

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biotecnología

**“PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA SPIKE DE
SARS-CoV-2.”**

**TESIS PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGÍA**

Presenta: L.F Shawa Verónica Montes Helguera

Matrícula: 2241800280

Correo personal: Shawahelguera@Gmail.com

Director: Dr. Armando Mejía Álvarez

Asesora: Dra. Fernanda Jocely Calderón De la Sancha

Lector: Dr. Ulises Carrasco Navarro

Ciudad de México, 21 de Mayo del 2025

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Dr. Armando Mejía por permitirme formar parte de su grupo de investigación, incluso sin pertenecer a su institución desde la Licenciatura. Esta oportunidad marcó una diferencia significativa en mi experiencia.

A mami Dra. Fer, gracias por estar siempre ahí. Por conseguirme el material cuando más lo necesitaba, por explicarme con paciencia y, sobre todo, por ese apoyo que fue mucho más allá del trabajo en el laboratorio. Tu calidez, tu trato siempre tan humano y tu forma de estar presente hicieron toda la diferencia. No sé qué hubiera hecho sin ti.

Al Dr. Ulises, gracias sinceras por su apoyo y generosidad. Su disposición para donarme material y acompañarme en este proceso, aún desde su rol como lector, fue invaluable. Su interés genuino por el crecimiento de sus estudiantes y su compromiso constante marcaron una gran diferencia en el desarrollo de esta tesis.

Para mi mamá Guillermina, que siempre me dio alas y el valor para volar tras mis sueños. Para mi papá Sergio, que me enseñó a pelear por lo que quiero y a no rendirme. Gracias a los dos, por ser el hogar, la guía y el amor incondicional.

Para Sharon, quien es un farolito en mi vida, que aunque brilla con su propia luz, no ilumina solo para sí misma, sino que también es una fuente de luz para mí, ofreciéndome su apoyo incondicional y guiándome en momentos de incertidumbre. DGBT.

A mis compañeras de laboratorio Monse y Diana, gracias por su compañerismo sincero y por hacerme sentir parte desde el primer día, sin importar que viniera de otra universidad. Nunca hubo trato diferenciado, solo apoyo genuino, respeto y muchas pláticas que hicieron los días en el laboratorio más ligeros e inolvidables. Compartir este proceso con ustedes fue un verdadero regalo.

A Isa, mi querida cosa 2, compañera de aventura, de risas y de porras tanto cuando todo salía bien como cuando el experimento decidía no cooperar. En este camino encontré en ti a una nueva hermanita, con un corazón enorme y una humildad que admiro profundamente. Gracias por estar en cada paso, por hacer de este proceso algo más bonito y llevadero.

Tabla de contenido

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 La proteína Spike del SARS-CoV-2 y su relevancia estructural	9
1.1.1 N-glicosilación de la proteína S	9
1.1.2 O-glicosilación en la proteína Spike	10
1.2 Importancia de la glicosilación en el diseño de vacunas y terapias	10
1.3 Sistemas heterólogos de expresión y su impacto en la glicosilación	10
2. ANTECEDENTES	12
2.1 Purificación de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i>	12
2.2 Producción y purificación de la proteína Spike.....	12
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS.....	14
5. OBJETIVO GENERAL	14
6. OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
7. MATERIALES Y METODOS	14
7.1 MEDIOS DE CULTIVO	14
7.1.1 YPD	14
7.1.2 YP-Metanol.....	15
7.1.3 YPD- 2% Glicerol	15
7.2 CLONACIÓN Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN <i>P. pastoris</i> DE LA PROTEÍNA SPIKE DEL VIRUS SARS-COV-2.....	15
7.3 OBTENCIÓN DEL VECTOR PARA LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA SPIKE EN <i>P. pastoris</i>	16
7.4 TRANSFORMACIÓN DE <i>P. pastoris</i>	18
7.5 PRODUCCIÓN DE PROTEINA HETEROLOGA	18
7.6 EXTRACCIÓN DE PROTEINA HETEROLOGA	19
7.7 PRECIPITACIÓN DE PROTEINA HETEROLOGA	19
7.7.1 SOLUCIONES	19
7.7.1.1 Soluciones de acetona.	19
7.7.1.2 Solución al 20% TCA/Acetona.	19
7.7.1.3 Buffer de carga.....	20
7.7.2 ADICIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TCA/ACETONA A LA MUESTRA	20
7.7.3 CENTRIFUGACIÓN Y ELIMINACIÓN DEL SOBRENADANTE.....	20
7.7.4 ELIMINACIÓN FINAL DE ACETONA Y RESUSPENSIÓN DEL PELLET	20
7.8 ULTRA- FILTRACIÓN	21
7.8.1 Soluciones para la Ultra- Filtración	21
7.8.2 Centrifugación para la Ultra- Filtración.....	21

7.9 CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD	21
7.9.1 Preparación de la curva estándar	22
7.9.2 Preparación y lectura de muestras	22
8. PURIFICACIÓN DE LA PROTEINA HETERÓLOGA EN COLUMNA NI-NTA SUPERFLOW.....	22
8.1 SOLUCIONES	23
8.1.1 Buffer de elución desnaturizante	23
8.1.2 Buffer de fosfatos	23
8.1.3 Buffer de fosfatos/ Imidazol 1M	23
8.2 Procedimiento de purificación	24
9. LIOFILIZACIÓN.....	25
9.1 Congelación Inicial	25
9.2 Procedimiento de liofilización	25
9.2.1 Configuración del liofilizador	25
9.2.2 Carga de las muestras	25
9.2.3 Inicio del ciclo	25
9.3 Almacenamiento	26
10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	26
10.1 SOLUCIONES	26
10.1.1 SDS 10%.....	26
10.1.2 1.5M TRIS-HCl.....	26
10.1.3 0.5M TRIS-HCl.....	26
10.1.4 10x electrode (running)	27
10.1.4 Buffer de carga	27
10.1.5 20% Persulfato de Amonio	27
10.1.6 Solución fijadora	27
10.1.7 Azul de Comassie.....	27
10.2 PREPARACIÓN DE GELES	28
10.2.1 Gel separador 10%	28
10.2.2 Gel concentrador 5% 10X.....	28
10.3 Preparación de muestras.....	28
10.4 Ensamblaje del sistema y carga de la muestra	29
10.5 Tinción y destinción	29
11. RESULTADOS	30
11.1 VERIFICACIÓN DEL GEN S TRANSFORMANTE	30
11.2 ELECTROFORESIS DE TRANSFORMANTE C2.....	31
11.3 ELECTROFORESIS DE TRANSFORMANTE A16.....	32
11.4 ELECTROFORESIS DE TRANSFORMANTES ULTRAFILTRADAS.....	33
11.5 ELECTROFORESIS DE TRANSFORMANTES PURIFICADAS	34
12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	35
13. CONCLUSIÓN.....	37

Índice de figuras

Figura 1. Protocolo de clonación <i>In-Fusion</i>	16
Figura 2. Plásmido pcDNA3.1-SARS2-Spike	17
Figura 3. Vector pPicza-Spike	18
Figura 4 y 5. Purificación de proteína Spike con columna Ni-NTA	24
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%	30
Figura 7. SDS-PAGE de la expresión de la proteína Spike en la transformante C2 inducida a diferentes tiempos	31
Figura 8. SDS-PAGE de la expresión de la proteína Spike en la transformante A16 inducida a diferentes tiempos	32
Figura 9. SDS-PAGE de las proteínas las transformantes C2 y A16 ultrafiltradas con tubos Amicon Ultra	33
Figura 10. SDS-PAGE de la proteína Spike purificada mediante cromatografía de afinidad con columna Ni-NTA	34

Índice de Tablas

Tabla 1. Características básicas de diferentes sistemas heterólogos para la expresión de proteínas recombinantes	11
---	-----------

RESUMEN

La proteína Spike (S) del SARS-CoV-2 es un blanco clave para el desarrollo de vacunas, terapias y herramientas diagnósticas, debido a su papel fundamental en la entrada del virus a células humanas mediante la interacción con el receptor ACE2. Esta glicoproteína presenta modificaciones postraduccionales, como N- y O-glicosilaciones, que afectan su estructura, funcionalidad e inmunogenicidad. La correcta caracterización de estas modificaciones es esencial para aplicaciones biomédicas.

El sistema de expresión en *Pichia pastoris* se presenta como una alternativa eficiente y rentable para la producción de proteínas recombinantes, incluida la proteína completa. Se evaluó la expresión de la proteína Spike en transformantes de *P. pastoris*, confirmando la inserción del gen S por electroforesis en gel de agarosa (~3855 pb). El análisis por SDS-PAGE mostró bandas compatibles con el peso teórico de la proteína (~180 kDa), observándose expresión desde las 24 h post-inducción y alcanzando su máxima intensidad a las 72 h. En transformantes ultrafiltradas y purificadas mediante cromatografía de afinidad, se detectaron formas de mayor peso molecular (hasta ~200 kDa), atribuibles a glicosilación o agregación.

Los resultados confirman que *P. pastoris* permite la expresión eficiente de la proteína Spike completa. No obstante, el incremento en el peso molecular sugiere la presencia de hiperglicosilación, un fenómeno común en levaduras, lo cual podría impactar su funcionalidad y requerir estrategias adicionales de ingeniería del sistema de expresión. Este trabajo aporta evidencia experimental que respalda el potencial de *P. pastoris* como plataforma para la producción de antígenos recombinantes de interés terapéutico y diagnóstico frente al SARS-CoV-

ABSTRACT

The SARS-CoV-2 Spike (S) protein is a key target for the development of vaccines, therapies, and diagnostic tools due to its essential role in viral entry into human cells via interaction with the ACE2 receptor. This glycoprotein undergoes post-translational modifications, including N- and O-glycosylation, which influence its structure, function, and immunogenicity. Accurate characterization of these modifications is critical for biomedical applications.

The *Pichia pastoris* expression system offers an efficient and cost-effective platform for recombinant protein production, including the full-length Spike protein. In this study, expression of the Spike protein in *P. pastoris* transformants was evaluated. Integration of the S gene (~3855 bp) was confirmed by agarose gel electrophoresis. SDS-PAGE analysis revealed bands consistent with the theoretical molecular weight (~180 kDa), with protein expression observed as early as 24 h post-induction and peaking at 72 h. In ultrafiltered and affinity-purified samples, higher molecular weight forms (~200 kDa) were detected, likely due to glycosylation or aggregation.

These results confirm that *P. pastoris* enables efficient expression of the full-length Spike protein. However, the observed increase in molecular weight suggests hyperglycosylation, a common feature in yeast expression systems, which may impact protein functionality and necessitate further optimization strategies. This study provides experimental evidence supporting the potential of *P. pastoris* as a platform for the production of recombinant antigens for therapeutic and diagnostic applications against SARS-CoV-2.

