

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SEDE DE OCCIDENTE

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIATURA EN
LABORATORISTA QUÍMICO

Construcción de vectores de expresión a partir de los genes *PirA* y *Ompk* en *Vibrio parahaemolyticus* como primer paso para el control de la necrosis hepatopancreática aguda del camarón (*Litopenaeus vannamei*) en Costa Rica

Ericka Barrantes Barrantes

2023

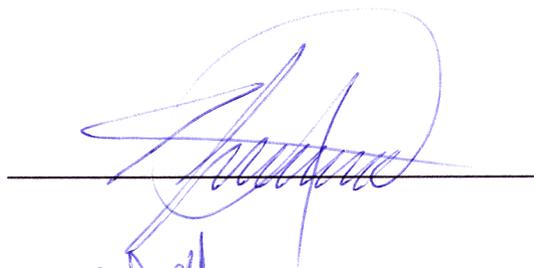
HOJA DE APROBACIÓN

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Trabajo Finales de Graduación de la Escuela de Ciencias Naturales de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Laboratorista Químico.

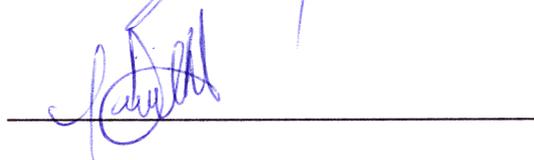
“Construcción de vectores de expresión a partir de los genes *PirA* y *Ompk* en *Vibrio parahaemolyticus* como primer paso para el control de la necrosis hepatopancreática aguda en camarón (*Litopenaeus vannamei*) en Costa Rica”

Aprobado por:

Diego Guerrero Oviedo
Departamento de Ciencias Naturales,
Sede de Occidente, UCR.
Presidente del tribunal.



Priscilla Rojas Alvarado
Departamento de Ciencias Naturales,
Sede de Occidente, UCR.
Miembro del tribunal.



Andrea García Quesada
Departamento de Ciencias Naturales,
Sede de Occidente, UCR.
Directora de tesis.



Élida Vargas Barrantes
Departamento de Ciencias Naturales,
Sede de Occidente, UCR.
Asesora.

Élida Vargas B.

Luis Alexis Jiménez Barboza
Departamento de Ciencias Naturales,
Sede de Occidente, UCR.
Asesor.



Ericka Barrantes Barrantes
Sustentante

Ericka Barrantes

DEDICATORIA

A mis padres, Alicia y Carlos Mario, por siempre darme su amor incondicional y recordarme que si doy lo mejor de mí es suficiente, este trabajo es el fruto de tanto que me han dado.

A mi pareja, Ignacio, por escucharme tantas veces durante el proceso y apoyarme en todo momento, simplemente gracias.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS		vii
ÍNDICE DE CUADROS		x
ÍNDICE DE ABREVIATURAS		xii
RESUMEN		xiii
1. INTRODUCCIÓN		15
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	15	
1.2. ANTECEDENTES.....	17	
1.3. OBJETIVOS.....	21	
1.3.1. Objetivo General.....	21	
1.3.2. Objetivos Específicos.....	21	
2. MARCO TEÓRICO		22
2.1. Acuicultura y cultivo de camarón blanco en Costa Rica	22	
2.2. Generalidades del camarón blanco (<i>Litopenaeus vannamei</i>)	23	
2.3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> y la AHPND.....	24	
2.4. Tratamientos alternativos contra la AHPND.....	25	
2.4.1. Generalidades de la inmunización pasiva.....	28	
2.4.2. Tecnologías utilizadas para la construcción de proteínas recombinantes	30	
3. MARCO METODOLÓGICO		34
3.1. Estandarización de la metodología para crear los dos vectores de expresión con los genes de la toxina <i>PirA</i> y la proteína <i>Ompk</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	34	
3.1.1. Fuente de ADN	34	

3.1.2.	Amplificación de los genes de la toxina <i>PirA</i> y la proteína <i>Ompk</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	36
3.1.3.	Electroforesis en gel de agarosa, limpieza y secuenciación de los genes de la toxina <i>PirA</i> y la proteína <i>Ompk</i>	36
3.1.4.	Digestión y ligación de los genes de la toxina <i>PirA</i> y la proteína <i>Ompk</i> en vectores plasmídicos de clonación y expresión.....	37
3.2.	Transformación de la bacteria <i>Escherichia coli</i> con el plásmido portador del gen de la toxina <i>PirA</i>	41
3.3.	amplificación y secuenciación del gen de la toxina <i>PirA</i> para comprobar SU PRESENCIA.....	41
3.3.1.	Amplificación y secuenciación del gen de la toxina <i>PirA</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	41
3.3.2.	Extracción de ADN de bacterias <i>E. coli</i> en caldos de cultivo.....	43
3.3.3.	Criopreservación de la bacteria <i>E.coli</i> JM109 para el almacenamiento a largo plazo del plásmido de expresión <i>PirA</i> - pET-28b(+).	44
4.	RESULTADOS	45
4.1.	Estandarización de la metodología para crear los dos vectores de expresión con los genes de la toxina <i>PirA</i> y la proteína <i>Ompk</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	45
4.1.1.	Amplificación de los genes de la toxina <i>PirA</i> y la proteína <i>Ompk</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	45
4.1.2.	Electroforesis en gel de agarosa, limpieza y secuenciación de los genes de la toxina <i>PirA</i> y la proteína <i>Ompk</i>	46
4.1.3.	Digestión y ligación de los genes de la toxina <i>PirA</i> en vectores plasmídicos de clonación y expresión.....	50

4.2.	Transformación de la bacteria <i>E. coli</i> con EL PLÁSMIDO de expresión <i>PirA</i> - pET-28b(+)	55
4.3.	amplificación y secuenciación del gen de la toxina <i>PirA</i> para comprobar SU PRESENCIA	55
4.3.1.	Amplificación y secuenciación del gen de la toxina <i>PirA</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	55
4.3.2.	Extracción de ADN de bacterias <i>E. coli</i> en caldo de cultivo LB más kanamicina	58
5.	DISCUSIÓN	61
5.1.	Estandarización de la metodología para crear los dos vectores de expresión con los genes de la toxina <i>PirA</i> y la proteína <i>Ompk</i> de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	61
5.2.	Transformación de la bacteria <i>Escherichia COLI</i> CON los plásmidos de expresión portadores DEL GEN de la toxina <i>PirA</i>	65
5.3.	amplificación y secuenciación del gen de la toxina <i>pir a</i> para comprobar su presencia	67
6.	CONCLUSIONES	72
7.	REFERENCIAS	74
8.	ANEXOS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sitios de restricción de las enzimas *Sacl*, *NdeI* y *NcoI* del plásmido de *PirA*-pGEM T easy y los vectores pET-2F8b(+) y pET-32a(+). a) pGEM-T easy con los sitios de restricción de *NcoI* y *NdeI*. b) pGEM-T easy con los sitios de restricción *Sacl* y *NdeI*. c) pET-28b(+) con los sitios de restricción *Sacl* y *NdeI*. d) pET-32a(+) con los sitios de restricción *Sacl* y *NdeI*. Modificado de Dotmatics (s/f).....39
- Figura 2.** Sitios de restricción de las enzimas *XhoI* y *NcoI* del plásmido de *PirA*-pGEM T easy y el vector *PirA*-pET-28b(+). a) *PirA*-pGEM-T easy con el sitio de restricción de *NcoI*. b) *PirA*-pET-28b(+) con los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*.....41
- Figura 3.** Productos de PCR convencional para la secuencia del gen de *PirA* y *Ompk* de *V. parahaemolyticus* en la electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 min a 90 V. Carril 1: NTC (control sin plantilla) para *PirA*. Carril 2: producto *Ompk*. Carril 3: NTC para *Ompk*. Carril 4: producto *PirA*. Carril 5: Marcador de peso molecular de 100 pb.....46
- Figura 4.** Productos de PCR convencional para la secuencia del gen de *Ompk* de *V. parahaemolyticus* en electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 min a 90 V. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2: Producto de PCR de *Ompk* como plantilla. Carril 3: ADN cromosómico como plantilla.....48
- Figura 5.** Resultados de la transformación de las bacterias *E. coli* JM109 con el plásmido *PirA*- pGEM-T easy. a) Cultivo que contiene el plásmido *PirA*-pGEM-T-easy, réplica 1. b) Cultivo que contiene *PirA*-pGEM-T-easy, réplica 2. c) Control negativo (sin inserto). d) Control positivo (Fragmento de 542 pb del vector pGEM®-luc).....50
- Figura 6.** Extracciones de las colonias *E. coli* JM109 transformada con el vector *PirA*-pGEM-T easy que contiene la secuencia de *PirA*, en la electroforesis en

gel de agarosa al 2% por 40 min a 90 V. Carril 1: Extracción 1, elución 1. Carril 2: Extracción 2, elución 1. Carril 3: Extracción 3, elución 1. Carril 4: Extracción 4, elución 1. Carril 5: Extracción 1, elución 2. Carril 6: Extracción 2, elución 2. Carril 7: Extracción 3, elución 2. Carril 8: Extracción 4, elución 2. Carril 9: Marcador de peso molecular *Hind III*.....51

Figura 7. Productos de digestión del vector *PirA-pGEM-T easy* en la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 60 min a 60 V. a) Digestión con las enzimas *NcoI* y *NdeI*. Carril 1: Marcador de peso molecular *Hind III*. Carril 2: Producto digerido. Carril 3: Producto sin digerir. b) Digestión con las enzimas *NdeI* y *SacI*. Carril 1: Marcador de peso molecular *Hind III*. Carril 2 y 3: Producto digerido. Carril 4: Producto sin digerir.....52

Figura 8. Productos de digestión del vector pET-32a(+) y pET-28b(+) con las enzimas *SacI* y *NdeI* en la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 60 min a 60 V a) pET-32a(+) Carril 1: Marcador de peso molecular *Hind III*. Carril 2, 3 y 4: Producto digerido. b) pET-28b(+) Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Producto digerido.....53

Figura 9. Resultados de la transformación de las bacterias *E. coli* JM109 con el plásmido *PirA-pET-28b(+)* en agar LB más kanamicina.....54

Figura 10. Productos de digestión del vector que se pensaba era pET-32a(+) que contiene la secuencia de *PirA* con las enzimas *XhoI* y *NcoI* en la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 60 min a 60 V. Carril 1: Marcador de peso molecular *Hind III*. Carril 2: Producto digerido colonia 3. Carril 3: Producto digerido colonia 5.....55

Figura 11. Productos de PCR convencional para el escaneo de 20 colonias de la placa con *E. coli* JM109 transformada con el plásmido de expresión *PirA-pET-28b(+)* en una electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 min a 90 V. Carril 1 y 17: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 16 y 24: Control

positivo. Carril 2-15 y18-23: Colonias escaneadas en búsqueda del plásmido de interés.....56

Figura 12. Cultivo de las 20 colonias analizadas *E. coli* JM109 transformadas con el vector *PirA*-pET-28b(+), dentro de las cuales se encuentra la colonia 9 que resultó positiva mediante PCR convencional.....58

Figura 13. Extracciones de la colonia 9 *E. coli* JM109 transformada con el vector *PirA*-pET-28b(+), en la electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 min a 90 V. Carril 1: Extracción 1. Carril 2: Extracción 2. Carril 3: Extracción 3. Carril 4: Extracción 4. Carril 5: Marcador de peso molecular Hind III.....59

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Criterios de validez de las relaciones de absorbancias 260/280 y 260/230 para la evaluación de la pureza del ADN mediante la técnica de análisis espectrofotometría	34
Cuadro 2. Iniciadores utilizados en la PCR para determinar y amplificar los genes <i>PirA</i> y <i>Ompk</i> de <i>V. parahaemolyticus</i>	35
Cuadro 3. Tamaño esperado de los fragmentos del plásmido de <i>PirA</i> -pGEM T easy y los vectores pET-28b(+) y pET-32a(+) luego de cortar los mismos con las enzimas de restricción <i>SacI</i> , <i>NdeI</i> y <i>NcoI</i>	38
Cuadro 4. Tamaño esperado de los fragmentos del plásmido pET-32a(+) y pGEM-T easy cuando poseen la secuencia de <i>PirA</i> luego de cortar los mismos con las enzimas de restricción.....	41
Cuadro 5. Datos de la estandarización del protocolo por PCR convencional para determinar y amplificar la secuencia del gen <i>PirA</i> de <i>V. parahaemolyticus</i>	44
Cuadro 6. Datos de la estandarización del protocolo por PCR convencional para determinar y amplificar la secuencia del gen <i>Ompk</i> de <i>V. parahaemolyticus</i>	45
Cuadro 7. Resultados de la secuenciación de ambos genes al compararlos con la base de datos del NCBI.....	47
Cuadro 8. Datos de la estandarización del protocolo de limpieza del producto de PCR convencional en el gel de agarosa para ambas secuencias de interés, según el fabricante y el modificado (variaciones en el volumen de elución y la cantidad de pocillos).....	48
Cuadro 9. Datos de la estandarización del protocolo de ligación del producto de PCR convencional <i>PirA</i> con el plásmido de clonación pGEM-T easy.....	49
Cuadro 10. Resultados de la verificación de la cantidad y calidad del ADN extraído del caldo LB más ampicilina e inoculado con las colonias de las bacterias <i>E. coli</i> JM109	

transformadas con el vector <i>PirA</i> -pGEM-T easy, se realizan dos eluciones por cada extracción.....	51
Cuadro 11. Datos de la estandarización del protocolo de ligación del producto de <i>PirA</i> -pGEM-T easy con los plásmidos de expresión pET-28b(+) y pET-32a(+).....	53
Cuadro 12. Resultados de la secuenciación del gen <i>PirA</i> de la colonia 9 de las bacterias JM109 transformadas con el plásmido <i>PirA</i> -pET-28b(+) comparados con la base de datos del NCBI.....	57
Cuadro 13. Resultados de la verificación de la cantidad y calidad del ADN extraído del caldo LB más kanamicina e inoculado con la colonia 9 de las bacterias <i>E. coli</i> JM109 transformadas con el vector <i>PirA</i> -pET-28b(+).....	58

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AHPND	Enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda
AuNPs	Nanopartículas de oro
CIBCM	Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular
Ct	Ciclo umbral
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfatos
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
kDa	KiloDalton
LB	Luria Bertani
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
OMP	Proteína de membrana externa
<i>Ompk</i>	Proteína de membrana externa k
pb	Pares de bases nitrogenadas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
TDH	Toxina termoestable directa

RESUMEN

La acuicultura provee productos valiosos para la alimentación humana. Sin embargo, la industria camaronera se ha visto impactada por distintas infecciones que afectan el desarrollo de los camarones y por ende el consumo de estos organismos.

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria que ocasiona la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND, por sus siglas en inglés) en los camarones, debido a una toxina binaria (*PirA* y *PirB*) que le confiere la patogenicidad capaz de provocar mortalidades de hasta un 100%.

La búsqueda de nuevas opciones para tratar la AHPND en camarón es fundamental, en vista de que el tratamiento comúnmente utilizado son los antibióticos y la resistencia a estos se genera por su uso prolongado.

La inmunización pasiva proveniente de ADN recombinante se considera una buena alternativa, puesto que se confirmó que la toxina *PirA* es segura para los camarones y podría usarse como un inmunoestimulante para controlar la *V. parahaemolyticus*. También, “la proteína de membrana externa k” (*Ompk* por sus siglas en inglés), al ser un antígeno compartido por al menos tres especies de *Vibrio*, al saber y otorgar protección cruzada entre ellas, podría emplearse en la inmunización pasiva.

La primera etapa consiste en colocar los genes objetivo en un plásmido para convertirlo en un vector de expresión. La segunda etapa consiste en la transformación de bacterias con el plásmido modificado para que sean portadoras del inserto y por consiguiente productoras de la proteína. Esta proteína se formula para obtener antígenos específicos con los que se inocula el animal para generar una respuesta inmune. Los anticuerpos elaborados se extraen para incluirlos en los alimentos que consumen los especímenes de estudio y así inmunizarlos pasivamente.

El objetivo de esta investigación es el construir vectores de expresión a partir de los genes *PirA* y *Ompk* en *Vibrio parahaemolyticus* como primer paso para el control de la necrosis hepatopancreática aguda en camarón (*Litopenaeus vannamei*) en Costa Rica.

A partir de los resultados de esta investigación, se logra estandarizar el protocolo para la amplificación del gen de la proteína *Ompk* mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional. Respecto al gen de la toxina *PirA*, se estandariza también la metodología para crear el vector de expresión y se transforman exitosamente las bacterias *Escherichia coli* JM109 y se confirma la presencia de este gen mediante la amplificación y secuenciación y enzimas de restricción. Estas bacterias se convierten en una cepa productora del plásmido construido, mas no poseen la capacidad de elaborar la toxina *PirA* por la falta de la T7 ARN polimerasa. Sin embargo, al contar con un vector de expresión que contiene la secuencia de interés para producir la proteína *PirA* en células apropiada, dicho vector podría utilizarse como material de partida en futuras investigaciones orientadas al control y diagnóstico de la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas.

Palabras clave: AHPND, plásmido modificado, enzimas de restrcción, transformación bacteriana, PCR

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La acuicultura satisface aproximadamente la mitad de la demanda de mariscos a nivel mundial, lo cual demuestra su gran importancia en la seguridad y nutrición humana (Béné *et al.*, 2015). Específicamente, el *Litopenaeus vannamei* es una de las especies de crustáceos más cultivadas debido a las ventajas que presenta en comparación con otras especies, tales como su alta tasa de crecimiento, mayor resistencia a densidades elevadas de cultivo y mayor tolerancia de temperatura y salinidad (Briggs *et al.*, 2005).

Sin embargo, la actividad acuícola global se ve afectada con una progresión rápida de enfermedades que podría intensificarse por el cambio climático (Mohan, 2015), ya que se ha demostrado que las altas temperaturas reducen la respuesta inmune del camarón y aumenta su sensibilidad a cepas patógenas de las bacterias del género *Vibrio* (Rivera *et al.*, 2018).

Particularmente, la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* ha ocasionado grandes pérdidas económicas en la industria camaronera, debido a que causa la enfermedad de la necrosis aguda del hepatopáncreas (AHPND por sus siglas en inglés) la cual provoca mortalidades de hasta un 100% en los camarones de cultivo (Varela-Mejías *et al.*, 2017). Según Soto-Rodríguez *et al.* (2015), dicha enfermedad provocó mortalidad masiva en la industria del camarón en China (2009), Vietnam (2010), Malasia (2011), Tailandia (2012) y en México (2014).

