



Diseño de un sistema bacteriano para la producción y purificación de la proteína recombinante NcGRA7 utilizando la actividad de Sortasa A de *Staphylococcus aureus*

Design of a bacterial system for the production and purification of recombinant NcGRA7 protein using Staphylococcus aureus Sortase A Activity

- ¹ Janneth Fernanda Cárdenas Cordero  <https://orcid.org/0000-0002-7877-4001>
Universidad de Cuenca (UCUENCA), Cuenca, Ecuador.
Maestría en Biociencias
janneth.cardenas@ucuenca.edu.ec
- ² Antonio Javier Vallecillo Maza  <https://orcid.org/0000-0001-9141-0176>
Universidad de Cuenca (UCUENCA), Cuenca, Ecuador.
antonio.vallecillo@ucuenca.edu.ec



Artículo de Investigación Científica y Tecnológica

Enviado: 15/11/2025

Revisado: 18/12/2025

Aceptado: 30/01/2026

Publicado: 12/02/2026

DOI: <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v9i1.2.3605>

Cítese: Cárdenas Cordero, J. F., & Vallecillo Maza, A. J. (2026). Diseño de un sistema bacteriano para la producción y purificación de la proteína recombinante NcGRA7 utilizando la actividad de Sortasa A de *Staphylococcus aureus*. *Anatomía Digital*, 9(1.2), 66-82. <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v9i1.2.3605>



ANATOMÍA DIGITAL, es una Revista Electrónica, Trimestral, que se publicará en soporte electrónico tiene como misión contribuir a la formación de profesionales competentes con visión humanística y crítica que sean capaces de exponer sus resultados investigativos y científicos en la misma medida que se promueva mediante su intervención cambios positivos en la sociedad. <https://anatomiadigital.org>
La revista es editada por la Editorial Ciencia Digital (Editorial de prestigio registrada en la Cámara Ecuatoriana de Libro con No de Afiliación 663) www.celibro.org.ec

Esta revista está protegida bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 International. Copia de la licencia: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>



Palabras claves:

Sortasa A. proteínas recombinantes, purificación proteica, NcGRA7, cromatografía de afinidad a metales.

Resumen

Introducción. La sortasa A (SrtA) es una enzima con actividad endopeptidasa y transpeptidasa presente principalmente en bacterias Gram positivas. Su capacidad para reconocer secuencias peptídicas específicas permitió su aplicación en el desarrollo de sistemas biotecnológicos para la producción y purificación de proteínas recombinantes. El uso de sistemas basados en SrtA optimiza el procesamiento proteico, facilita la clarificación de las muestras y permite obtener proteínas con altos niveles de pureza mediante procedimientos relativamente simples y reproducibles.

Objetivo. Desarrollar un sistema bacteriano de producción y purificación de proteínas recombinantes basado en la actividad enzimática de la Sortasa A de *Staphylococcus aureus* (Sa-SrtA). **Procedimiento.** Se modificó el vector de expresión pET15b NT-Histidina (Novagen) mediante la incorporación de la secuencia codificante de $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ (GenBank Ac. No.: AF162687), seguida del motivo consenso LPET4G, reconocido por la enzima para realizar la escisión proteolítica. Posteriormente, se clonó la secuencia de la proteína antigénica NcGRA7 de *Neospora caninum* (GenBank Ac. No.: U82229), generando la construcción His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ -LPET4G-NcGRA7. La expresión del sistema se realizó en *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3), y la purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC) utilizando resina Ni-NTA. La escisión enzimática se indujo en presencia de Ca^{2+} y triglicina, permitiendo la liberación de la proteína diana. **Resultados.** El sistema permitió la expresión y purificación eficiente de la proteína recombinante NcGRA7, obteniéndose la proteína mediante un único proceso cromatográfico mediado por la actividad de $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$.

Conclusión. El sistema basado en $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ constituye una herramienta eficaz y reproducible para la producción y purificación de proteínas recombinantes, con potencial aplicación en el desarrollo de sistemas diagnósticos y otras aplicaciones biotecnológicas. **Área de estudio general:** Biología. **Área de estudio específica:** Biología molecular. **Tipo de estudio:** Artículos originales.

Keywords:

Sortase A,
recombinant
proteins,
protein purification,
NcGRA7,
immobilized metal
affinity
chromatography.

Abstract

Introduction. Sortase A (SrtA) is a cysteine transpeptidase found in Gram-positive bacteria, where it catalyzes site-specific peptide bond cleavage and ligation. Due to these properties, SrtA widely applied as a biotechnological tool for the production and purification of recombinant proteins, allowing controlled proteolytic processing and improved purification efficiency. **Objective.** This study aimed to develop a bacterial system for the production and purification of recombinant proteins based on the enzymatic activity of *Staphylococcus aureus* Sortase A (Sa-SrtA). **Methodology.** A modified pET15b NT-Histidine vector (Novagen) was constructed by incorporating the coding sequence of $\Delta 60$ Sa-SrtA (GenBank Acc. No.: AF162687) from *S. aureus* (ATCC 12598), followed by the consensus recognition motif LPET4G. The antigenic protein NcGRA7 from *Neospora caninum* (GenBank Acc. No.: U82229) was cloned downstream of this motif, generating the fusion construct His-tag- $\Delta 60$ Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7. Protein expression was conducted in *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3), and purification was performed by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using Ni-NTA resin. Enzymatic cleavage was induced in the presence of Ca^{2+} and triglycine, enabling the release of the target protein. **Results.** A bacterial model was obtained for the generation of purified recombinant proteins by the enzymatic activity of $\Delta 60$ Sa-SrtA. The system allowed the purification of the recombinant protein of *N. caninum* 4G-NcGRA7, that could be used for the generation of the diagnostic system. **Conclusion.** The $\Delta 60$ Sa-SrtA-based system represents an effective and reliable strategy for the production and purification of recombinant proteins, with potential applications in diagnostic and biotechnological developments. **General Area of Study:** Biology. **Specific area of study:** Molecular Biology. **Type of study:** Original articles.

