



Producción y purificación de osteopontina bovina recombinante mediante *Escherichia coli* como fábrica celular

Production and purification of recombinant bovine osteopontin using *Escherichia coli* as a Cell Factory

Angela Patricia Brijaldo Villamizar¹
María Camila Londoño-Méndez²
Luis Fernando Arbeláez Ramírez³
Fabian Leonardo Rueda Alfonso⁴



DOI: <https://doi.org/10.19053/01228420.v19.n2.2022.13877>

RESUMEN: Los programas de reproducción y mejoramiento animal requieren la optimización de herramientas biotecnológicas capaces de favorecer los índices reproductivos en diversas especies. El uso de aditivos proteicos que mejoren la criopreservación espermática y la producción de embriones *in vitro*, parece ser una alternativa interesante. La Osteopontina se ha relacionado con el potencial fecundante del espermatozoide y con el desarrollo embrionario temprano. El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones óptimas para la producción de Osteopontina recombinante (rOPN) mediante el uso de *Escherichia coli* como fábrica celular. Para esto, el gen de la OPN se insertó en un vector de expresión pET28(a+) inducible por IPTG, con resistencia a la Kanamicina y una cola de histidinas (6xHis-tag). El constructo resultante se usó para transformar células competentes de *E. Coli* BL21-Star™. Las colonias transformadas se usaron para la producción de rOPN-H6 a 20, 30 y 37 °C, probándose dos concentraciones del inductor IPTG (1.0 y 0.1mM). Se realizó una purificación de la rOPN-H6 mediante columnas de afinidad con imidazol (10, 50, 200, 350, 500mM). Los resultados evidenciaron que la producción de rOPN-H6 solo fue exitosa a 37°C independiente de la concentración de IPTG empleada. La purificación de la rOPN-H6 fue exitosa usando imidazol a 200mM, con una aparente tendencia a la dimerización luego de obtener la proteína purificada. De este modo, se concluye cuáles son las mejores condiciones para obtener la OPN recombinante, sugiriendo su potencial uso en ensayos de criopreservación espermática y en medios de cultivo para producción de embriones *in vitro*.

PALABRAS CLAVES: Reproducción Bovina, Proteínas Recombinantes, Fábricas Celulares, Plasma Seminal, Criopreservación De Semen

ABSTRACT: Animal reproduction and improvement programs require the optimization of biotechnological tools capable of favoring reproductive rates in various species. The use of protein additives that improve sperm cryopreservation and *in vitro* embryo production seems to be an interesting alternative. Osteopontin has been related to the fertilizing potential of the sperm and early embryonic development. The objective of this work was to determine the optimal conditions to produce recombinant Osteopontin (rOPN) by using *Escherichia coli* as a cell factory. For this, the OPN gene was inserted into an expression vector pET28(a+) inducible by IPTG, with resistance to Kanamycin and a histidine tail (6xHis-tag). The resulting construct was used to transform competent *E. coli* BL21-Star™ cells. The transformed colonies were used to produce rOPN-H6 at 20, 30, and 37 °C, testing two concentrations of the inducer IPTG (1.0 and 0.1mM). A purification of rOPN-H6 was performed using imidazole affinity columns (10, 50, 200, 350, 500mM). The results showed that the production of rOPN-H6 was only successful at 37°C regardless of the concentration of IPTG used. Purification of rOPN-H6 was successful using imidazole at 200mM, with an apparent tendency to dimerization after obtaining purified protein. In this way, the best conditions to obtain recombinant OPN is concluded, suggesting its potential use in sperm cryopreservation assays and culture media for *in vitro* embryo production.

KEYWORDS: Bovine Reproduction, Recombinant Proteins, Cell Factories, Seminal Plasma, Sperm Cryopreservation

FECHA DE RADICACIÓN: 11 de enero de 2022 **FECHA DE APROBACIÓN:** 03 de mayo de 2022

CÓMO CITAR: Brijaldo Villamizar, A. P., Londoño-Méndez, M. C., Arbeláez Ramírez, L. F., & Rueda, F. (2022). Producción y purificación de osteopontina bovina recombinante mediante *Escherichia coli* como fábrica celular. *Ciencia y Agricultura*, 19(2): 46-62. <https://doi.org/10.19053/01228420.v19.n2.2022.14071>

- 1 MSc(c), Agrosavia, Universidad de Pamplona, patty_0154@hotmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1051-5046>
- 2 MV, Agrosavia, mclondono@agrosavia.co, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2884-6035>
- 3 PhD, Universidad de Pamplona, luisfernandoarbelaezramirez@gmail.com, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0230-0096>
- 4 PhD, Agrosavia, Autor de correspondencia: frueda@agrosavia.co, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5502-2544>

INTRODUCCIÓN

El uso de la biotecnología reproductiva es fundamental para favorecer los programas de reproducción y mejoramiento genético en la ganadería bovina. En optimización de las herramientas biotecnológicas, algunos trabajos han mencionado el uso de proteínas provenientes del plasma seminal con acción protectora y reparadora del daño celular ocasionado durante los procesos de criopreservación en las células espermáticas (Barrios et al., 2000; Rueda et al., 2013), daño que genera una disminución en el potencial fecundante del semen descongelado (Peris et al., 2007; Sicherle et al., 2011). Entre las proteínas conocidas esta la Osteopontina (OPN), la cual mejora la producción *in vitro* de embriones, favorece la capacitación espermática, la unión espermatozoide-ovocito, la fecundación y el desarrollo embrionario temprano (Gabler et al., 2003; Monaco et al., 2009; Moura, 2005). La OPN es una glucofosfoproteína secretada extracelularmente, altamente fosforilada, constituida por 314 aminoácidos con un peso molecular entre 44 y 75kDa (Icer y Gezmen-Karadag, 2018).

En la especie bovina, la OPN tiene 22 aminoácidos menos, lo que se atribuye a la falta de un sitio de unión al Ca^{2+} , capaz de generar el potencial de membrana (Prince, 1989) además, se ha descrito que tiene una relación positiva con la fertilidad en los toros, ya que ejerce protección contra infecciones bacterianas en la superficie epitelial de las glándulas accesorias (Cancel et al., 1997). Los estudios realizados sobre la estructura y función de la OPN bovina en el plasma seminal indican que tiene la capacidad de unirse a los glucosaminoglicanos (GAG), involucrados en el proceso de capacitación y reacción acrosomal (Thérien et al., 1999). Así mismo, la expresión de la OPN ha sido estudiada en el oviducto (Liu et al., 2014). Lo anterior no solo evidencia que la OPN participa de manera importante en el proceso de fecundación (Boccia et al., 2013), sino que permite que sea reconocida como un marcador de fertilidad del macho bovino (Wei et al., 2017; Willforss et al., 2021).