La capacidad de infección de esta bacteria se asocia con la presencia de un plásmido que contiene una toxina binaria (*PirA* y *PirB*), la cual le confiere su patogenicidad (Xiao *et al.*, 2017). Además *V. parahaemolyticus* posee otra toxina conocida como toxina termoestable directa (TDH por sus siglas en inglés), que tiene

actividad hemolítica sobre una variada gama de eritrocitos y altera el flujo iónico de las células intestinales (Heitmann *et al.*, 2005). Por tanto, esta bacteria genera gastroenteritis en seres humanos asociada al consumo de productos marinos contaminados, crudos o mal cocinados o con una manipulación y almacenamiento inadecuado (Rodríguez-Camacho *et al.*, 2014).

Los antibióticos suponen el tratamiento más utilizado contra enfermedades bacterianas en acuicultura, pero el uso prolongado puede generar resistencia (FAO, 2002). Por lo tanto, la búsqueda de nuevas opciones para tratar la AHPND en camarón blanco es fundamental para evitar pérdidas grandes de producto y dinero, tales como el uso de nanopartículas, probióticos, anticuerpos desplegados en fagos y productos naturales (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018; Peña-Navarro, 2012; Sotomayor & Balcázar, 2003; Tello-Olea, 2018; Trujillo-García, 2016).

La inmunización pasiva proveniente de ADN recombinante se considera una buena alternativa, pues se confirmó que el efecto patogénico ocurre solamente en presencia de ambas toxinas, lo cual significa que la toxina tipo *PirA* es segura para los camarones y podría usarse como un inmunoestimulante para controlar la *V. parahaemolyticus* (Campa-Córdova *et al.*, 2017). También, la “proteína de membrana externa k” (*Ompk*, por sus siglas en inglés) al ser un antígeno compartido por al menos tres especies de *Vibrio* a saber y otorgar protección cruzada entre ellas, podría emplearse en la inmunización pasiva (Li *et al.*, 2010).

Para la inmunización pasiva, en primer lugar, los genes objetivo se colocan en el plásmido mediante técnicas estándar; en segundo lugar, se secuencian para verificar la fidelidad (plásmido modificado) (Shroff *et al.*, 1999); en tercer lugar, según los autores ya citados, después se transforman bacterias (por ejemplo, *Escherichia coli*) con el plásmido modificado para convertirlas en portadoras del inserto; en cuarto lugar, se comprueba su aceptación si expresan la proteína de interés; en quinto lugar, dichas bacterias se reproducen para producir grandes cantidades del vector y por consiguiente de la proteína, a la cual se le controla la calidad y se formula para la administración en organismos (Shroff *et al.*, 1999); en

sexto lugar, se inocula el animal con antígenos específicos que inducen respuesta inmune al producir una gran cantidad de anticuerpos, en sétimo y último lugar, dichos anticuerpos se extraen y purifican para incluirlos en los alimentos que consumen los especímenes de estudio para inmunizarlos pasivamente (Romero *et al.*, 2014).

Debido a la necesidad de contar con diferentes alternativas para el control de infecciones en el cultivo de camarón (*Litopenaeus vannamei*) en Costa Rica, el objetivo de esta investigación es el construir vectores de expresión a partir de los genes *PirA* y *Ompk* en *Vibrio parahaemolyticus* como primer paso para el control de la necrosis hepatopancreática aguda en camarón (*Litopenaeus vannamei*) en Costa Rica.

1.2. ANTECEDENTES

En China, se mostró que la *Ompk* era un candidato eficaz como vacuna contra la infección por *V. alginolyticus*, puesto que el análisis de alineación indicó que la *Ompk* estaba altamente conservada; es decir, podría servir como antígeno de superficie (Qian, *et al.*, 2008a). Según Qian *et al.* (2008b), al momento de probar la eficiencia de la *Ompk* se observó que el grupo vacunado de corvina amarilla grande infectada (*Pseudosciaena crocea*) tuvo una tasa de supervivencia significativamente mayor que el grupo no vacunado.

También en China, Ningqiu *et al.* (2008) clonaron y expresaron el gen *Ompk* de *V. harveyi* para investigar si tiene un efecto antigénico protector en mero manchado de naranja (*Epinephelus coioides*). Los resultados indicaron que la *Ompk* debe considerarse como un candidato para el desarrollo de la vacuna contra la infección por *V. harveyi* en *E. coioides*, ya que la mortalidad del grupo vacunado

con *Ompk* (0/30) fue significativamente menor que el grupo control (24/30) (Ningqiu *et al.*, 2008).

Por su parte, Li *et al.*, (2010) estudiaron el poliformismo de la *Ompk* mediante la clonación y evaluación del efecto antigénico en esta misma especie con los genes *Ompk* de diecinueve *Vibrio*cepas en comparación con la cepa EcGs020802 de *V. harveyi* que se empleó en el trabajo previo de Ningqiu *et al.*, (2008). Los resultados mostraron que la *Ompk* era un antígeno compartido entre las tres especies de *Vibrio* probadas (*V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*) y que tiene todos los atributos protectores para ser una posible vacuna común contra la vibriosis (Li *et al.*, 2010).

En cuanto a la toxina *PirA*, se caracteriza porque tiene un tamaño de 13 kDa y una similitud entre 28-35% con las proteínas *PirA* encontradas en bacterias de especies tan diversas como *Photobacterium luminescens*, *P. asymbiotica*, *Xenorhabdus doucetiae* y *Yersinia intermedia* (Han, Tang, Tran, *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2015).

Existen reportes que indican que la toxina *PirA* de *V. parahaemolyticus* puede ser utilizada, al igual que la proteína *Ompk*, como inmunoestimulante. Para ello, Campa-Córdova *et al.* (2017) realizaron un estudio en México que comprendió los siguientes grupos experimentales con *L. vannamei*: (i) control no infectado (solo agua de mar), (ii) administración similar a *PirA* por inmersión + desafío de infección por *V. parahaemolyticus* y (iii) control infectado por *V. parahaemolyticus*. Los resultados señalaron que el control no infectado y los grupos tratados con *PirA* obtuvieron una mortalidad promedio de 1,66%, mientras que el grupo no tratado con *PirA* pero desafiado con *V. parahaemolyticus* tuvo una tasa de mortalidad del 48,33%.

Asimismo, Nakamura *et al.*, (2019) descubrieron que los anticuerpos específicos (IgY) de *PirA* protegieron a los camarones *L. vannamei* mediante inmunización pasiva, mientras que los de *PirB* permitieron que la infección por AHPND provocada por *V. parahaemolyticus* progresara tras 6 días. Las tasas de

supervivencia del primer y segundo desafío, que corresponden a los huevos recolectados tras la primera y segunda inmunización respectivamente, fueron de 86% y 87% para anti-*PirA*-IgY, 14% y 12% para anti-*PirB*-IgY, y 0% para el control-IgY.

De modo que, en el presente trabajo se utilizará el gen de la toxina *PirA* y el gen de la proteína *Ompk*, pero no el gen de la toxina *PirB*.

Por otro lado, en Costa Rica no se registran estudios similares en cuanto a la construcción de vectores de expresión que transporten genes con potencial antigénico contra la AHPND en camarones. No obstante, se registran algunas investigaciones relacionadas al tema de la presencia de *V. parahaemolyticus* en camarones y la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda como se cita a continuación.

Peña-Navarro *et al.* (2020) realizaron una investigación para determinar la presencia de *Vibrio spp.* en camarones de cultivo en quince fincas localizadas en el Golfo de Nicoya y la región Pacífico Central entre enero del 2017 y junio del 2018. Usaron la extracción de ADN del hepatopáncreas y el estómago, en camarones juveniles para su posterior análisis mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y secuenciación (Peña-Navarro *et al.*, 2020). Los mismos autores indican la presencia de los genes de las toxinas *PirA* y *PirB* pertenecientes a la *Vibrio parahaemolyticus* en cinco fincas.

Aunado a ello, Peña-Navarro & Varela-Mejías (2015) realizaron en Costa Rica el análisis histopatológico en *Litopenaeus vannamei* infectado con *V. parahaemolyticus*. Los principales hallazgos a nivel histológico fueron hemocitos melanizados, infiltración hemocítica, melanosis, esferoides tipo A, B y C, mionecrosis coagulativa, fagocitosis, picnosis, entre otras. Estas alteraciones en el tejido, resultan útiles para determinar el estado sanitario de los camarones y en particular el efecto citopático de *V. parahaemolyticus* en infecciones (Peña-Navarro & Varela-Mejías, 2015).

También, se estudió el efecto estimulador de tres extractos esenciales sobre el sistema inmunológico del camarón *L. vannamei*, desafiado con *Vibrio parahaemolyticus*. Estos son manano-oligosacáridos (T1), ajo (T2) y un compuesto de extractos de plantas (T3). Se realizó dos bioensayos con una duración de seis y catorce días, donde se determinó que los parámetros inmunológicos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Sin embargo, los parámetros zootécnicos presentaron diferencias estadísticamente significativas solo para el bioensayo que se extendió por seis días, el efecto estimulador de T2 fue el que presentó mejores resultados. Además, el análisis histológico demostró ser el parámetro más adecuado para medir el efecto inmunoestimulante, donde T1 y T2 mostraron los mejores resultados (Peña-Navarro, 2012).

En conclusión, tanto en Costa Rica como en otros países se han estudiado tratamientos alternativos al uso de antibiótico contra la vibriosis y se confirma la importancia de estos al detectar los genes *PirA* y *PirB* que causan la enfermedad en fincas camaroneras. La toxina *PirA* y la proteína *Ompk* pueden ser candidatos para una inmunización pasiva contra la AHPND, debido a que se ha demostrado el efecto inmunoestimulante de ambos genes contra diferentes especies de *Vibrio* puesto que los datos evidencian una reducción de la mortalidad ocasionada por la infección.

Actualmente, en la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica (UCR) se está trabajando en la identificación molecular de *Vibrio parahaemolyticus* y de sus toxinas *PirA* y *PirB* en camarones *Litopenaeus vannamei* provenientes de fincas de cultivo de la provincia de Guanacaste, mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

El objetivo de la presente investigación es la construcción de vectores de expresión con los genes de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk* en *V. parahaemolyticus*, al ser una parte fundamental para lograr la inmunización pasiva luego de obtener y conocer las secuencias de dichos genes en los cultivos de camarones.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

Construir vectores de expresión a partir de los genes *PirA* y *Ompk* en *Vibrio parahaemolyticus* como primer paso para el control de la necrosis hepatopancreática aguda del camarón (*Litopenaeus vannamei*) en Costa Rica.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Estandarizar la metodología para crear los dos vectores de expresión con los genes de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk* de *Vibrio parahaemolyticus*.
- Transformar la bacteria *Escherichia coli* con los plásmidos construidos para convertirla en una posible cepa productora de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk*.
- Detectar los genes de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk* en bacterias *E. coli* transformadas mediante amplificación y secuenciación para comprobar la presencia de estos genes.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. ACUICULTURA Y CULTIVO DE CAMARÓN BLANCO EN COSTA RICA

Según INCOPECA (2020), la acuicultura en Costa Rica ha adquirido un valor cada vez mayor, tanto por ser una alternativa de producción de proteína de origen acuático como desde el punto de vista empresarial.

Dicha actividad en nuestro país está casi totalmente dominada por el cultivo de peces de agua dulce, específicamente tilapia y trucha (INCOPECA, 2020). La misma institución indica que, en lo referente a cultivos en aguas salobres, es de importancia el cultivo del camarón blanco del género *Litopenaeus* sobre todo en las áreas aledañas al Golfo de Nicoya, Pacífico Central y Sur.

De hecho, se logró posicionar en el mercado europeo los camarones producidos en Costa Rica como un producto orgánico certificado, lo que ha contribuido a un aumento gradual de la producción (Peña-Navarro & Chacón-Guzmán, 2019).

Sin embargo, la presencia de enfermedades, el bajo nivel de tecnificación de los productores, las políticas ambientales, el comercio local y la competencia del producto nacional en el extranjero ocasionó que la producción de camarón nacional disminuyera aproximadamente un 50 % entre 2009 y 2015 (Peña-Navarro & Chacón-Guzmán, 2019; Zamora-Ovares, 2005).

Briggs (2009) señala que en nuestro país se emplea el sistema de cultivo semintensivo; es decir, los estanques tienen un tamaño de 1 a 5 hectáreas (ha) y una profundidad de 1 a 1,2 metros (m) y se utilizan semillas producidas en incubadoras y densidades de siembra entre 10 y 30 post larvas/m².

Además, los rendimientos de la producción varían entre 500 y 2 000 kg/ha/cosecha (Briggs, 2009), según la cantidad de cosechas (una sola cosecha o cosechas parciales), la sobrevivencia, volumen de producción por ciclo, etc (Zamora-Ovares, 2005).

2.2. GENERALIDADES DEL CAMARÓN BLANCO (*Litopenaeus vannamei*)

El *Litopenaeus vannamei* posee un aspecto de color blanco translúcido o amarillento y con la cabeza ligeramente más oscura, posee en el rostro ocho o nueve dientes en el área dorsal y uno o dos en la región inferior (Organización del Sector Pesquero y Acuícola del Istmo Centroamericano. & Sistema de la integración Centroamericana., 2018).

Además, las crías se alimentan de plancton y el adulto se alimenta de materia orgánica en descomposición y pequeños organismos entre los que figuran crustáceos y moluscos (Organización del Sector Pesquero y Acuícola del Istmo Centroamericano. & Sistema de la integración Centroamericana., 2018).

El camarón blanco es nativo de la costa oriental del Océano Pacífico, desde Sonora en México hasta Tumbes en Perú, cuyas aguas posean una temperatura normalmente superior a 20 °C durante todo el año; se encuentra en hábitats marinos tropicales, donde los adultos viven y se reproducen en mar abierto mientras que la poslarva migra a las costas a pasar la etapa juvenil, adolescente y pre adulta en estuarios, lagunas y manglares (Briggs, 2006).

En cuanto a las características reproductivas, el *Litopenaeus vannamei* madura sexualmente entre los seis y siete meses y la hembra produce cerca de 250000 huevos que eclosionan unas 16 horas después de la liberación en aguas

marinas (Organización del Sector Pesquero y Acuícola del Istmo Centroamericano. & Sistema de la Integración Centroamericana., 2018).

2.3. *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y LA AHPND

El género *Vibrio* se considera oportunista, es decir, si las condiciones del camarón no son las óptimas, estas bacterias aprovechan que el sistema inmune del hospedador disminuye (Rubio-Limonta & Silveira-Coffigny, 2012). Además, el género *Vibrio* coexiste normalmente en los animales de cultivo, colonizando principalmente el tracto digestivo, las branquias y la cutícula, pero el proceso infeccioso se presenta cuando las bacterias logran acceder al interior del organismo (Peña-Navarro & Varela-Mejías, 2015).

Específicamente, *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria de hábitat marino que tiene como reservorios: sedimento, partículas suspendidas, plancton, pescados y mariscos (almejas, ostiones, camarón, calamar y cangrejo) (Zamora-Pantoja & Quróz-Santiago, 2005). Además, los mismos autores indican que crece en condiciones de salinidad entre el 3 al 8 %, temperatura entre 10°C – 44°C con una óptima de crecimiento de 35°C – 37°C y el pH varía de 5 a 11 con intervalo óptimo de 7,5 a 8,6.

Esta bacteria fue la primera especie relacionada con la enfermedad AHPND en camarones, dado que es portadora de un plásmido que contiene una toxina binaria que le confiere la patogenicidad (Xiao *et al.*, 2017). Se cree que los genes que codifican las toxinas *PirA* y *PirB* fueron adquiridos posteriormente por el plásmido, pues tienen un peso molecular de 13 y 50 kDa respectivamente y presentan un contenido de CG significativamente menor al presente en el resto del plásmido (Han *et al.*, 2015).

Particularmente, la AHPND se origina cuando la *V. parahaemolyticus* coloniza el estómago de los camarones, lugar desde el cual libera dos toxinas con capacidad proteolítica llamadas *PirA* y *PirB*. Estas toxinas se acumulan y afectan el hepatopáncreas, hecho que genera desprendimientos celulares masivos y agudos, acompañados de necrosis (Varela-Mejías *et al.*, 2017).

Por otro lado, la bacteria *V. parahaemolyticus* es la causante de gastroenteritis en seres humanos asociada al consumo de productos marinos contaminados, crudos o mal cocinados o con una manipulación y almacenamiento inadecuado (Rodríguez-Camacho *et al.*, 2014), debido a la toxina termoestable directa (TDH), la cual tiene actividad hemolítica sobre una variada gama de eritrocitos y altera el flujo iónico de las células intestinales (Heitmann *et al.*, 2005).

La bacteria se manifiesta por la presencia de diarrea acuosa, en ocasiones con sangre, dolor abdominal, náusea, vómito, y en algunos casos fiebre y dolor de cabeza. También, el periodo de incubación es de 12 a 24 horas y la duración de los síntomas de uno a siete días. Además, no se tiene certeza alguna sobre la dosis infectante requerida para provocar un cuadro gastroentérico y en consecuencia los brotes epidémicos tienen frecuencias y características que varían ampliamente según la región (Amarales-Osorio, 2006).

2.4. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS CONTRA LA AHPND

Los crustáceos poseen mecanismos de defensa que los protegen en contra de invasores, pero carecen de inmunoglobulinas propias de la inmunidad adaptativa, por lo que su respuesta inmune está constituida principalmente por la inmunidad innata que consiste básicamente en barreras físicas, la cascada de coagulación, fagocitosis, encapsulación y formación de nódulos (Vazquez *et al.*, 2009).

A causa de las pérdidas económicas que ocasionan las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* asociadas a la AHPND en la industria camaronera, y a causa también del desarrollo de cepas resistentes por el amplio y frecuente uso de antibióticos para el control de microorganismos patógenos (FAO, 2002), se han propuesto algunas soluciones para combatirla.

Una de las estrategias para enfrentar esta enfermedad incluye la administración de inmunoestimulantes. Propiamente, la nanotecnología presenta diversas aplicaciones en este campo, debido a que las nanopartículas tienen un gran potencial por las propiedades derivadas de sus dimensiones, que incluyen la capacidad de activar componentes del sistema inmune (Tello-Olea, 2018).

En México se evaluó la capacidad inmunoestimulante e inmunoprotectora de nanopartículas de oro (AuNPs) administradas oralmente en camarón frente a una infección experimental con *V. parahaemolyticus*. Se observó una inmunoestimulación temprana y segura a nivel sistémico y una supervivencia del 80% en los organismos retados con *V. parahaemolyticus*- AHPND (Tello-Olea, 2018).

También en México, se transformó la cepa *E. coli* BL21 para expresar y purificar las toxinas recombinantes *PirA* y *PirB*, las cuales sirvieron como blanco para seleccionar fragmentos de anticuerpos que se unen a la toxina mediante la técnica de despliegue de fagos (Trujillo-García, 2016). Luego, el mismo autor indica que la mortalidad en camarones, retados con *V. parahaemolyticus*, disminuyó 25% a las 24h y 56% a las 48h al emplear los fagos-scFv anti-*PirA* y anti-*PirB*, que se eligieron mediante dos rondas de bioselección evaluadas según el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés). Es decir, se reduce la mortalidad en el camarón porque los anticuerpos desplegados en fagos reconocen y neutralizan específicamente a *PirA* y *PirB*.

