave) 

(*) El retiro desde la Facultad de Medicina, Facultad de Odontología, DISE y Centro RAI, será una vez a la semana a través de empresa externa Stericycle y la unidad RESPEL. El resto de las facultades que generen este tipo de residuos deberá gestionar retiro mensual a través de la unidad RESPEL.

Instructivo elaborado en colaboración con la Facultad de Ciencias Biológicas.