Por su parte, se han desarrollado estudios de producción de proteínas del plasma seminal bovino con el fin de aumentar la eficiencia reproductiva del semen usado en la inseminación artificial (Alvarez-Gallardo et al., 2013). Proteínas como la Espermadhesina-1 (I. Bustamante-Filho et al., 2014) y la Binder Sperm Protein (BSP) (Singh et al., 2020) han sido producidas de forma heteróloga usando *E. coli* como fábrica celular, con resultados interesantes en cuanto a la estructura y función de estas proteínas y sobre su uso para mejorar la calidad del semen en procesos de biotecnología reproductiva. De acuerdo con los perfiles de expresión, tanto la Espermadhesina como la BSP tienen tendencia a formar agregados insolubles en forma de cuerpos de inclusión por la presencia de múltiples enlaces disulfuro, lo que puede limitar su aplicación práctica. Por su parte, la expresión de OPN de forma recombinante ha sido probada previamente y aunque se ha descrito que se expresa de forma insoluble predominantemente, luego de ser resuspendida se ha aplicado en

espermatozoides bovinos (Bustamante-Filho et al., 2021). Sin embargo, los resultados no han sido concluyentes.

De otro lado, el uso de suplementos en el medio de fertilización *in vitro*, ha evidenciado un incremento en el desarrollo de blastocistos, y parece mejorar la tolerancia del embrión al proceso de congelación (Stoecklein, et al. 2021). En este sentido, la expresión de OPN en sistemas recombinantes puede ser una alternativa para el desarrollo de aditivos biológicos capaces de aumentar la eficiencia reproductiva del semen criopreservado, para ser usado en procesos como la inseminación artificial y la producción de embriones *in vitro* de alto valor genético. El objetivo de este estudio fue determinar las condiciones óptimas para producir y purificar OPN recombinante a nivel de laboratorio, de cara a futuros procesos de industrialización, dada su importancia y sus perspectivas de uso en biotecnología reproductiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Gen de la Osteopontina y constructo plasmídico

Para la producción de la *rOPN* se utilizó la secuencia reportada en las bases de datos de NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) con número de accesión: M66236 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dicha secuencia fue sintetizada y optimizada para el uso de codones de *E. coli* por Biomatik (LLC, Delaware, USA) a solicitud. La secuencia original contenía un péptido de secreción, retirado para la expresión con el fin de obtener la OPN en su forma madura (Figura 1). La secuencia obtenida fue clonada en el vector pET28(a⁺)



MRIAVICFCLGLIASALPVKPTSSGSSSEKQLNKNYPDAVAIWLPDPSP
QKQFLTPQNSVSSSEETDDNKQNTLPSKSNESPEQTDDLDDDDNS
QDVNSNDSDDAETDDPDHSDSHSDESDEVDFTDIPTIAVFTPF
IPTESANDGRGDSVAYGLKSRKFRRSNVQSPDATEEDFTSHIESEE
MHDAPKKTSQLTDHSKETNSSELSKELTPKAKDKNKHSNLIESQENSK
LSQEFHSLEDKLDLHKSEEDKHLKIRISHELDSASSEVN

MPVKPTSSGSSSEKQLNKNYPDAVAIWLPDPSPKQKQFLTPQNSVSS
EETDDNKQNTLPSKSNESPEQTDDLDDDDNSQDVNSNDSDDAET
TDDPDHSDSHSDESDEVDFTDIPTIAVFTPFIPTESANDGRGDSV
AYGLKSRKGRRSNVQSPDATEEDFTSHIESEEMHDAPKKTSQLTDH
SKETNSSELSKELTPKAKDKNKHSNLIESQENSKLSQEGHSLEDKLDL
HKSEEDKHLKIRISHELDSASSEVN

FIGURA 1. Modelo de la OPN con el péptido señal de secreción de 16 aminoácidos (izquierda; secuencia reportada en NCBI prot, accesión M66236); y sin el péptido señal clonada en el plásmido pET28(a⁺) para obtener *rOPN*-H6 con secuencia optimizada a través del codón de la *E. coli* (derecha). Ambos modelos se realizaron mediante la base de datos SWISS-MODEL de la plataforma ExPASy (<https://www.swissmodel.expasy.org/>). Como plantilla se usó la subunidad 15 del complejo promotor del anafase por homología en la secuencia de aminoácidos.

usando un cassette de resistencia a la Kanamicina, inducible por IPTG (Iso-propil β -D-tiogalactopiranosido). Este vector fue diseñado con un “TAG” de polihistidinas (6xHIS) en la parte N- terminal de la secuencia de la proteína. El constructo resultante (pET 28(a⁺)-OPN-H6) se usó para transformar bacterias competentes de la cepa BL21 Star™ (DE3) de *E. coli* (Figura 2).

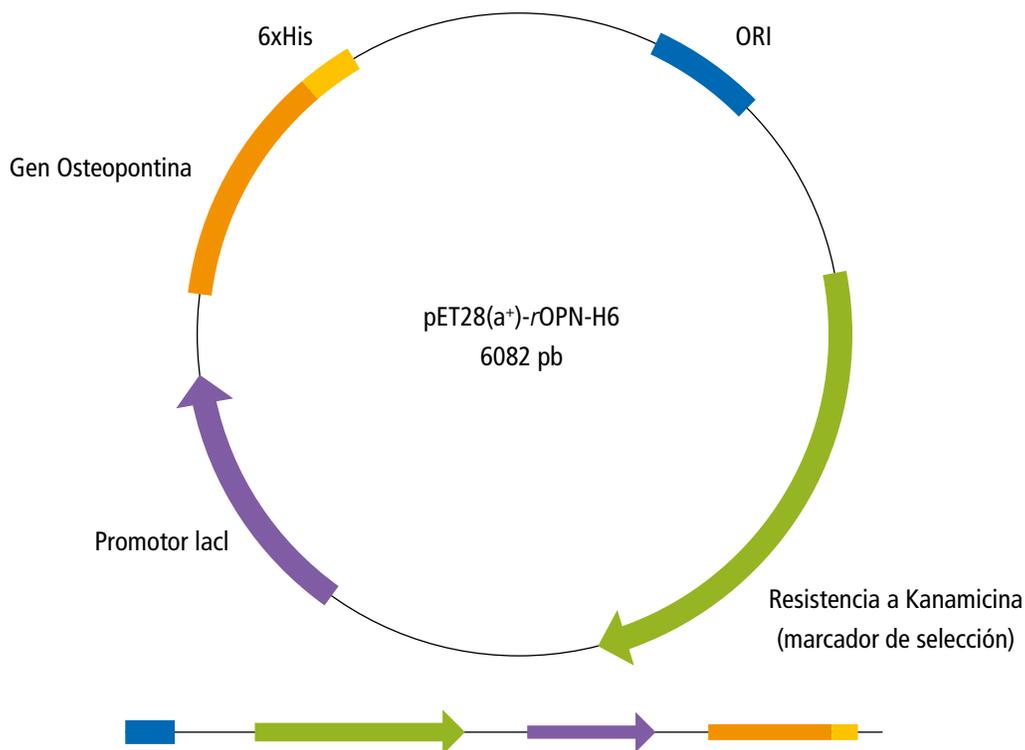


FIGURA 2. Constructo plasmídico pET28(a⁺) conteniendo el promotor inducible por IPTG (*lacI*), un cassette de resistencia a la Kanamicina como marcador de selección; y la secuencia de rOPN bovina en su forma madura y una cola de seis histidinas (6xHis) adicionada en la parte N-terminal de la OPN.

