

Clonación del gen del patógeno *Vibrio parahaemolyticus* para su posible producción como vacuna en plantas

Hassian León, Carlos Angulo

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR), Grupo de Inmunología y Vacunología. angulo@cibnor.mx

Biotecnología y Ciencias Agropecuarias

Abstract

The appearance of multidrug-resistant strains of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood has given rise to the generation of recombinant vaccines through genetic engineering as an alternative. The objective was to generate a genetic construct that expressed a protein to produce a vaccine against *V. parahaemolyticus*. The gene Vp was ligated to the pBi121 vector, generating a pBi121::genVp construct that was cloned into *Escherichia coli* and subsequently into *Agrobacterium tumefaciens*. Positive clones were confirmed by endpoint PCR with a 1,100 bp amplicon. In conclusion, the genetic construct pBi121::genVp was correctly generated and transferred to *A. tumefaciens*. Therefore, its use in plants is proposed to produce the protein and evaluate its immunogenicity in an animal model.

Keywords: vaccine design, enteric pathogen, recombinant protein.

Resumen

La aparición de cepas multiresistentes de *Vibrio parahaemolyticus* en alimentos marinos ha dado como alternativa la generación de vacunas recombinantes mediante ingeniería genética. El objetivo fue generar una construcción genética que expresara una proteína para producir una vacuna contra *V. parahaemolyticus*. El gen Vp se ligó al plásmido pBi121, generando una construcción pBi121::genVp que se clonó en *Escherichia coli* y posteriormente en *Agrobacterium tumefaciens*. La clonación positiva se confirmó mediante PCR de punto final con un amplicón de 1,100 pb. En conclusión, la construcción genética pBi121::genVp fue generada y transferida correctamente a *A. tumefaciens*. Por lo que se propone su uso en plantas para producir la proteína y evaluar su inmunogenicidad en un modelo animal.

Palabras clave: diseño de vacunas, patógeno entérico, proteína recombinante.

Problemática

La vibriosis en peces, crustáceos y moluscos, o la gastroenteritis en humanos, es una problemática de salud causada principalmente por el patógeno *Vibrio parahaemolyticus*.

Usuarios

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER), Secretaría de Salud, Industria acuícola.

Introducción

Los peces y mariscos son consumidos en el mundo. (Parlapani, 2021). Sin embargo, estos alimentos pueden contaminarse con patógenos, entre los que destaca *Vibrio parahaemolyticus* (Letchumanan et al., 2019). Esta bacteria produce toxinas hemolisina directa termostable (TDH), hemolisina relacionada con TDH (TRH) y la proteína TLH que provocan vómito, diarrea aguda y hasta la muerte (Hong et al., 2018). Estudios recientes demuestran que existen alternativas contra *V. parahaemolyticus*, entre ellas la vacunación (Mdarhri et al., 2022; Ji et al., 2020). Las vacunas recombinantes son una alternativa actual para el tratamiento de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Estas vacunas se producen mediante ingeniería genética, que consiste en una construcción elaborada con ADN circular (plásmido) y un gen que expresa una proteína con la capacidad de estimular el sistema inmune (Daniali et al., 2024). En su producción comúnmente se utiliza el plásmido pBi121, que emplea la maquinaria genética de células vegetales para la producción de la vacuna recombinante (Monreal-Escalante et al., 2019).



Figura 1. Los 8 pasos generar una construcción genética. Paso 1: replicación de pUC57::gen_Vp. Paso 2: extracción por lisis alcalina. Paso 3: liberar el gen_Vp y abrir el plásmido pBi121 con enzimas. Paso 4: ligar el gen_Vp con el plásmido pBi121. Paso 5: transferir pBi121::gen_Vp a *E.coli* por choque térmico. Paso 6: confirmar la transferencia por PCR punto final. Paso 7: transferir pBi121::gen_Vp a *A. tumefaciens* mediante electroporación. Paso 8: infectar plantas *A. tumefaciens* con pBi121::gen_Vp

Objetivos

Generar la construcción genética (pBi121::genVp) que codifique para un antígeno compuesto de los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* para su posible expresión en plantas.