1. INTRODUCCIÓN

La pandemia causada por el virus SARS-CoV-2 evidencia la importancia de comprender las estructuras moleculares y mecanismos de acción de este patógeno para el desarrollo de intervenciones eficaces. La proteína Spike (S), es una glicoproteína transmembrana presente en la superficie del virus SARS-CoV-2, desempeña un papel central en la infección viral y la respuesta inmune inducida por el virus. Esta proteína es la principal responsable de la entrada del virus en las células humanas, lo que la convierte en un objetivo clave para el desarrollo de vacunas, terapias y diagnósticos. Su estudio detallado es importante para avanzar en el control y mitigación de esta enfermedad (Zamorano C. et al., 2020).

La proteína S consta de dos subunidades funcionales: S1, que contiene el dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés), y S2, que está involucrada en la fusión de la membrana del virus con la célula hospedadora. Específicamente, la unión del RBD con la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de las células humanas es el paso inicial en la infección viral. Esta interacción activa cambios conformacionales en la proteína S que permiten la fusión de membranas, un proceso que es esencial para la entrada del genoma viral al citoplasma (Jackson et al., 2021).

Desde el inicio de la pandemia, la investigación en torno a la proteína S ha facilitado el desarrollo de vacunas basadas en diferentes plataformas, como ARN mensajero, vectores virales y subunidades proteicas. Estas vacunas aprovechan la capacidad de la proteína S para generar una respuesta inmune robusta, induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la región RBD, lo que impide la unión con el receptor ACE2. Además, estudios estructurales han permitido identificar regiones conservadas que son altamente inmunogénicas, lo que ha sido clave para mejorar las estrategias de diseño vacunal (Huang, Y et al., 2020).

Además de su relevancia en el desarrollo de vacunas, la proteína S es un blanco terapéutico central en la creación de anticuerpos monoclonales, pequeñas moléculas inhibidoras y otras estrategias antivirales. Su alta variabilidad genética y el surgimiento de mutaciones en su región RBD han representado desafíos adicionales, ya que pueden influir en la infectividad, eficacia de las vacunas y las terapias. La caracterización precisa de la proteína S y sus

mutantes en diferentes contextos epidemiológicos es relevante para diseñar estrategias más eficaces (Datta, P et al., 2020).

Por otra parte, las investigaciones en biotecnología han avanzado en la producción y purificación de la proteína S en sistemas expresión heterólogos. Estas herramientas permiten obtener proteínas con alto grado de pureza y funcionalidad, facilitando estudios estructurales, funcionales y el desarrollo de ensayos inmunológicos de alta especificidad. Estas estrategias han resultado cruciales para entender mejor la interacción entre la proteína S y ACE2, así como para probar candidatos terapéuticos con mayor precisión (Xia, X. et al., 2021).

1.1 La proteína Spike del SARS-CoV-2 y su relevancia estructural

La proteína S del SARS-CoV-2 tiene un peso molecular aproximado de 180 kDa en su forma no modificada, es decir, sin modificaciones postraduccionales como la glicosilación. Esta proteína es el principal factor mediador de la entrada del virus en las células huésped. Es una glicoproteína trimérica que se encuentra densamente modificada con cadenas de carbohidratos (glicanos) unidas en sus sitios de N-glicosilación y, en menor medida, O-glicosilación. Cuando la proteína S está glicosilada, su peso molecular aumenta debido a la adición de estos carbohidratos, lo que puede hacer que supere los 200 kDa, dependiendo de la cantidad y el tipo de azúcares añadidos (Yang et al., 2021).

La glicosilación afecta tanto la estructura tridimensional de la proteína como su funcionalidad. Los glicanos desempeñan un papel fundamental en la estabilidad estructural de la proteína, la inmunoevasión del virus y las interacciones con el receptor ACE2 en las células huésped. Estos glicanos pueden actuar como una capa protectora que impide el reconocimiento del sistema inmune, un fenómeno conocido como "escudo glicano" (Watanabe et al., 2020). Además, las modificaciones glicosídicas tienen un impacto significativo en la funcionalidad y eficacia de las proteínas recombinantes producidas en sistemas heterólogos, lo que es relevante para el desarrollo de vacunas y terapias basadas en la proteína S.

1.1.1 N-glicosilación de la proteína S

La N-glicosilación es el principal tipo de modificación en la proteína S. Se han identificado al menos 22 potenciales sitios de N-glicosilación a lo largo de su secuencia. Estos glicanos

N-unidos pueden ser de tipo complejo o tipo oligomanosa, dependiendo del entorno celular y del sistema de producción utilizado. Otros estudios de espectrometría de masas han demostrado que la diversidad en los patrones de glicosilación puede influir en la presentación antigénica de la proteína, afectando tanto la unión al receptor ACE2 como el diseño de inmunógenos eficaces (Grant et al., 2020). La caracterización exhaustiva de los perfiles de glicosilación resulta fundamental para la optimización de la producción de proteínas Spike recombinantes destinadas a aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.

1.1.2 O-glicosilación en la proteína Spike

Aunque menos estudiada que la N-glicosilación, la O-glicosilación también se ha identificado en la proteína Spike, con posibles ubicaciones en regiones como el dominio N-terminal (NTD) y los bucles cercanos a los sitios de escisión por furina. La O-glicosilación podría desempeñar un papel importante en la modulación de las interacciones virus-receptor y en la estabilidad de la proteína durante procesos como la entrada viral y la fusión de membranas. Además, estos glicanos podrían contribuir al "escudo glicano", complicando aún más el reconocimiento por anticuerpos y células inmunitarias, lo que refuerza la necesidad de su estudio en sistemas de producción recombinante (Shajahan et al., 2021).

1.2 Importancia de la glicosilación en el diseño de vacunas y terapias

El estudio de la glicosilación en la proteína Spike no solo es relevante para entender la biología del SARS-CoV-2, sino también para mejorar las estrategias de intervención. Vacunas basadas en la proteína Spike recombinante, como las desarrolladas por Novavax, se benefician de una glicosilación adecuada para replicar la conformación nativa de la proteína viral y garantizar su eficacia. Si no son controladas, las modificaciones en los patrones de glicosilación, , pueden reducir la inmunogenicidad de la proteína o alterar sus propiedades bioquímicas (Harvey et al., 2021). Por tanto, la optimización de los procesos de producción y purificación que preserven o mejoren la glicosilación adecuada es crítica en este campo.

1.3 Sistemas heterólogos de expresión y su impacto en la glicosilación

La glicosilación de la proteína Spike puede variar significativamente dependiendo del sistema heterólogo de expresión utilizado. Sistemas como células de mamíferos (CHO y HEK293) son capaces de realizar modificaciones postraduccionales complejas, incluyendo

la glicosilación de tipo N y O, que son esenciales para la actividad biológica, estabilidad y solubilidad de las proteínas. Estas células producen glicanos complejos y ramificados similares a los humanos, lo que es fundamental para la producción de proteínas terapéuticas. Sin embargo, el cultivo de células de mamífero suele ser costoso y requiere condiciones de crecimiento estrictas (Karbalaei, M et al., 2020).

Por otro lado, las bacterias, como *Escherichia coli*, son sistemas de expresión populares debido a su rápido crecimiento y facilidad de manipulación genética. No obstante, carecen de los mecanismos celulares para realizar modificaciones postraduccionales, lo que limita su uso en la producción de proteínas que requieren estas modificaciones para su correcta función (Weinacker, D et al., 2013).

Pichia pastoris, una levadura metilotrófica, se destaca como un sistema de expresión que combina características de procariotas y eucariotas. Ofrece un crecimiento rápido y la capacidad de alcanzar altas densidades celulares en medios de cultivo económicos. Además, dispone de los mecanismos bioquímicos necesarios para realizar glicosilaciones de tipo N y O. A diferencia de otras levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *P. pastoris* produce glicanos de menor tamaño y evita enlaces α -1,3 en las manosas terminales, reduciendo la antigenicidad en aplicaciones terapéuticas. Estas características hacen de *P. pastoris* una opción atractiva para la producción de proteínas recombinantes con patrones de glicosilación similares a los humanos (Karbalaei, M et al., 2020).

Tabla 1. Características básicas de diferentes sistemas heterólogos para la expresión de proteínas recombinantes

Características	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Células CHO
Tiempo de duplicación	30 min	60–120 min	24 h
Costo del medio de cultivo	Bajo	Bajo	Alto
Complejidad del medio de cultivo	Mínimo	Mínimo	Complejo
Nivel de expresión	Alto	Bajo a alto	Bajo a moderado
Mecanismos de secreción	Secreción hacia el periplasma	Secreción hacia el medio	Secreción hacia el medio
Plegamiento de proteínas	Suele ser necesario volver a plegar	Suele ser necesario volver a plegar	Plegamiento correcto
N-glicosilación	No	Alto contenido de manosa	Complejo
O-glicosilación	No	Si	Si

Fosforilación y acetilación	No	Si	Si
Desventajas	Acumulación de LPS	Sesgo de codón	Contaminación con virus animales
Abreviaturas: CHO, ovario de hámster chino; LPS, lipopolisacárido.			

2. ANTECEDENTES

2.1 Purificación de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

La purificación de proteínas recombinantes expresadas en *P. pastoris* emplea diversos protocolos cromatográficos. Entre ellos, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de intercambio iónico y la cromatografía en fase reversa, son técnicas comúnmente utilizadas para aislar proteínas de interés con alta pureza y actividad biológica. Por ejemplo, Tolner et al, (2012) describen un sistema de cultivo de *P. pastoris* para la generación y purificación de proteínas recombinantes, donde las proteínas secretadas con etiquetas de histidina (6X-His) se purifican del cultivo mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC).

La fusión de proteínas de interés con etiquetas como 6X-His, facilita su purificación eficiente mediante cromatografía de afinidad. Chen et al. (2014) optimizaron la expresión en *P. pastoris* para eliminar contaminantes proteicos comunes en la purificación posterior de proteínas con 6X-His, mejorando la eficiencia del proceso.

El sistema de expresión en *P. pastoris* permite una alta producción de proteínas recombinantes, lo que facilita la obtención de cantidades suficientes para estudios estructurales, diagnósticos y producción de vacunas. Haon et al. (2015) establecieron una plataforma de producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*, destacando su capacidad para producir enzimas fúngicas en cantidades adecuadas para aplicaciones industriales y de investigación.

2.2 Producción y purificación de la proteína Spike

El proceso de purificación de proteínas es una herramienta esencial para la comprensión de las funciones moleculares y estructurales de las biomoléculas. En el caso de la proteína Spike del SARS-CoV-2, la purificación ha permitido avanzar en estudios que abordan su estructura tridimensional, interacciones moleculares y potenciales aplicaciones en la ciencia biomédica, especialmente en la creación de vacunas y terapias antivirales.