Preparación de células competentes

Para realizar la transformación de la cepa BL21STAR, se prepararon células competentes a partir de un cultivo de 50 mL preparados de un inóculo 1/100 en crecimiento a 37 °C y 200 rpm. Cuando alcanzaron una $OD_{550} = 0.2-0.4$, los cultivos obtenidos se centrifugaron a $4000 \times g$ durante 15min a 4 °C. Los pellets se resuspendieron en 12.5 mL de $CaCl_2$ 50 mM y se incubaron en baño de hielo durante 45min. Las células resuspendidas se centrifugaron de nuevo bajo las mismas condiciones y el pellet se resuspendió en 1.25mL de $CaCl_2$ 50 mM en glicerol al 15 % v/v para preparar alícuotas de 200 μ L. Las alícuotas obtenidas se guardaron a -80 °C hasta su posterior uso.

Transformación de *Escherichia coli* cepa BL21STAR

La transformación de las células competentes de la cepa BL21STAR se realizó con 100ng del constructo pET28(a⁺)-OPN-H6, adicionados a las alícuotas de 200µL de las bacterias competentes descongeladas. Bacterias y plásmido se incubaron en baño de hielo durante 30-60 min y luego a 42 °C durante 45seg. Posteriormente se llevaron a un baño de hielo durante 1 minuto y se adicionaron 800µL de medio Luria Bertani estéril (LB), incubando a 37°C durante 1 h. Las células transformadas se llevaron a una placa de LB con Kanamicina (50 mg/mL) incubando a 37 °C durante 16 h. Se realizaron cultivos de las colonias obtenidas para extraer el ADN plasmídico y comprobar la transformación. Los cultivos bacterianos con transformación positiva se criopreservaron con crioperlas glicerizadas y se guardaron a -80°C hasta su posterior uso.

Extracción del ADN plasmídico

La extracción de los plásmidos se realizó mediante el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Manchester, UKA), el cual está basado en tecnología de membrana de gel de sílice. La extracción se realizó según las instrucciones del fabricante y la cuantificación se realizó mediante un mini espectrómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, California, USA) por triplicado de cada una de las extracciones.

Digestión del ADN plasmídico

El ADN plasmídicos extraído de las bacterias de BL21STAR transformadas fue digerido con las enzimas de restricción *MluI* (Promega lot:00003887726) y *XhoI* (Promega lot:0000404566) y visualizado en geles de agarosa al 0.8% mediante quimioluminiscencia. Las imágenes fueron analizadas por el software Image Lab™ (Bio-Rad, California, USA) para verificar la presencia del inserto. Para determinar el peso molecular de las bandas de ADN plasmídicos se empleó el marcador de peso molecular Thermo Scientific GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder. Ref SM1333.Lot 000730688.

Curva de crecimiento *E. coli* BL21STAR transformada

Una crioperla de la BL21STAR transformada fue usada para realizar un inóculo de 5 ml de medio líquido LB en presencia de 50 µg/ml de Kanamicina. El inóculo se incubó a 37 °C con agitación constante a 200 rpm durante 16 h. Se midió la OD₅₅₀ del cultivo resultante y se diluyó a una OD₅₅₀ = 0.05 en un volumen final de 100 mL. El nuevo cultivo con LB/Kanamicina se incubó a 37 °C con agitación constante de 200 rpm durante 9 horas y se midió la OD₅₅₀ cada hora para establecer la fase exponencial a la cual se debería inducir la producción mediante la adición de IPTG. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Pruebas de producción de la rOPN-H6

Las pruebas de expresión se realizaron de acuerdo con lo reportado para cepas de *E. coli* (Rueda et al., 2014). Se realizó un inóculo de 5 mL que se dejó en crecimiento a 37°C durante 16 h en medio LB conteniendo Kanamicina (50 µg/mL) y agitación constante a 200 rpm. Después de la incubación, el cultivo resultante se usó para inocular 50 mL de LB/Kanamicina a una OD₅₅₀ inicial de 0.05 (por triplicado). Cada nuevo cultivo se incubó a 37 °C durante 2.5 h hasta llegar a la fase exponencial de la BL21STAR transformada y se realizó la inducción con dos concentraciones de IPTG (0.1 y 1.0 mM). Después de la inducción, se realizó la producción de la rOPN-H6 con tres temperaturas (20, 30 y 37 °C) durante 3h a 37 °C y 16 h a 20 y 30 °C. Después de la prueba de producción, cada cultivo se centrifugó a 4500 xg durante 15 min y cada pellet se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

Disrupción celular

Los pellets obtenidos de las pruebas de producción se sometieron a disrupción celular para liberar la rOPN-H6 producida. Cada pellet fue resuspendido en 1 mL de PBS conteniendo un coctel inhibidor de proteasas (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA). Cada suspensión se dejó en baño de hielo y se sometió a ultrasonido mediante un sonicador (Omni Sonic Ruptor 400 150 Ultrasonic Homogenizer, Kennesaw, USA) a potencia del 20% en ciclos “on/off” de 0.5 seg durante 5 min. Se realizaron 3 rondas de ultrasonido por pellet y se centrifugaron a 4500xg durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes y pellets se separaron para evaluar la producción de rOPN-H6 soluble y en agregados (cuerpos de inclusión).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot

Las fracciones solubles e insolubles se sometieron a SDS-PAGE de acuerdo con el método descrito por Lammeli (Nature, 1970), en geles de poliacrilamida al 15%. Las muestras fueron desnaturalizadas con uso de β-mercaptoetanol y Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) mediante incubación a 98 °C durante 5 min para la fase soluble y 45 min para la fase insoluble. Se usó buffer Tris-Glicina con SDS (pH 8.0) para la separación electroforética, la cual se realizó en una cámara Mini Protean Tetra vertical electrophoresis cell (Bio-Rad, California, USA) durante 1.5 h a 100 V. Para determinar el peso molecular de las bandas de proteína, se utilizó el marcador de peso Precisión Plus Protein™ Dual Xtra (Bio-Rad, California, USA), con rango de peso entre 2 kDa hasta 250 kDa.