Materiales y Métodos

Dos cultivos independientes de *Escherichia coli* TOP 10, que contenían las construcciones pUC57::gen_VP y el plásmido pBi121, respectivamente, se propagaron en medio LB con kanamicina 50 mg/L durante 2 días a 37 °C. Posteriormente, la extracción de ADN plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 1989). A continuación, la digestión enzimática del plásmido pUC57 se realizó a 37 °C durante 20 minutos con SmaI-SacI para abrir el plásmido y liberar el "gen_VP" (Monreal-Escalante et al., 2019). Los productos de la digestión fueron separados en una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 75 V por 40 minutos, donde las bandas cortadas se purificaron conforme al kit QIAEX II Gel Extraction (QIAGEN®) y los productos se resguardaron a -20 °C. La reacción de ligación con la enzima T4 ADN ligasa se llevó a cabo durante 24 horas a 4 °C, uniendo el gen_VP con el plásmido pBi121 para generar la construcción pBi121::gen_VP (Villegas, 2023).

Para replicar la construcción genética pBi121::gen_VP, células de *E.coli* TOP10 (Invitrogen® C404003TM) se transformaron mediante el método de choque térmico, sembrando las células en medio LB con kanamicina a 50 mg/L e incubándolas a 37 °C durante 2 días. Posteriormente, se extrajo la construcción genética por un método alcalino, seguido de una PCR de punto final para confirmar la presencia del gen_VP (Sambrook et al., 1989). A continuación, la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* GV-3101 con la construcción pBi121::gen_VP se realizó por electroporación a 1.8 V, sembrando las células en medio YM con kanamicina a 50 mg/L e incubándolas a 28 °C durante 4 días. Finalmente, se realizó otra extracción alcalina de la construcción genética y posteriormente una PCR de punto final para confirmar las clonas positivas (Monreal-Escalante et al., 2019) (Figura 1).

Resultados y Discusión

Con la liberación del gen_VP del plásmido comercial pUC57 (Figura. 2) y su inserción en el plásmido pBi121 se generó la construcción pBi121::gen_VP. La construcción genética se clonó en *E.coli* para replicarla y así obtener suficientes copias; para posteriormente clonarla en *A. tumefaciens*; y

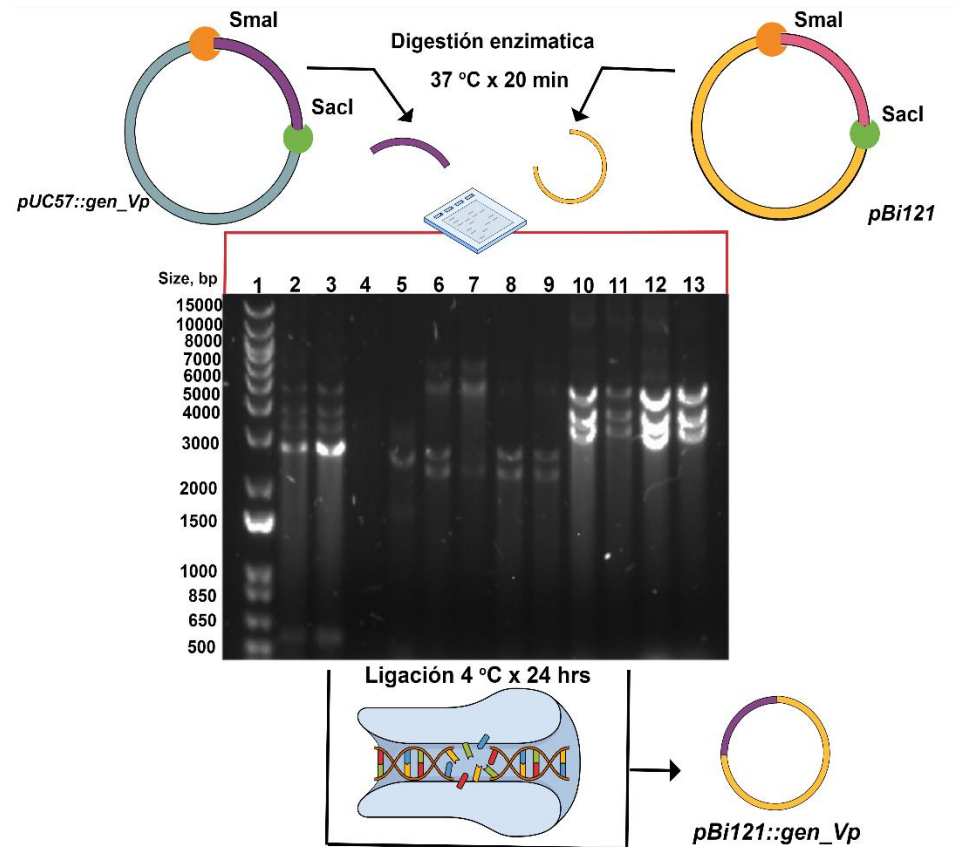


Figura 2. Perfil de restricción del pUC57::gen_Vp y de pBi121. Carril 1: marcador 1 kb plus. Carriles 3-6: liberación del gen Vp de 2,300 pb. Carriles 7-10: apertura del plásmido pBi121 con un tamaño de 12,000 pb.

finalmente confirmar las clonas positivas mediante PCR de punto final, obteniendo como resultado en ambos casos un amplicón de 1,100 pb (Figura. 3). La construcción genética pBi121::gen_VP se elaboró con el propósito posterior de utilizarla para la transformación de plantas, ya que las células vegetales son utilizadas como plataforma para la expresión de proteínas recombinantes en la producción de vacunas orales (Monreal-Escalante et al., 2019).