Un estudio realizado por Chen et al. (2020) logró expresar y purificar la proteína Spike del SARS-CoV-2 en *P. pastoris*. Los investigadores clonaron el gen que codifica la subunidad S1 de la proteína Spike en un vector de expresión específico para *P. pastoris*, logrando una expresión eficiente. La proteína recombinante se purificó utilizando cromatografía de afinidad y se confirmó su identidad mediante análisis de Western blot. Este enfoque demostró ser efectivo para producir cantidades significativas de la proteína Spike con alta pureza.

Otro estudio llevado a cabo por Zhang et al. (2021) exploró la expresión de la proteína Spike en *S. cerevisiae*. Los autores diseñaron una construcción genética que permitió la secreción de la proteína Spike en el medio de cultivo. Tras la expresión, la proteína se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico y se evaluó su actividad biológica. Los resultados indicaron que la proteína Spike producida en *S. cerevisiae* mantenía su capacidad de unirse al receptor ACE2, sugiriendo su potencial para aplicaciones en estudios de interacción proteína-receptor y en el desarrollo de vacunas.

Además, Li et al. (2022) investigaron la expresión de una versión truncada de la proteína Spike en *P. pastoris*. Eliminando la región transmembrana, logrando una expresión soluble de la proteína en el espacio periplásmico de la levadura. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad y filtración en gel, obteniendo una proteína de alta pureza y funcionalidad. Este método facilitó la producción de antígenos para pruebas serológicas y estudios estructurales.

Estos estudios destacan la viabilidad de utilizar sistemas de expresión en levaduras para la producción y purificación de la proteína Spike del SARS-CoV-2. Las metodologías empleadas proporcionan una base sólida para futuras investigaciones y aplicaciones biotecnológicas relacionadas con esta proteína viral.

3. JUSTIFICACIÓN

La proteína Spike del SARS-CoV-2 facilita la interacción del virus con las células huésped, por lo que obtenerla en su forma purificada permite utilizarla en estudios estructurales, diagnósticos, en la producción de antígenos y desarrollo de fármacos. Los sistemas de expresión como *P. pastoris* ofrecen ventajas como una producción eficiente y la capacidad de obtener proteínas con modificaciones postraduccionales necesarias para su funcionalidad. Obtener la proteína Spike pura y funcional es importante para que el diseño de tratamientos inmunológicos, como anticuerpos monoclonales, plataformas de vacunación basadas en proteínas recombinantes y diseño de fármacos garantice su

efectividad frente al virus completo. Asimismo, contar con una fuente estable de proteína purificada facilita y potencia la investigación sin el riesgo de la exposición al virus.

4. HIPÓTESIS

- Es posible la producción heteróloga de la proteína Spike nativa glicosilada de SARS-CoV-2 en *Pichia pastoris*.

5. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar a la levadura *P. pastoris* como sistema de expresión para producir la proteína Spike del SARS-CoV-2

6. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Diseñar un vector de clonación para la expresión de la proteína S del SARS-CoV-2 en *P. pastoris*.
- Seleccionar transformantes de *P. pastoris* con el vector ...
- Inducir la expresión de la proteína Spike en la transformante seleccionada.
- Purificar la proteína Spike de *P. pastoris* mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel (Ni-NTA), aprovechando su etiqueta de histidina para obtener una proteína altamente purificada.
- Confirmar la presencia de la proteína Spike purificada utilizando SDS-PAGE, identificando su peso molecular esperado y comparando con un marcador de peso molecular estándar.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 MEDIOS DE CULTIVO

7.1.1 YPD

Para mantenimiento y crecimiento de *P. pastoris*. Para medio sólido se añade agar bacteriológico a una concentración de 20g/L, se esteriliza por autoclave 20 min a 120 °C, una vez estéril se añade en campana 10% de D10X (Dextrosa 200 g/L filtrada por membrana de 0.22 µm).

Extracto de levadura (BD Bioxon)	10 g
Bactopeptona (Gibco)	20 g
Agua destilada	900 mL

7.1.2 YP-Metanol

Para inducir la expresión de proteínas heterólogas en *Pichia pastoris*, se esteriliza por autoclave a 120 °C durante 20 min. Una vez esterilizado y enfriado a temperatura ambiente, en condiciones de esterilidad, se añade 1% de metanol puro justo antes de la inoculación. El metanol se utiliza como fuente de carbono y como inductor de la expresión de genes bajo el control del promotor AOX1, el cual se activa en presencia de este compuesto.

Extracto de levadura (BD Bioxon)	10 g
Bactopeptona (Gibco)	20 g
Agua destilada	990 mL

7.1.3 YPD- 2% Glicerol

Para crecimiento celular de transformantes de *Pichia pastoris*. Se esteriliza por autoclave 20 minutos a 120 °C, una vez estéril se añade en campana 10% de D10X.

Extracto de levadura (BD Bioxon)	10 g
Bactopeptona (Gibco)	20 g
Glicerol (Karal)	20 mL
Agua destilada	900mL

7.2 CLONACIÓN Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA EN *P. pastoris* DE LA PROTEÍNA SPIKE DEL VIRUS SARS-COV-2.

Se empleó el plásmido pPICZ-A α , un vector de expresión de 3.6 kb utilizado para expresar proteínas recombinantes en *P. pastoris* cepa x33 lvtrogen. Las proteínas se expresaron como fusiones a un péptido C-terminal que contenía el epítipo c-Myc y una cola de polihistidinas (6xHis), también denominada His-tag. Este vector permite un alto nivel de expresión del gen de interés gracias a la presencia del promotor AOX1, inducible por metanol.

7.3 OBTENCIÓN DEL VECTOR PARA LA PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA PROTEÍNA SPIKE EN *P. pastoris*.

Para la construcción del vector de expresión de la proteína Spike en *P. pastoris* cepa x33 Ivitrogen, se empleó la tecnología “*In Fusion*” (ClonTech). Esta tecnología permite una clonación rápida, sencilla y precisa sin el uso de enzimas de restricción y ligasa, se puede clonar cualquier inserto en cualquier vector. En general esta técnica funciona mediante dos reacciones PCR, los productos resultantes ahora son fusionados mediante el reactivo del kit “*In Fusion*”, tal y como se muestra en la siguiente figura.

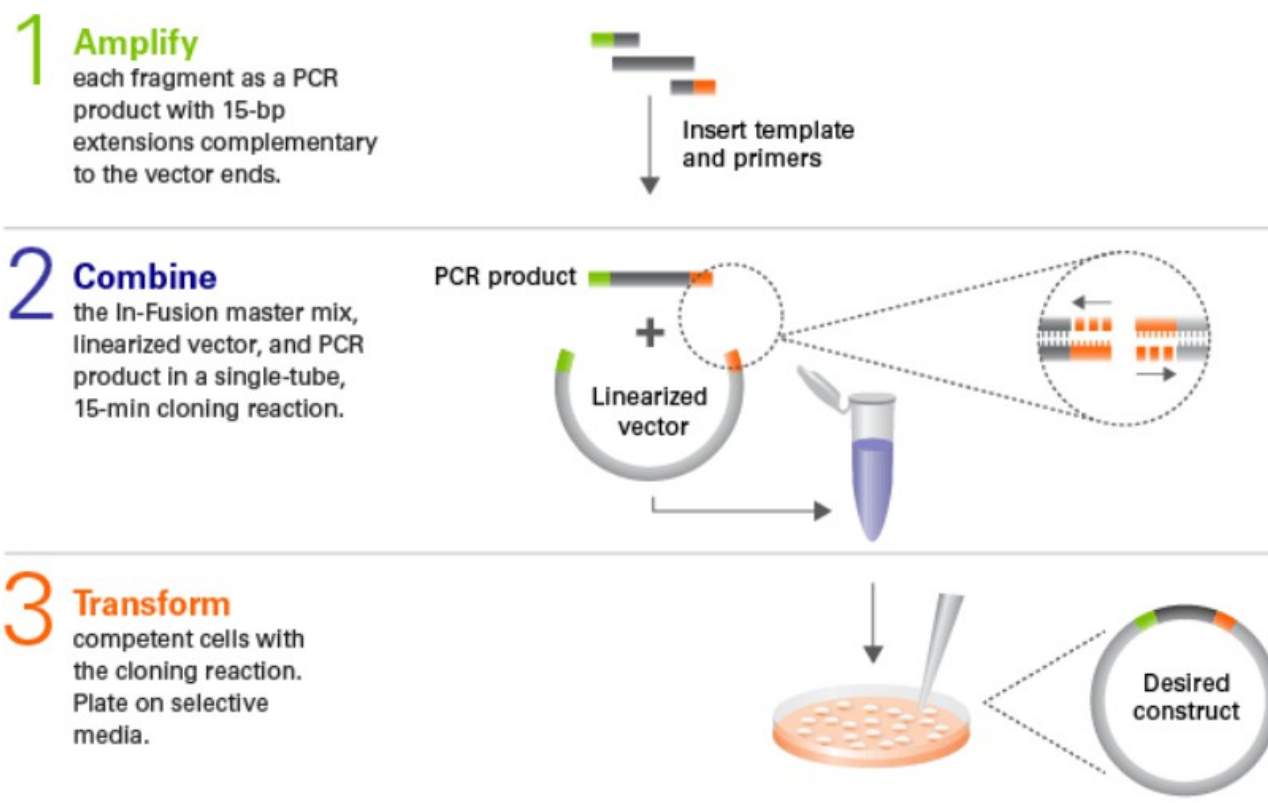


Figura 1. Protocolo de clonación *In-Fusion*. (<https://www.takarabio.com/services-and-support>)

Para la amplificación del gen s (Spike) se utilizó el plásmido pcDNA3.1-SARS2-Spike. Mediante la herramienta en línea “In-Fusion Cloning Primer Design Tool”.

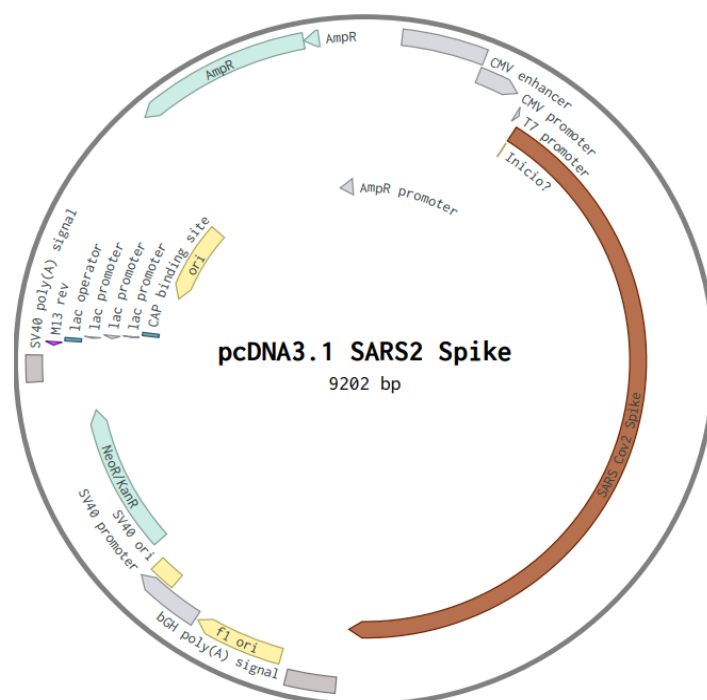


Figura 2. Plásmido pcDNA3.1-SARS2-Spike.