Por su parte, el Western Blot se llevó a cabo mediante transferencia de los geles de la SDS-PAGE a una membrana PVDF mediante el uso de solución de bloqueo un único anticuerpo anti-his (SIGMA A7058-1VL) en dilución 1:2000, incubado durante 2 h. El revelado de las membranas se realizó con un sustrato

revelador Vector VIP Peroxidase Substrate (Vector Laboratories SK-4600). El análisis de los geles SDS-PAGE y las membranas de Western Blot se realizó mediante la digitalización de la imagen con el documentador Gel-Doc XR y el software Imagen Lab (Bio-Rad, California, USA).

Purificación de rOPN-H6 soluble

Luego de obtenidas las condiciones óptimas de producción para rOPN-H6 en su forma soluble, se realizaron producciones de 1000 mL. La fase soluble obtenida luego de la disrupción fue filtrada en membranas de 0.22 μm e inyectada en una columna de afinidad a la histidina HisTrap HP (GE Healthcare Bio-Sciences AB Björkgatan, Sweden) de 1.0 ml conteniendo Níquel como agente quelante. La elución se realizó mediante 20 volúmenes de columna con cinco diferentes buffers con aumento secuencial de la concentración de imidazol desde 10 a 500 mM: buffer A (10 mM), B1 (50 mM), B2 (200 mM), B3 (350 mM) y B4 (500 mM). Las fracciones obtenidas se sometieron a SDS-PAGE y Western Blot de acuerdo con la metodología que se describe previamente.

Cuantificación de rOPN-H6 soluble

La cuantificación de la proteína presente en las fracciones eluidas de la columna de afinidad se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se hizo una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (50, 100, 200 300, 400, 500, 600 700 y 800 $\mu\text{g/mL}$). 2.0 μL de curva y muestras se depositaron en placas de Elisa de 96 pozos y se adicionó 100 μL de reactivo de Bradford en previamente diluido con agua destilada-desionizada (1:5). La absorbancia se midió a 620 nm a través de un lector de placas Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek, VT, USA) y se calculó la concentración de proteína por regresión lineal con las absorbancias de la curva de BSA (ecuación: $Y=2742.9x - 516.64$; $R^2 = 0.9947$)

Análisis estadístico

Se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para determinar si la distribución de los datos era normal. De acuerdo con los resultados de normalidad se optó por realizar una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar diferencias en el crecimiento (OD_{550}) entre las diferentes temperaturas de los cultivos. Se realizaron pruebas de rango post hoc para determinar medias como subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí para el caso de la temperatura en este caso se empleó en la temperatura. Para el caso de las diferencias en las concentraciones de IPTG, se realizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La OPN es una proteína reconocida por tener múltiples funciones, destacándose su relación con la fertilidad en el macho bovino (Kumar et al., 2012). Aunque sus variaciones estructurales son amplias, se sabe que en el plasma seminal participa en el proceso de unión entre el espermatozoides y el ovocito a través de receptores de la familia integrina y glucoproteínas transmembranales CD44 (Eduardo et al., 2008). En este sentido, lograr su producción de forma recombinante, nos facilita conocer sus características estructurales y funcionales, además contribuye a dilucidar su participación en los procesos reproductivos. Al respecto, la fábrica celular seleccionada fue *E.coli*, debido a su versatilidad, múltiples opciones genéticas y fácil cultivo, así como costos de los medios (Cajazeiras et al., 2009).

Lo anterior podría ser una ventaja de cara a un proceso de escalamiento en el desarrollo de un biotecnológico que pueda ser usado para suplementar medios para los procesos de criopreservación espermática o producción de embriones *in vitro*. A partir de la transformación de la cepa BL21STAR de *E.coli* con el constructo pET 28(a+)-OPN-H6, se observó la presencia de treinta colonias que crecieron en LB-Agar con Kanamicina. De estas colonias se seleccionaron tres y se realizó la comprobación mediante extracción del ADN plasmídico y su digestión con las enzimas *Mlu*I y *Xho*I. Los resultados de la restricción, visualizados en el gel de agarosa, coincidieron con el patrón de bandas teórico de acuerdo con el mapa de restricción: dos bandas de 4404 pb y 1678 pb (Figura 3).

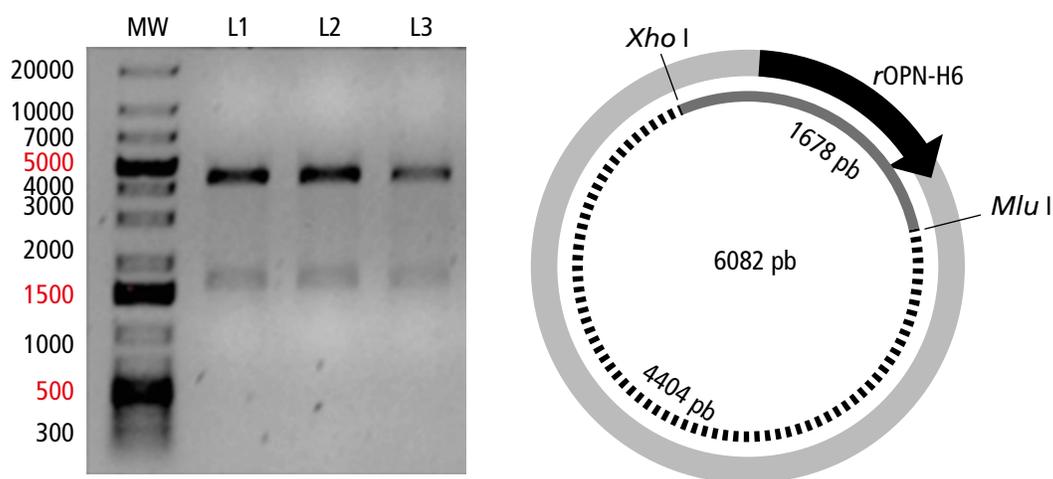


FIGURA 3. Digestión enzimática con *Xho*I y *Mlu*I de los plásmidos extraídos a partir de cultivos de colonias seleccionadas en placas de agar con Kanamicina. El tamaño de cada fragmento visualizado en geles de agarosa al 0.8% (lado izquierdo) corresponde a los tamaños esperados según el mapa de restricción del constructo pET28(a+)-rOPN-H6 (lado derecho). MW: Marcador de peso Gene Ruler (300-20000 pb); y L1-L3: Plásmidos digeridos con las enzimas de restricción extraídos de las colonias positivas.

Una vez transformada, la cinética de crecimiento de *E. coli* BL21STAR en medio LB evidenció el inicio de la fase exponencial a las 3 horas a 37 °C y 200 rpm, momento en el cual se realizó la inducción de la producción de rOPN-H6 mediante IPTG (Figura 4).