Otra estrategia de control bacteriológico con resultados prometedores se enfoca al empleo de bacterias probióticas. Estas bacterias probióticas ocupan espacios y demandan nutrientes del agua y del fondo del estanque, así como

directamente del tracto digestivo de los camarones; ello reduce las posibilidades de colonización y desarrollo de otros microorganismos que sean patógenos o puedan convertirse en nocivos (Sotomayor & Balcázar, 2003).

En Ecuador, se estudió diferentes mezclas de cepas probióticas, las cuales son Ili (*Vibrio alginolyticus*), P62 y P63 (*Vibrio sp.*) y P64 (*Bacillus sp.*), al someterlas a una prueba de inhibición in vitro con *vibrios* patógenos (*Vibrio harveyi* E22, *V. vulnificus* S2 y *V. parahaemolyticus* PA2) para demostrar su efecto antagónico. Los resultados mostraron que las mezclas P63-Ili, P62-P64 y P62-P63-Ili presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50%, es decir, tienen potencial aplicación para el control de *vibrios* patógenos en los sistemas acuícolas (Sotomayor & Balcázar, 2003).

A pesar de que la utilización de probióticos es una alternativa prometedora, Noor-Uddin *et al.* (2015) estudió las propiedades de resistencia a los antimicrobianos de las bacterias probióticas mediante la evaluación de siete probióticos usados en el cultivo de camarones vietnamitas por su contenido de especies bacterianas, resistencia antimicrobiana fenotípica y genes de resistencia transferibles asociados.

Los resultados mostraron que solo 6/60 aislamientos fueron resistentes a más de cuatro antimicrobianos y la secuenciación del genoma completo mostró que contenían cuatro genes de resistencia, pero no se conocen estructuras asociadas con la transferencia horizontal de genes. Es decir, las cepas bacterianas probióticas parecen contribuir con tipos y cantidades muy limitadas de genes de resistencia en comparación con las especies bacterianas naturales en los ambientes acuícolas (Noor-Uddin *et al.*, 2015).

2.4.1. Generalidades de la inmunización pasiva

La inmunización pasiva se produce cuando se introducen, en un individuo que no ha estado previamente en contacto con el patógeno, los anticuerpos específicos obtenidos de un donante previamente infectado o inmunizado para conferir resistencia frente a la enfermedad (Instituto de Acuicultura Torre de la Sal, 2020).

Una de las formas de inmunización pasiva es el realizar una vacuna de ADN recombinante con la que se inmunice al donante. La vacuna usa porciones del genoma de un patógeno que se clonan, expresan y purifican a partir de bacterias, levaduras o células de mamífero, las cuales codifican antígenos estructurales implicados en la inducción de una respuesta inmune protectora (Zanetti *et al.*, 1987).

Según Singh & Srivastava (2011), algunas ventajas de este tipo de vacunas es que permiten la fabricación de grandes cantidades y con alta pureza de la proteína objetivo, a un costo menor, con mayor estabilidad durante el almacenamiento, y de fácil administración. Las mismas poseen un entorno biológico relativamente seguro en comparación con la purificación de las mismas proteínas del propio patógeno, sea atenuado o muerto, pues no producen la enfermedad y los efectos secundarios generados por la vacunación son mínimos (Singh & Srivastava, 2011).

Los pasos para producir vacunas recombinantes son: selección de proteínas inmunogénicas, construcción de vectores de expresión, transformación bacteriana y verificación de la transformación (Lara, 2011). El mismo autor indica que para la producción de proteínas recombinantes es necesario insertar en un vector de expresión la información genética de la proteína que se quiere producir, seleccionar la cepa que va a producir la proteína de interés y escoger el cultivo adecuado para alcanzar altas densidades de la cepa seleccionada con el propósito de lograr una alta producción de la proteína de interés, y purificar la proteína recombinante.

Los plásmidos son ADN extracromosómico de replicación autónoma que se encuentra en la naturaleza, principalmente en bacterias, y portan genes accesorios más que indispensables (José. Rodríguez, 2011; Shroff *et al.*, 1999).

De acuerdo con el uso, los plásmidos se pueden clasificar en vectores de clonación, cuya finalidad es el almacenamiento de secuencias y la obtención de grandes cantidades del ADN insertado o de la molécula recombinante, o en vectores de expresión, su objetivo es producir un transcrito (ARN) o la proteína producto de ese ARN (Sandoval *et al.*, 2013).

Por ello, los genes objetivos pueden colocarse en sitios de clonación en el esqueleto del plásmido mediante técnicas estándar, secuenciarse para verificar la fidelidad y expresarse para demostrar la aceptación de la proteína del inserto del gen. Una vez que se obtienen niveles satisfactorios de expresión, se pueden producir grandes cantidades de plásmido, controlar la calidad, formular y administrar en animales de experimentación (Shroff *et al.*, 1999).

Entre los animales de experimentación se encuentran las gallinas, pues al inocularlas con antígenos específicos se induce una respuesta inmune que produce una gran cantidad de anticuerpos que se transfieren a la yema del huevo, que a su vez se extrae y se purifica mediante diferentes técnicas para administrarlos directamente al animal o incluirlos en los alimentos (Romero *et al.*, 2014).

Los anticuerpos de yema de huevo de gallina suponen la ventaja de ser un método rentable, de alto rendimiento y conveniente. Por tanto, se pueden emplear para prevenir y controlar enfermedades (Carlander *et al.*, 2000).

2.4.2. Tecnologías utilizadas para la construcción de proteínas recombinantes

2.4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Los análisis moleculares y genéticos necesitan gran cantidad de ADN, por consiguiente, la amplificación de segmentos de este mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es fundamental, puesto que se trata de una técnica rápida y económica que calienta la muestra para la desnaturalización del ADN, es decir, para que la doble cadena de ADN se separe en dos segmentos de una sola hebra (National Human Genome Research Institute, 2019).

Luego, una enzima llamada *polimerasa Taq* sintetiza dos nuevas hebras de ADN utilizando las hebras originales como plantillas en presencia de altas concentraciones de oligonucleótidos y cloruro de magnesio a temperaturas menores a las iniciales, o sea, este proceso resulta en la duplicación del ADN original, donde cada una de las nuevas moléculas contiene una hebra vieja y una hebra nueva de ADN (Gonzalez *et al.*, 2014; National Human Genome Research Institute, 2019).

El ciclo anterior se repite de 25 a 35 veces de forma automática gracias al termociclador, el cual es un equipo que aplica el efecto *peltier*, que consiste en invertir la corriente eléctrica para calentar y enfriar los tubos de reacción a la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción (Romero *et al.*, 2010).

Por otro lado, gran parte del éxito de la PCR se debe al aporte en la simplificación al identificar y clonar ADN (Pedrosa, 1999; Rodríguez-Lázaro & Hernández, 2006).

. De hecho, sus ventajas son la alta especificidad y sensibilidad, mientras que las limitaciones incluyen el agotamiento de los reactivos, el tiempo de ejecución de

los programas y los resultados falsos positivos debido a materiales contaminados (Garrote & Días, 2020).

La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa o en tiempo real (qPCR por sus siglas en inglés) viene a solventar algunas deficiencias de métodos convencionales, al emplear la especificidad y sensibilidad de la PCR combinada con la detección directa y simultánea del producto, dado que la señal de fluorescencia se amplifica proporcionalmente al ADN replicado, es decir, la concentración de ADN es evaluada en tiempo real (Garrote & Días, 2020; Shipley, 2007).

Según Solano-Luna *et al.* (2018), los protocolos más usados por qPCR utilizan dos diferentes métodos de detección: 1. Fluoróforos específicos de ADN bicatenario, como el fluorocromo SYBR Green que se intercala entre las dos bandas de ADN. 2. Sondas fluorescentes específicas de la secuencia como la sonda TaqMan®, que lleva un fluoróforo ligado a su extremo 5' y a un apagador en su extremo 3', de modo que la fluorescencia de la sonda hibridada es apagada en razón de la proximidad de los dos fluoróforos, pero es detectada después de que la ADN polimerasa se desplaza e hidroliza la sonda.

Las sondas fluorescentes dan mayor seguridad de alcanzar la especificidad, sin embargo, el emplear el SYBR Green ofrece también una buena precisión. Además, el utilizar dicho fluorocromo presenta la ventaja de que el diseño o ajuste de los ensayos es directo y los costos de materiales son bajos (Rodríguez & Rodríguez, 2006).

Por otro lado, las curvas Melting o curvas de disociación se realiza en los productos amplificados para asegurar la especificidad de la qPCR, pues al fijar distintas temperaturas a los amplicones se obtiene una gráfica de la cinética de disociación donde se determina la temperatura Melting, que es la temperatura en la cual el 50% de la molécula de ADN está desnaturalizada y varía según la composición y el tamaño de la molécula. Es decir, resulta característica para cada secuencia (Mercado-Michel & Vasquez-Michel, 2018).

Además, el ciclo umbral (Ct) es el punto en el cual la fluorescencia de la reacción sobrepasa la fluorescencia basal, o sea, es el punto donde la reacción de amplificación da comienzo (De Alba-Aguayo & Rueda, 2013). Dichos autores indican que el Ct es un valor definido de forma arbitraria por el usuario, aunque es posible definirlo de forma matemática obteniendo el valor máximo de la segunda derivada de la curva de amplificación.

2.4.2.2. Enzimas de restricción y ligación

Las enzimas de restricción son proteínas que cortan ambas hebras de ADN en forma específica: cada enzima reconoce una secuencia particular del ADN denominada sitio de restricción (Juri-Ayub *et al.*, 2019).

Dependiendo de las propiedades enzimológicas, se pueden distinguir diferentes tipos. Las endonucleasas de restricción de tipo II son homodímeros que reconocen secuencias palindrómicas cortas de 4-8 pb de longitud, que en presencia de Mg^{2+} , escinden el ADN dentro o junto al sitio de reconocimiento (Chies *et al.*, 2006).

Específicamente, la *BamHI* (*Bacillus amyloliquefaciens H*) es una endonucleasa de restricción de tipo II que escinde la secuencia de ADN dúplex 5'-GGATCC-3' entre residuos de guanina adyacentes en ambas hebras para generar una extensión 5' de 4 nucleótidos (Jack *et al.*, 1991). Además, *HindIII* (*Haemophilus influenzae*) es una endonucleasa de restricción de tipo II que reconoce y escinde la secuencia palindrómica 5'-AAGCTT-3' en presencia de Mg^{2+} (Tang *et al.*, 2000).

Particularmente, *NcoI* (*Rhodococcus ruber*) es una endonucleasa que reconoce y escinde la secuencia 5'-CCATGG-3' (Vazques *et al.*, 1996). Mientras que la *NdeI* (*Neisseria denitrificans*) es una endonucleasa que reconoce y escinde la secuencia 5'-CATATG-3' (Watson *et al.*, 1982). Asimismo, *SacI* (*Streptomyces*

achromogenes) es una endonucleasa de tipo II que reconoce y escinde la secuencia 5'-GAGCTC-3' (Chies *et al.*, 2006).

Luego de que las enzimas de restricción cortaron tanto el vector como el ADN diana, se obtendrán extremos cohesivos o pegajosos que son complementarios, que permiten la unión de los dos fragmentos mediante el restablecimiento de enlaces covalentes entre el vector y el ADN diana con enzimas de ligación (Avila *et al.*, 1995).

2.4.2.3. Transformación

La transformación es el proceso por el cual ciertas bacterias llamadas competentes, son capaces de incorporar ADN exógeno que está libre en el medio proveniente de otras bacterias (Betancor *et al.*, 2008).

En el caso del ADN recombinante, la transformación es el fenómeno por el cual las células bacterianas incorporan ADN al introducir un plásmido que posee el mismo, mediante un choque térmico u otro método (Avila *et al.*, 1995).

El vector de expresión incluye un gen de resistencia a un antibiótico junto con el gen que se quiere transferir (López-López, 2011), de modo que, sólo aquellas bacterias que contengan el plásmido formarán colonias en las placas de agar adicionadas con el antibiótico adecuado (Avila *et al.*, 1995).

La *E.coli* es el huésped bacteriano más utilizado para la expresión de proteínas recombinante, debido varias ventajas como su conocida información genética, el rápido crecimiento de las células, las altas tasas de producción de proteínas, el fácil manejo de las mismas en laboratorios estándar y los medios de cultivo son relativamente económicos (Singh & Srivastava, 2011)

3. MARCO METODOLÓGICO

- 3.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA CREAR LOS DOS VECTORES DE EXPRESIÓN CON LOS GENES DE LA TOXINA *PIRA* Y LA PROTEÍNA *OMPK* DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*.

3.1.1. Fuente de ADN

El ADN utilizado en esta investigación fue aislado de colonias crecidas en una placa con medio de cultivo TCBS (tiosulfato, citrato, bilis, sacarosa) donada por la Universidad Técnica Nacional (UTN), sede de Guanacaste. Las bacterias cultivadas en esta placa fueron aisladas de macerados de camarones moribundos con signos clínicos característicos de la AHPND y recolectados de una finca camaronera ubicada en Guanacaste. El ADN de las colonias se extrajo mediante el kit de extracción QIAmp UCP DNA Micro Kit de Qiagen (56204) y fueron identificadas como *V. parahaemolyticus* mediante PCR y secuenciación.

La cantidad y calidad del ADN se verificó a través de la medición de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de microvolumen *Nanodrop one* y mediante fluorescencia con el fluorímetro *Qubit® 4* de *Thermo Fisher Scientific-Invitrogen*; los criterios de validez se muestran en el Cuadro 1. La integridad fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa, se consideraron muestras íntegras aquellas que presentaron una banda estrecha.

Cuadro 1. Criterios de validez de las relaciones de absorbancias 260/280 y 260/230 para la evaluación de la pureza del ADN mediante la técnica de análisis espectrofotometría.

Relación de absorbancia	Criterios de validez	
	Valor	Pureza
260/280	>2,1	ADN contaminado con ARN
	1,8 - 2,1	Pureza óptima
	1,6 - 1,7	Pureza aceptable
	<1,6	ADN contaminado con compuestos aromáticos
260/230	2 - 2,2	Pureza óptima
	>1,8	Pureza aceptable
	<1,8	ADN contaminado con proteína, sales, fenol, hidratos de carbono.
	<1,5	ADN altamente contaminado con proteína, sales, fenol, hidratos de carbono.

Fuente: Banco Nacional de ADN Carlos III (2020).

Lo anterior fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica por otros investigadores; es decir, la fuente de ADN se encontraba preparada para su uso en la presente investigación.

Con la fuente de ADN preparada, se dispuso a realizar copias de las secuencias de los genes de interés *PirA* y *Ompk* a través de la PCR. Una vez se contó con suficientes copias de los genes, se procedió a la creación de los plásmidos de expresión recombinantes y la transformación de la bacteria *E. coli*.

3.1.2. Amplificación de los genes de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk* de *Vibrio parahaemolyticus*.

Se estandarizó el protocolo de PCR convencional tanto para el gen de la toxina *PirA* como para el gen de la proteína *Ompk*.

Los iniciadores utilizados para los dos protocolos de amplificación (*PirA* y *Ompk*) se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Iniciadores utilizados en la PCR para determinar y amplificar los genes *PirA* y *Ompk* de *V. parahaemolyticus*.

Gen	Iniciador	Secuencia del iniciador (5' a 3')	Longitud del fragmento a amplificar (pb)	Fuente
<i>PirA</i>	<i>PirA</i> -Forward	ATGAGTAACAATATAAA ACATGAAAC	333	Sirikharin <i>et al.</i> (2015)
	<i>PirA</i> -Reverse	GTGGTAATAGATTGTA CAGAA		
<i>Ompk</i>	<i>Ompk</i> -Forward	CGGGATCCGCAGATTA CTCTGACGGCGATAT	776	Mao <i>et al.</i> (2007)
	<i>Ompk</i> -Reverse	CCCAAGCTTTTAGAAC TTGTAAGTTACTGCGA		

3.1.3. Electroforesis en gel de agarosa, limpieza y secuenciación de los genes de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk*.

Los productos de PCR de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk* se corrieron en geles de agarosa al 2% para confirmar su tamaño mediante el marcador O'GeneRuler 100pb ADN Ladder (Thermo Scientific) y se utilizó el GelRed® Nucleic Acid (Biotium) como colorante fluorescente.

Seguidamente las muestras amplificadas se enviaron a secuenciar al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM). Las secuencias de las muestras se alinearon con el programa *Bio Edit Sequence Alligment Editor*®2.2.28 y se compararon mediante el algoritmo BLASTn® 2.2.28 con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Después de la confirmación de las dos secuencias de interés mediante PCR y secuenciación, se realizó la limpieza de ambos genes en un gel de agarosa al 0.7%, mediante el kit *Wizard*® SV Gel and PCR Clean-Up System (A9281).

3.1.4. Digestión y ligación de los genes de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk* en vectores plasmídicos de clonación y expresión.

El producto de amplificación limpio del gen de la toxina *PirA* se ligó al vector de clonación pGEM-T easy (PROMEGA) y se transformó la bacteria *E. coli* JM109, de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante.

Se consideraron colonias positivas aquellas que crecieron en placas de agar LB (Sigma Aldrich) con ampicilina, IPTG y X-Gal, y que presentaban un color blanco. Estas colonias que resultaron positivas se cultivaron en caldo Luria Bertani (LB) (NEOGEN) con el antibiótico ampicilina y se incubaron a 37°C a 250 rpm por una noche, con el objetivo de extraer luego el ADN plasmídico utilizando el método descrito en el kit de extracción *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (K0502). Cabe mencionar que se llevaron a cabo dos eluciones por cada extracción de ADN.

Además, se realizó un control negativo y un control positivo siguiendo el mismo protocolo que el cultivo del vector de interés, excepto que en el primero no se le agregó ningún inserto y en el segundo se añadió un fragmento de 542 pb del vector pGEM®-luc como inserto.

Se verificó la cantidad y calidad del ADN a través de la medición de absorbancia a 260 nm en un *Nanodrop one* y mediante fluorescencia con el

fluorímetro *Qubit® 4* de *Thermo Fisher Scientific-Invitrogen*; los criterios de validez se pueden ver en el Cuadro 1. Además, las muestras se corrieron en geles de agarosa para confirmar su integridad.

El ADN del plásmido se utilizó para verificar la inserción de la secuencia de *PirA* en el pGEM-T easy mediante el uso de las enzimas de restricción *NdeI* y *NcoI*. Es importante indicar que todas las enzimas de restricción utilizadas corresponden a la marca Promega y que se siguió el protocolo del fabricante para su uso.

Una vez se corroboró el inserto de *PirA* en el plásmido de clonación pGEM-T easy (*PirA*-pGEM-T easy), éste fue digerido con las enzimas de restricción *SacI* y *NdeI*. Seguidamente el vector de expresión pET-32a(+) (Novagen) fue digerido con las mismas enzimas de restricción y desfosforilado con la enzima fosfatasa alcalina siguiendo el protocolo descrito por el fabricante del vector.

