

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN MOLECULAR *IN SITO* DE SARS-COV-2



Diana Angélica Tapia Sidas¹, Roberto Ruíz Medrano¹, Berenice Calderón Pérez¹, Brenda Yazmín Vargas Hernández¹, José Abrahán Ramírez Pool¹, Leandro Alberto Núñez Muñoz¹, Rogelio González González¹, Luis Gabriel Brieba de Castro², Beatriz Xoconostle Cázares¹.

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Ciudad de México, CP. 07360.

dianaa.tapia@cinvestav.mx; bxoconos@cinvestav.mx.

RESUMEN

Una de las estrategias para controlar la pandemia causada por SARS-CoV-2 es la realización masiva de pruebas diagnósticas para aislar a los infectados. Hoy en día la prueba oficial basada en la RT-qPCR no ha logrado cubrir la demanda de diagnóstico del virus. La técnica de RT-LAMP se ha establecido como un excelente método diagnóstico de infecciones virales, siendo una alternativa viable para la detección de SARS-CoV-2. El objetivo del presente proyecto es desarrollar un sistema de detección de SARS-CoV-2 rápido, práctico, altamente sensible, específico y autosustentable basado en la técnica de RT-LAMP. Para lograrlo, se llevó a cabo la producción y purificación de las enzimas recombinantes Bst DNA polimerasa y transcriptasa inversa, las cuales fueron utilizadas para el establecimiento de un ensayo de RT-LAMP para la detección específica de SARS-CoV-2 mediante fluorescencia y colorimetría. El sistema de detección propuesto permitió detectar al virus de forma específica en muestras de RNA de pacientes infectados, así como en transcritos *in vitro* y material de referencia.

Introducción

La pandemia causada por SARS-CoV-2 ha afectado a más de 160 millones de personas a nivel mundial (1). En ausencia de vacunas y fármacos efectivos contra este nuevo virus, se requiere de cantidades masivas de pruebas diagnósticas para aislar a los infectados y así controlar la pandemia. La RT-PCR en tiempo real no ha logrado cubrir la demanda de diagnóstico masivo de SARS-CoV-2 debido a su alto consumo de tiempo y a la escasez mundial de reactivos, equipo especializado, personal entrenado y laboratorios autorizados requeridos para esta prueba (2). La técnica de RT-LAMP (siglas en inglés de *Reverse Transcription Loop-mediated isothermal AMplification*) es una excelente alternativa para el diagnóstico viral *in sitio* debido a su rapidez, practicidad, fácil interpretación, alta sensibilidad, especificidad y uso de equipo no sofisticado (3).

Objetivos

- Expresión y purificación de las enzimas Bst DNA polimerasa y reverso transcriptasa.
- Establecimiento y estandarización de un sistema de detección molecular basado en RT-LAMP para el diagnóstico *in sitio* de SARS-CoV-2, utilizando enzimas de producción propia y oligos diseñados por nuestro grupo.

Metodología

- Las enzimas Bst DNA polimerasa (Bst) y reverso transcriptasa (RT) fueron producidas de forma recombinante en *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el sistema de chaperonas pKJE7 y purificadas por cromatografía líquida de acuerdo con protocolos establecidos por el laboratorio de Bioquímica estructural de LANGEBIO.
- Se evaluó la actividad enzimática de las proteínas recombinantes. La enzima Bst DNA polimerasa se evaluó mediante la técnica de LAMP modificada (4), mientras que la transcriptasa reversa se evaluó mediante una reacción de RT-PCR.
- Se estableció un ensayo de RT-LAMP colorimétrico y fluorométrico para la detección del gen N1 de SARS-CoV-2 y del gen de la RNasa P como control endógeno, utilizando las enzimas purificadas bajo las condiciones descritas en la literatura para esta técnica (5).

Resultados

- Las enzimas Bst DNA polimerasa y reverso transcriptasa, recuperadas en la fase soluble, fueron purificadas mediante un proceso de dos pasos cromatográficos.
- Ambas enzimas demostraron tener actividad enzimática tras su purificación.
- Las enzimas Bst DNA polimerasa y reverso transcriptasa purificadas fueron utilizadas para la amplificación específica del gen N1 de SARS-CoV-2 y del gen de RNasa P a partir de un ensayo de RT-LAMP.