Luego de realizar las dos reacciones de PCR, los productos obtenidos (vector linealizado y gen *s*) fueron mezclados y combinados con el reactivo del kit “In Fusion”. El producto de reacción fue la construcción lista para clonar en *P. pastoris* cepa x33 Ivitrogen y lograr la producción de Spike. Este plásmido se nombró pPic α -Spike. Este vector se empleó para transformar *P. pastoris* cepa x33 Ivitrogen y purificar la proteína Spike. Además, la proteína Spike fue fusionada con el factor α de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que facilitó la secreción de la proteína Spike por parte de *P. pastoris*, así como su glicosilación.

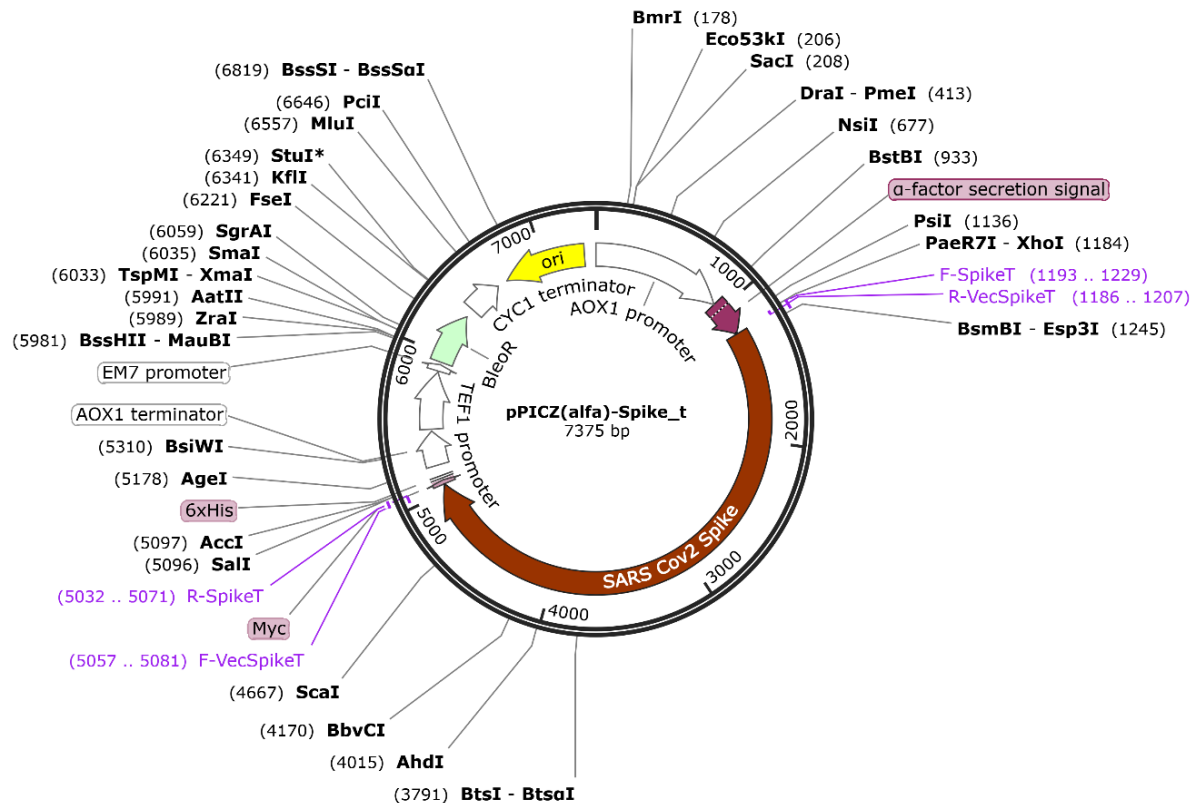


Figura 3. Vector pPicZ α -Spike.

7.4 TRANSFORMACIÓN DE *P. pastoris*.

Se mezclaron 1 μ L del vector pPicZ α -Spike con 40 μ L de células electrocompetentes de *P. pastoris* cepa x33 Ivitrogen en cubetas Gene-Pulser (BIO-RAD) de 0.2 cm, además de un control negativo con solo células electrocompetentes. La mezcla se incubó durante 5 min en hielo y, a continuación, se dio un pulso de 1500 kV de acuerdo al protocolo indicado por el fabricante (BioRad) para células de *P. pastoris* cepa x33 Ivitrogen. Inmediatamente después, se adicionó 1 mL de sorbitol 1 M frío y se incubó a 30°C durante una hora sin agitación. Una alícuota de 200 μ L se sembró en placas con agar YPD con una concentración de 50 μ g/mL de fleomicina, las cuales se incubaron a 30°C durante 72 a 96 h, hasta ver colonias seleccionables para posteriores análisis.

7.5 PRODUCCIÓN DE PROTEINA HETEROLOGA

A partir de 1 colonia de *Pichia pastoris* cepa x33 Ivitrogen transformada, que portaba el vector pPicZ α -Spike, se sembró un preinóculo de 50 mL de medio YPD con 2% de glicerol, incubando a 30 °C y 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 2–

6. Las células se recuperaron centrifugando a 5,000 rpm, a temperatura ambiente por 5 minutos. Se desechó el medio de cultivo y las células se resuspendieron suavemente en 50 mL de medio YP con 1% de metanol para la inducción de la expresión. Se incubó a 30 °C, 250 rpm por 72 h, añadiendo 1% de metanol en condiciones de esterilidad cada 24 h para compensar el metanol consumido y evaporado.

7.6 EXTRACCIÓN DE PROTEINA HETEROLOGA

En condiciones de esterilidad, se tomaron muestras de la inducción de la expresión de la proteína cada 24 h durante un total de 72 h para su posterior análisis mediante SDS-PAGE. Para ello, se extrajeron 15 mL de la suspensión celular en cada toma de muestra. Las células fueron centrifugadas a 5,000 rpm, a temperatura ambiente, durante 4 minutos. Posteriormente, se desechó el pellet y el sobrenadante se conservó en tubos Eppendorf nuevos. Las muestras de sobrenadante se almacenaron a 4°C hasta su análisis posterior. El volumen restante de la suspensión celular se reincubó, y se añadió 1% de metanol, ajustando la cantidad según el volumen total presente en el cultivo, para asegurar la inducción continua de la expresión de la proteína. Este proceso se repitió cada 24 horas hasta completar las 72 h de inducción.

7.7 PRECIPITACIÓN DE PROTEINA HETEROLOGA

La precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) y acetona es una técnica comúnmente utilizada para concentrar y purificar proteínas, especialmente cuando se requiere eliminar contaminantes o concentrar proteínas de muestras biológicas.

7.7.1 SOLUCIONES

7.7.1.1 Soluciones de acetona.

Acetona al 100% fría	500 mL
Acetona al 80% fría	500 mL

7.7.1.2 Solución al 20% TCA/Acetona.

Mantener la mezcla en hielo o a -20°C hasta su uso, ya que tanto el TCA como la acetona deben estar fríos para evitar la desnaturalización temprana de las proteínas.

TCA al 100% (Sigma- Aldrich)	8 g
Acetona al 100% fría	40 mL

7.7.1.3 Buffer de carga

Agua MilliQ	3.5 mL
0.5 M Tris-HCl (Sigma- Aldrich)	1.25 mL
Glicerol (Karal)	2.5 mL
10% SDS	2 mL

7.7.2 ADICIÓN DE LA SOLUCIÓN DE TCA/ACETONA A LA MUESTRA

Para precipitar las proteínas, se añadió un volumen equivalente de la solución 20% TCA/acetona a la muestra. Por ejemplo, se tenía 15 mL de muestra se añadió 15 mL de la solución 20% TCA/acetona, se almacenó la muestra -20°C durante toda la noche.

7.7.3 CENTRIFUGACIÓN Y ELIMINACIÓN DEL SOBRENADANTE

Se centrifugó la muestra con TCA/acetona a 2,000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante con cuidado, asegurándose de no perder el pellet proteico. Seguidamente, se agregó 5 mL de acetona al 100%, y se centrifugó nuevamente a 2,000 rpm durante 5 minutos. Después, se desechó la acetona y se añadió 5 mL de acetona al 100% para realizar una nueva centrifugación a 2,000 rpm durante 5 minutos. Tras esta centrifugación, se desechó nuevamente la acetona y se agregó 5 mL de acetona al 80%. La muestra se centrifugó a 2,000 rpm durante 5 min, luego se desechó la acetona y se añadió de nuevo 5 mL de acetona al 80%, para centrifugar una vez más a 2,000 rpm durante 5 min.

7.7.4 ELIMINACIÓN FINAL DE ACETONA Y RESUSPENSIÓN DEL PELLET

Después del último lavado con acetona, se desechó el sobrenadante de acetona con cuidado y se dejó el pellet al aire durante unos minutos para evaporar el exceso de acetona. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 5 mL de buffer de carga y se almacenó la muestra a 4°C para su posterior análisis.

7.8 ULTRA- FILTRACIÓN

La ultrafiltración es una técnica de separación que utiliza una membrana semipermeable para concentrar o desalinizar muestras de proteínas, eliminando pequeñas moléculas como sales, detergentes, o contaminantes, mientras retiene las macromoléculas de interés. Los tubos Amicon Ultra 30k son dispositivos con membranas de corte de 30 kDa que permiten este proceso de filtración para concentrar proteínas de mayor peso molecular (>30 kDa).

7.8.1 Soluciones para la Ultra- Filtración

Amortiguador de unión para ultra-filtración

NaCl – 500mM

Na₂HPO₄ – 50 mM

NaH₂PO₄ – 50 mM

NaCl (Meyer)	29.22 g
Na ₂ HPO ₄ (Karal)	7.098 g
NaH ₂ PO ₄ (J.T Baker)	5.99 g
Agua MilliQ	1000 mL
Ajustar el pH a 8.0 con NaOH y filtrar con membrana (0.2 o 0.45 µm).	

7.8.2 Centrifugación para la Ultra- Filtración

Se cargaron los tubos Amicon - Ultra de 15 ml con las muestras de la proteína. Luego, estos fueron centrifugados a 4000 rpm durante 30 min a 4°C. Después de este tiempo, se agregaron 10 ml de amortiguador de unión para ultra filtración a los tubos y se centrifugaron nuevamente durante 30 minutos a 4°C. Finalmente, se recolectaron las muestras presentes en la membrana con una micropipeta con la punta esterilizada y se vertió la muestra en tubos nuevos estériles de 1.5 mL. Las muestras se almacenaron a -20°C para sus posteriores análisis.