El producto de ambas digestiones fue ligado con el kit LigaFast™ Rapid DNA Ligation System de Promega. El resultado de esta ligación no fue exitoso, por tanto, se repitió pero se utilizó el plásmido pET-28b(+) (Novagen) en lugar del pET-32a(+), y se desfosforiló el *PirA*-pGEM-T easy en vez del pET-28b(+).

El producto limpio de amplificación de la proteína *OmpK* no fue posible digerirlo con *BamHI* y *HindIII* ni tampoco ligarlo al vector pET-30a(+) (Novagen), debido a que la concentración del producto amplificado luego del proceso de limpieza fue muy baja para poder realizar la digestión con las enzimas y no se contaba con más muestra para repetir el proceso de amplificación. Por las limitaciones expuestas, no fue posible continuar con lo planteado para el gen *OmpK*.

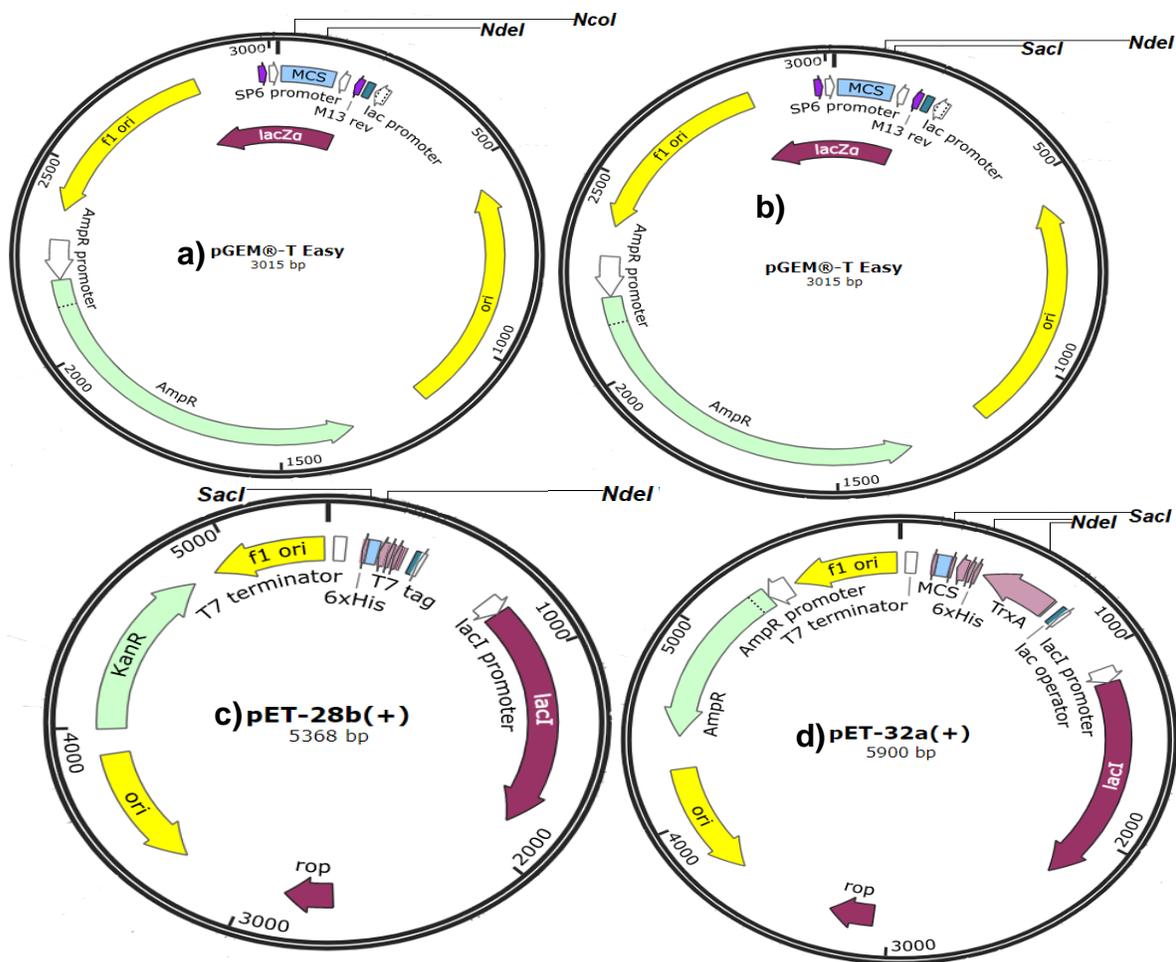
En la Figura 1 se pueden observar los sitios de restricción y en el Cuadro 3 se pueden ver los tamaños esperados de los fragmentos luego de cortar con las enzimas de restricción *NdeI*, *NcoI* y *SacI* el plásmido de *PirA*-pGEM-T easy y los vectores pET-28b(+) y pET-32a(+).

Cuadro 3. Tamaño esperado de los fragmentos del plásmido de *PirA*-pGEM T easy y los vectores pET-28b(+) y pET-32a(+) luego de cortar los mismos con las enzimas de restricción *SacI*, *NdeI* y *NcoI*.

Plásmido	Enzimas de restricción	Número de fragmentos	Tamaño de los fragmentos (pb)
<i>PirA</i> insertado en el vector pGEM-T easy	<i>NdeI</i> y <i>NcoI</i>	2	392*
			2956
pET-28b(+)	<i>SacI</i> y <i>NdeI</i>	2	12
			3336*
pET-32a(+)	<i>SacI</i> y <i>NdeI</i>	2	47
			5321*
pET-32a(+)	<i>SacI</i> y <i>NdeI</i>	3	156
			345
			5399*

*Contiene el fragmento de interés.

Figura 1. Sitios de restricción de las enzimas *SacI*, *NdeI* y *NcoI* del plásmido de *PirA*-pGEM T easy y los vectores pET-28b(+) y pET-32a(+). a) pGEM-T easy con los sitios de restricción de *NcoI* y *NdeI*. b) pGEM-T easy con los sitios de restricción *SacI* y *NdeI*. c) pET-28b(+) con los sitios de restricción *SacI* y *NdeI*. d) pET-32a(+) con los sitios de restricción *SacI* y *NdeI*. Modificado de Dotmatics (s/f).



3.2. TRANSFORMACIÓN DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI* CON EL PLÁSMIDO PORTADOR DEL GEN DE LA TOXINA *PIRA*.

Cabe señalar que no se logró una transformación efectiva con las células BL21 (células ideales para expresión proteica), razón por la cual se sustituyeron las mismas por las *E. coli* JM109.

Se transformaron las células *E. coli* JM109 con el plásmido de expresión construido, según el protocolo de choque térmico indicado por el fabricante (pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems de Promega). Las células transformadas se cultivaron en agar Luria Bertani (LB) con el antibiótico kanamicina y los cultivos fueron incubados a 37°C por una noche.

3.3. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA TOXINA *PIRA* PARA COMPROBAR SU PRESENCIA

3.3.1. Amplificación y secuenciación del gen de la toxina *PirA* de *Vibrio parahaemolyticus*

Se emplearon los iniciadores diseñados por Han *et al.* (2015) para llevar a cabo una qPCR de las colonias del producto de la transformación de las bacterias JM109 con la ligación fallida entre el producto de digestión del plásmido pET-32a(+) y el *PirA*-pGEM-T-easy.

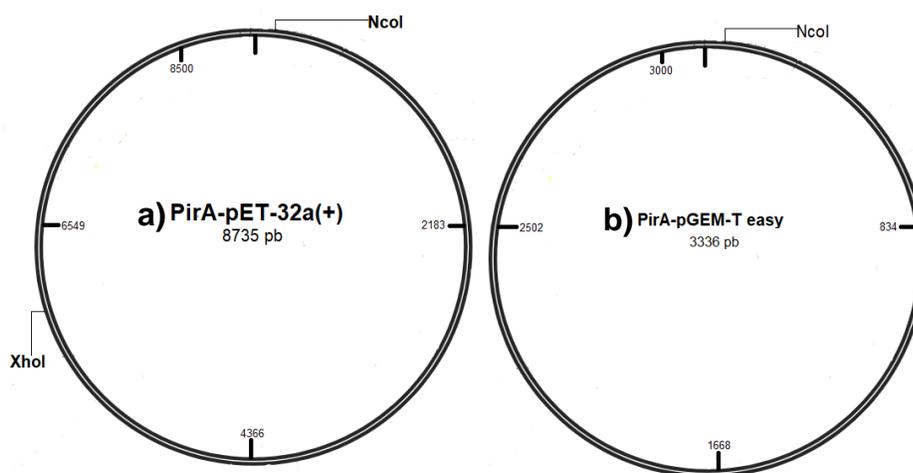
A las colonias positivas en la qPCR se les extrajo el ADN plasmídico con el Kit *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (K0502)* de *Thermo Scientific*. Como ambos plásmidos comparten la resistencia a la ampicilina, se realizó una digestión con las enzimas *XhoI* (no produce corte en el *PirA*- pGEM-T easy sólo en *PirA*-pET-32a(+))

y *NcoI* para verificar que las colonias positivas para la secuencia de *PirA* se encontraban dentro del plásmido de interés (pET-32a(+)) y no dentro del pGEM-T-easy. En la Figura 2 se pueden observar los sitios de restricción y en el Cuadro 4 se pueden ver los tamaños esperados de los fragmentos luego de cortar con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* el plásmido de *PirA*-pGEM-T easy y el vector *PirA*-pET-32a(+).

Cuadro 4. Tamaño esperado de los fragmentos del plásmido pET-32a(+) y pGEM-T easy cuando poseen la secuencia de *PirA* luego de cortar los mismos con las enzimas de restricción.

Vector- <i>PirA</i>	Enzimas de restricción	Número de fragmentos	Tamaño de los fragmentos (pb)
<i>PirA</i> insertado en el vector pGEM-T easy	<i>XhoI</i>	No tiene sitio de restricción	No aplica
	<i>NcoI</i>	1	3336
<i>PirA</i> insertado en el vector pET-32a(+)	<i>XhoI</i> y <i>NcoI</i>	2	2975
			5760

Figura 2. Sitios de restricción de las enzimas *XhoI* y *NcoI* del plásmido de *PirA*-pGEM T easy y el vector *PirA*-pET-32a(+). a) *PirA*-pET-32a(+) con los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*. b) *PirA*-pGEM-T easy con el sitio de restricción de *NcoI*.



Como lo anterior no fue exitoso, se realizó la identificación de las colonias de la bacteria *E. coli* JM109 que poseían el plásmido de expresión de interés alternativo (*PirA*- pET-28b(+)). Se llevó a cabo empleando una PCR de colonia y utilizando el protocolo de amplificación descrito en el punto 3.1.1.

Para llevar a cabo la PCR de colonia se tomó una única colonia de la placa transformada con un asa estéril y se diluyó en 20 µl de agua grado biología molecular libre de nucleasas. De esta dilución se tomó 4 µl para utilizarlos como plantilla para realizar la PCR de colonia, mientras que el volumen restante de cada colonia diluida se utilizó para inocular placas de agar LB más kanamicina. Dichas placas se utilizaron posteriormente como fuente para inocular caldos de cultivo y realizar extracciones de ADN del plásmido de interés.

La colonia amplificada con *PirA* se envió al CIBCM de la Universidad de Costa Rica con el propósito de verificar su fidelidad. La secuencia de la muestra se alineó con el programa *Bio Edit Sequence Alligment Editor*®2.2.28 y se comparó mediante el algoritmo BLASTn® 2.2.28 con la base de datos del NCBI.

3.3.2. Extracción de ADN de bacterias *E. coli* en caldos de cultivo.

La colonia que resultó positiva para el vector *PirA*- pET-28b(+) fue inoculada en caldos LB más kanamicina, los cuales se incubaron a 37°C y 250 rpm por una noche para utilizarlos en las extracciones de ADN del plásmido y para guardar stock de glicerol a -80°C y conservarlos a largo plazo.

El ADN del plásmido se extrajo utilizando el método descrito en el kit de extracción *GeneJET Plasmid Miniprep Kit (K0502)*. Se verificó la cantidad y calidad del ADN a través de la medición de absorbancia a 260 nm en un *Nanodrop one* y mediante fluorescencia con el fluorímetro *Qubit*® 4 de *Thermo Fisher Scientific-Invitrogen*. Además, las muestras se corrieron en geles de agarosa para confirmar la presencia del plásmido.

3.3.3. Criopreservación de la bacteria *E.coli* JM109 para el almacenamiento a largo plazo del plásmido de expresión *PirA*-pET-28b(+).

De los tubos con caldo LB y antibiótico kanamicina inoculados con colonias positivas para *PirA*-pET-28b(+), se tomó 920 μ L y se agregaron en tubos con tapón de rosca de 2 mL (crioviales) que contenían 80 μ L de glicerol al 100 %. Los crioviales fueron colocados primero a 4 °C por 3 h, a -20 °C por 24 h y después se congelaron a -80°C para almacenarlos a largo plazo.

4. RESULTADOS

4.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA CREAR LOS DOS VECTORES DE EXPRESIÓN CON LOS GENES DE LA TOXINA *PIRA* Y LA PROTEÍNA *OMPK* DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*.

4.1.1. Amplificación de los genes de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk* de *Vibrio parahaemolyticus*.

El protocolo para la amplificación del gen de la toxina *PirA* mediante PCR convencional se muestra en el Cuadro 5, en el cual se especifican los valores de volumen y concentración requeridos para cada reactivo.

Las condiciones de la PCR para la amplificación de *PirA* fueron las descritas por Sirikharin *et al.* (2015) con la modificación del tiempo de alineación a 40 s y la utilización de 40 ciclos.

Cuadro 5. Datos de la estandarización del protocolo por PCR convencional para determinar y amplificar la secuencia del gen *PirA* de *V. parahaemolyticus*.

Reactivo	Volumen para una reacción (μL)	Concentración final de la reacción de PCR
Dream Taq PCR Master Mix (2 X)	12,5	1,00 X
Primer F (10 ng/ μL)	1,0	0,40 ng/ μL
Primer R (10 ng/ μL)	1,0	0,40 ng/ μL
ADN (95 ng/ μL)	2,0	7,6 ng/ μL
Agua grado biología molecular	8,5	-----

En el Cuadro 6 se presentan los valores de concentración y volumen requeridos para cada reactivo en la PCR convencional para el gen de la proteína *Ompk*.

Respecto a las condiciones de la PCR para la amplificación de *Ompk*, fueron similares a las utilizadas para la amplificación de *PirA* con algunas modificaciones tomadas de Qian *et al.* (2008b) y Qian *et al.* (2008a): 5 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 53°C y 1,5 min a 72°C, y finalmente 10 min a 72°C.

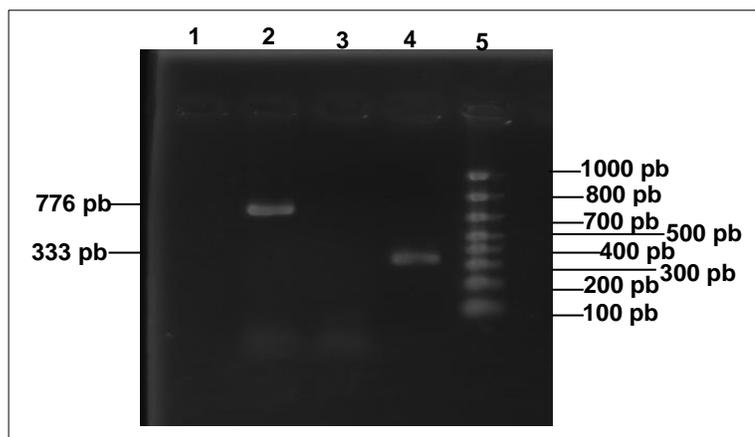
Cuadro 6. Datos de la estandarización del protocolo por PCR convencional para determinar y amplificar la secuencia del gen *Ompk* de *V. parahaemolyticus*.

Reactivo	Volumen para una reacción (µL)	Concentración final de la reacción de PCR
Dream Taq PCR Master Mix (2 X)	12,5	1,00 X
Primer F (10 µM)	1,0	0,40 µM
Primer R (10 µM)	1,0	0,40 µM
ADN (144 ng/µL)	2,0	11,52 ng/µL
Agua grado biología molecular	8,5	-----

4.1.2. Electroforesis en gel de agarosa, limpieza y secuenciación de los genes de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk*.

En la Figura 3 se observan los productos de la PCR convencional de las secuencias de los genes de la toxina *PirA* y la proteína *Ompk* en la electroforesis en gel de agarosa, ambos realizados con los protocolos y condiciones estandarizadas en este estudio.

Figura 3. Productos de PCR convencional para la secuencia del gen de *PirA* y *Ompk* de *V. parahaemolyticus* en la electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 min a 90 V. Carril 1: NTC (control sin plantilla) para *PirA*. Carril 2: producto *Ompk*. Carril 3: NTC para *Ompk*. Carril 4: producto *PirA*. Carril 5: Marcador de peso molecular de 100 pb.



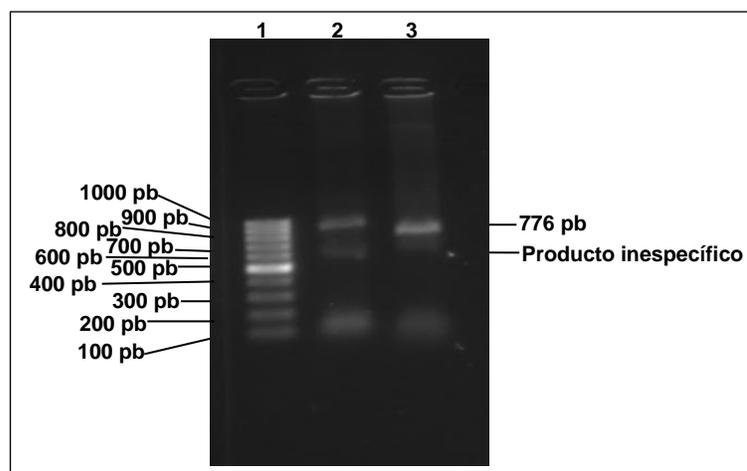
El resultado de la secuenciación de ambos genes al compararlo mediante el algoritmo BLASTn® 2.2.28 con la base de datos del NCBI se detalla en el Cuadro 7, el cual incluye el gen, nombre del alineamiento y número de acceso del GenBank, tamaño del fragmento secuenciado, y el porcentaje de identidad y cobertura.

Cuadro 7. Resultados de la secuenciación de ambos genes al compararlos con la base de datos del NCBI.