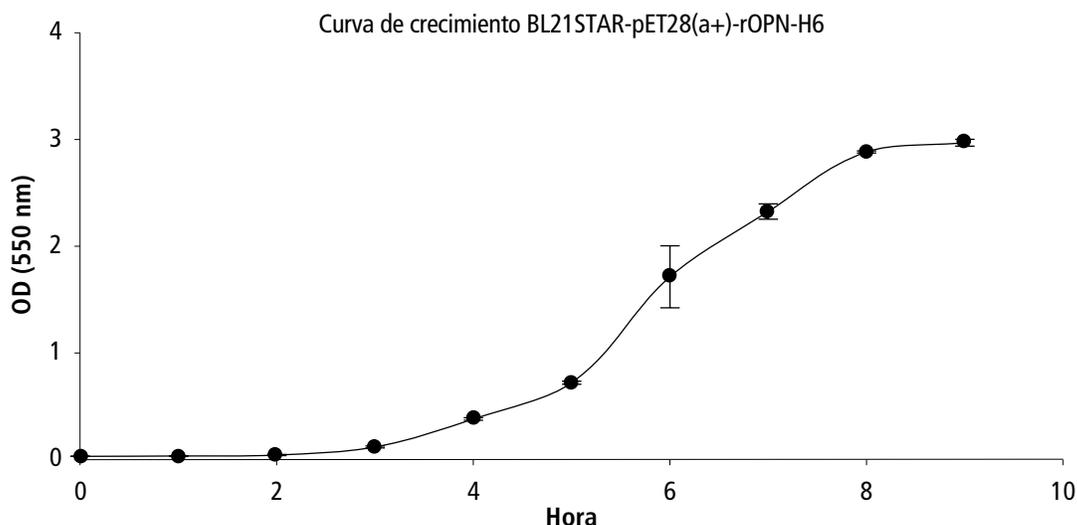


FIGURA 4. Cinética de crecimiento de la cepa de *E. coli* BL21STAR transformada con el plásmido pET28(a⁺)-rOPN-H6. Se midió la OD₅₅₀ cada hora durante 9 horas para establecer el inicio de la fase exponencial y determinar el tiempo óptimo de inducción mediante IPTG para la producción de rOPN-H6.

Las pruebas de producción de rOPN-H6 se realizaron en tres temperaturas diferentes: 20 ,30 y 37 ° C; y dos diferentes concentraciones de inductor: 0.1 y 1.0 mM de IPTG. Los resultados evidenciaron que no hubo diferencias estadísticas significativas ($p = 0.36$) cuando se evaluó la OD₅₅₀ al final de la producción. Se compararon los tratamientos entre la temperatura y la concentración de IPTG (Figura 5). Sin embargo, cuando se realizó la detección de la proteína con el anticuerpo anti-His, se determinó que únicamente se obtuvieron cantidades detectables de rOPN-H6 con una producción a 37 °C, independientemente de la concentración de IPTG (Figura 6).

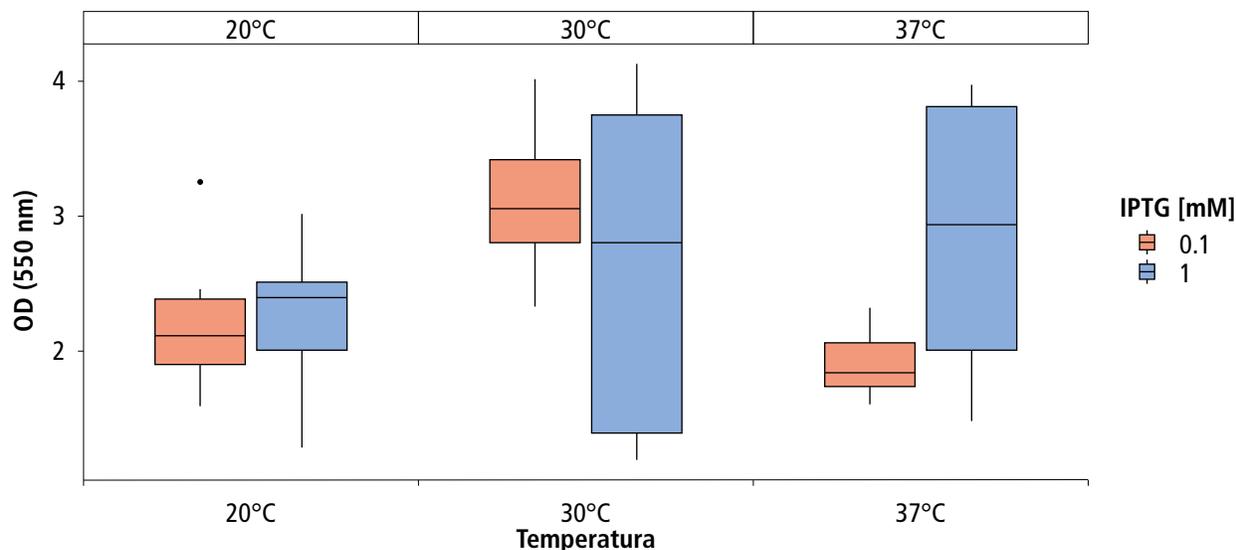


FIGURA 5. Diferencias de crecimiento de BL21STAR ($P < 0.05$) transformada con pET28(a+)-rOPN-H6 luego de inducir la producción con IPTG a dos concentraciones (0.1 y 1.0 mM). Se realizaron pruebas de crecimiento a tres temperaturas (20, 30 y 37°C) y se compararon mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Adicionalmente, la proteína detectable solo se visualizó en las fracciones solubles en el Western Blot. Las membranas reveladas después de la transferencia evidenciaron la presencia de una banda cuyo peso molecular se calculó en 60 kDa (Figura 6).

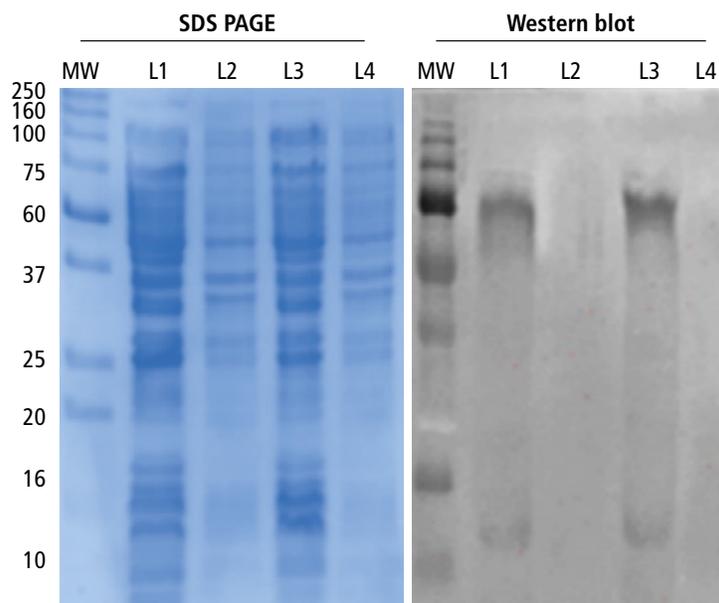


FIGURA 6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las fracciones solubles (L1 y L3) e insolubles (L2 y L4) extraídas de cultivos de BL21STAR, transformadas con pET28(a+)-rOPN-H6. Los cultivos se realizaron a 37 °C y la producción se realizó durante 3 h, previa inducción con IPTG 0.1 mM (L1 y L2) y 1.0 mM (L3 y L4). Mw: marcador de peso molecular con rango entre 10 y 250 kDa.