1. Introducción

Las proteínas son moléculas de gran complejidad y diversidad, por ello son adecuadas para diferentes aplicaciones (1). Las proteínas se emplean ampliamente en la industria,

incluidas las enzimas utilizadas para fabricar textiles, productos químicos y para procesar alimentos y piensos (2) . Muchas otras proteínas se utilizan como reactivos de diagnóstico o investigación (3) (4). Por ello la producción de proteínas recombinantes es una de las aportaciones más importantes de la biotecnología porque su generación es más económica y requiere una producción más simple y escalable que genera proteínas con mayor rendimiento y pureza que las proteínas de origen natural (5) (6) (7) (8).

En 2004 se desarrolló una herramienta biotecnológica basada en la Sa-SrtA que permite la generación de un sistema de purificación de proteínas recombinantes (9) , la cual se establece como un sistema útil en la producción de proteínas recombinantes, que podría ser una alternativa en los países subdesarrollados para la obtención de proteínas de pureza considerable y bajo costo. La finalidad de los sistemas de purificación de proteínas recombinantes es la obtención de proteínas puras de alta calidad (1) (10) .

Las sortasas se convirtieron en valiosas herramientas bioquímicas para la purificación de proteínas recombinantes y la ligación covalente de biomoléculas mediante enlaces peptídicos específicos (11) (12) (13). Entre ellas, la Sortasa A de *Staphylococcus aureus* (Sa-SrtA), característica de bacterias Gram positivas, es una enzima importante que generó una innovación en la bioingeniería de proteínas permitiendo la purificación de proteínas mediante por su acción de endopeptidasa y transpeptidasa, esta herramienta biotecnológica permitió la incorporación de análogos de péptidos, fluoróforos, aminoácidos no naturales, marcadores isotópicos, modificaciones postraduccionales y sondas bioquímicas o biofísicas, así como la generación de proteínas cicladas (14) (15) .

La purificación de proteínas mediante sistemas basados en la actividad enzimática de Sa-SrtA requiere una construcción genética específica, con las siguientes características:

- a) Región 1: Secuencia correspondiente a etiqueta de afinidad en la región amino terminal, que interacciona con la matriz de columna cromatográfica en el IMAC.
- b) Región 2: Sa-SrtA, secuencia de la enzima con actividad endopeptidasa.
- c) Región 3: LPETG, el motivo consenso de la $\Delta 60$ Sa-SrtA. Esta secuencia es reconocida por la Sa-SrtA para realizar la escisión entre residuos de T y G.
- d) Región 4: Proteína diana, secuencia correspondiente a la proteína de interés (14) .

El sistema de purificación mediado por la actividad enzimática de Sa-SrtA se fundamenta en la cromatografía de Afinidad a Metales Inmovilizados (IMAC), la cual aprovecha la actividad endopeptidasa de la enzima para liberar la proteína de interés de la matriz cromatográfica (16). En este proceso se inmoviliza a la proteína de interés en la columna IMAC con Ni-NTA y posteriormente se separa de la matriz de la columna por la adición de Ca^{2+} , cofactor de Sa-SrtA, y Gli³, reactivo nucleófilo, el cual permite la obtención de la proteína de interés con un residuo de glicina adicional en la región aminoterminal (16)

En este proyecto se obtuvo la proteína $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ enzimáticamente funcional en el modelo de expresión bacteriano *E. coli BL21*, y logramos la construcción genética para la purificación de la proteína 4G-NcGRA7 de *Neospora caninum* (17) (18) (19). La obtención de un modelo bacteriano funcional nos permite producir proteínas recombinantes para diversas aplicaciones biotecnológicas, desde proteínas antigénicas para el inmunodiagnóstico de enfermedades o como inmunógenos, hasta proteínas con actividad enzimática de diversa naturaleza que puedan ser utilizadas en la industria farmacéutica, alimenticia, etc.

Los objetivos generales del presente estudio fueron:

- Diseñar, construir y producir un modelo bacteriano para la generación proteínas recombinantes purificadas mediante la actividad enzimática de la proteína $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$.

Y se establecieron como objetivos específicos:

- Diseñar, construir y evaluar la funcionalidad un vector de expresión para producción de proteínas recombinantes fusionadas a la proteína $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$, y la purificación de estas mediante afinidad a metales y la eliminación del péptido de afinidad con la actividad de endopeptidasa de la proteína $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$.
- Diseñar, construir y producir dos proteínas antigénicas 4G-NcGRA7 y 4G-NcSAG4 de *Neospora caninum* purificadas mediante afinidad a metales y la actividad de endopeptidasa de la proteína $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$.

2. Metodología

El presente trabajo corresponde a una investigación de tipo experimental, desarrollada bajo un diseño de laboratorio controlado, en el que se manipularon de manera intencionada variables biológicas y técnicas para evaluar la amplificación, clonación, expresión y purificación de las proteínas recombinantes His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ -LPET4G y 4G-NcGRA7 mediante el uso de sistemas bacterianos de expresión y cromatografía de afinidad a metales. El estudio se enmarca en un nivel explicativo, dado que busca comprobar relaciones causales entre las condiciones experimentales aplicadas y la eficiencia de obtención de las proteínas de interés. La modalidad de investigación es cuantitativa, aplicada y de laboratorio, que empleo procedimientos experimentales reproducibles y controlados con fines de validación biotecnológica y optimización de técnicas de purificación proteica, utilizando herramientas moleculares y bioquímicas para la obtención y análisis de resultados verificables.

Se inició la generación de las construcciones génicas mediante la amplificación de las regiones $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ y NcGra7 utilizando los primers correspondientes, establecidos en

la sección Anexo 1. Su detección y aislamiento se realizó una electroforesis en gel al 1.2 % de agarosa, teñido con Bromuro de etidio (0.3 mg/mL).