7.9 CUANTIFICACIÓN POR EL MÉTODO DE BRADFORD

El método de Bradford es una técnica colorimétrica basada en la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas. Este cambio genera una variación en la absorbancia que puede medirse en un espectrofotómetro.

7.9.1 Preparación de la curva estándar

Se realizó una curva estándar usando una solución de BSA (albúmina sérica bovina) diluida en una serie de concentraciones conocidas. En este caso, las concentraciones utilizadas fueron 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.8 mg/mL y 1 mg/mL.

Se realizaron dos curvas de calibración en las que la albúmina fue diluida en TRIS-HCl y en el buffer de fosfatos.

7.9.2 Preparación y lectura de muestras

Para la preparación de las muestras para la cuantificación, se utilizó el manual del reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo de ensayo en placa de 96 pocillos.

Se agregaron 5 μ L de muestra por triplicado en cada pocillo, y posteriormente se añadieron 125 μ L del reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich) a las muestras. Las muestras fueron resuspendidas utilizando una micropipeta con punta estéril durante 30 s. Asimismo, se preparó un blanco por triplicado con el buffer en el que se encontraba la proteína, empleando el mismo procedimiento que con las muestras.

Una vez resuspendidas, las muestras se dejaron reposar durante 15 min y se midió su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

Finalmente, se utilizó la ecuación de la recta obtenida de la curva estándar para calcular la concentración de proteínas en las muestras desconocidas.

8. PURIFICACIÓN DE LA PROTEINA HETERÓLOGA EN COLUMNA NI-NTA SUPERFLOW

La purificación de proteínas heterólogas, como la proteína Spike expresada en *P. pastoris*, mediante columnas de afinidad Ni-NTA (Nitrilotriacético Níquel), es una técnica común basada en la interacción entre los residuos de histidina presentes en las proteínas (por lo general en una etiqueta *His-tag* añadida a la secuencia de la proteína recombinante) y los iones de níquel inmovilizados en la matriz del medio.

8.1 SOLUCIONES

8.1.1 Buffer de elución desnaturizante

8M Urea (BioRad)	480.50 g
100 mM NaH ₂ PO ₄ (J.T Baker)	13.80 g
100 mM Tris-HCL (Sigma- Aldrich)	12.10 g
Agua MilliQ	1000 mL
Ajustar el pH a 4.5 con HCl y filtrar con membrana (0.2 o 0.45 µm).	

8.1.2 Buffer de fosfatos

NaCl (Meyer)	5.84 g
Na ₂ HPO ₄ (Karal)	1.41 g
NaH ₂ PO ₄ (J.T Baker)	1.19 g
Agua MilliQ	200 mL
Ajustar el pH a 8.0 con NaOH y filtrar con membrana (0.2 o 0.45 µm).	

8.1.3 Buffer de fosfatos/ Imidazol 1M

NaCl (Meyer)	2.92 g
Na ₂ HPO ₄ (Karal)	0.705 g
NaH ₂ PO ₄ (J.T Baker)	0.595 g
Imidazol (Merck)	6.80 g
Agua MilliQ	100 mL
Ajustar el pH a 8.0 con NaOH y filtrar con membrana (0.2 o 0.45 µm).	

Se realizaron diluciones de ambos buffer para obtener las siguientes soluciones con diferente concentracion de Imidazol: 0.1M, 0.2M, 0.3M, 0.4M, 0.5M, 0.6M, 0.75M, 0.9M

La purificación de la proteína Spike se realizó siguiendo el manual de la columna Ni-NTA Superflow (Qiagen), específicamente el protocolo para la purificación manual de proteínas etiquetadas con 6xHis utilizando una jeringa.

8.2 Procedimiento de purificación

Se equilibró la columna inyectando 30 mL de buffer de fosfatos, evitando la entrada de aire y asegurando un goteo lento. Posteriormente, se equilibró nuevamente con 15 mL de buffer de fosfatos con imidazol 0.1M, manteniendo las mismas condiciones para evitar la presencia de burbujas y asegurar un flujo constante.

Con una jeringa nueva, se cargó la muestra de proteína y se completó hasta el volumen máximo con buffer de fosfatos con imidazol 0.1M. La muestra se inyectó en la columna, recolectando las fracciones de proteína en tubos nuevos y esterilizados de 1.5 mL, en duplicado, asegurando un goteo lento y evitando la entrada de aire.

El proceso se repitió utilizando diferentes diluciones de buffer de fosfatos con imidazol en concentraciones de 0.2M a 1M, recolectando nuevamente las fracciones por duplicado en tubos nuevos y esterilizados.

Finalmente, una vez recolectadas todas las fracciones a diferentes concentraciones, se procedió al lavado de la columna con 30-50 mL de buffer de elución desnaturizante.

Las fracciones recolectadas se almacenaron a -80°C para sus posteriores análisis y la columna Ni-NTA se refrigeró a 4°C

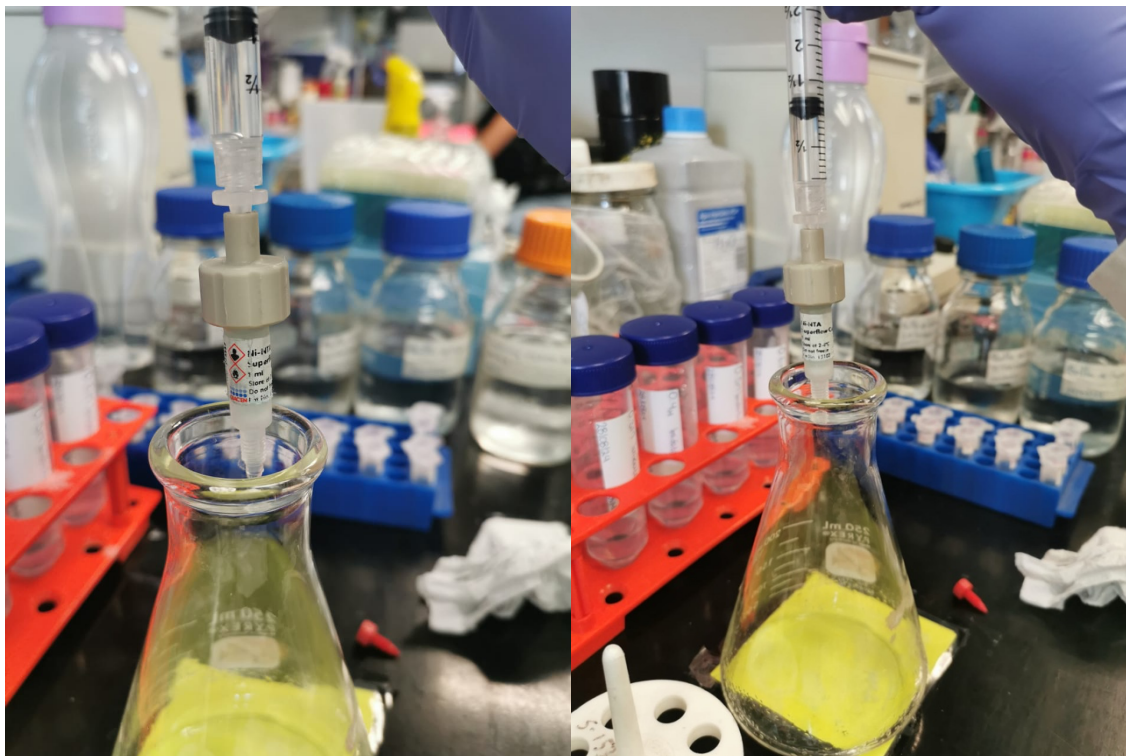


Figura 4 y 5. Purificación de proteína Spike con columna Ni-NTA

9. LIOFILIZACIÓN

La liofilización, también conocida como secado por congelación, es un método de deshidratación empleado para preservar materiales biológicos y concentrar proteínas en soluciones acuosas. Este proceso permite la eliminación de agua mediante sublimación directa del hielo en condiciones de vacío y bajas temperaturas, seguido de la eliminación del agua residual ligada por desorción. Es una técnica ampliamente utilizada en biotecnología debido a su capacidad para mantener la estabilidad estructural y funcional de las biomoléculas sensibles al calor y a condiciones químicas adversas.

En el presente trabajo, la liofilización se utilizó para concentrar y conservar las fracciones purificadas de la proteína *Spike* obtenidas mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel.

9.1 Congelación Inicial

Las muestras se congelaron a -80°C con un día de anticipación antes de proceder con la liofilización.

Las fracciones purificadas se dispensaron en un frasco de 750 mL con tapa de la marca Labconco, asegurando dejar suficiente espacio para permitir la expansión del volumen durante el proceso de congelamiento.

9.2 Procedimiento de liofilización

9.2.1 Configuración del liofilizador

El equipo se configuró ajustando el vacío y la temperatura de la cámara de acuerdo con el protocolo estándar. Se establecieron condiciones de presión inferiores a 0.1 mbar y temperaturas del condensador de -50°C o más bajas.

9.2.2 Carga de las muestras

Los viales congelados se transfirieron rápidamente al liofilizador para minimizar la descongelación. Se dispusieron de manera uniforme dentro de la cámara para asegurar una desecación homogénea.

9.2.3 Inicio del ciclo

El ciclo de liofilización se inició activando el equipo, permitiendo que las muestras pasaran por dos etapas:

Fase de sublimación primaria: Eliminación del agua en forma sólida (hielo).

Fase de desorción secundaria: Eliminación del agua residual ligada.

Este proceso se llevó a cabo durante un periodo de 8 horas.

9.3 Almacenamiento

Al finalizar la liofilización, los viales se sellaron herméticamente para prevenir la reabsorción de humedad. Las muestras liofilizadas se almacenaron a -80°C hasta su posterior uso en análisis de electroforesis.

10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

El SDS-PAGE es una técnica utilizada para analizar y separar proteínas según su tamaño molecular. Emplea dodecilsulfato de sodio (SDS) para desnaturalizar las proteínas y conferirles una carga negativa proporcional a su longitud. Durante la electroforesis, las proteínas migran a través de un gel de poliacrilamida, donde las más pequeñas avanzan más rápido. Es útil para evaluar la pureza de muestras, determinar el peso molecular aparente y confirmar la expresión de proteínas recombinantes. Es una herramienta fundamental en bioquímica y biotecnología por su precisión y versatilidad.

10.1 SOLUCIONES

10.1.1 SDS 10%

SDS (BioRad)	10g
Agua MilliQ	100mL
Filtrar con membrana (0.2 o 0.45 µm).	

10.1.2 1.5M TRIS-HCl

Tris Base (Merck)	27.23g
Agua MilliQ	100mL
Ajustar el pH a 8.8 con HCl y filtrar con membrana (0.2 o 0.45 µm).	

10.1.3 0.5M TRIS-HCl

Tris Base (Merck)	6g
Agua MilliQ	100mL
Ajustar el pH a 6.8 con HCl y filtrar con membrana (0.2 o 0.45 µm).	