E. coli también ha sido la fábrica celular seleccionada para la producción de proteínas recombinantes de interés en reproducción bovina como la Espermadhesina-1 (Bustamanete Filho, 2010), conocida como la proteína ácida del fluido seminal (aSFP), incluso la misma *rOPN-H6* producida en condiciones similares (Bustamante-Filho et al., 2021). En la presente investigación se utilizó la cepa BL21 STAR para la producción de la *rOPN-H6*, ya que sus características genéticas permiten una mejor producción de las proteínas recombinantes. Características como la presencia del lisógeno DE3, permite el transporte del gen para la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lacUV5*, haciendo un control más preciso de la producción. Adicionalmente, BL21STAR presenta una mutación en el gen de la ARNasa E (*rne131*), lo cual reduce la degradación del ARNm y en consecuencia aumenta la estabilidad de los transcritos y la producción de proteínas (García-Fraga et al., 2015). Lo anterior puede ser la razón por la cual la proteína se produjo únicamente a 37 °C, debido a que las características de estas células bacterianas no requieren bajas temperaturas para que la maquinaria celular produzca las proteínas. A pesar de que BL21STAR carece de los genes de las proteasas *OmpT* e *lon* (Ono et al., 2007), se evidenció que la *rOPN-H6* se produjo de manera soluble en su totalidad. Esto puede deberse también a la estabilidad del ARNm, producto de las mutaciones en la cepa. Al respecto, los trabajos que han expresado *rOPN-H6* en *E. coli* reportan mayor cantidad de agregados insolubles como cuerpos de inclusión respecto a la proteína soluble (I. C. Bustamante-Filho et al., 2021), lo que ha hecho necesaria la introducción de protocolos de solubilización adicionales usando urea altamente concentrada.

En este caso, la producción no evidenció la presencia de cuerpos de inclusión, lo que puede deberse a dos cosas: 1) La eliminación del péptido señal de secreción para expresar la OPN de forma madura (como se encontraría en el plasma seminal); y 2) la optimización de codones para *E. coli* que se realizó en la síntesis del gen. Al respecto, se ha descrito que la optimización del uso de codón de *E. coli* para proteínas heterólogas favorece la solubilidad en la expresión debido a que elimina la presencia de codones “raros” favoreciendo la eficiencia en la traducción (Retnoningrum et al., 2012). Adicionalmente, se sabe que en la formación de cuerpos de inclusión insolubles predomina la formación de hojas de plegamiento tipo beta en la estructura secundaria de las proteínas recombinantes (Carbonell & Villaverde, 2002). En este caso, la proteína que contiene el péptido señal presenta una interrupción en las hélices alfa según el modelo tridimensional (Figura 1), lo cual podría ser la diferencia en términos de solubilidad.

Una vez se establecieron las mejores condiciones para la producción de *rOPN-H6* soluble mediante su expresión en diferentes temperaturas, se realizaron las producciones a un volumen de 1L en incubación a 37 °C con 0.1 mM de IPTG. La proteína obtenida de estas se purificó mediante columnas de afinidad, usando diferentes concentraciones de imidazol. Se determinó

la cantidad de proteína en las fracciones eluidas con cada buffer para establecer el patrón de separación. Los resultados evidenciaron que la *rOPN-H6* eluyó en dos picos definidos cuando se usó buffer con imidazol 200 mM (Figura 7). Se realizaron cinco producciones y purificaciones bajo las mismas condiciones y se determinó que en promedio la producción de *rOPN-H6* es de 0.11 ± 0.04 mg/L después de purificar por afinidad.