El amplicón $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ y el plásmido pET15b se digirieron secuencialmente con las enzimas de restricción NdeI y BamHI durante 2 h a 37 °C, seguido de su aislamiento y purificación. Posteriormente se realizó una PCR de extensión para añadir los residuos complementarios y obtener el plásmido pET15b con extremos cohesivos. El producto de digestión de Sa-SrtA se ligó al plásmido pET15b con la enzima ADN ligasa T4 y se obtuvo plásmido pET15-SrtA. El amplicón NcGRA7 se ligó al plásmido pCR2.1 mediante la enzima ADN ligasa T4 para su propagación, obteniéndose el plásmido pCR2.1-NcGRA7.

Para formar el plásmido pET-S4G se intercaló los primers SRTA-R2 del amplicón Sa-SrtA2 y SRTA-F2 para formar la secuencia $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ seguido del motivo LPET4G y permitir de esta manera su unión. Los primers SRTA-F1 y SRTA-R3 por su parte permitieron la amplificación de la secuencia $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G}$. Se aisló, purificó y se introdujo en el plásmido pET15b mediante ligación y se obtuvo el plásmido pET-S4G.

La secuencia codificante del plásmido pCR2.1- NcGRA7 fue aislada y se digirió con las enzimas MseI y BamHI. El plásmido pET-S4G se digirió con las enzimas NdeI y BamHI. Finalmente, el inserto con la secuencia codificante de NcGRA7 se ligó por separado con la enzima ligasa T4 al plásmido pET-S4G durante 24h a 16°C para generar el plásmido pET-S4G-NcGRA7.

Los plásmidos obtenidos se clonaron por transformación química en la cepa *E. coli* Top10. A partir del cultivo bacteriano se aisló el plásmido pET15-SrtA. El plásmido se digirió con la enzima HindIII y se realizó una electroforesis de ADN con agarosa al 1,2%. Las bandas obtenidas en el gel de agarosa se compararon con las bandas obtenidas en el programa Serial Cloner para verificar el patrón obtenido.

Los plásmidos pET15-SrtA, pET-S4G, pET-S4G- NcGRA7 aislados y verificados se introdujeron por transformación química en *E. coli* Rosetta 2 (DE3). La expresión de las proteínas se indujo mediante la adición de IPTG (100 μM), inductor de la expresión de proteínas. Las proteínas se aislaron mediante la lisis de la pared bacteriana por sonicación y posteriormente se desnaturalizaron por acción térmica. Las proteínas aisladas fueron His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$, His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G}$, His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7}$. La presencia de las proteínas se verificó mediante SDS-PAGE, utilizando un gel concentrador al 3 % y un gel separador al 12 %. Las proteínas se visualizaron mediante tinción del gel con Azul Brillante Coomassie G-250.

La resina Ni-NTA se colocó en la columna cromatográfica. Se hidrató la resina con 2 volúmenes de agua para cromatografía. Se equilibró la resina con 2 volúmenes el buffer de Lisis y se repitió 2 veces.

Se colocó 2-4 volúmenes del extracto de la proteína His-tag- $\Delta 60$ Sa-SrtA-LPET4G. Se recogió el líquido que no se adhirió a la resina y este fue la Muestra 1 (M1). Se añadió 5 volúmenes del Buffer de lavado, se repitió 5 veces y se recogió cada fracción de lavado obteniendo 5 muestras: Muestras 2-6 (M2-M6). Se añadió en la columna, 1 volumen de la solución de elución se repitió 3 veces y se recogió en una misma fracción y está fue la muestra 7 (M7). Esta muestra fue la proteína His-tag- $\Delta 60$ Sa-SrtA-LPET4G purificada.

Finalmente se añadió 5 volúmenes de agua de cromatografía y esta fue la muestra 8 (M8). A las 8 muestras se les añadió el buffer de carga para proteínas 2X y las muestras obtenidas fueron desnaturalizadas mediante ebullición durante 5 minutos. Se realizó un SDS PAGE con un gel concentrador al 3% (voltaje de 60 voltios) y un gel separador del 12% (voltaje de 120 voltios). Las proteínas se visualizaron mediante tinción del gel con Azul Brillante Coomassie G-250.

Se colocó la resina HPur Ni-NTA en la columna Ni-NTA. Se hidrató la resina con 2 volúmenes de agua para cromatografía. Se equilibró la resina con 2 volúmenes el buffer de Lisis y se repitió 2 veces.

Se colocó 2-4 volúmenes de los extractos de las proteínas His-tag- $\Delta 60$ Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7. Se recogió el líquido que no se adhirió a la resina y esta fue Muestra 1 (M1). Se añadió 5 volúmenes del Buffer de lavado y se repitió 4 veces y se recogió cada fracción de lavado y se obtuvo 4 muestras: Muestra 2-5 (M2-M5). Se añadió 1 volumen del buffer de escisión y se esperó 24h para recoger la muestra 6 (M6). Esta muestra contiene la proteína purificada: 4G-NcGRR7. La M7 es un lavado previo a la elución de His-tag- $\Delta 60$ Sa-SrtA-LPET.

Se añadió en la columna, 1 volumen del buffer de elución, repetimos 3 veces y se recogieron en una misma fracción la muestra 8 (M8). Esta muestra libera la proteína His-tag- $\Delta 60$ Sa-SrtA-LPET.

Finalmente, se añadió 5 volúmenes de agua de cromatografía para obtener la muestra 9 (M9). A las 9 muestras se añadió el buffer de carga para proteínas 2X y fueron desnaturalizadas mediante ebullición durante 5 minutos. Se realizó un SDS PAGE con un gel concentrador al 3% (con un voltaje de 60 voltios) y un gel separador del 12% (con un voltaje de 120 voltios). Las proteínas se visualizaron mediante tinción del gel con Azul Brillante Coomassie G-250.