Gen	Tamaño del fragmento secuenciado (pb)	Porcentaje (%)		Nombre del alineamiento del GenBank	N° de acceso GenBank
		Identidad	Cobertura		
<i>PirA</i>	279	100	100	Vibrio parahaemolyticus isolate AHPND- <i>PirA</i> -KK-VIET1 <i>PirA(PirA)</i> gene, partial cds	MN48042 7.1
<i>Ompk</i>	702	100	100	Vibrio parahaemolyticus strain 20151116002-3 chromosome I, complete sequence	CP034305 .1

La electroforesis realizada se puede ver en la Figura 4, corresponde a los productos de la PCR convencional del gen de la proteína *Ompk* utilizando como plantilla ADN cromosómico y un producto de PCR de *Ompk* purificado, en el segundo caso se obtuvo un producto inespecífico.

Figura 4. Productos de PCR convencional para el gen de *Ompk* de *V. parahaemolyticus* en electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 min a 90 V. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 2: Producto de PCR de *Ompk* como plantilla. Carril 3: ADN cromosómico como plantilla.



Por otro lado, la concentración obtenida de ADN de ambos genes luego de realizar la purificación se detalla en el Cuadro 8, inicialmente siguiendo el protocolo comercial que indica el fabricante y después con las variaciones en el volumen de elución y la cantidad de pocillos y masa del gel de agarosa empleado, que permitieron aumentar la concentración de ADN de las secuencias de interés.

Cuadro 8. Datos de la estandarización del protocolo de limpieza del producto de PCR convencional en el gel de agarosa para ambas secuencias de interés, según el fabricante y el modificado (variaciones en el volumen de elución y la cantidad de pocillos).

Gen	Protocolo	Número de pocillos del gel de agarosa	Masa del gel de agarosa (mg)	Volumen de elución (μL)	Concentración obtenida (ng/μL)
<i>PirA</i>	Comercial	1	222,4	50	1,55
	Modificado	2	230,9	25	6,83
<i>Ompk</i>	Comercial	1	233,5	50	1,38
	Modificado	3	128,6	25	15,8

4.1.3. Digestión y ligación de los genes de la toxina *PirA* en vectores plasmídicos de clonación y expresión.

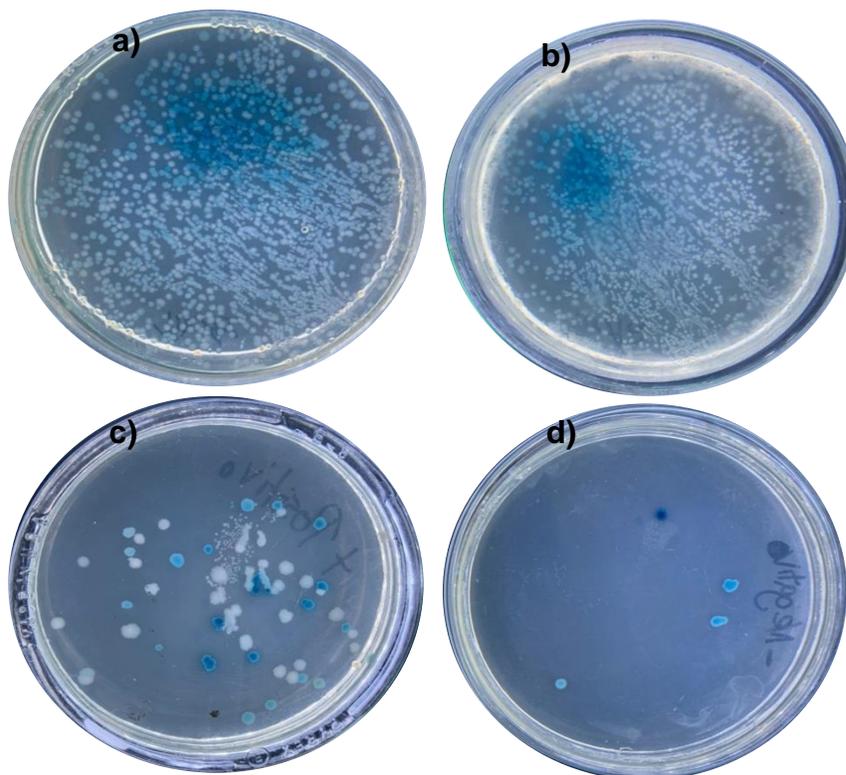
Se logró estandarizar el protocolo de ligación del producto de PCR *PirA* con el vector de clonación pGEM-T easy, los datos se especifican en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Datos de la estandarización del protocolo de ligación del producto de PCR convencional *PirA* con el plásmido de clonación pGEM-T easy.

Relación inserto:vector	3:1
Cantidad de vector (ng)	50

La transformación de las bacterias *E.coli* JM109 para la verificación de la inserción del producto de PCR purificado de la secuencia del gen *PirA* en el plásmido pGEM-T easy fue exitosa como se puede ver la Figura 5.

Figura 5. Resultados de la transformación de las bacterias *E. coli* JM109 con el plásmido *PirA*-pGEM-T easy. a) Cultivo que contiene el plásmido *PirA*-pGEM-T-easy, réplica 1. b) Cultivo que contiene *PirA*-pGEM-T-easy, réplica 2. c) Control positivo (Fragmento de 542 pb del vector pGEM@-luc). d) Control negativo (sin inserto).



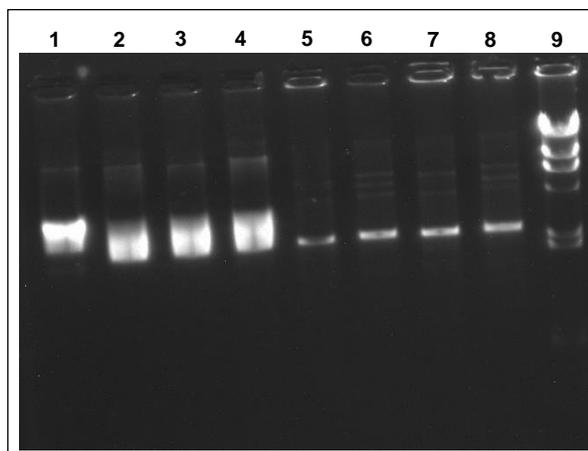
Los resultados del Cuadro 10 corresponden a la verificación de la cantidad y calidad del ADN extraído de caldos de cultivo con colonias JM109 *PirA*-pGEM-T easy, el cual incluye las relaciones de pureza y la concentración medida en fluorímetro y espectrofotómetro.

Cuadro 10. Resultados de la verificación de la cantidad y calidad del ADN extraído del caldo LB más ampicilina e inoculado con las colonias de las bacterias *E. coli* JM109 transformadas con el vector *PirA*-pGEM-T easy, se realizan dos eluciones por cada extracción.

Extracción	Elución	Concentración (ng/ μ L)		Relaciones de pureza (nm)	
		Fluorometría	Espectrofotometría	A260/A280	A260/A230
1	1	58,2	68,5	1,84	2,08
	2	4,94	10,3	1,79	1,72
2	1	70,1	93,5	1,84	2,13
	2	4,56	7,7	1,93	1,55
3	1	55,5	93,4	1,87	2,20
	2	5,72	10,1	1,92	1,88
4	1	62,2	83,6	1,85	2,11
	2	2,61	8,9	1,92	1,56

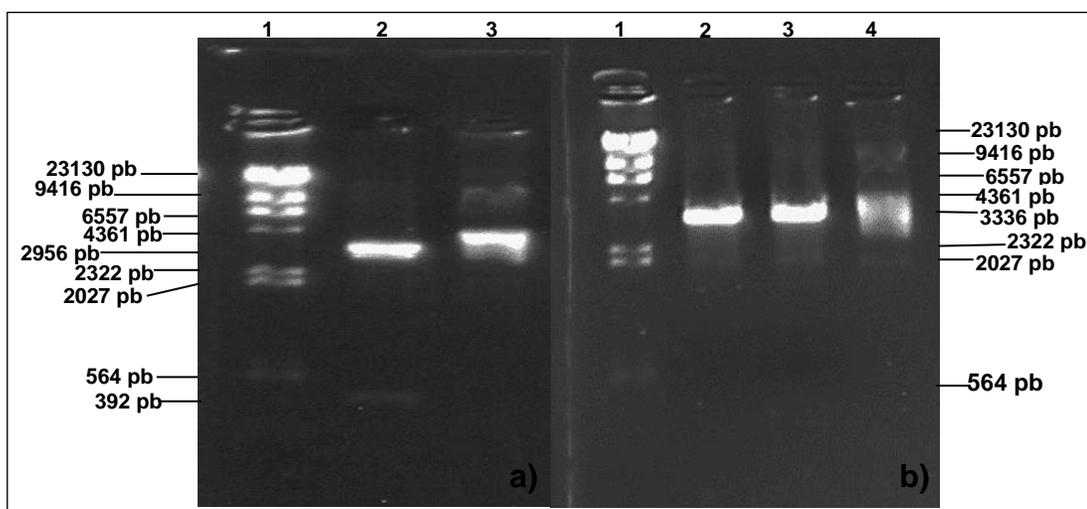
Asimismo, los resultados de la electroforesis en gel de agarosa para confirmar la integridad de las extracciones de las colonias que contienen el plásmido *PirA*-pGEM-T easy, se pueden ver en la Figura 6.

Figura 6. Extracciones de las colonias *E. coli* JM109 transformada con el vector *PirA*-pGEM-T easy que contiene la secuencia de *PirA*, en la electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 min a 90 V. Carril 1: Extracción 1, elución 1. Carril 2: Extracción 2, elución 1. Carril 3: Extracción 3, elución 1. Carril 4: Extracción 4, elución 1. Carril 5: Extracción 1, elución 2. Carril 6: Extracción 2, elución 2. Carril 7: Extracción 3, elución 2. Carril 8: Extracción 4, elución 2. Carril 9: Marcador de peso molecular Hind III.



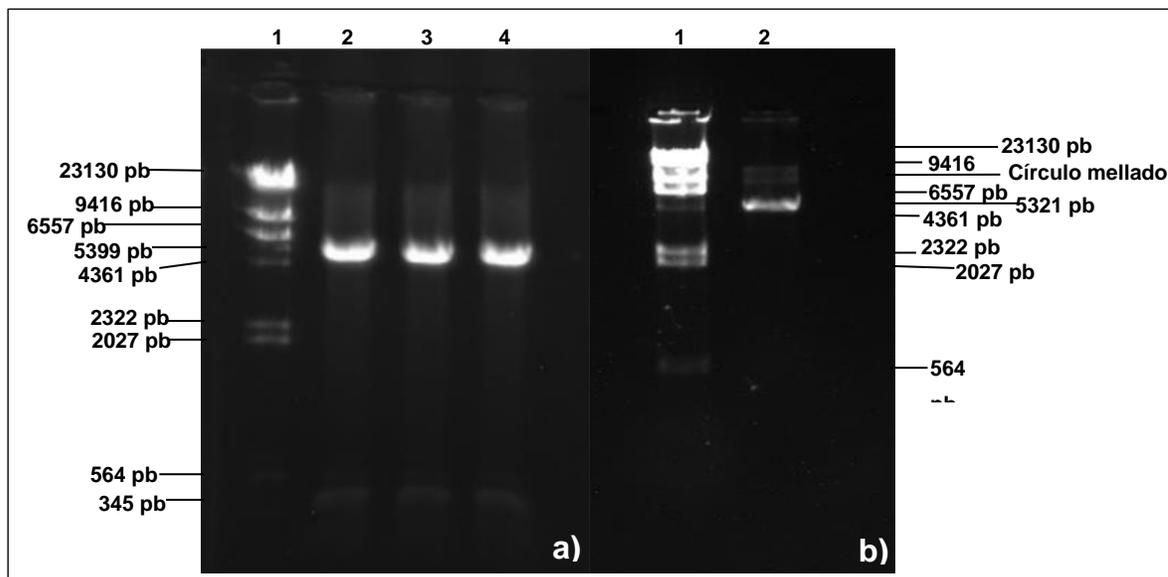
Los resultados de la digestión del plásmido *PirA*-pGEM-T easy con las enzimas de restricción se muestran en la electroforesis en gel de agarosa de la Figura 7, tanto para confirmar la presencia del inserto a) como para confirmar la digestión del vector para su posterior ligación b).

Figura 7. Productos de digestión del vector *PirA*-pGEM-T easy en la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 60 min a 60 V a) Digestión con las enzimas *NcoI* y *NdeI*. Carril 1: Marcador de peso molecular *Hind* III. Carril 2: Producto digerido. Carril 3: Producto sin digerir. b) Digestión con las enzimas *NdeI* y *SacI*. Carril 1: Marcador de peso molecular *Hind* III. Carril 2 y 3: Producto digerido. Carril 4: Producto sin digerir.



Se logró la digestión del vector pET-32a(+) y del vector pET-28b(+) con las enzimas *NdeI* y *SacI* como se puede ver en la Figura 8.

Figura 8. Productos de digestión del vector pET-32a(+) y pET-28b(+) con las enzimas *SacI* y *NdeI* en la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 60 min a 60 V a) pET-32a(+) Carril 1: Marcador de peso molecular Hind III. Carril 2, 3 y 4: Producto digerido. b) pET-28b(+) Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Producto digerido.



Se logró estandarizar el protocolo de ligación de *PirA*-pGEM-t easy con el vector de expresión pET-32a(+) y pET-28b(+), los datos se plasman en el Cuadro 11.

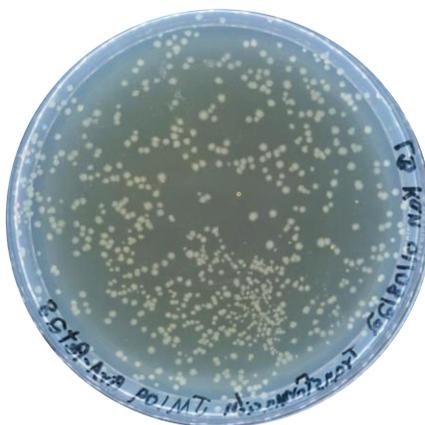
Cuadro 11. Datos de la estandarización del protocolo de ligación del producto de *PirA*-pGEM-T easy con los plásmidos de expresión pET-28b(+) y pET-32a(+).

Relación inserto:vector	3:1
Cantidad de vector (ng)	75

4.2. TRANSFORMACIÓN DE LA BACTERIA *E. COLI* CON EL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN *PIRA*- PET-28B(+)

En la Figura 9 se muestran los resultados de la transformación de las bacterias *E.coli* JM109 con el plásmido *PirA*-pET-28b(+), cuyo medio es agar LB con kanamicina.

Figura 9. Resultados de la transformación de las bacterias *E. coli* JM109 con el plásmido *PirA*-pET-28b(+) en agar LB más kanamicina.



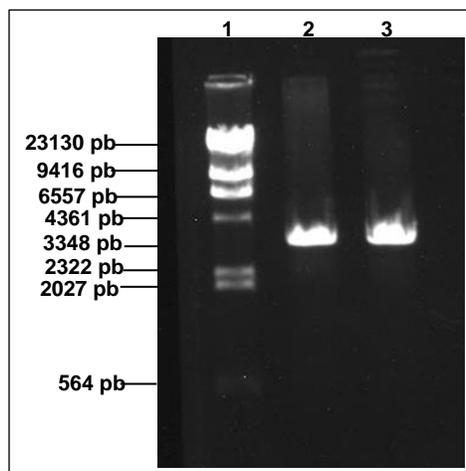
4.3. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA TOXINA *PIRA* PARA COMPROBAR SU PRESENCIA

4.3.1. Amplificación y secuenciación del gen de la toxina *PirA* de *Vibrio parahaemolyticus*.

Los resultados de la digestión con las enzimas *XhoI* y *NcoI* de las colonias 3 y 5 que se creía que poseen el plásmido *PirA*-pET-32a(+) se muestran en la electroforesis en gel de agarosa de la Figura 10. Se logra confirmar que las colonias

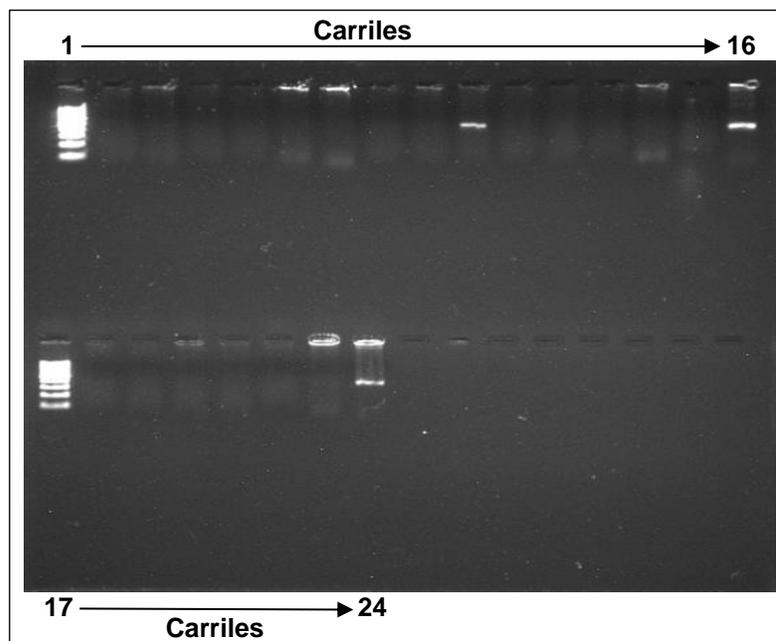
3 y 5 solamente tenían el plásmido pGEM-T easy que contenía la secuencia del gen *PirA*.

Figura 10. Productos de digestión del vector que se creía era pET-32a(+) que contiene la secuencia de *PirA* con las enzimas *XhoI* y *NcoI* en la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% por 60 min a 60 V Carril 1: Marcador de peso molecular *Hind III*. Carril 2: Producto digerido colonia 3. Carril 3: Producto digerido colonia 5.



La electroforesis en gel de agarosa que se puede ver en la Figura 11, corresponde a los productos de la PCR convencional de 20 colonias analizadas de la placa de *E.coli* JM109 transformada con el plásmido de expresión *PirA*-pET-28b(+). Se observa una única colonia positiva (colonia 9). Cabe mencionar que en total se analizaron 50 colonias con PCR convencional para *PirA* de la placa de *E.coli* JM109 transformada con el plásmido de expresión *PirA*-pET-28b(+).

Figura 11. Productos de PCR convencional para el escaneo de 20 colonias de la placa con *E. coli* JM109 transformada con el plásmido de expresión *PirA*-pET-28b(+) en una electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 min a 90 V. Carril 1 y 17: Marcador de peso molecular de 100 pb. Carril 16 y 24: Control positivo. Carril 2-15 y 18-23: Colonias escaneadas en búsqueda del plásmido de interés.



Los resultados de la secuenciación del producto de PCR de la colonia que resultó positiva (colonia 9) para el plásmido de expresión *PirA*-pET-28b(+) (Figura 11) fueron comparados con la base de datos del NCBI, los resultados se detallan en el Cuadro 12 que incluye el gen, nombre del alineamiento y número de acceso del GenBank, tamaño del fragmento secuenciado, y el porcentaje de identidad y cobertura.