10.1.4 10x electrode (running)

Tris base (Merck)	30.3g
Glicina (Merck)	144g
SDS (BioRad)	10g
Agua MilliQ	1000mL
Ajustar el pH a 8.3 con HCl y filtrar con membrana (0.2 o 0.45 μ m).	

10.1.4 Buffer de carga

0.5M Tris-HCl (Sigma- Aldrich)	1.25mL
Glicerol (Karal)	1.5mL
10% SDS (BioRad)	2.5mL
Azul de Bromofenol	2 μ L
Agua MilliQ	3.5mL

10.1.5 20% Persulfato de Amonio

Persulfato de Amonio (Bio Rad)	200mg
Agua MilliQ	1mL
Preparar esta solución el mismo día que se preparan los geles	

10.1.6 Solución fijadora

Etanol 40% (J.T Baker)	40mL
Ácido acético 10%	10mL
Agua destilada 50%	50mL

10.1.7 Azul de Comassie

Ácido Fosfórico (H ₃ PO ₄) 10% (J.T Baker)	100mL
Sulfato de Amonio (NH ₄) ₂ SO ₄ 10% (J.T Baker)	100mL
Metanol 20% (J.T Baker)	200mL
Comassie 0.12%p/v (BioRad)	1.2g
Agua MilliQ 60%	600mL

Para el sulfato de amonio primero se disuelven 100g de sulfato en 100mL de agua MilliQ.

La solución se deja en agitación todo un día.

10.2 PREPARACIÓN DE GELES

10.2.1 Gel separador 10%

	1X	2X
Agua MilliQ	3.4mL	6.7mL
1.5M Tris-HCl pH:8.8 (Sigma- Aldrich)	2.1mL	4.3mL
SDS 10% (BioRad)	85μL	170μL
Acrilamida/Bisacilamida (BioRad)	2.8mL	5.7mL
20% Persulfato de Amonio (BioRad)	42.5μL	85μL
TEMED (BioRad)	17μL	34μL

10.2.2 Gel concentrador 5% 10X

	1X	2X
Agua MilliQ	2.4mL	4.7mL
0.5M Tris-HCl pH:6.8 (Sigma-Aldrich)	443.7μL	887.3μL
SDS 10% (BioRad)	35μL	70μL
Acrilamida/Bisacilamida (BioRad)	582.8μL	1165.5μL
20% Persulfato de Amonio (BioRad)	17.5μL	35μL
TEMED	7μL	14μL

10.3 Preparación de muestras

Se preparó un sample buffer para muestras con 450 μL de sample buffer y 25 μL de β-mercaptoetanol.

Para el carril que contenía el marcador, se mezclaron en tubos de PCR 2 μL de marcador de peso molecular (Bio-Rad) y 5 μL del sample buffer y se cargo el volumen final de 7 μL en el gel.

Para las muestras de proteína, se tomaron los volúmenes calculados en la cuantificación de proteína y se ajustaron los volúmenes añadiendo la cantidad necesaria de sample buffer hasta alcanzar un total de 30 μL. Estas muestras se calentaron a 95 °C durante 4 minutos y los 30 μL se cargaron en el gel.

10.4 Ensamblaje del sistema y carga de la muestra

Se ensambló la celda de electroforesis, asegurándose de sellarla correctamente. Luego, se preparó un buffer de electrodos al 1x diluyendo 125 mL de solución 10x electrode (running) en 1125 mL de agua destilada. El buffer preparado se vertió completamente en la cámara de electroforesis. Posteriormente, se retiraron los peines de los geles y se cargaron las muestras en los pocillos correspondientes. Finalmente, se conectó la cámara a una fuente de poder y se aplicaron 100 V hasta que las muestras alcanzaron el final del gel.

10.5 Tinción y destinción

Los geles se sumergieron en solución fijadora y se dejaron en agitación durante 30 minutos. Luego, se enjuagaron con agua destilada hasta que desapareció el olor a ácido acético y se eliminaron los restos de SDS. Posteriormente, los geles se sumergieron en 30 mL de azul de Coomassie y se dejaron en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. Después, se enjuagaron con agua destilada hasta eliminar la mayor cantidad posible del color azul. Finalmente, el gel se reveló utilizando el equipo Gel-Doc EZ Imager (Bio-Rad).

11. RESULTADOS

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa (Figura 6) muestran bandas de aproximadamente 3855 pb, correspondientes al gen S de la proteína Spike. Se observó una amplificación exitosa en las muestras de los transformantes C2, A16, T212, 2.21 confirmando la inserción del gen.

11.1 VERIFICACIÓN DEL GEN S TRANSFORMANTE

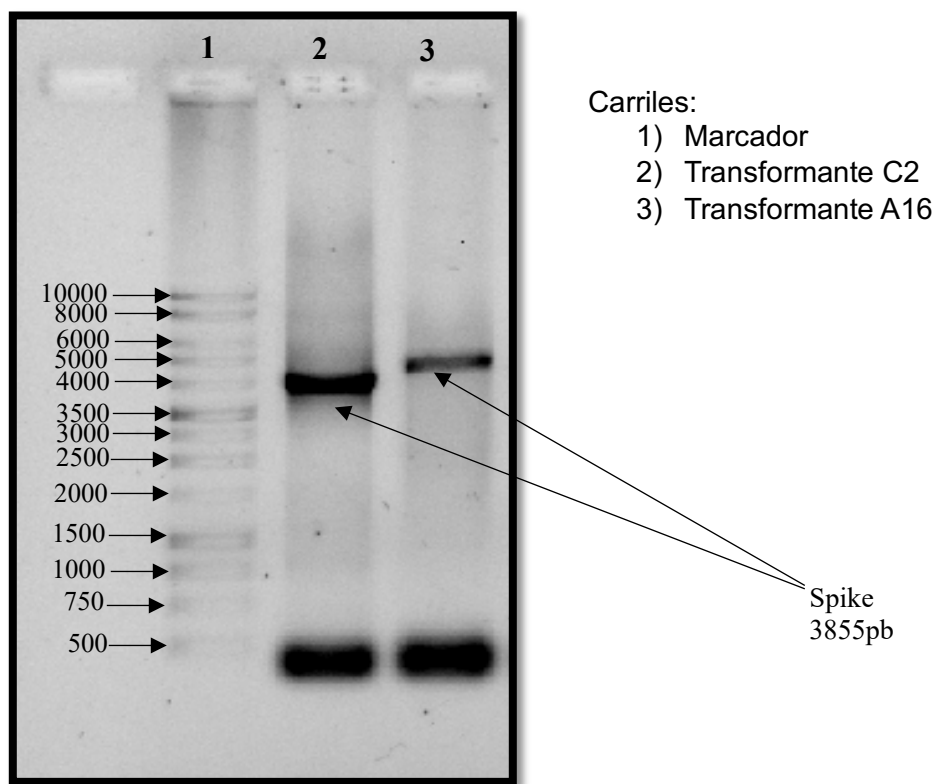


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observa la amplificación del gen S (3855 pb) en las líneas de transformantes C2, A16. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (Thermo Scientific).

11.2 ELECTROFORESIS DE TRANSFORMANTE C2

La expresión de la proteína Spike fue analizada en diferentes tiempos de inducción en la transformante C2 (Figura 7). Se observó una banda de ~180 kDa a partir de las **24 horas**. Esto sugiere que la proteína alcanza su nivel máximo de expresión temprano.

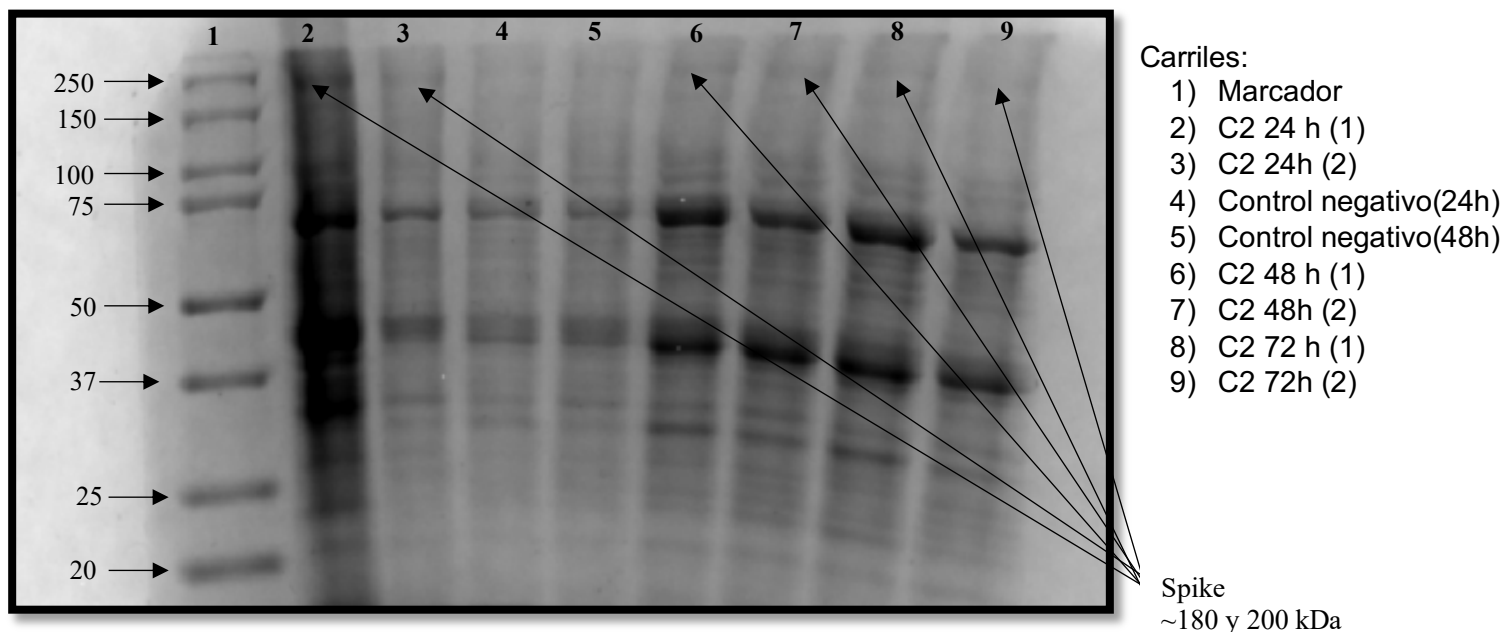


Figura 7. SDS-PAGE de la expresión de la proteína Spike en la transformante C2 inducida a diferentes tiempos. Se analizaron muestras tomadas a 24 h, 48 h y 72 h por duplicado. La banda correspondiente a la proteína Spike (~180 kDa) es visible a partir de las 24 horas. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (BioRad) y los carriles 4 y 5 un control negativo (*P. pastoris* sin el gen *S*).