3. Resultados

Se construyó un prototipo de plásmido pET-S4G-NcGRA7 a partir del vector pET15b como sistema de expresión bacteriano con control de purificación por afinidad para la proteína de fusión. El diseño de las proteínas de fusión conllevaba un riesgo potencial para la estabilidad de la fusión. Sin embargo, debido a que la actividad de escisión de $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ es inducible y moderada, se asumió que la fusión sería estable durante la expresión de la proteína (9) (13) (14). En segundo lugar, la etiqueta His-tag es pequeña y no interfiere con la actividad de $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$, y esto proporcionó un control de purificación por afinidad para la proteína de fusión (14).

La construcción de los plásmidos pET15-SrtA y pET-S4G fue validada en un sistema bacteriano utilizando un mapa de restricción. En la **Figura 1a** se visualizaron los plásmidos pET15b (Carril1), pET15-SrtA (Carril 2 y 3) escindidos con la enzima HindIII generando las bandas de PM de 5559 pb para el vector pET15b y las bandas de PM de 5559 y 609 pb para el plásmido pET15-SrtA, la banda de PM de 5559 bp representó el vector vacío y la banda de PM de 609 pb presentó la secuencia codificante para la $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$. También el plásmido pET-S4G (Carril 4 y 5) fue escindido con la enzima HindIII generando las bandas de PM de 5559, 316 y 326 pb. La banda de PM de 5559 pb fue el vector vacío y las bandas de PM de 316 y 326 pb que se observaron solapadas en la **Figura 1a** corresponde a un corte distinto que realizó la enzima HindIII al plásmido pET-S4G; esto se debió a la presencia del motivo consenso LPET4G que generó un patrón de corte distinto respecto al plásmido pET15-SrtA. Las bandas obtenidas de las digestiones de los plásmidos pET15b, pET15-SrtA, pET-S4G fueron semejantes a las bandas obtenidas por simulación en los mapas de restricción del programa Serial Cloner al estudiar los 3 plásmidos con la enzima HindIII. El mapa de restricción verificó la validez de la ligación del plásmido pET15b y la secuencia codificante de la $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ para generar el plásmido pET15-SrtA. También este mapeo validó el PCR de extensión superpuesta que permitió el solapamiento del plásmido pET15-SrtA y el motivo consenso LPET4G para generar el plásmido pET-S4G, obteniéndose las construcciones pET15-SrtA y pET-S4G.

La construcción del plásmido pET-S4G-NcGRA7 fue validada en un mapa de restricción utilizando la enzima de restricción HindIII. Se obtuvieron las bandas de PM de 5559, 899 y 316 pb para plásmido pET-S4G-NcGRA7 (Carril 6-9), visualizadas en la **Figura 1b**. El patrón de bandas obtenidas de las digestiones del plásmido pET-S4G-NcGRA7 fue semejante a las bandas obtenidas por simulación en los mapas de restricción del programa Serial Cloner al estudiar el plásmido con la enzima HindIII. La banda de PM de 5559 pb caracterizó el vector vacío visualizado también en la **Figura 1b**. Las bandas de PM de 5559 y 316 son semejantes en los mapas de restricción lo que nos indica que la banda de

PM de 899 pb presenta el segmento de ADN que codificó para la proteína de fusión His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7.

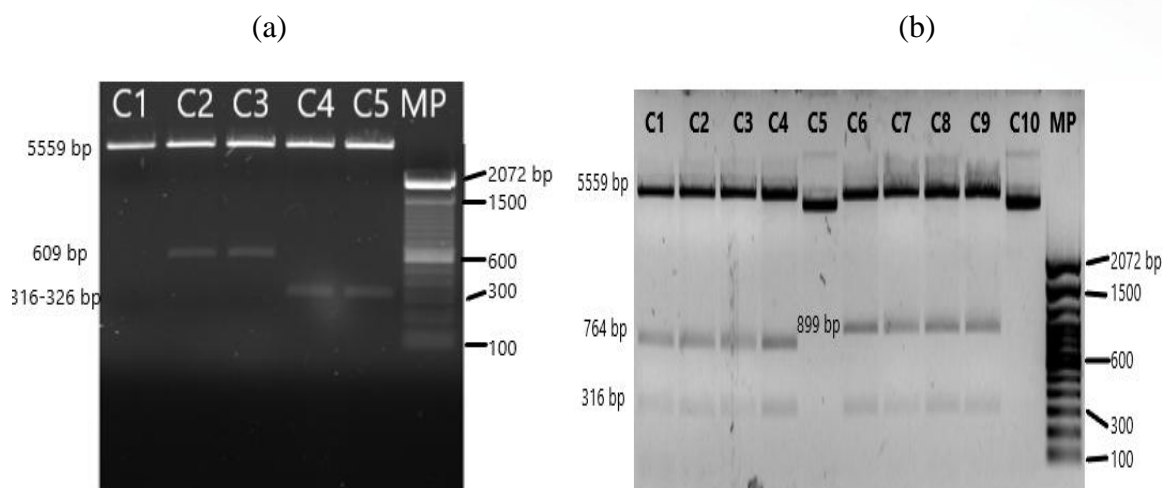


Figura 1. Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1,2 % de los plásmidos pET15-SrtA, pET-S4G, pET-S4G-NcSAG4 y pET-S4G-NcGRA7 digeridos con la enzima HindIII.

(a) C1: Carril 1, plásmido pET15b; C2–C3: Carriles 2 y 3, plásmido pET15-SrtA; C4–C5: Carriles 4 y 5, plásmido pET-S4G; MP: marcador de peso molecular.

(b) C1–C4: Carriles 1 a 4, plásmido pET-S4G-NcSAG4; C5: Carril 5, plásmido pET15b; C6–C9: Carriles 6 a 9, plásmido pET-S4G-NcGRA7; C10: Carril 10, plásmido pET15b; MP: marcador de peso molecular.