Conclusiones

La construcción genética pBi121::gen_VP se generó con base en un gen de un antígeno compuesto de los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus*, que fue posible clonar en *E. coli* y en *A. tumefaciens* para su uso en la transformación genética de plantas para la expresión de la vacuna recombinante.

Impacto Socioeconómico

La generación de vacunas contra la vibriosis en peces, crustáceos y moluscos, o la gastroenteritis en humanos, es una alternativa para combatir los daños que causa el patógeno *Vibrio parahaemolyticus* en la producción de alimentos para el consumo humano. Además, la producción de vacunas recombinantes en plantas con el propósito de su administración oral probablemente tendría un impacto mayor porque se ha justificado por su bajo costo, fácil distribución, sencilla administración y potencial estabilidad funcional a temperatura ambiente.



Contacto PCTI:
hnlascosoria@gmail.com

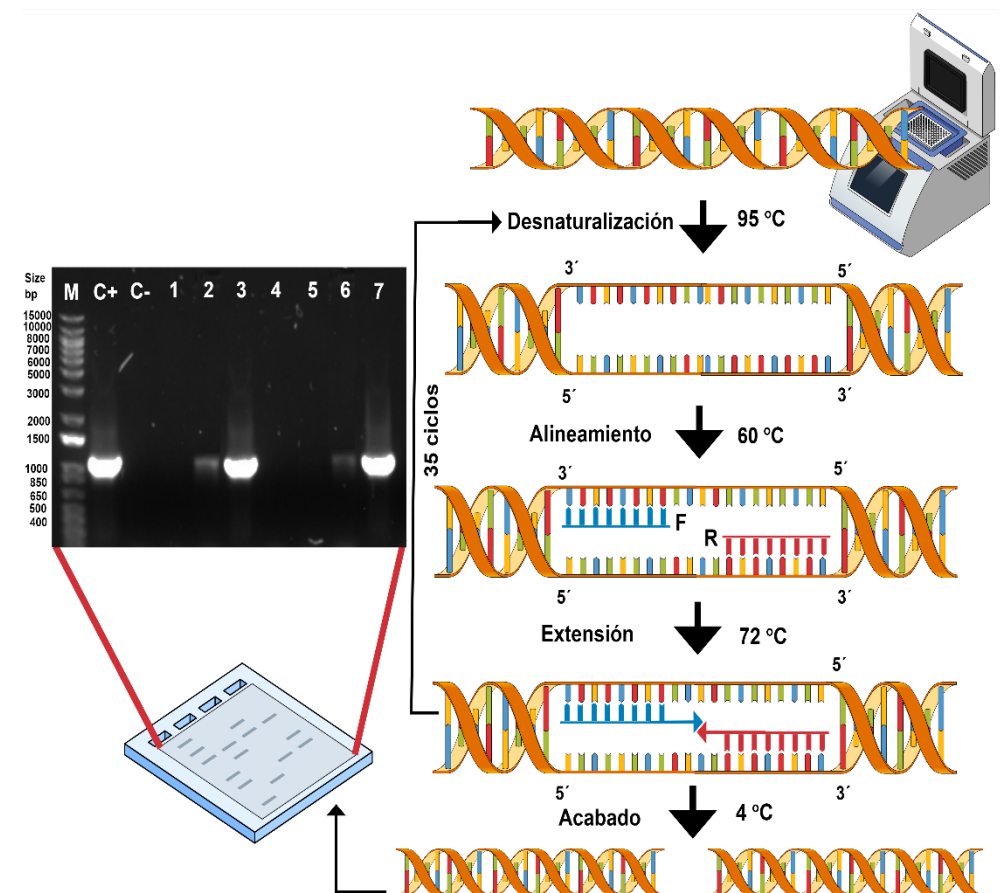


Figura 3. Producto de PCR de clonas de *E. coli* TOP10. Carril M: marcador de peso molecular 1 kb plus. Carril C+: control positivo. Carril C-: control negativo. Carriles 2, 3, 6 y 7: amplicon 1,100 pb del gen_VP.