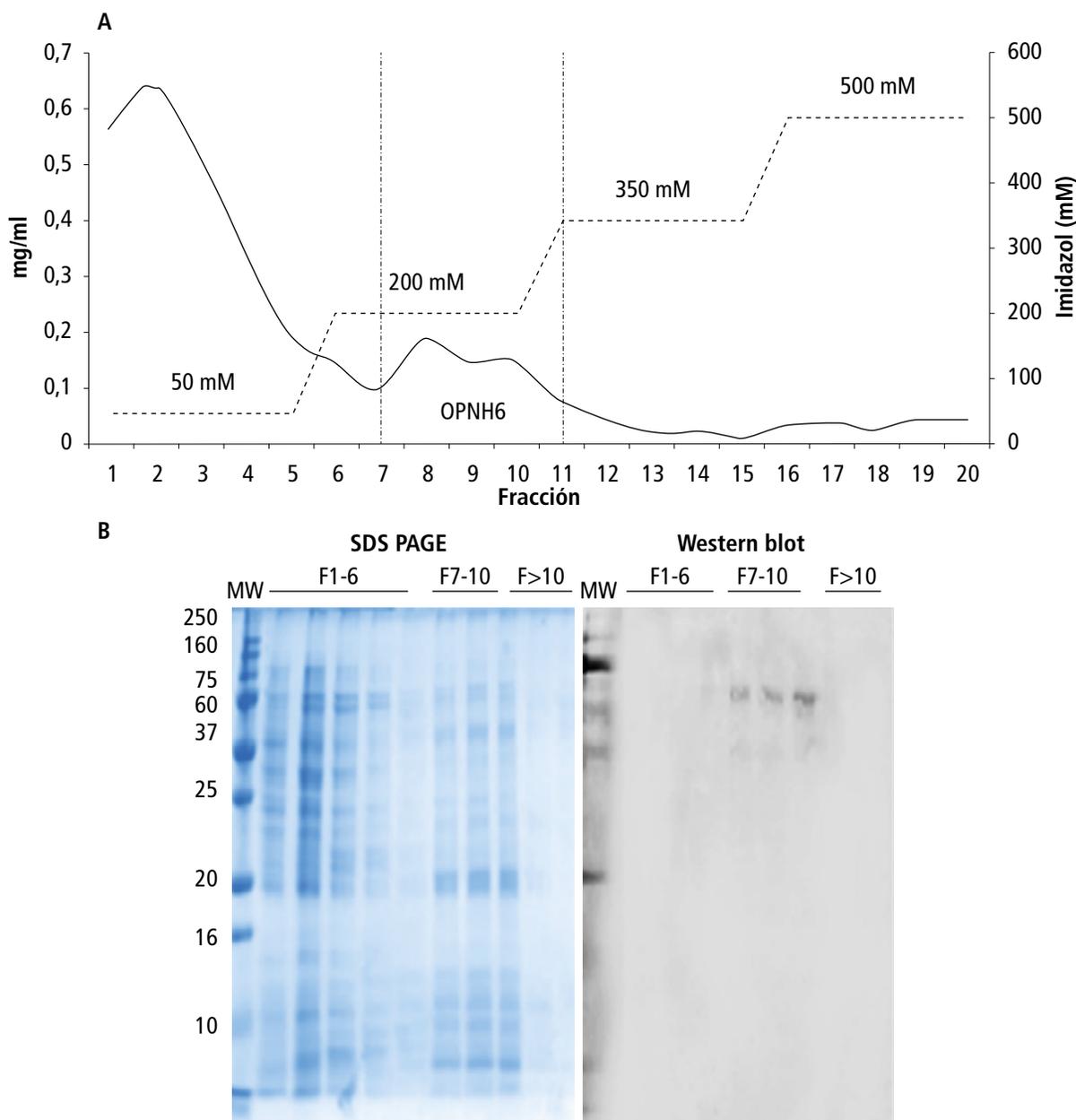


FIGURA 7. Purificación de *rOPN-H6* mediante columnas de afinidad a la histidina. A) Separación en fracciones usando diferentes concentraciones de imidazol, y B) electroforesis en geles de poliácridamida (SDS-PAGE) y Western Blot de las fracciones eluidas (F) a través de la columna de afinidad. Mw: marcador de peso molecular con rango entre 10 y 250 kDa.

La secuencia de la *rOPN-H6* producida en este trabajo tiene un peso molecular teórico de cerca de 30 kDa, la mitad del peso determinado en la SDS-PAGE y el Western Blot (60 kDa). Lo anterior, junto con la presencia de dos picos muy cercanos en la purificación con un patrón de elución semejante indica la posibilidad de que la *rOPN-H6* producida pueda tener cierta tendencia a la dimerización, lo que sugiere una interacción de las colas de histidinas (6x His) posiblemente con alguna parte de la estructura primaria. En este sentido, se ha descrito que la presencia de la cola de histidinas puede mediar dimerizaciones (Haglin et al., 2017), y que esta organización no solo influye en la arquitectura de complejos multipeptídicos, sino además tiene un efecto positivo en la estabilidad y función de proteínas de auto-ensamble con tendencia a formar nanopartículas funcionales (Rueda et al., 2015). Esta particularidad debería ser tenida en cuenta al evaluar sus características funcionales en futuras investigaciones.

Por último, la purificación de *rOPN-H6* arrojó una cantidad de alrededor de 0.1 mg por cada litro de cultivo de *E.coli* BL21STAR transformada, cantidad recuperada después de la elución en columnas de afinidad. Aunque estas cantidades dependen en un alto grado de la naturaleza de la proteína, algunos autores reportan cantidades muy superiores de proteínas recombinantes de diferente naturaleza que van desde los 5 hasta los 34 mg por 50 mL de cultivo cuando se usan estrategias similares a las realizadas en este trabajo (optimización de codón, uso de cepas especializadas y control de condiciones de expresión) (Sivashanmugam et al., 2009). Sin embargo, un escalamiento en biorreactores en el que se pueda aumentar la biomasa y conseguir un control más fino de las condiciones de crecimiento, pH de los medios y condiciones de crecimiento, así como la optimización de las condiciones de la purificación, podría aumentar la producción de *rOPN-H6*, sugiriéndose para su producción bioindustrial. Lo anterior dependería de que *rOPN-H6* tenga una eficiencia suficiente en pruebas de criopreservación espermática y/o fertilización *in vitro*.

CONCLUSIONES

La importancia de las proteínas en los procesos de biotecnología reproductiva continúa siendo reconocida en grupos de investigación a nivel global. En el caso de la OPN, su importancia solo ha sido ampliamente reconocida en el proceso de fertilización del espermatozoide. Los resultados que se presentan en este trabajo demuestran la mejor forma de expresar y purificar OPN recombinante en condiciones de laboratorio cuando se usa la cepa especializada de *E. coli* BL21STAR como fábrica celular bacteriana. De forma interesante, ni la temperatura ni las concentraciones de IPTG influenciaron la formación de agregados y se obtuvo la proteína recombinante en su mayoría soluble. Conseguir expresarla en su forma soluble prácticamente en su totalidad no solo

constituye una ventaja en términos de producción y purificación mediante columnas de afinidad, sino que abre las puertas para un estudio más detallado de su estructura y función. Así mismo, las cantidades obtenidas después de la purificación, en las condiciones planteadas, representa un importante primer paso en el camino para el desarrollo de un biotecnológico que pueda aumentar la eficiencia de herramientas biotecnológicas de uso frecuente en la reproducción bovina. Todo esto en conjunto hace que valga la pena el planteamiento de futuros experimentos que involucren el uso de rOPN-H6 en procesos de criopreservación espermática, fertilización *in vitro* y producción de embriones bovinos de alto valor genético.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo hizo parte del proyecto: “Soluciones biotecnológicas para mejorar el desempeño reproductivo de los bovinos en procesos *in vivo* e *in vitro*” con la financiación del Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural MADR, TV18 (Agenda Dinámica Corporativa de AGROSAVIA).

REFERENCIAS

- Alvarez-gallardo, H., Kjelland, M. E., Moreno, J. F., Jr, T. H. W., Lara-sagaho, A. V, Randel, R. D., Lammoglia, M. A., Pe, M., Romo, S., & Espero, E. (2013). *Gamete Therapeutics : Recombinant Protein Adsorption by Sperm for Increasing Fertility via Artificial Insemination*. 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065083>.
- Barrios, B., Pe, R., Gallego, M., Muin, T., & Cebria, A. (2000). *Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane 1 and Jose*. 1537, 1531–1537. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1531>
- Boccia, L., Di Francesco, S., Neglia, G., De Blasi, M., Longobardi, V., Campanile, G., & Gasparrini, B. (2013). Osteopontin improves sperm capacitation and *in vitro* fertilization efficiency in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 80(3), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.017>.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Bustamante Filho, I. C. (2010). Cloning, expression and purification of proteins from bovine seminal plasma related with semen freezability. In *Science*. e [Trabajo de grado, Repositorio institucional Universidade Federal do Rio Grande do sul]. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/23020>
- Bustamante-Filho, I. C., Renato Menegassi, S., Ribas Pereira, G., Dias Salton, G., Mosena Munari, F., Roberto Schneider, M., Costa Mattos, R., Otávio Jardim Barcellos, J., Pereira Laurino, J., Obino Cirne-Lima, E., & Inês Mascarenhas Jobim, M. (2021). Bovine seminal plasma osteopontin: Structural modelling, recombinant expression and its relationship with semen quality. *Andrologia*, 53(1), 1–15. <https://doi.org/10.1111/and.13905>