La expresión de las proteínas His-tag- Δ 60Sa-SrtA y His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G se realizó en cepa de *E. coli* Rosetta 2(DE3) con la utilización de los plásmidos pET15-SrtA y pET-S4G. La presencia de la proteína His-tag- Δ 60Sa-SrtA se visualizó en el spot de PM de alrededor de 25 Kilodaltons (KDa) en el Carril 1(C1) de la **Figura 2**, verificando la utilidad del plásmido pET15-SrtA para la expresión de la proteína His-tag- Δ 60Sa-SrtA. La presencia de la proteína His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G se visualizó en el Carril 2 y 3 (C2-C3) de la **Figura 2** por la presencia de 2 spot que nos indicó que la expresión de la proteína His-tag- Δ 60Sa-SrtA -LPET4G generó una proteína lineal con un PM de 25 KDa y una proteína ciclada con un PM de 23 KDa, datos parecidos a los que se presentaron en el estudio de (9) en el cual la forma lineal de la proteína His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G apareció a 23 KDa y la forma ciclada apareció a los 20 KDa. Una explicación probable a la ciclación de la proteína His-tag- Δ 60Sa-SrtA -LPET4G es la acción de la aminopeptidasa endógena de *E. coli* que es muy eficiente en eliminar la primera metionina durante la postraducción como resultado, la nueva G N-terminal puede actuar como un nucleófilo intra o intermolecular y por lo tanto la G del N-terminal en His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G por actividad transpeptidasa de Δ 60Sa-SrtA generó un ataque nucleofílico en su propia secuencia LPET4G y formó una His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G ciclada, que migró más rápido que la His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G lineal en el gel SDS-PAGE (9). La presencia de la proteína His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G ciclada nos generó

la primera evidencia que la proteína $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ expresada mostró un patrón compatible con su actividad transpeptidasa.

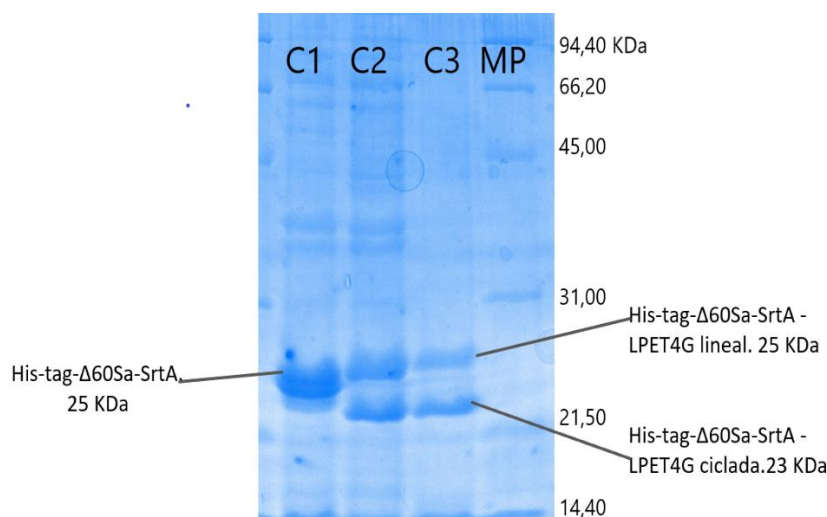


Figura 2. SDS-PAGE al 12%. de las proteínas expresadas His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ y His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ -LPET4G en su forma lineal y ciclada en la cepa *E. coli* Rosetta 2 (DE3).

*C1: Carril 1. Muestra de la proteína His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$. C2.C3: Carril 2-3. Muestra de la proteína His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ -LPET4G. PM. Marcador de peso molecular

La expresión de la proteína de fusión His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ -LPET4G-NcGRA7 se realizó en la cepa de *E. coli* Rosetta 2 (DE3) utilizando el plásmido pET-S4G-NcGRA7 se visualiza en la **Figura 3**. En los carriles 3 y 4 (C3 y C4) de la **Figura 3** se colocó el extracto de la proteína His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ -LPET4G-NcGRA7. En estos carriles se observaron bandas de diferentes PM, las bandas de PM de 23 y 25 KDa correspondientes a la proteína His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ -LPET4G ciclada y lineal, también se observaron 2 bandas: la primera de PM de 33 kDa representó la proteína 4G-NcGRA7(17) y la segunda banda de PM de 50 kDa correspondió a la proteína fusionada His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ -LPET4G-NcGRA7, el PM de la segunda banda se correlacionó con la suma de los PM de las proteínas: His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ -LPET4G (23-25 KDa) y NcGRA7 (24-33KDa) (18), que lo conformaban. La presencia de las bandas que correspondieron a la proteína His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ -LPET4G (23-25 KDa) y 4G-NcGRA7 (33 KDa) nos confirmaron la actividad endopeptidasa de $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ pero además nos indicó que esta actividad estuvo autoinducida de forma basal durante el crecimiento del cultivo bacteriano(9), y es un inconveniente que presenta el sistema debido a que la actividad de endopeptidasa de $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ es inducible, moderada y no se suprime completamente durante la expresión de proteínas, lo que causa una escisión de la proteína de fusión no deseada en una fase temprana (13) (15). Para mejorar la estabilidad de la proteína de fusión, (9) realizó una $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ mutante en la que cambio el Triptófano 194 (W194) por la A, proporcionado

estabilidad a la proteína de fusión durante la expresión y purificación, y ayuda a disminuir la transpeptidación que genera productos ciclados (20), sin embargo, el tiempo requerido para la escisión aumenta notablemente.