11.3 ELECTROFORESIS DE TRANSFORMANTE A16

El análisis de expresión en SDS-PAGE en la transformante A16 (Figura 8) muestra que la proteína Spike (~180 kDa) es visible desde las **24 h** post-inducción. A las **72 h**, la banda muestra una mayor intensidad, lo que indica un incremento en la cantidad de proteína expresada con el tiempo. Estos resultados sugieren que la expresión de Spike en *P. pastoris* aumenta progresivamente, alcanzando su punto máximo a las 72 h.

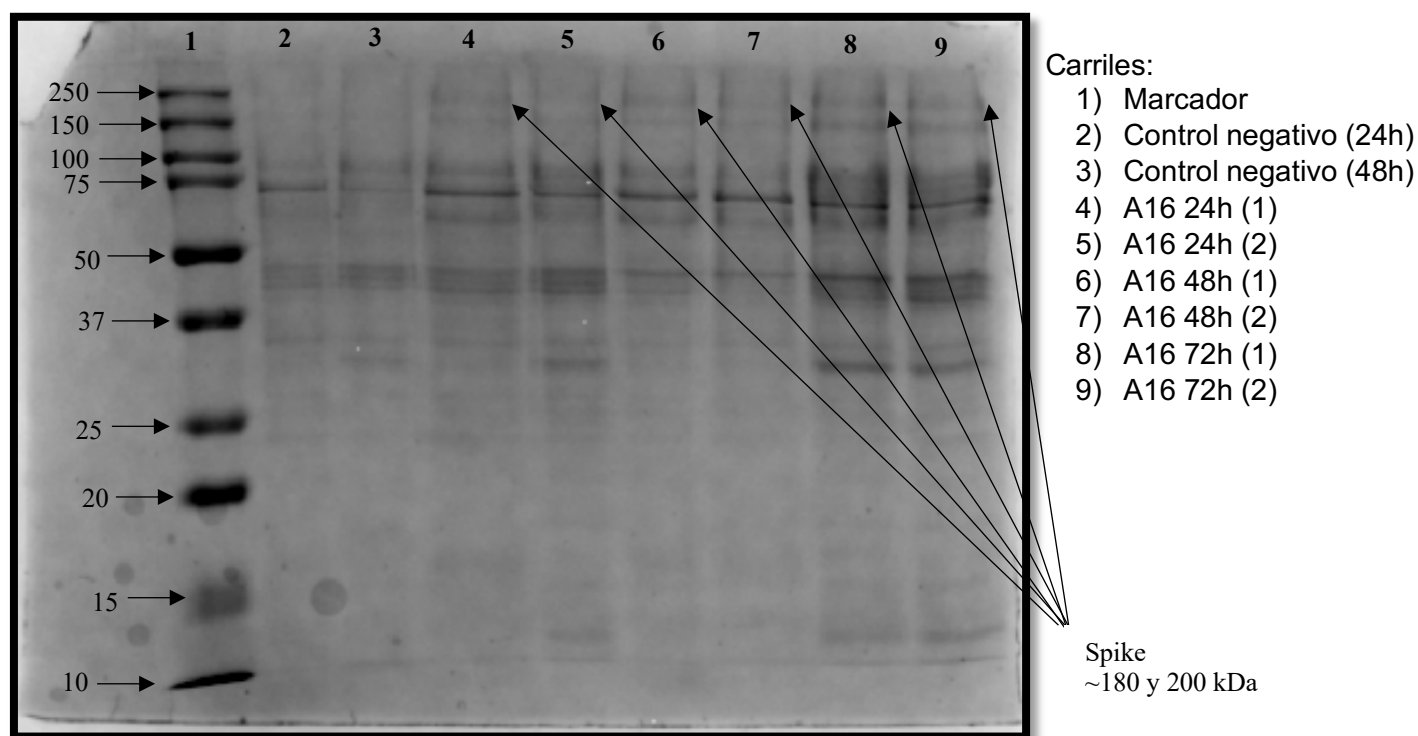


Figura 8. SDS-PAGE de la expresión de la proteína Spike en la transformante A16 inducida a diferentes tiempos. Se analizaron muestras a **24 h, 48 h y 72 h** por duplicado. Se observa una banda de **~180 kDa** correspondiente a la proteína Spike, visible a partir de las 24 h, con una mayor intensidad a las 72 h. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (BioRad) y los carriles 3 y 4 un control negativo (*P. pastoris* sin el gen *S*).

11.4 ELECTROFORESIS DE TRANSFORMANTES ULTRAFILTRADAS

El análisis de SDS-PAGE (Figura 9) muestra la presencia de bandas en las transformantes ultrafiltradas en el rango de **180 y 200 kDa**. La proteína Spike tiene un peso teórico de ~180 kDa, por lo que la aparición de bandas de mayor peso molecular podría atribuirse a diferentes grados de glicosilación, oligomerización o agregación.

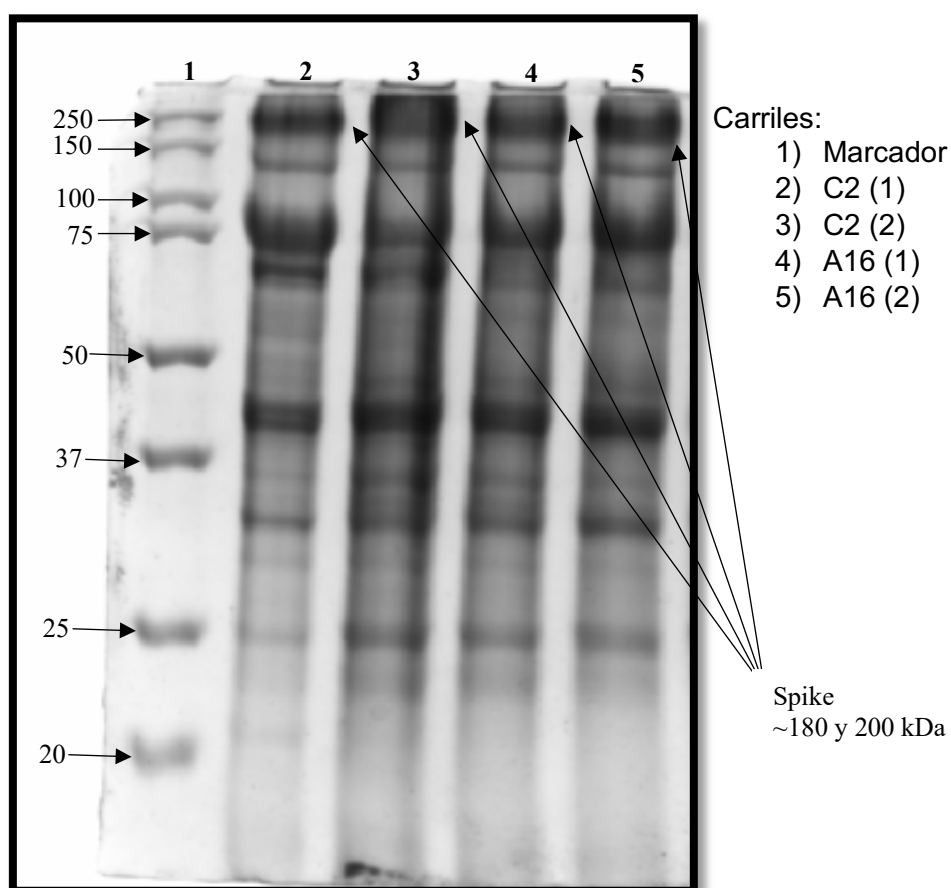


Figura 9. SDS-PAGE de las proteínas las transformantes C2 y A16 ultrafiltradas con tubos Amicon Ultra. Se observan bandas en las muestras correspondientes a las transformantes dentro del rango de **180 kDa y más de 200 kDa**, lo que sugiere la presencia de la proteína Spike en diferentes estados de agregación o glicosilación. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (BioRad).

11.5 ELECTROFORESIS DE TRANSFORMANTES PURIFICADAS

El análisis de SDS-PAGE de la proteína purificada mediante cromatografía de afinidad en columna Ni-NTA mostró la presencia de bandas en el rango de **180-200 kDa** (Figura 10). Dado que la proteína Spike tiene un peso teórico de ~180 kDa, este incremento sugiere la presencia de **formas glicosiladas, dímeros o agregados de la proteína**. La elución con **0.2 M de imidazol** permitió recuperar la proteína de interés con alto rendimiento, lo que indica una interacción eficiente con la resina de Ni-NTA.

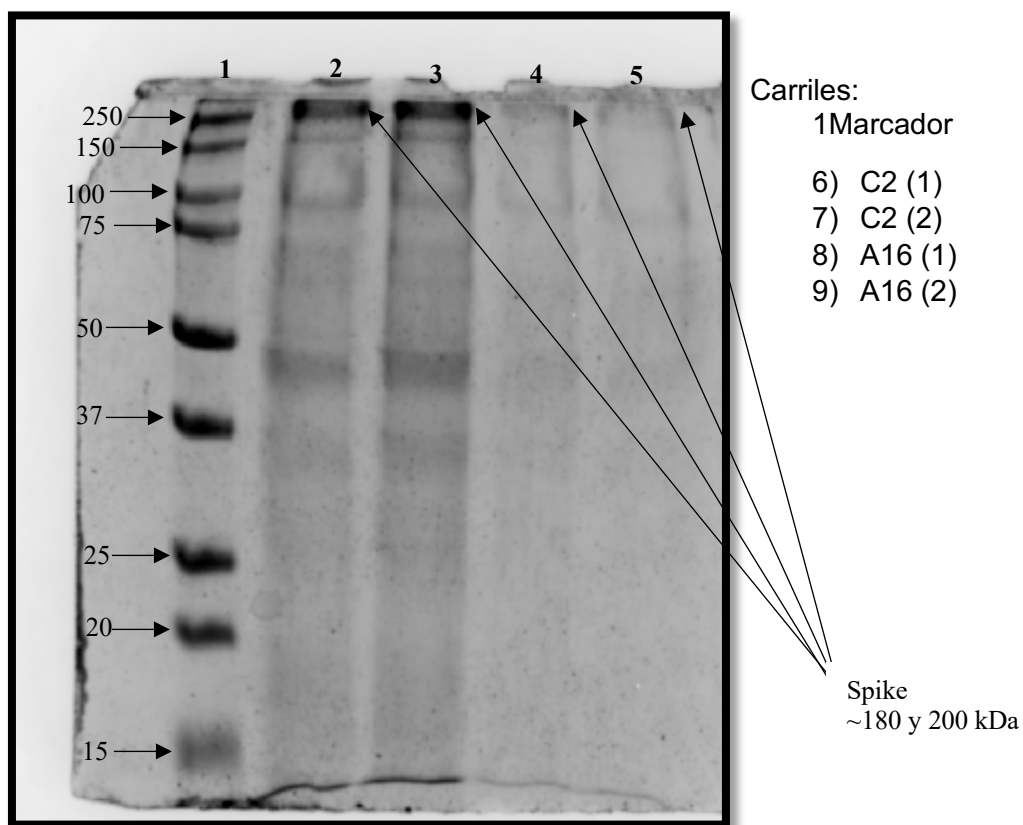


Figura 10. SDS-PAGE de la proteína Spike purificada mediante cromatografía de afinidad con columna Ni-NTA. Se cargaron fracciones eluidas con **0.2 M de imidazol**, observándose bandas en el rango de **180-200 kDa** en las muestras de ambas transformantes. El carril M corresponde al marcador de peso molecular.