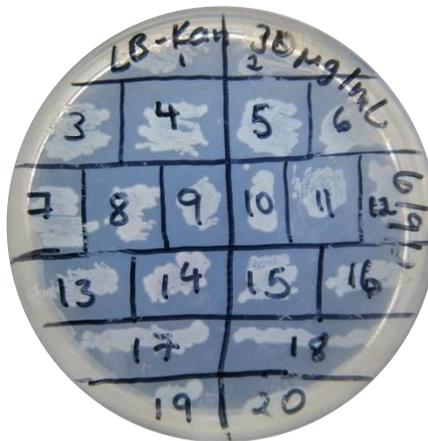
Cuadro 12. Resultados de la secuenciación del gen *PirA* de la colonia 9 de las bacterias JM109 transformadas con el plásmido *PirA*-pET-28b(+) comparados con la base de datos del NCBI.

Gen	Tamaño del fragmento secuenciado (pb)	Porcentaje (%)		Nombre del alineamiento del GenBank	N° de acceso GenBank
		Identidad	Cobertura		
<i>PirA</i>	281	99,63	96	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolate AHPND- <i>PirA</i> -KK-VIET1 <i>PirA(PirA)</i> gene, partial cds	MN48042 7.1

4.3.2. Extracción de ADN de bacterias *E. coli* en caldo de cultivo LB más kanamicina

En la Figura 12 se puede observar el cultivo, en agar LB con kanamicina, de las 20 colonias analizadas, correspondientes a bacterias JM109 transformadas con el plásmido *PirA*-pET-28b(+), dentro de las cuales se encuentra la colonia 9 que resultó positiva para la secuencia del gen *PirA* mediante PCR convencional (Figura 11).

Figura 12. Cultivo de las 20 colonias analizadas *E. coli* JM109 transformadas con el vector *PirA-pET-28b(+)*, dentro de las cuales se encuentra la colonia 9 que resultó positiva mediante PCR convencional.



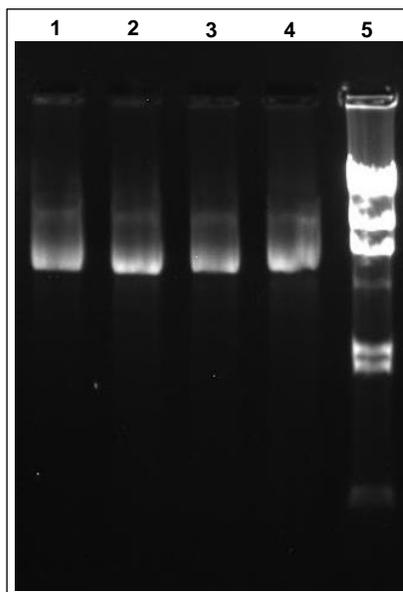
Al ADN extraído del caldo de cultivo con la colonia 9 se le verificó la cantidad y calidad. Los resultados se muestran en el Cuadro 13, donde se incluye las relaciones de pureza y la concentración medida en fluorímetro y espectrofotómetro.

Cuadro 13. Resultados de la verificación de la cantidad y calidad del ADN extraído del caldo LB más kanamicina e inoculado con la colonia 9 de las bacterias *E. coli* JM109 transformadas con el vector *PirA-pET-28b(+)*.

Extracción	Concentración (ng/µL)		Relaciones de pureza (nm)	
	Fluorimetría	Espectrofotometría	A260/A280	A260/A230
1	54,5	79,9	1,81	1,78
2	51,3	99,5	1,78	1,55
3	40,2	61,7	1,81	1,77
4	47,5	94,2	1,81	1,77

Asimismo, los resultados de la electroforesis en gel de agarosa para confirmar la presencia del plásmido de expresión *PirA*-pET-28b en las extracciones de la colonia 9 se pueden ver en la Figura 13.

Figura 13. Extracciones de la colonia 9 *E. coli* JM109 transformada con el vector *PirA*-pET-28b(+), en la electroforesis en gel de agarosa al 2% por 40 min a 90 V. Carril 1: Extracción 1. Carril 2: Extracción 2. Carril 3: Extracción 3. Carril 4: Extracción 4. Carril 5: Marcador de peso molecular Hind III.



5. DISCUSIÓN

5.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA CREAR LOS DOS VECTORES DE EXPRESIÓN CON LOS GENES DE LA TOXINA *PIRA* Y LA PROTEÍNA *OMPK* DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*.

Se confirma que los protocolos de PCR fueron optimizados, al observarse en la electroforesis los productos de PCR con los tamaños esperados, 333 pb para *PirA* y 776 pb para *Ompk* (Cuadro 5 y 6). Además, esto se corrobora al secuenciar estos productos y obtenerse un porcentaje de identidad y cobertura del 100% (Cuadro 7).

En el gel de agarosa de los productos de PCR para la amplificación del gen de la proteína *Ompk* se observan dímeros de cebadores, los cuales se definen como pequeños amplicones posiblemente generados por la polimerasa al existir complementariedad en el extremo 3' de los cebadores, que induce a que ambos se traslapen y sirvan de templados e iniciadores (Figura 3) (Bolívar *et al.*, 2014). Estos dímeros de cebadores podrían interferir en los análisis posteriores.

Sin embargo, al momento de purificar los productos de PCR del gel se elimina esta interferencia, pues al cortar el gel de agarosa se toma solamente el ADN de interés y los productos de PCR purificados quedan libre de posibles inhibidores, *primers* o desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs por sus siglas en inglés) lo cual ayuda también a la calidad de la reacción de secuenciación (Genómica Médica, 2015).

Otro aspecto que se debe de tomar en cuenta en el momento de realizar la limpieza de los productos de PCR del gel de agarosa es la concentración final obtenida, puesto que se necesita al menos 70 ng/μL de ADN aproximadamente para llevar a cabo el corte con enzimas de restricción. La concentración de ADN obtenida

va a depender fundamentalmente del proceso de corte, se debe agregar la mayor cantidad de pocillos, pero se elimina el exceso de gel de agarosa, de modo que, se tome la mayor cantidad de bandas, pero sin incrementar en demasía la masa final.

En el caso del protocolo de la PCR para la secuencia del gen de la proteína *Ompk*, se obtuvieron resultados de PCR insatisfactorios pues no se lograba obtener la concentración adecuada del producto de PCR limpio con las muestras disponibles. Este resultado pudo deberse a los cebadores para la secuencia del gen de la proteína *Ompk* que poseen los sitios de restricción de las enzimas *BamHI* y *HindIII*, lo cual permite la digestión directa del producto de la PCR y se evita una transformación previa. Aun así, un número sustancial de nucleótidos en el extremo de la hebra del cebador no coincide con la secuencia diana y forma un saliente que dificulta la unión entre el primer y la plantilla de ADN (Hou, 2002).

Otra posible razón por la cual no se pudo alcanzar la concentración adecuada podría ser por el tamaño del producto (776 pb). Si el ADN plantilla presenta degradación, el propio ADN molde está compuesto únicamente por fragmentos pequeños al estar degradado y por tanto es más difícil la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular (Golenberg *et al.*, 1996).

Como última medida, se probó el utilizar un producto de PCR como plantilla en lugar de ADN genómico, pero ocasionó la formación de productos inespecíficos (Figura 4), es decir, no se logró amplificar adecuadamente la secuencia del gen de la proteína *Ompk* y por ende no se contaba con suficiente material para continuar con la etapa siguiente.

Por otra parte, en el proceso de inserción de la secuencia de interés en el plásmido de clonación (pGem-T-easy), se empleó el cribado azul-blanco por ser simple y visual (Sadeghi *et al.*, 2017). Este fenómeno ocurre gracias al operón *lac* que está compuesto por tres genes estructurales: a) El gen *lacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa que hidroliza la lactosa en glucosa y galactosa. b) El gen *lacY* que codifica la β -galactosido permeasa involucrada en el transporte de la

lactosa. c) El gen *lacA* que codifica β -galactosido acetilasa cuya función es desconocida (Méndez, 1978).

Según la literatura, el hospedador debe ser una cepa de *E. coli* a la que le faltan aminoácidos en el extremo amino de la β -galactosidasa, la cual es la enzima responsable de la formación de un color azul ante la presencia del sustrato X-gal (Sadeghi *et al.*, 2017). Específicamente la β -galactosidasa cataliza la hidrólisis del sustrato sintético X-gal, esta reacción produce galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol que sufre dimerización y oxidación espontáneas para formar un pigmento de color azul (Julin, 2018).

El gen de interés se inserta en un sitio de clonación múltiple que se encuentra dentro de la secuencia codificante del péptido α , que corresponde a los aminoácidos faltantes del extremo amino de la β -galactosidasa; por tanto, el péptido α se interrumpe y resulta en colonias blancas (Sadeghi *et al.*, 2017; Sherwood, 2003). Es decir, el crecimiento de la bacteria en el medio que contiene el X-gal da como resultado colonias azules que indican el transporte del vector solo, como es el caso del control negativo, o colonias blancas que señalan la aceptación del vector con ADN insertado, como el control positivo y las réplicas 1 y 2 (Figura 5) (Chaffin & Rubens, 1998).

Además, el isopropiltiogalactósido conocido como IPTG se utilizó en el medio para realizar la transformación bacteriana porque es un análogo de galactosa que se une a la proteína represora *lac*, lo cual altera su conformación para que sea incapaz de unirse al operador *lac* e induce así la transcripción del operón *lac* (Green & Sambrook, 2019).

Respecto a la cantidad y calidad del ADN extraído de las bacterias transformadas con el plásmido *PirA-pGEM-T easy*, se obtuvo que las concentraciones de las eluciones dos son muy bajas en comparación con las eluciones uno. También las relaciones A260/A280 y A260/A230 muestran que las eluciones uno poseen una pureza óptima mientras que las eluciones dos tienen

presencia de contaminantes (Cuadro 10). Por ende, se recomienda realizar una sola elución en futuras extracciones.

Respecto a la comprobación de la inserción del gen *PirA* (333 pb) en el plásmido de clonación pGEM-T easy (3015 pb), se logró confirmar que el plásmido *PirA*-pGem-T easy tenía un tamaño aproximado de 3348 pb al obtenerse un fragmento de 392 pb aproximadamente que contiene el producto de PCR de interés, y otro fragmento de 2956 pb aproximadamente que sería el cuerpo del plásmido (Figura 7.a).

Por otro lado, la reacción de digestión realizada para liberar el inserto de interés del plásmido de clonación fue exitosa al encontrarse diferencias entre el producto no digerido y el producto digerido. Además, los productos digeridos poseen el tamaño de 3336 pb, aproximadamente, producto del plásmido pGEM-T easy más la secuencia del gen *PirA* (Figura 7.b)

Por último, el resultado de la digestión del vector pET-28b(+), se encuentra dentro del tamaño esperado (5321pb) y el segundo fragmento al ser tan pequeño (47 pb) en comparación con el anterior no se observa en el gel. También, se nota la presencia de un ADN no esperado que puede ser ADN de círculo mellado (Figura 8), la forma de migración más lenta de un plásmido en un gel de agarosa y que se forma cuando se corta una hebra de la hélice del ADN y relajan la tensión superhelicoidal (Tirabassi, 2021).

Se logró crear el vector de expresión pET-28b(+) que contiene la secuencia de *PirA*, lo cual significa que se puede utilizar este para la etapa posterior que corresponde a la transformación bacteriana.

5.2. TRANSFORMACIÓN DE LA BACTERIA *ESCHERICHIA COLI* CON LOS PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN PORTADORES DEL GEN DE LA TOXINA *PIRA*

La selección de las bacterias *E. coli* transformadas con el plásmido de expresión *PirA*-pET-28b(+) se realizó mediante el crecimiento en placas de agar con el antibiótico kanamicina, pues el vector presenta el gen *kanr* que les otorga resistencia a este antibiótico.

En esta investigación se propuso inicialmente transformar *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido de expresión construido. La literatura indica que las cepas BL21(DE3) químicamente competentes contienen el gen de la ARN polimerasa del fago T7 unido al promotor inducible por IPTG y que es posible utilizarlo con cualquier plásmido de expresión que contenga el promotor T7 (Sigma-Aldrich, 2022).

El plásmido pET-28b(+) y el pET-32a(+) son plásmidos utilizados para la expresión proteica y necesitan que se les proporcione la fuente de polimerasa de ARN T7 por parte de la célula huésped (Novagen, 1999), la cual es una enzima monomérica que no requiere factores de transcripción auxiliares para su actividad (Arnaud-Barbe *et al.*, 1998). Además, posee una especificidad extremadamente alta para sus secuencias promotoras afines, de modo que, sólo el ADN de T7 o el ADN clonado aguas abajo de un promotor de T7 puede servir como molde para la síntesis de ARN (Promega, 2022).

Otro beneficio de la ARN polimerasa T7 es su selectividad y actividad, debido a que casi todos los recursos de la célula se convierten en la expresión del gen objetivo, propiamente el producto deseado y puede comprender más del 50% de la proteína celular total unas pocas horas después de la inducción (Novagen, 1999).

Las células BL21(DE3) se escogieron para esta investigación por las características ya mencionadas, sin embargo, no fue posible transformarlas probablemente porque perdieron su competencia.

Para corroborar esta posibilidad se realizaron varias pruebas, primero las células BL21(DE3) se sometieron al proceso de transformación utilizando el plásmido PirA-pGem-T easy y no fue posible. Adicionalmente, dos controles positivos fueron empleados. En el primer control se transformaron las cepas *E. coli* JM109 con el plásmido PirA-pGem-T easy y se obtuvieron resultados satisfactorios; es decir, un abundante crecimiento bacteriano (Anexo 1). Para el segundo control se transformaron las mismas células BL21 (DE3) con un control positivo (pUC19), un plásmido superenrollado provisto por el kit y se siguieron todas las indicaciones del fabricante, pero no se obtuvo crecimiento en las placas lo que señala que las bacterias no aceptaron el plásmido (Anexo 1).

Igualmente, se realizó un control negativo; o sea, se sometieron las células BL21 (DE3) a todo el proceso de transformación, incluyendo la adición del plásmido, pero se inocularon en placas de agar LB sin ampicilina y se observó un gran crecimiento (Anexo 1).

Lo anterior puede deberse a que las células bacterianas perdieran la competencia: en otras palabras, no pueden absorber ADN extraño porque la membrana celular y la pared celular son impermeables (Kroemer, 2022).

La competencia se ve influida por el estado de crecimiento, la concentración de ADN y la composición del medio (Chaves & Ordóñez, 2016). Se considera que la concentración de ADN y la composición del medio es el correcto al crecer las bacterias BL21(DE3) del control negativo y al crecer las *E. coli* JM109 (Anexo 1).

El estado de crecimiento es el factor que podría estar afectando la transformación bacteriana; es decir, puede ser que las células no se encontraran en la fase exponencial del ciclo de vida, la cual se considera la mejor etapa para la preparación de *E. coli* químicamente competentes (Serrano-Rivero *et al.*, 2013) y, por ende, no adquirieron los vectores.

El fabricante de las células BL21(DE3) Sigma-Aldrich garantiza la competencia de las células hasta un año después de haber sido adquiridas, sin embargo, debido a los atrasos generados en el proyecto por la limitación en el uso

del laboratorio, causados por la pandemia del COVID-19, las células cumplieron el período de garantía y no se pudieron utilizar previo.

A pesar de estos resultados, la literatura recomienda que se debe realizar una transformación inicial en cepas que carezcan del gen de la ARN polimerasa T7, como las cepas JM109, esto permite recuperar el plásmido con una alta cantidad y estabilidad para análisis de su secuencia o como una fuente estable del plásmido si en pasos posteriores se presentara algún inconveniente (Novagen, 1999). Por lo tanto, transformar en las células JM109 con el plásmido de expresión construido *PirA*-pET-28b(+) fue la mejor opción, pues para las investigaciones que se quieren llevar a cabo en futuros proyectos se requerirá una fuente de células que sea estable y que puede producir eficientemente el plásmido de interés, características que no poseen las células BL21 (DE3).

5.3. AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA TOXINA PIR A PARA COMPROBAR SU PRESENCIA.

La PCR de colonia tiene como objetivo determinar si las colonias bacterianas transformadas portan el gen de interés (AMGEN FOUNDATION, 2019). Cuando se realizó la primera PCR de colonia producto de la transformación del plásmido pET-32a(+) con la posible secuencia del gen *PirA*, se obtuvo como resultado dos colonias positivas (colonia 3 y 5) para la secuencia del gen *PirA* (Anexo 3), pero al utilizar cebadores que sólo flanquean el inserto, dicho inserto no brinda información de si se encuentra dentro del plásmido de clonación (pGem-T-easy) o dentro del plásmido de expresión (pET-32a(+)), en razón de que ambos comparten el mismo gen de resistencia a la ampicilina.

Por ende, se procedió a digerir el ADN de ambas colonias. Sin embargo, se determinó que el plásmido que poseían era el pGEM-T easy con el inserto de *PirA*,

porque es el tamaño que coincidió con los resultados obtenidos (3348 pb), es decir, no se observaron los fragmentos esperados de 5399 pb y 345 pb del vector pET-32a(+) con la secuencia de *PirA* (Figura 10).

Para poder corroborar que el inserto realmente se encuentra en el vector de interés se recomienda realizar una PCR que contenga un cebador que flanquee un sitio del plásmido y otro cebador que se una al inserto, de esta forma se confirma el tamaño y la orientación del inserto (Abi-Ghanem, 2017).

En la segunda ligación realizada se seleccionó un vector que tuviera el gen de resistencia a un antibiótico diferente a la ampicilina (el pET-28b(+)) para evitar este tipo de confusiones, pues si la bacteria transformada crece en un medio con kanamicina y es positiva para la secuencia del gen *PirA*, hay una alta probabilidad que ese gen se encuentre en el vector de interés. Sin embargo, se recomienda para futuros análisis corroborar la presencia del inserto de interés en el vector pET-28b(+) utilizando un primer del plásmido y uno del inserto, proceso permitiría también determinar la dirección del inserto como se mencionó previamente, necesario para la correcta producción del polipéptido maduro de la proteína *PirA*.

Un proceso que se recomienda es la desfosforilación del vector parental, dado que, al eliminarse un grupo fosfato de un extremo, el vector no puede ligarse a sí mismo, pero puede ligarse a un inserto con un grupo fosfato (Kaisermann *et al.*, 2020). En otras palabras, disminuye la frecuencia de vector recircularizado (Briones-Martín del Campo, 2008).

En la primera ligación que se realizó sin éxito (*PirA*-pET-32a(+)), se desfosforiló el vector parental como se recomienda pero no se tomó en cuenta que los sitios de corte de las enzimas de restricción en el plásmido *PirA*-pGEM-T easy, estaban muy cercanos entre sí (12 pb). Además, la purificación de los productos de digestión se realizó directamente del tubo que lo contenía y no del gel de agarosa (con la meta de obtener una concentración mayor luego de su limpieza). Estos dos hechos pueden ser la razón por la cual el plásmido se volvió a unir entre sí.