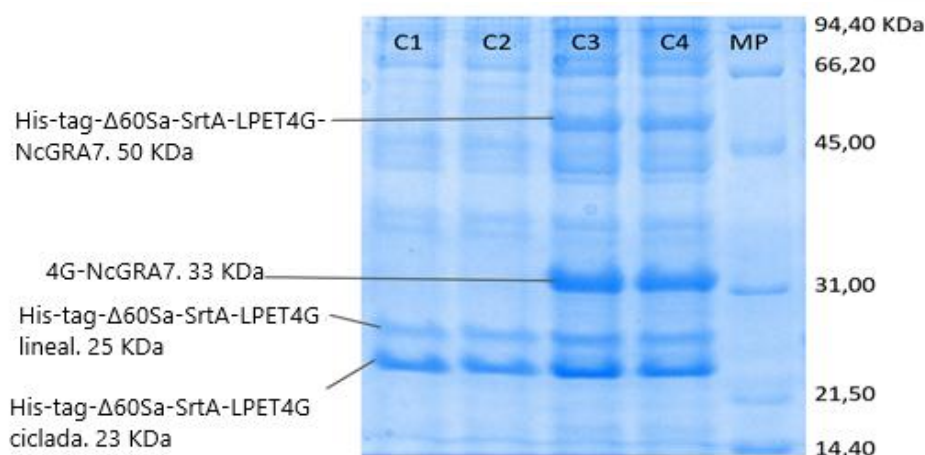


Figura 3. SDS PAGE al 12% de las proteínas His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G}$ y 4G-NcGRA7, 4G-NcSAG4 y 4G-NcGRA7 expresadas en la cepa E. coli Rosetta 2 (DE3) *C1-C2: Carril 1-2. Muestra de la proteína de fusión His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G-NcSAG4}$. C3-C4: Carril 3-4. Muestra de la proteína de fusión His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7}$. MP: Marcador de peso molecular.

La purificación de la proteína 4G-NcGRA7 se realizó en base a la actividad endopeptidasa de la $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ y la IMAC y se visualizó en la **Figura 4**. La M1 fue la fracción que se recogió al pasar la muestra del extracto de proteína His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7}$ por la columna y que no se fijó en la Ni-NTA. La proteína de fusión His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7}$ se fijó a la columna Ni-NTA por las interacciones moleculares (13) (14). La M1 mostró un patrón de bandas de diferentes PM, las bandas de PM de 25 y 23 KDa corresponde a la proteína His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G}$ en su forma lineal y ciclada. La banda de PM de 50 KDa representa la proteína de fusión His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7}$. Esta proteína fue objetivo de la actividad endopeptidasa de $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ que reconoció el motivo consenso LPET4G y cortó entre la T y G (9). La proteína escindida presenta 4G extras en el extremo N-terminal de su secuencia aminoacídica, 4G-NcGRA7, debido al corte proteolítico de la reacción de escisión. La banda de 30 KDa indica la proteína 4G-NcGRA7 fue autoescindida en el medio. Las otras las bandas desconocidas correspondieron a proteínas inespecíficas que se producen en el medio de cultivo (9). Las M2-M5 fueron las fracciones de lavado de la columna para eliminar el exceso de las muestras del extracto de la proteína que no se fijó en la columna. La fracción M6 correspondió a la proteína 4G-NcGRA7 purificada, esta proteína contiene 4G extra por la reacción de escisión mediada por la $\Delta 60\text{Sa-SrtA}$ en la que se escindió el motivo consenso LPET4G entre los aminoácidos T y G de la proteína His-tag- $\Delta 60\text{Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7}$. La reacción se potenció al añadir el buffer de

escisión (mM Tris-HCl, pH 7.5, 50mM, NaCl, 5mM BME, 5mM CaCl₂, and 5mM Gli₃), el cual tenía Ca²⁺, cofactor de la enzima, que acelera la actividad Δ60Sa-SrtA, y la Gli₃, reactivo nucleófilo aceptor de la reacción de escisión y ayuda a disminuir la reacción de transpeptidación y disminuye la formación de proteínas de fusión cicladas. La presencia de las G extras en el N-terminal es una desventaja de este método de purificación (10) (15), sin embargo, se desconoce si estos residuos aminoacídicos (4G) alteren la actividad enzimática de las proteínas purificadas por falta de estudios sobre el tema; aún pudiesen alterar la conformación estructural de las proteínas obtenidas. La problemática se presenta porque al ser una etiqueta tan pequeña su remoción es difícil (14) (21). Por ello no sería deseable el uso de este método de purificación para proteínas en las cuales se desea realizar la caracterización estructural ya que podría alterar su conformación. La M7 representa una fracción de lavado previo a la elución de His-tag-Δ60Sa-SrtA-LPET.

La M8 presentó la proteína His-tag-Δ60Sa-SrtA-LPET, fracción restante de la proteína de fusión His-tag-Δ60Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7 en sus 2 formas: lineal (25KDa) y ciclada (23 KDa), que se queda unida al Ni-NTA de la columna. La fracción de His-tag-Δ60Sa-SrtA-LPET se eluyó por la acción del imidazol del buffer de elución. La M9 fue el lavado final de la columna. La presencia de proteína purificada 4G-NcGRA7 visualizada en M7 de la **Figura 4** demostrando la efectividad del sistema de purificación mediado por Δ60Sa-SrtA para obtener una proteína pura. Demostrando la efectividad del método de mediado por Δ60Sa-SrtA para la purificación de las proteínas recombinantes y la validación de la construcción del vector para la expresión de un sistema de purificación con actividad endopeptidasa para la obtención de proteínas recombinantes puras. La Δ60Sa-SrtA permitió obtener proteínas con una pureza de entre 98-99%.