12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La producción de la proteína Spike del SARS-CoV-2 en *P. pastoris* ha sido objeto de diversos estudios, enfocándose principalmente en la expresión de dominios específicos de la proteína, como el dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, un estudio comparó la conformación del RBD expresado en *P. pastoris* y en células de mamífero HEK-293T, encontrando que en ambos sistemas el RBD estaba correctamente plegado y era funcional (Sainz-Pastor et al., 2021).

Un estudio reciente desarrolló un proceso rentable para la producción heteróloga del RBD de la proteína Spike en *Pichia pastoris* utilizando un biorreactor de tanque agitado, demostrando que este sistema permite una producción eficiente a gran escala con costos reducidos en comparación con otros sistemas de expresión (Menezes et al., 2022). Sin embargo, aunque estos trabajos han logrado expresar fragmentos de la proteína Spike, la producción de la proteína completa en *P. pastoris* no ha sido ampliamente reportada.

Un proyecto en Argentina se propuso producir biotecnológicamente la proteína S completa de SARS-CoV-2 en *P. pastoris* para fines diagnósticos y terapéuticos, aunque los resultados específicos de este proyecto no han sido detalladamente publicados (CONICET, 2021). La producción de la proteína completa en este sistema presenta desafíos adicionales, principalmente relacionados con la hiperglicosilación y el correcto plegamiento de la proteína.

La hiperglicosilación es una característica conocida en *P. pastoris*, que puede afectar la movilidad electroforética de las proteínas recombinantes. Este fenómeno se debe a la adición excesiva de residuos de manosa en las cadenas de N-glicanos durante la maduración proteica. Se ha reportado que en levaduras como *P. pastoris*, la glicosilación puede representar entre el 10% y el 30% del peso total de la proteína (Spadiut & Herwig, 2014). Esto explica el incremento en el peso molecular observado en SDS-PAGE, donde la proteína Spike mostró un peso molecular superior al esperado (~180-200 kDa en lugar de 141 kDa). Para mitigar este efecto, se han desarrollado cepas de *P. pastoris* con rutas de glicosilación modificadas,

permitiendo una glicosilación más controlada y adecuada para aplicaciones específicas (Gerngross, 2004).

En comparación, la expresión de la proteína Spike en sistemas de células de mamífero, como HEK293 o CHO, permite una glicosilación más similar a la de las proteínas humanas, lo cual es crucial para estudios estructurales y funcionales. En estos sistemas, la glicosilación representa aproximadamente entre el 15% y 25% del peso total de la proteína, pero con estructuras de N-glicanos más homogéneas y compatibles con el sistema inmune humano (Wang et al., 2020). No obstante, la producción en estos sistemas suele ser más costosa y con menor rendimiento que en levaduras como *P. pastoris*.

En resumen, aunque *P. pastoris* ha demostrado ser un sistema eficiente para la producción de dominios específicos de la proteína Spike, la producción de la proteína completa sigue siendo un desafío. La hiperglicosilación representa una limitación importante, pues puede afectar la funcionalidad y estabilidad de la proteína recombinante. Las estrategias para abordar la hiperglicosilación y mejorar la calidad de la proteína recombinante son áreas clave para futuras investigaciones en este campo.

13. CONCLUSIÓN

Se logró evaluar a la levadura *P. pastoris* como un sistema de expresión eficiente para la producción de la proteína *Spike* del SARS-CoV-2, confirmando su capacidad para secretar y modificar postraduccionalmente la proteína recombinante. Además, se obtuvo la proteína purificada mediante cromatografía de afinidad en columna Ni-NTA, usando la etiqueta de histidina incluida en su estructura. La presencia de la proteína *Spike* purificada se verificó mediante SDS-PAGE, donde se identificó su peso molecular. Estos resultados validan el uso de *Pichia pastoris* como sistema de expresión viable para la producción de proteínas virales recombinantes, con aplicaciones potenciales en investigación y desarrollo de inmunógenos y terapias contra el SARS-CoV-2.

Como perspectivas futuras, se propone la optimización del rendimiento y calidad de la proteína recombinante mediante el ajuste de condiciones de cultivo, coexpresión de chaperonas u otras estrategias de ingeniería metabólica. Asimismo, es fundamental avanzar hacia la caracterización funcional y estructural de la proteína *Spike* expresada, con el fin de confirmar la conservación de su conformación nativa y la presencia de epítomos antigénicos relevantes.

BIBLIOGRAFIA

Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45-66.

Chen, X., Li, Y., Wang, W., & Wang, Y. (2020). Expression and purification of SARS-CoV-2 spike protein S1 subunit in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 324, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.009>.

Chen, Y., Li, Y., Liu, P., Sun, Q., & Liu, Z. (2014). Optimized expression in *Pichia pastoris* eliminates common protein contaminants from subsequent His-tag purification. *Biotechnology Letters*, 36(4), 711–718.

Choi, B. K., Bobrowicz, P., Davidson, R. C., Hamilton, S. R., Kung, D. H., Li, H., ... & Wildt, S. (2003). Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(9), 5022-5027.

CONICET. (2021). Producción biotecnológica de proteínas del SARS-CoV-2 en *Pichia pastoris*. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Recuperado de <https://nanobiotec.conicet.gov.ar>

Datta, P. K., Liu, F., Fischer, T., Rappaport, J., & Qin, X. (2020). SARS-CoV-2 pandemic and research gaps: Understanding SARS-CoV-2 interaction with the ACE2 receptor and implications for therapy. *Theranostics*, 10(16), 7448.

Gerngross, T. U. (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1409-1414.

Grant, O. C., Montgomery, D., Ito, K., & Woods, R. J. (2020). Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition. *Scientific reports*, 10(1), 14991.

Haon, M., Grisel, S., Navarro, D., Gruet, A., Berrin, J.-G., & Bignon, C. (2015). Recombinant protein production facility for fungal biomass-degrading enzymes using the yeast *Pichia pastoris*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1002.

Harvey, W. T., Carabelli, A. M., Jackson, B., Gupta, R. K., Thomson, E. C., Harrison, E. M., ... & Robertson, D. L. (2021). SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology*, 19(7), 409-424.

Huang, Y., Yang, C., Xu, X. F., Xu, W., & Liu, S. W. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1141-1149.
Infection Microbiology, 10, 570271. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.570271>.

Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 23(1), 3-20.

Jiang, X., Wang, C., Han, X., Xie, Y., Jiang, Z., & Wang, X. (2022). Expression and purification of recombinant SARS-CoV-2 Spike protein in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 193, 106027.

Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 235(6), 3944–3958. <https://doi.org/10.1002/jcp.29238>.

Li, H., Zhao, M., & Wang, L. (2022). Production of a truncated SARS-CoV-2 spike protein in *Pichia pastoris* and its immunogenicity in mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(2), 635–645. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11691-7>.

Menezes, F. G., da Costa, L. F., Souza, T. A. C. B., da Silva, J. V., & Moreira, R. A. (2022). Development of a cost-effective process for the heterologous production of SARS-CoV-2 spike receptor binding domain using *Pichia pastoris* in stirred-tank bioreactor. *Process Biochemistry*, 119, 290-298. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.06.018>

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172.

Sainz-Pastor, N., Masuda, T., Fischer, R., & Schillberg, S. (2021). Production of recombinant SARS-CoV-2 receptor binding domain in different expression systems and its immunogenicity. *Biotechnology Journal*, 16(11), e2100123. <https://doi.org/10.1002/biot.202100123>

Shajahan, A., Lee, J., Jha, S., Hossain, M., & Liu, H. (2021). Comprehensive characterization of N- and O-linked glycosylation of SARS-CoV-2 spike protein: Implications for viral infectivity, immune evasion, and vaccine design. *Frontiers in Microbiology*, 12, 663775. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663775>

Spadiut, O., & Herwig, C. (2014). Production and purification of recombinant proteins from *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3481-3495.

Tolner, B., Bhavsar, G., Foster, B., Vigor, K., & Chester, K. (2012). Production of recombinant proteins from *Pichia pastoris*: Interfacing fermentation and immobilized metal ion affinity chromatography. In *Laboratory Protocols in Fungal Biology* (pp. 407–420).

Wang, D., Zhang, X., & Liu, Y. (2020). Production of recombinant proteins in HEK293 cells: Advances and future perspectives. *Biotechnology Advances*, 38, 107414.

Wang, Q., Zhang, Y., Wu, L., Niu, S., Song, C., Zhang, Z., & Lu, G. (2020). Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*, 181(4), 894-904. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.045>

Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Vulnerabilities in coronavirus glycan shields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(26), 16041–16048. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010768117>.

Weinacker, D., Rabert, C., Zepeda, A. B., Figueroa, C. A., Pessoa, A., & Farías, J. G. (2013). Applications of recombinant *Pichia pastoris* in the healthcare industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(4), 1061–1073. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013000400011>.

Xia, X. (2021). Domains and functions of spike protein in SARS-CoV-2 in the context of vaccine design. *Viruses*, 13(1), 3. <https://doi.org/10.3390/v13010003>.

Zamorano Cuervo, N., & Grandvaux, N. (2020). ACE2: Evidence of role as entry receptor for SARS-CoV-2 and implications in comorbidities. *Frontiers in Cellular and*

Zhang, L., Liu, Y., Wang, S., & Zhang, Z. (2021). Expression of SARS-CoV-2 spike protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01604-6>.

Zhao, X., Chen, H., & Wang, H. (2021). Glycans of SARS-CoV-2 spike protein in virus infection and antibody production. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 629873.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS

No. 00221

Matricula: 2241800280

PRODUCCIÓN HETERÓLOGA DE LA
PROTEÍNA SPIKE DE SARS-CoV-2

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 21 del mes de mayo del año 2025 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. FERNANDA JOCELY CALDERON DE LA SANCHA
DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ
DR. ULISES CARRASCO NAVARRO



SHAWA VERONICA MONTES HELGUERA
ALUMNA

siendo los dos primeros asesores de la alumna y lector el tercero, de la Idónea Comunicación de Resultados, se reunieron a evaluar la presentación cuya denominación aparece al margen, para la obtención del diploma de:

ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

DE: SHAWA VERONICA MONTES HELGUERA

y de acuerdo con el artículo 79 fracción II del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, se comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

ASESORA

DRA. FERNANDA JOCELY CALDERON DE LA
SANCHÁ

ASESOR

DR. ARMANDO MEJIA ALVAREZ

LECTOR

DR. ULISES CARRASCO NAVARRO