- Bustamante-Filho, I., Salton, G. D., Munari, F. M., Schneider, M. R., Mattos, R. C., Laurino, J. P., Cirne-Lima, E. O., & Jobim, M. I. M. (2014). Recombinant expression and purification of the bovine acidic Seminal Fluid Protein. *Animal Reproduction*, *11*(2), 96–103.
- Cajazeiras, J. B., Melo, L. M., Albuquerque, E. S., Rádis-Baptista, G., Cavada, B. S., & Freitas, V. J. F. (2009). Analysis of protein expression and a new prokaryotic expression system for goat (*Capra hircus*) spermadhesin Bdh-2 cDNA. *Genetics and Molecular Research : GMR*, *8*(3), 1147–1157. <https://doi.org/10.4238/vol8-3gmr639>
- Cancel, a M., Chapman, D. a, & Killian, G. J. (1997). Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, *57*(6), 1293–1301. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.6.1293>
- Carbonell, X., & Villaverde, A. (2002). *Protein aggregated into bacterial inclusion bodies does not result in protection from proteolytic digestion*. 1939–1944. <https://doi.org/10.1023/A:1021173114193>
- Eduardo, C., Souza, A., Moura, A. A., & Killian, G. J. (2008). *Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1 / A2 , 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid* & &. *105*, 72–89. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.027>
- Gabler, C., Chapman, D. A., & Killian, G. J. (2003). Expression and presence of osteopontin and integrins in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Reproduction*, *126*(6), 721–729. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260721>
- García-Fraga, B., da Silva, A. F., López-Seijas, J., & Sieiro, C. (2015). Optimized expression conditions for enhancing production of two recombinant chitinolytic enzymes from different prokaryote domains. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *38*(12), 2477–2486. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1485-5>
- Haglin, E. R., Yang, W., Briegel, A., & Thompson, L. K. (2017). His-Tag-Mediated Dimerization of Chemoreceptors Leads to Assembly of Functional Nanoarrays. *Biochemistry*, *56*(44), 5874–5885. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00698>
- Icer, M. A., & Gezmen-Karadag, M. (2018). The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clinical Biochemistry*, *59*(July), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003>
- Liu, Q., Xie, Q. Z., Zhou, Y., & Yang, J. (2014). Osteopontin is expressed in the oviduct and promotes fertilization and preimplantation embryo development of mouse. *Zygote*, *760*. <https://doi.org/10.1017/S0967199414000483>
- Monaco, E., Gasparrini, B., Boccia, L., De Rosa, A., Attanasio, L., Zicarelli, L., & Killian, G. (2009). Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. *Theriogenology*, *71*(3), 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.08.012>
- Moura, A. A. (2005). *Seminal plasma proteins and fertility indexes in the bull : The case for osteopontin*. *Anim Reprod*, *2*, March, 3–10.
- Nature. (1970). Laemmli buffer Background Purpose of the Laemmli buffer Laemmli Buffer Recipe Preparation Recommended Storage Temperature of Laemmli buffer Laemmli buffer References. *Nature*.
- Ono, B., Kimiduka, H., Kubota, M., Okuno, K., & Yabuta, M. (2007). Role of the ompT mutation in stimulated decrease in colony-forming ability due to intracellular

- protein aggregate formation in *Escherichia coli* strain BL21. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(2), 504–512. <https://doi.org/10.1271/bbb.60541>
- Peris, S. I., Bilodeau, J. F., Dufour, M., & Bailey, J. L. (2007). Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Molecular Reproduction and Development*, 74(7), 878–892. <https://doi.org/10.1002/mrd.20686>
- Prince, C. W. (1989). Secondary structure predictions for rat osteopontin. *Connective Tissue Research*, 21(1–4), 15–20. <https://doi.org/10.3109/03008208909049991>
- Retnoningrum, D. S., Pramesti, H. T., Santika, P. Y., Valerius, O., Asjarie, S., & Suciati, T. (2012). Codon optimization for high level expression of human bone morphogenetic protein-2 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 84(2), 188–194. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.05.010>
- Rueda, F., Cano-Garrido, O., Mamat, U., Wilke, K., Seras-Franzoso, J., García-Fruitós, E., & Villaverde, A. (2014). Production of functional inclusion bodies in endotoxin-free *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22), 9229–9238. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6008-9>
- Rueda, F., Céspedes, M. V., Conchillo-Solé, O., Sánchez-Chardi, A., Seras-Franzoso, J., Cubarsi, R., Gallardo, A., Pesarrodona, M., Ferrer-Miralles, N., Daura, X., Vázquez, E., García-Fruitós, E., Mangues, R., Unzueta, U., & Villaverde, A. (2015). Bottom-Up Instructive Quality Control in the Biofabrication of Smart Protein Materials. *Advanced Materials*, 27(47), 7816–7822. <https://doi.org/10.1002/adma.201503676>
- Rueda, F., Garcés P, T., Herrera L, R., Arbeláez R, L., Peña J, M., Velásquez P, H., Hernández V, A., & Cardozo C, J. (2013). Seminal plasma proteins increase the post-thaw sperm viability of Sanmartinero bull's semen. *Revista MVZ Cordoba*, 18(1), 3327–3335.
- Sicherle, C. C., Maia, M. S., Bicudo, S. D., Rodello, L., & Azevedo, H. C. (2011). Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen supplemented with catalase or Trolox. *Small Ruminant Research*, 95(2–3), 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.10.011>
- Singh, B. P., Asthana, A., Basu, A., & Tangirala, R. (2020). Conserved core tryptophans of FnII domains are crucial for the membranolytic and chaperone-like activities of bovine seminal plasma protein PDC-109. 594, 509–518. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13617>
- Sivashanmugam, A., Murray, V., Cui, C., Zhang, Y., Wang, J., & Li, Q. (2009). Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. 18(1), 936–948. <https://doi.org/10.1002/pro.102>
- Thérien, I., Moreau, R., & Manjunath, P. (1999). Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, 61, 590–598. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.3.590>
- Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871–891. <https://doi.org/10.1071/RD9950871>
- Wei, R., Wong, J. P. C., & Kwok, H. F. (2017). Osteopontin - A promising biomarker for cancer therapy. *Journal of Cancer*, 8(12), 2173–2183. <https://doi.org/10.7150/jca.20480>

Willfors, J., Morrell, J. M., Resjö, S., Hallap, T., Padrik, P., Siino, V., de Koning, D. J., Andreasson, E., Levander, F., & Humblot, P. (2021). Stable bull fertility protein markers in seminal plasma. *Journal of Proteomics*, 236, 104135. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104135>