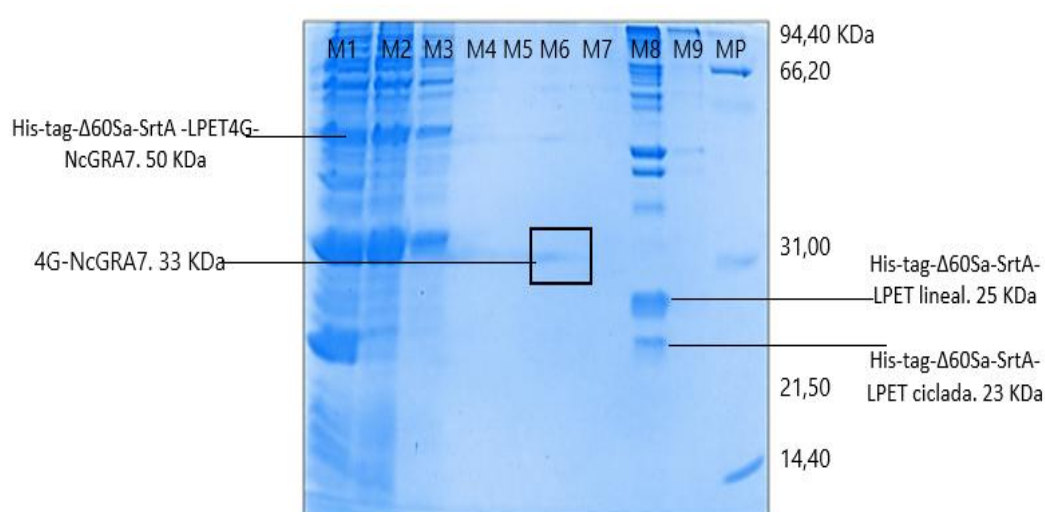


Figura 4. SDS-PAGE al 12%.de las diferentes fracciones de purificación mediante IMAC de la proteína 4G-NcGRA7.*M1: No pegado. M2-M5: Lavados .M6: Proteína 4G-NcGRA7 purificada. M7: Lavado. M8: La proteína His-tag-Δ60Sa-SrtA-LPET eluida. M9: Lavado IMAC. MP: marcador de peso molecular.

4. Discusión

En este estudio se logró construir con éxito el plásmido pET-S4G-NcGRA7 a partir del vector pET15b para la expresión de la proteína de fusión His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7. La validación mediante mapas de restricción y simulaciones en Serial Cloner confirmó la correcta inserción de los elementos genéticos involucrados. La expresión de la proteína en *E. coli* Rosetta 2(DE3) permitió visualizar tanto formas lineales como cicladas de la proteína His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G, evidenciando la actividad transpeptidasa funcional de Δ 60Sa-SrtA. Además, la escisión espontánea observada durante la expresión confirmó la actividad endopeptidasa basal de la sortasa, lo cual representa una ventaja para procesos de purificación automatizada, aunque puede comprometer la estabilidad de las proteínas de fusión (5) (6) (22).

La proteína objetivo, 4G-NcGRA7, fue obtenida y purificada con éxito utilizando IMAC en conjunto con la actividad de Δ 60Sa-SrtA, confirmando la viabilidad del sistema de escisión para liberar proteínas recombinantes. Aunque la adición de residuos 4G en el extremo N-terminal representa una posible desventaja para estudios estructurales, el método demostró ser eficiente para la obtención de proteínas con alta pureza (98-99%). En conjunto, estos resultados validan la estrategia de construcción y purificación basada en sortasa A como una herramienta eficaz para la producción de proteínas recombinantes funcionales.

5. Conclusiones

- La obtención de la proteína recombinante 4G-NcGRA7 de *Neospora caninum* se logró a partir de la escisión de la proteína de fusión His-tag- Δ 60Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7. Este proceso fue posible gracias a la actividad endopeptidasa de la Δ 60Sa-SrtA, combinada con la cromatografía de afinidad (IMAC), y fue favorecido por las propiedades fisicoquímicas de la proteína, como su buena solubilidad en el sistema de expresión *E. coli* Rosetta 2(DE3). La estrategia permitió liberar y purificar de forma eficiente la proteína de interés, sin etiquetas adicionales, mediante un solo paso cromatográfico. La construcción genética del sistema pET-S4G-NcGRA7 fue validada mediante digestión con enzimas de restricción y análisis por geles, confirmando la correcta inserción de todos los elementos necesarios para la expresión y escisión controlada.
- La presencia de formas cicladas y lineales de las proteínas intermedias indicó una actividad basal funcional de la Δ 60Sa-SrtA durante la expresión, lo que confirma su eficacia, pero también resalta la necesidad de optimización para aplicaciones sensibles. A pesar de la incorporación de residuos 4G en el extremo N-terminal de la proteína escindida, se obtuvo una pureza del 98–99%, lo cual valida esta metodología como una alternativa eficiente para la producción y purificación de proteínas recombinantes sin etiquetas.

6. Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en relación con el artículo presentado.

7. Declaración de contribución de los autores

Todos autores contribuyeron significativamente en la elaboración del artículo.

8. Costos de financiamiento

La presente investigación fue financiada por la Universidad de Cuenca y VLIR-Network Ecuador.

9. Referencias Bibliográficas

1. Colgrave ML, Dominik S, Tobin AB, Stockmann R, Simon C, Howitt CA, et al. Perspectives on future protein production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [Internet]. 2021 [cited 2025 Dec 3];69(50):15076– 15083. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.1c05989>
2. Szkodny AC, Lee KH. Biopharmaceutical manufacturing: historical perspectives and future directions. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* [Internet]. 2022 [cited 2025 Dec 3];13(1):141–165. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-092220-125832>
3. Lagassé D, Alexaki A, Simhadri V, Katagiri N, Jankowski W, Sauna Z, et al. Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research* [Internet]. 2017 [cited 2025 Dec 3];6:113. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28232867/>
4. Freitas AI, Domingues L, Aguiar TQ. Tag-mediated single-step purification and immobilization of recombinant proteins toward protein-engineered advanced materials. *Journal of Advanced Research* [Internet]. 2022 [cited 2025 Dec 3]; 36:249–64. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090123221001065>
5. Remans K, Lebendiker M, Abreu C, Maffei M, Sellathurai S, May MM, et al. Protein purification strategies must consider downstream applications and individual biological characteristics. *Microbial Cell Factories* [Internet]. 2022 [cited 2025 Dec 3];21(1):52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35392897/>
6. Ishola AB, Muia J. Method optimization for recombinant protein production [Conference Oklahoma State University Center for Health Sciences Research Week 2024- Oklahoma] [Internet]. 2024 [cited 2025 Dec 3]. Available from:

<https://scholars.okstate.edu/en/publications/method-optimization-for-recombinant-protein-production/fingerprints/>

7. Grossmann L, McClements DJ. Current insights into protein solubility: a review of its importance for alternative proteins. Food Hydrocolloids [Internet]. 2023 [cited 2025 Dec 3];137:108416. Available from: https://www.researchgate.net/publication/366264583_Current_insights_into_protein_solubility_A_review_of_its_importance_for_alternative_proteins
8. Wood P, Tavan M. A review of the alternative protein industry. Current Opinion in Food Science [Internet]. 2022 [cited 2025 Dec 3];47:100869. Available from: https://www.researchgate.net/publication/360636288_A_Review_of_the_Alternative_Protein_Industry
9. Mao H. A self-cleavable sortase fusion for one-step purification of free recombinant proteins. Protein Expression and Purification [Internet]. 2004 [cited 2025 Dec 3];37(1):253–263. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15294306/>
10. Zhang ZX, Nong FT, Wang YZ, Yan CX, Gu Y, Song P, et al. Strategies for efficient production of recombinant proteins in Escherichia coli: alleviating the host burden and enhancing protein activity. Microbial Cell Factories [Internet]. 2022 [cited 2025 Dec 3];21(1):191. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36109777/>
11. Whedon SD, Lee K, Wang ZA, Zahn E, Lu C, Yapa Abeywardana M, et al. Circular engineered sortase for interrogating histone H3 in chromatin. Journal of the American Chemical Society [Internet]. 2024 [cited 2025 Dec 3];146(49):33914–33927. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39585806/>
12. Zou Z, Mate DM, Nöth M, Jakob F, Schwaneberg U. Enhancing robustness of sortase A by loop engineering and backbone cyclization. Chemistry [Internet]. 2020 [cited 2025 Dec 3];26(60):13568–13572. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32649777/>
13. Li J, Zhang Y, Soubias O, Khago D, Chao F an, Li Y, et al. Optimization of sortase a ligation for flexible engineering of complex protein systems. Journal of Biological Chemistry [Internet]. 2020 [cited 2025 Dec 3];295(9):2664–2675. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31974162/>
14. Amacher JF, Antos JM. Sortases: structure, mechanism, and implications for protein engineering. Trends in Biochemical Sciences [Internet]. 2024 [cited 2025 Dec 3];49(7):596–610. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38692993/>

15. Kumari P, Bowmik S, Paul SK, Biswas B, Banerjee SK, Murty US, et al. Sortase A: A chemoenzymatic approach for the labeling of cell surfaces. *Biotechnology and Bioengineering* [Internet]. 2021 [cited 2025 Dec 3];118(12):4577–4589. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34491580/>
16. Antos J, Truttmann M, Ploegh H. Recent advances in sortase-catalyzed ligation methodology. *Current Opinion in Structural Biology* [Internet]. 2016 [cited 2025 Dec 3];38:111–118. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27318815/>
17. Abdou AM, Nishikawa Y. Protective efficacy of the NcGRA7-deficient parasite as a live attenuated vaccine against *Neospora caninum* infection in mice. *Journal of Veterinary Medical Science* [Internet]. 2025 [cited 2025 Dec 3];87(5):472–480. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40128980/>
18. Rico-San Román L, Amieva R, Horcajo P, García-Sánchez M, Pastor-Fernández I, Ortega-Mora LM, et al. Characterization of *Neospora caninum* virulence factors NcGRA7 and NcROP40 in bovine target cells. *Veterinary Parasitology* [Internet]. 2023 [cited 2025 Dec 3];320:109973. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401723001048>
19. Aguado A, Álvarez G, Schares G, Risco V, Fernández A, Marugán V, et al. Characterisation of NcGRA7 and NcSAG4 proteins: Immunolocalisation and their role in the host cell invasion by *Neospora caninum* tachyzoites. *Acta Parasitologica* [Internet]. 2010 [cited 2025 Dec 3];55(4):304-312. Available from: https://www.researchgate.net/publication/227247778_Characterisation_of_NcGRA7_and_NcSAG4_proteins_Immunolocalisation_and_their_role_in_the_host_cell_invasion_by_Neospora_caninum_tachyzoites
20. Jacobitz A, Kattke M, Wereszczynski J, Clubb R. Sortase transpeptidases: structural biology and catalytic mechanism. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* [Internet]. 2017 [cited 2025 Dec 3];109:223–264. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28683919/>
21. Wood A, Tsang P. Examining the activity of sortase a variants in peptide ligation. Undergraduate Scholarly Showcase Program (Spring 2019) [Internet]. 2019 [cited 2025 Dec 3]; Available from: <https://journals.uc.edu/index.php/Undergradshowcase/article/view/1128>
22. Nag N, Khan H, Tripathi T. Capter 1 - Strategies to improve the expression and solubility of recombinant proteins in *E. coli*. *Advances in Protein Molecular and Structural Biology Methods* [Internet]. 2022 [cited 2025 Dec 3]; 1–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90264-9.00001-5>

El artículo que se publica es de exclusiva responsabilidad de los autores y no necesariamente reflejan el pensamiento de la **Revista Anatomía Digital**.



El artículo queda en propiedad de la revista y, por tanto, su publicación parcial y/o total en otro medio tiene que ser autorizado por el director de la **Revista Anatomía Digital**.