Como solución se desfosforiló el plásmido *PirA*-pGEM-T easy en lugar del vector pET-28b(+), el cual sustituyó al vector pET-32a(+) por otorgar resistencia a la kanamicina. De modo que las bacterias que crecieron en el medio LB con kanamicina eran sólo aquellas capaces de poseer el plásmido pET-28b(+) (Figura 12). De ellas, solamente las colonias que resultaran positivas en la PCR para el gen de *PirA* contenían el inserto de interés; tal fue el caso de la colonia 9 (Figura 11).

Además, se debió escanear un gran número de colonias para obtener una única colonia con *PirA*- pET-28b(+), debido al ruido de fondo generado por colonias sin el inserto de interés. La purificación de los productos de digestión directamente del tubo y no del gel pudo generar productos de ligación no deseados que produjeron un gran número de colonias transformadas sin el inserto pero que contenían genes de resistencia y muy pocas colonias con el inserto de interés (Checa-Rojas, 2018).

También, se debe tomar en cuenta los problemas de contaminación en el laboratorio ocasionados por inconvenientes en la infraestructura del mismo, específicamente la caída de material sucio a través del cielo raso que se encuentra en malas condiciones. Esto posiblemente afectó la concentración obtenida del ADN purificado al limpiar los productos en el gel, por consiguiente, es un aspecto prioritario a mejorar o solucionar para futuras investigaciones.

Otra de las mejoras implementadas para *PirA*, fue enviar a secuenciar productos de una PCR convencional en lugar de una PCR en tiempo real. Aunque en esta prueba se ahorra más tiempo, se recomienda utilizar fragmentos grandes de al menos 150 pb porque los más pequeños, que se producen por lo general en la técnica de qPCR, se pueden comportar como cebadores y son difíciles de purificar con buen rendimiento (Laboratorio Secuenciación IdiPAZ, 2017).

Se confirma que el plásmido pET-28b(+) contiene el gen *PirA*, al ser el porcentaje de identidad de un 99,63 % y el de cobertura de la secuencia de interés de un 96 % para la secuencia del gen *PirA* de la bacteria *V. parahaemolyticus*.

Desde otra perspectiva, los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de las bases aromáticas nitrogenadas o nucleótidos. Por tanto, la espectrofotometría proporciona una estimación simple y precisa de la concentración de ADN cuando se encuentra relativamente puro, es decir, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorban a longitudes de onda similares (Villareal-Gómez *et al.*, 2019).

Las concentraciones de las extracciones de ADN de las bacterias JM109 con el plásmido *PirA*- pET-28b(+) fueron mayores a 50 ng/μL que es el valor mínimo para que tengan validez las relaciones de absorbancias 260/280 y 260/230 empleadas para evaluar la pureza del ADN (Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020).

Según los criterios de validez de las relaciones de absorbancias 260/280 y 260/230, se consideran las extracciones de ADN un material adecuado para otros trabajos en biología molecular, al poseer en general una pureza aceptable para A260/A280, aunque se indica la presencia de contaminantes para la A260/A230.

A pesar de que la concentración del ADN también fue medida a través del uso de un espectrofotómetro de microvolumen, se recomienda utilizarlo sólo para verificar la calidad del ADN, mediante la determinación de las relaciones A260/A280 y A260/A230, en razón de que se conoce que la fluorimetría es mucho más sensible y específica que la espectrofotometría, al medir el haz de excitación y el nivel de luz fluorescente que emite la muestra cuando los fluoróforos se intercalan en los ácidos nucleicos del ADN. Por consiguiente, las proteínas y otros componentes celulares no interfieren con la lectura (Murillo-Carrasco, 2017; Villareal-Gómez *et al.*, 2019).

Además, se visualizó el plásmido en las extracciones de ADN de las bacterias JM109 mediante la electroforesis en gel de agarosa, lo que confirma la presencia del vector de interés *PirA*- pET-28b(+) en las mismas (Figura 13).

Las bacterias *E. coli* JM109 de la colonia 9 transformadas con el vector *PirA*-pET-28b(+) fueron criopreservadas al ser trascendentales para futuras investigaciones para desarrollar la vacuna de interés.

La técnica de criopreservación consiste en congelar células suspendidas en un agente crioprotector a temperaturas de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ultra-congelación) para reducir el metabolismo celular hasta el punto de prácticamente anularlo. Esta técnica presenta las ventajas reducir el riesgo de contaminación, la posibilidad de ser aplicada a la mayoría de los géneros microbianos y permite la mantención de los microorganismos a largo plazo (Ocares & Castro, 2020).

Cabe mencionar que los crioviales se colocaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 h, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h y después se congelaron a -80°C para almacenarlos a largo plazo, debido a que se recomienda dejar la suspensión microbiana en contacto con el crioprotector permeable durante un tiempo. para equilibrar los solutos intracelulares antes de la congelación (Hubálek, 2003).

El presente trabajo permitió construir un vector de expresión con el gen de la toxina *PirA* de *Vibrio parahaemolyticus*, que transformado en una cepa bacteriana adecuada podría producir el polipéptido maduro de la proteína *PirA*, producto que podría ser identificado, aislado y purificado para utilizarse como material de partida en futuras investigaciones. Como por ejemplo para inmunizar una especie adecuada capaz de generar anticuerpos que puedan emplearse para contrarrestar la enfermedad AHPND (Lazarte *et al.*, 2021) o anticuerpos que puedan ser utilizados en la elaboración de una técnica diagnóstica de la enfermedad, alternativa a la PCR, ya que las cepas bacterianas que contienen los genes de *PirA* y *PirB* no siempre expresan la toxina binaria (Mai *et al.*, 2020).

6. CONCLUSIONES

- Se estandarizó la metodología para crear el vector de expresión con el gen de la toxina *PirA* de *Vibrio parahaemolyticus*, desde la amplificación de su secuencia hasta la digestión y ligación de la misma con el plásmido pET-28b(+).
- Respecto al gen de la proteína *Ompk*, se estandarizó el protocolo para la amplificación del mismo mediante PCR convencional, aunque no se logró la purificación del producto de PCR debido a las dificultades para lograr obtener una concentración adecuada que permitiera continuar con los análisis.
- Se transformaron exitosamente las bacterias *Escherichia coli* JM109 en una cepa productora del vector construido, mas no poseen la capacidad de elaborar la toxina *PirA* por la falta de la T7 ARN polimerasa.
- Se detectó la presencia de la secuencia del gen de la toxina *PirA* a través de la amplificación, secuenciación y digestión con enzimas de restricción esto confirma que las células de *Escherichia coli* JM109 adquirieron el plásmido construido.
- Se cuenta con un plásmido de expresión que contiene la secuencia de interés para producir el polipéptido maduro de la proteína *PirA* en células apropiadas. El polipéptido maduro de la proteína *PirA* podría utilizarse como material de partida en futuras investigaciones orientadas al control y diagnóstico de la enfermedad AHPND.

RECOMENDACIONES

- Purificar los productos de las digestiones con enzimas de restricción utilizando el procedimiento para limpieza en el gel de agarosa y no el procedimiento para limpieza en el tubo directamente, con el fin de eliminar el ruido de fondo de colonias sin el inserto de interés.
- Realizar controles negativos y positivos en las transformaciones, puesto que brindan claridad sobre los problemas que pueden ocurrir en el proceso.
- Realizar la PCR con cebadores que flanqueen tanto secuencias del plásmido como del inserto de interés en los procesos en los cuales se empleen dos plásmidos que otorguen resistencia a un mismo antibiótico. Otra opción es digerir el ADN de las colonias positivas en PCR, mediante el uso de enzimas de restricción, para confirmar con el tamaño de los productos de digestión que poseen el plásmido con el inserto de interés.
- Usar vectores que otorguen resistencia a antibióticos diferentes, de modo que, si crecen las bacterias en el medio y si la PCR es positiva es muy probable que se tenga el inserto dentro de plásmido de interés.
- Para reducir los problemas en la amplificación de la Ompk, es recomendable utilizar *primers* que no posean los sitios de restricción de las enzimas, de forma que la secuencia de nucleótidos coincida en su totalidad con el ADN plantilla.

7. REFERENCIAS

- Abi-Ghanem, D. (2017, abril 11). *Molecular cloning of PCR products: Transformation and colony screening*. Quartzzy. <https://blog.quartzzy.com/2017/04/10/molecular-cloning-pcr-products-transformation-colony-screening>
- Amarales-Osorio, Lidia. (2006). *Circular de vigilancia epidemiológica de Brote de Vibrio parahaemolyticus*.
- AMGEN FOUNDATION. (2019). *Guía para el estudiante: PCR de colonias*.
- Arnaud-Barbe, N., Cheynet-Sauvion, V., Oriol, G., Mandrand, B., & Mallet, F. (1998). Transcription of RNA templates by T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Research*, 26(15), 3550–3554.
- Avila, J. T., de Vera, A. M., Hernandez, C., & Vasallo, P. M. (1995). Analisis Del Dna. II: Clonar, Secuenciar y PCR. *Nefrologia*, 15(2), 31–43. <https://www.revistanefrologia.com/es-pdf-X0211699595022870>
- Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). *PROGRAMA CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN*.
- [https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite CIT- QC PF Saint-](https://cit.ligue-cancer.net/CIT_Public/images/stories/CIT/pdf/WebSite%20CIT-QC%20PF%20Saint-)
- Béné, C., Barange, M., Subasinghe, R., Pinstруп-Andersen, P., Merino, G., Hemre, G. I., & Williams, M. (2015). Feeding 9 billion by 2050 – Putting fish back on the menu. *Food Security*, 7(2), 261–274.
- Betancor, L., Gadea, M., & Flores, K. (2008). Genética bacteriana. En *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (3a ed., pp. 59–80). Oficina del Libro FEFMUR. https://clasesparticularesdebioquimica.files.wordpress.com/2016/05/seccion_1_libro_temas_byv_medica.pdf
- Bolivar, A. M., Rojas, A., & Garcia-Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances En Biomedicina*, 3(1), 25–33.

- Briggs, M. (2006, abril 7). *Programa de información de especies acuáticas. Penaeus vannamei*. FAO.
http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Penaeus_vannamei/es
- Briggs, M. (2009). *Cultured aquatic species fact sheets. Penaeus vannamei*. FAO.
http://www.fao.org/tempref/FI/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/es_whitelegshrimp.htm
- Briggs, M., Funge-Smith, Simon., Subasinghe, R. P., & Phillips, Michael. (2005). *Introducciones y movimientos de dos especies de camarones peneidos en Asia y el Pacífico*. FAO. <http://www.fao.org/3/a0086s/A0086S00.htm#TOC>
- Briones-Martín del Campo, M. Cecilia. (2008). *Construcción de un vector para clonar productos de PCR* [Tesis de Posgrado, INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.].
<https://repositorio.ipicyt.edu.mx/bitstream/handle/11627/228/BrionesMartindelCampo.pdf;sequence=1>
- Campa-Córdova, A. I., León-Gallo, A. F., Romero-Maldonado, A., Ibarra-Serrano, A. C., Rosales-Mendoza, S., Hirono, I., & Angulo, C. (2017). Recombinant *PirA*-like toxin protects shrimp against challenge with *Vibrio parahaemolyticus*, the aetiological agent of acute hepatopancreatic necrosis disease. *Journal of Fish Diseases*, 40(11), 1725–1729. <http://doi.wiley.com/10.1111/jfd.12625>
- Carlander, D., Kollberg, H., Wejåker, P.-E., & Larsson, A. (2000). Peroral Peroral Immunotherapy with Yolk Antibodies for the Prevention and Treatment of Enteric Infections. *Immunologic Research*, 21(1), 1–6.
- Chaves, A., & Ordóñez, A. (2016). *Recombinación en bacterias. Transformación. Conjugación. Transducción generalizada*.

<http://www.agro.unc.edu.ar/~wpweb/genetica/wp-content/uploads/sites/12/2016/11/CAPÍTULO-16-.-RECOMBINACIÓN-EN-BACTERIAS.pdf>

- Checa-Rojas, Alberto. (2018, marzo 15). *Método: Células competentes y transformación*. Conogasi. <https://conogasi.org/articulos/metodo-celulas-competentes-y-transformacion/>
- Chies, J., de O-Dias, A., Maia, H., & Astolfi-Filho, S. (2006). BPUAMI: A novel sacI neoschizomer from *Bacillus Pumilus* discovered in an isolate from Amazon Basin, recognizing 5'-GAG↓CTC-3'. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 96–100.
- de Alba-Aguayo, D. R., & Rueda, A. (2013). Problema bioquímico: Determinación del ciclo umbral y la eficiencia para la PCR cuantitativa en tiempo real. *Revista de Educación Bioquímica.*, 32(1), 36–39. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952013000100006
- Dotmatics. (s/f). *Plasmid Files*. SnapGene. Recuperado el 4 de noviembre de 2022, a partir de <https://www.snapgene.com/>
- FAO. (2002). *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. Grupo Editorial de la Dirección de Información de la FAO. <http://www.fao.org/3/y7300s/y7300s00.htm>
- Garrote, H., & Días, C. A. (2020). Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa: del “Nobel” a la actualidad. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 35(4), 1–4. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892019000400009&lng=es&nrm=iso&tlng=es

- Genómica Médica. (2015). *Protocolos de preparación de muestras*.
- Golenberg, E. M., Bickel, A., & Weihs, P. (1996). Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(24), 5026–5033.
- Gonzalez, J. B., Pereira, N., Soto, Z., Hernández, E., & Villarreal, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella* spp. y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30(1), 73–94.
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Screening Bacterial Colonies Using X-Gal and IPTG: α -Complementation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 790–795.
<https://sci-hub.se/10.1101/pdb.prot101329>
- Han, J. E., Tang, K. F. J., Pantoja, C. R., White, B. L., & Lightner, D. v. (2015). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*, 442, 12–15.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0044848615001076>
- Han, J. E., Tang, K. F. J., Tran, L. H., & Lightner, D. v. (2015). Photorhabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 113(1), 33–40.
- Heitmann, I., Jofré, L., Hormázabal, J. C., Olea, A., Vallebuona, C., & Valdés, C. (2005). Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Chilena de Infectología*, 22(2), 131–140.
- Hou, J. (2002). Design of endonuclease restriction sites into primers for PCR cloning. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE*, 18(12), 1690–1691.
<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/18/12/1690/239567>

Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205–229. [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4)

INCOPESCA. (2020). *Acuicultura*. INCOPESCA. <https://www.incopescas.go.cr/acuicultura/index.aspx>

Instituto de Acuicultura Torre de la Sal. (2020). *El Instituto de Acuicultura Torre de la Sal publica un estudio que demuestra la efectividad de los anticuerpos frente a un parásito que afecta a la dorada*. <https://www.dicv.csic.es/arxius/15-09-2020 NP IATS Anticuerpos parásito dorada.pdf>

Jack, W. E., Greenough, L., Dorner, L. F., Xu, S.-Y., Strzelecki, T., Aggarwal, A. K., & Schildkraut, I. (1991). Overexpression, purification and crystallization of BamHI endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 19(8), 1825.

Julin, D. A. (2018, enero 30). *Blue/White Selection*. Molecular Life Sciences; Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1531-2_94

Juri-Ayub, M., Manzur, M. J., Campos, L., Castro, M., & Jerez, B. (2019). *Guías de trabajos prácticos: Ingeniería genética y genómica / Manipulación genética y genómica*. http://www.fqbf.unsl.edu.ar/documentos/mde/Biología Molecular/ing_genetica_juri_ayub.pdf

Kaisermann, J., Pawlowski, M., & Mendel, Y. (2020). *Técnicas de biología molecular II* (Cambridge Stanford Books, Ed.). Cambridge Stanford Books. <https://books.google.co.cr/books?id=hqX5DwAAQBAJ&pg=PT129&lpg=PT129&dq=desfosforilación+ciap&source=bl&ots=EGuRMAISAF&sig=ACfU3U3B8qc6li1HpRTEbvWcedTju8cLwQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwiGsJjci7H6AhWoSjABHWG2Dv4Q6AF6BAgkEAM#v=onepage&q=desfosforilación ciap&f=fa>

- Kroemer, T. (2022). *Comprensión de las Células Competentes en la Transformación Bacteriana*. GoldBio. <https://www.goldbio.com/articles/article/Celulas-Competentes-Transformacion-Bacteriana>
- Laboratorio Secuenciación IdiPAZ. (2017). *Guía práctica para el usuario de Secuenciación Sanger IdiPAZ*.
- Lara, Á. (2011). Producción de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(2), 209–223. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382011000200006
- Lazarte, J. M. S., Kim, Y. R., Lee, J. S., Chun, J. H., Kim, S. W., Jung, J. W., Kim, J., Kayansamruaj, P., Thompson, K. D., Kim, H., & Jung, T. S. (2021). Passive Immunization with Recombinant Antibody VLRB-*PirAvp/PirBvp*-Enriched Feeds against *Vibrio parahaemolyticus* Infection in *Litopenaeus vannamei* Shrimp. *Vaccines*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.3390/VACCINES9010055>
- Lee, C.-T., Chen, I.-T., Yang, Y.-T., Ko, T.-P., Huang, Y.-T., Huang, J.-Y., Huang, M.-F., Lin, S.-J., Chen, C.-Y., Lin, S.-S., Lightner, D. v., Wang, H.-C., Wang, A. H.-J., Wang, H.-C., Hor, L.-I., & Lo, C.-F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), 10798–10803.
- Li, N., Yang, Z., Bai, J., Fu, X., Liu, L., Shi, C., & Wu, S. (2010). A shared antigen among *Vibrio* species: Outer membrane protein-*Ompk* as a versatile Vibriosis vaccine candidate in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish and Shellfish Immunology*, 28(5–6), 952–956. <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/science/article/pii/S1050464810000604>

- López-López, N. (2011). *Eliminación del gen marcador de selección en plantas transplastómicas mediante la expresión transitoria de la recombinasa cre* [Tesis de grado]. Universidad Pública de Navarra.
- Mai, H. N., Cruz-Flores, R., & Dhar, A. K. (2020). Development of an indirect Enzyme Linked Immunoassay (iELISA) using monoclonal antibodies against Photorhabdus insect related toxins, *PirAVp* and *PirBVp* released from *Vibrio* spp. *Journal of Microbiological Methods*, 176. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2020.106002>
- Mao, Z., Yu, L., You, Z., Wei, Y., & Liu, Y. (2007). Cloning, expression and immunogenicity analysis of five outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* zj2003. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(3), 567–575. <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/science/article/pii/S1050464807000101?via%3Dihub>
- Mazón-Suástegui, José., García-Bernal, Milagro., Avilés-Quevedo, Aracel., Campa-Córdova, Ángel., Salas-Leiva, Joan., & Abasolo-Pacheco, Fernando. (2018). Evaluación de medicamentos homeopáticos en la supervivencia y respuesta antioxidante del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* infectado con *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista MVZ Córdoba*, 23(3), 6850–6859.
- Méndez, S. (1978). *Regulación post-transcripcional en el Operon Lactosa de Escherichia Coli K12* [Tesis de Doctorado]. Universidad de Buenos Aires.
- Mercado-Michel, B. G., & Vasquez-Michel, A. (2018). Estandarización de la PCR en tiempo real por análisis de curvas melting para la detección de tuberculosis drogoresistente. *Revista Con-Ciencia*, 6(2), 111–121.
- Mohan, C. V. (2015). *Climate change and aquatic animal disease* (Núm. 117).
- Murillo-Carrasco, A. Germán. (2017). *Evaluación de los niveles de DNA circulante en plasma de pacientes con cáncer de mama por PCR digital* [Tesis de Grado,

- Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/6135/Murillo_c_a.pdf?sequence=2
- Nakamura, R., Pedrosa-Gerasmio, I. R., Alenton, R. R. R., Nozaki, R., Kondo, H., & Hirono, I. (2019). Anti-*PirA*-like toxin immunoglobulin (IgY) in feeds passively immunizes shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease. *Journal of Fish Diseases*, *42*, 1125–1132. <https://doi.org/10.1111/jfd.13024>
- National Human Genome Research Institute. (2019, septiembre 27). *Reacción en cadena de la polimerasa (RCP)*. <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>
- Ningqiu, L., Junjie, B., Shuqin, W., Xiaozhe, F., Haihua, L., Xing, Y., & Cunbin, S. (2008). An outer membrane protein, *Ompk*, is an effective vaccine candidate for *Vibrio harveyi* in Orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish and Shellfish Immunology*, *25*(6), 829–833. <https://www.sciencedirect.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/science/article/pii/S1050464808002155>
- Noor-Uddin, G. Md., Larsen, M. H., Christensen, H., Aarestrup, F. M., Phu, T. M., & Dalsgaard, A. (2015). Identification and Antimicrobial Resistance of Bacteria Isolated from Probiotic Products Used in Shrimp Culture. *PLOS ONE*, *10*(7).
- Novagen. (1999). *pET System Manual*.
- Ocares, Y., & Castro, J. F. (2020). Preservación de microorganismos por congelación. En J. F. Castro (Ed.), *Conformación de colecciones de cultivos microbianos*. *Boletín INIA N° 428*. (pp. 119–134). Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación INIA Quilamapu, Ministerio de Agricultura.
- Organización del Sector Pesquero y Acuícola del Istmo Centroamericano., & Sistema de la integración Centroamericana. (2018, septiembre 6). *Litopenaeus vannamei*. ClimaPesca. <https://climapesca.org/2018/09/06/litopenaeus-vannamei/>

- Pedrosa, Andrés. (1999). Reacción en cadena de la polimerasa. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 3(2).
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011
- Peña-Navarro, Nelson. (2012). *Efecto estimulador de tres productos naturales sobre el sistema inmunológico del camarón Litopenaeus vannamei, desafiado con Vibrio parahaemolyticus* [Tesis de Licenciatura]. Universidad de Costa Rica.
- Peña-Navarro, N., Castro-Vásquez, R., Vargas-Leitón, B., & Dolz, G. (2020). Molecular detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in Penaeus vannamei shrimps in Costa Rica. *Aquaculture*, 523(735190), 1–8.
<https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2020.735190>
- Peña-Navarro, N., & Varela-Mejías, Alexander. (2015). Análisis histopatológico en Litopenaeus vannamei infectado con Vibrio parahaemolyticus. *Agronomía Mesoamericana*, 26(1).
- Peña-Navarro, Nelson., & Chacón-Guzmán, Jonathan. (2019). Acuicultura en Costa Rica. *WORLD AQUACULTURE*, 50(2), 23–28.
https://www.researchgate.net/publication/334726301_Acuicultura_en_Costa_Rica
- Promega. (2022). *T7 RNA Polymerase*. Promega.
<https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-biology-enzymes-and-reagents/t7-rna-polymerase/?catNum=P2075>
- Qian, R. H., Xiao, Z. H., Zhang, C. W., Chu, W. Y., Wang, L. S., Zhou, H. H., Wei, Y. W., & Yu, L. (2008a). A conserved outer membrane protein as an effective vaccine candidate from Vibrio alginolyticus. *Aquaculture*, 278(1–4), 5–9.
[https://www.sciencedirect-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/science/article/pii/S0044848608001452](https://www.sciencedirect.com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/science/article/pii/S0044848608001452)

- Qian, R. H., Xiao, Z., Zhang, C., Chu, W., Mao, Z., & Yu, L. (2008b). Expression and purification of two major outer membrane proteins from *Vibrio alginolyticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 245–251.
- Rivera, R., Domínguez, C., & Rodríguez, J. (2018). *Efecto de la temperatura sobre la susceptibilidad del camarón blanco *Penaeus vannamei* a *Vibrio parahaemolyticus**.
- Rodríguez, José. (2011). Biomolecules in nanotechnology. *La Granja*, 13(1), 3–12.
- Rodríguez, M., & Rodríguez, W. (2006). *Métodos físico-químicos en Biotecnología: PCR en tiempo real*.
- Rodríguez-Camacho, Méndez-Gómez, J. C., Rivas-Montaño, Cortés-Ruiz, A. M., & Méndez-Gómez, E. (2014). Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. *Revista Bio Ciencias*, 2(4), 282–292.
- Rodríguez-Lázaro, D., & Hernández, M. (2006). MOLECULAR METHODOLOGY IN FOOD MICROBIOLOGY DIAGNOSTICS: TRENDS AND CURRENT CHALLENGES. *IUFoST World Congress, 13th World Congress of Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1051/IUFoST:20060643>
- Romero, P., Magnoli, A., & Peralta, M. F. (2014). Biotecnología de la Inmunoglobulina Y (IgY) en animales domésticos como preventivo ó terapéutico en enfermedades entéricas. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 15(1), 1–8. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63637992007.pdf>
- Romero, Y., Díaz, A., Arroyo, B., & Villalba, V. (2010). Métodos de identificación bacteriana y sus aplicaciones en la investigación odontológica. *Duazary*, 7(2), 247–256. https://search-proquest-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/docview/1835766474?rfr_id=info%3Axri%2Fsid%3Aprimo

- Rubio-Limonta, M., & Silveira-Coffigny, R. (2012). Enfermedades infecciosas en camarones *Penaeus* y langosta *Panulirus*. Situación actual. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 13(7), 1–17.
- Sadeghi, S., Ahmadi, N., Esmaeili, A., & Javadi-Zarnaghi, F. (2017). Blue-white screening as a new readout for deoxyribozyme activity in bacterial cells. *RSC Advances*, 7, 54835–54843. <https://doi.org/10.1039/c7ra09679h>
- Sandoval, A. S., Mena, M., & Márquez, A. L. (2013). Vectores de clonación y expresión. En A. M. Salazar, A. S. Sandoval, & J. Armendáriz (Eds.), *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. (1a ed.). McGraw Hill Medical. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1473§ionid=102743892#1118679752>
- Serrano-Rivero, Y., Hernández-García, A., & Fando-Calzada, Rafael. (2013). Comparación de dos métodos para la preparación de células competentes en *Escherichia coli*. *CENIC*, 44(2), 1–6. <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181227534009.pdf>
- Sherwood, A. L. (2003). Virtual Elimination of False Positives in Blue-White Colony Screening. *Biotechniques*, 34(3), 644–647. <https://www.future-science.com/doi/pdf/10.2144/03343pf03>
- Shiple, G. (2007). An introduction to real-time PC. En T. Dorak (Ed.), *Real-time PCR* (pp. 1–38). Taylor & Francis Group.
- Shroff, K. E., Smith, L. R., Baine, Y., & Higgins, T. J. (1999). Potential for plasmid DNAs as vaccines for the new millennium. *Pharmaceutical Science and Technology Today*, 2(5), 205–212.
- Sigma-Aldrich. (2022). *BL21(DE3) Chemically Competent Cells for protein expression* | Sigma-Aldrich. Merck. <https://www.sigmaaldrich.com/CR/es/product/sigma/cmc0014>

- Singh, Manmohan., & Srivastava, I. K. (Eds.). (2011). *Development of Vaccines : From Discovery to Clinical Testing* (1a ed.). John Wiley & Sons, Incorporated. <https://ebookcentral-proquest-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/lib/sibdilibro-ebooks/reader.action?docID=697480&ppg=6>
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sanguanrut, P., Chi, T. D., Mavichak, R., Proespraiwong, P., Nuangsaeng, B., Thitamadee, S., Flegel, T. W., & Sritunyalucksana, K. (2015). Characterization and PCR detection of binary, pir-like toxins from vibrio parahaemolyticus isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *PLoS ONE*, *10*(5).
- Solano-Luna, L. M., Chavarro-Mesa, E., & Ángel-Díaz, J. E. (2018). PCR cuantitativa para la detección del virus de la tristeza de los cítricos en Colombia. *Ciencia y Agricultura*, *15*(1), 7–18.
- Sotomayor, M. A., & Balcázar, J. L. (2003). Inhibición de vibrios patógenos de camarón por mezclas de cepas probióticas. *Revista AquaTIC*, *19*, 9–15. <http://www.revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/254/242>
- Soto-Rodríguez, S. A., Gomez-Gil, B., Lozano-Olvera, R., Betancourt-Lozano, M., & Morales-Covarrubias, M. S. (2015). Field and Experimental Evidence of Vibrio parahaemolyticus as the Causative Agent of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease of Cultured Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Northwestern Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(6), 1689–1699.
- Tang, D., Ando, S., Takasaki, Y., & Tadano, J. (2000). Mutational analyses of restriction endonuclease—HindIII mutant E86K with higher activity and altered specificity. *Protein Engineering, Design and Selection*, *13*(4), 283–289.
- Tello-Olea, M. A. (2018). *Actividad inmunoestimulante de nanopartículas de oro en camarón blanco (Litopenaeus vannamei) contra Vibrio parahaemolyticus* [Tesis maestría]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Tirabassi, R. (2021, abril 27). *How to Identify Supercoils, Nicks and Circles in DNA Plasmid Preps*. BiteSizeBio. <https://bitesizebio.com/13524/how-to-identify-supercoils-nicks-and-circles-in-plasmid-preps/>

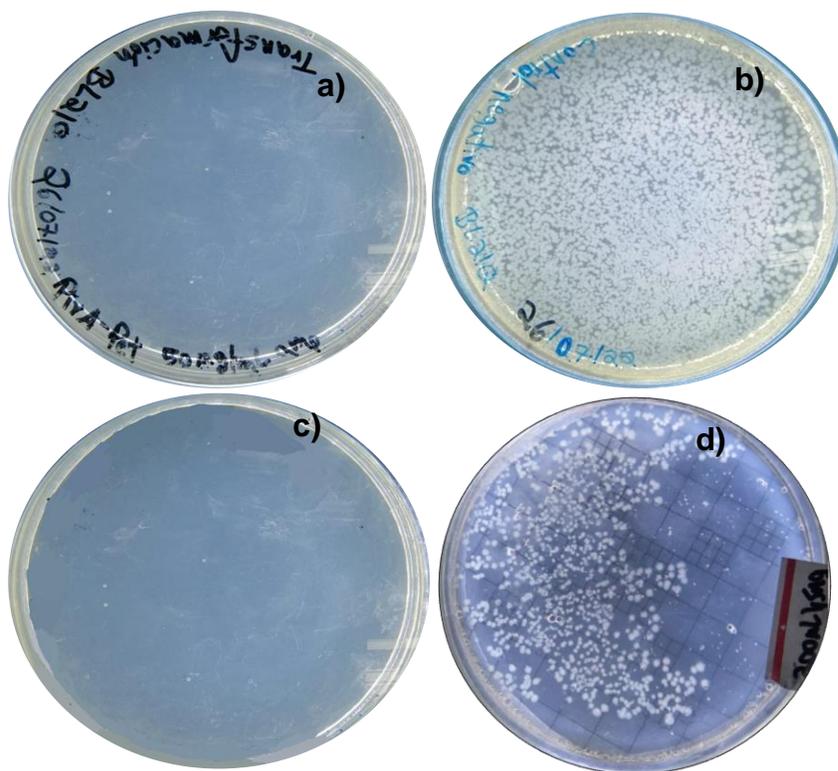
- Trujillo-García, E. A. (2016). *Neutralización de la toxinas PirA y PirB de Vibrio parahaemolyticus asociado a AHPND con fragmentos de anticuerpos desplegados en fagos* [Tesis de maestría]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- Varela-Mejías, A., Peña-Navarro, N., & Aranguren-Caro, L. F. (2017). Necrosis aguda del hepatopáncreas: una revisión de la enfermedad en *Penaeus vannamei*. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 735–745.
- Vazques, R., Martinez, D., Reyes, G., Marquez, G., Reyes, N., Diaz, Y., Luis, M., Gonzalez, B., & Gonzalez, N. (1996). Purificación De La Endonucleasa De Restricción NcoI Libre De Exonucleasas Y Endonucleasas Contaminantes. *Biotecnología Aplicada*, 13(4), 289–290.
<http://www.bioline.org.br/request?ba96111>
- Vazquez, L., Alpuche, J., Maldonado, G., Agundis, C., Pereyra-Morales, A., & Zenteno, E. (2009). Immunity mechanisms in crustaceans. *Innate Immunity*, 15(3), 179–188.
- Villareal-Gómez, L. Jesús., Iglesias, A. Leticia., & Perez, G. Lizeth. (2019). *Manual de prácticas de laboratorio: Biología Molecular*. Universidad Autónoma de Baja California.
- Watson, R. J., Schildkraut, I., Qiang, B. Q., Martin, S. M., & Visentin, L. P. (1982). NdeI: a restriction endonuclease from *Neisseria denitrificans* which cleaves DNA at 5'-CATATG-3' sequences. *FEBS Letters*, 150(1), 114–116.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)81315-X](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)81315-X)
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y. (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the *PirAB* toxins as mediated by *PirAB-Tn903* are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports*, 7(42177), 1–11.
- Zamora-Ovares, G. (2005, febrero 1). *Visión general del sector acuícola nacional. Costa Rica*. FAO. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_costarica/es

Zamora-Pantoja, D. R., & Quróz-Santiago, C. (2005). Un enemigo marino silencioso *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Digital Universitaria*, 6(4).

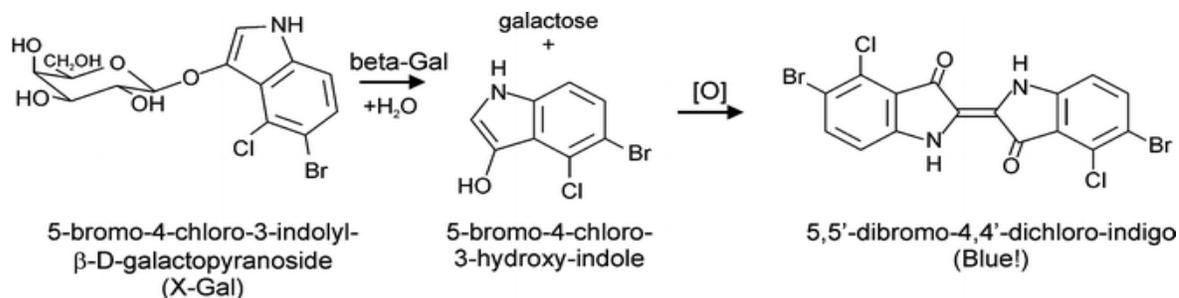
Zanetti, M., Sercarz, E., & Salk, J. (1987). The immunology of new generation vaccines. *Immunology Today*, 8(1), 18–25. <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.sibdi.ucr.ac.cr/science/article/pii/0167569987908279>

8. ANEXOS

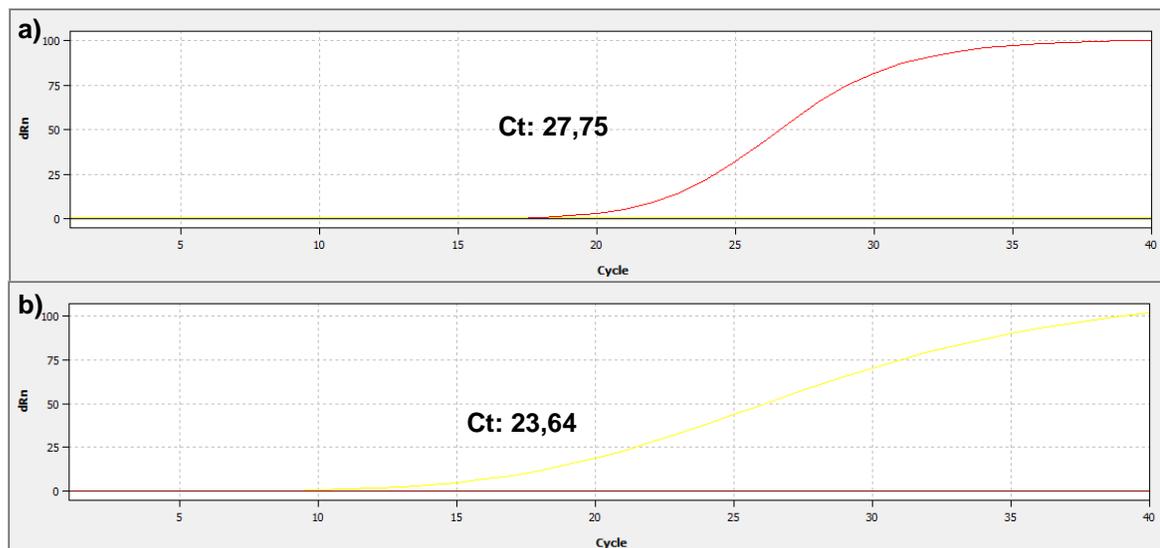
Anexo 1. Resultados de la transformación de las bacterias *E. coli* BL21 con el plásmido que se creía era *PirA*-pET-32a(+) pero en realidad era pGEM-T easy que contiene la secuencia del gen *PirA*. a) Cultivo que contiene el gen *PirA*. b) Control negativo (LB sin ampicilina) c) Control positivo (puc19). d) Control positivo (bacterias *E. coli* JM109 que contienen el gen *PirA*).



Anexo 2. Reacciones químicas para la formación del color azul con el sustrato X-Gal y la β -galactosidasa. Tomado de Julin (2018).



Anexo 3. Gráficos de amplificación de las colonias positivas para la secuencia de *PirA* mediante qPCR de las bacterias *E. coli* JM109 transformadas supuestamente con el plásmido pET-32a(+).(+) pero que poseían en realidad el vector pGEM-T easy. a) Colonia 5. b) Colonia 3.



Anexo 3. Gráficos de amplificación de las colonias positivas para la secuencia de *PirA* mediante qPCR de las bacterias *E. coli* JM109 transformadas supuestamente con el plásmido pET-32a(+).(+) pero que poseían en realidad el vector pGEM-T easy. a) Colonia 5. b) Colonia 3.