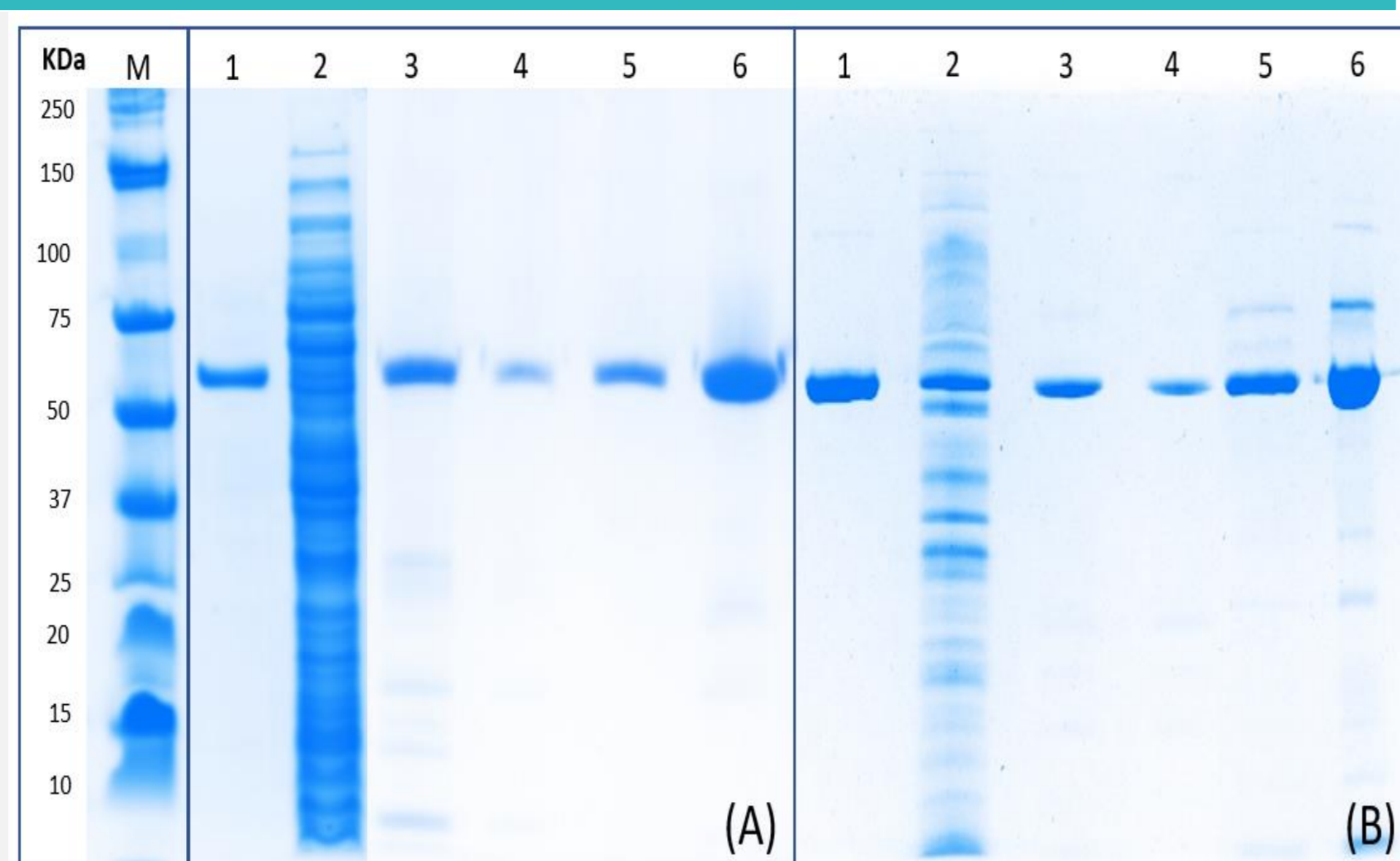


Fig. 1. Expresión y purificación de las enzimas recombinantes: (A) RT y (B) Bst. M: marcador de peso molecular; 1: control positivo; 2: fase soluble; 3: 1ra. Purificación por afinidad a níquel; 4: desalado; 5: 2da. Purificación por intercambio catiónico (RT) o por afinidad a heparina (Bst); 6: proteína concentrada final.

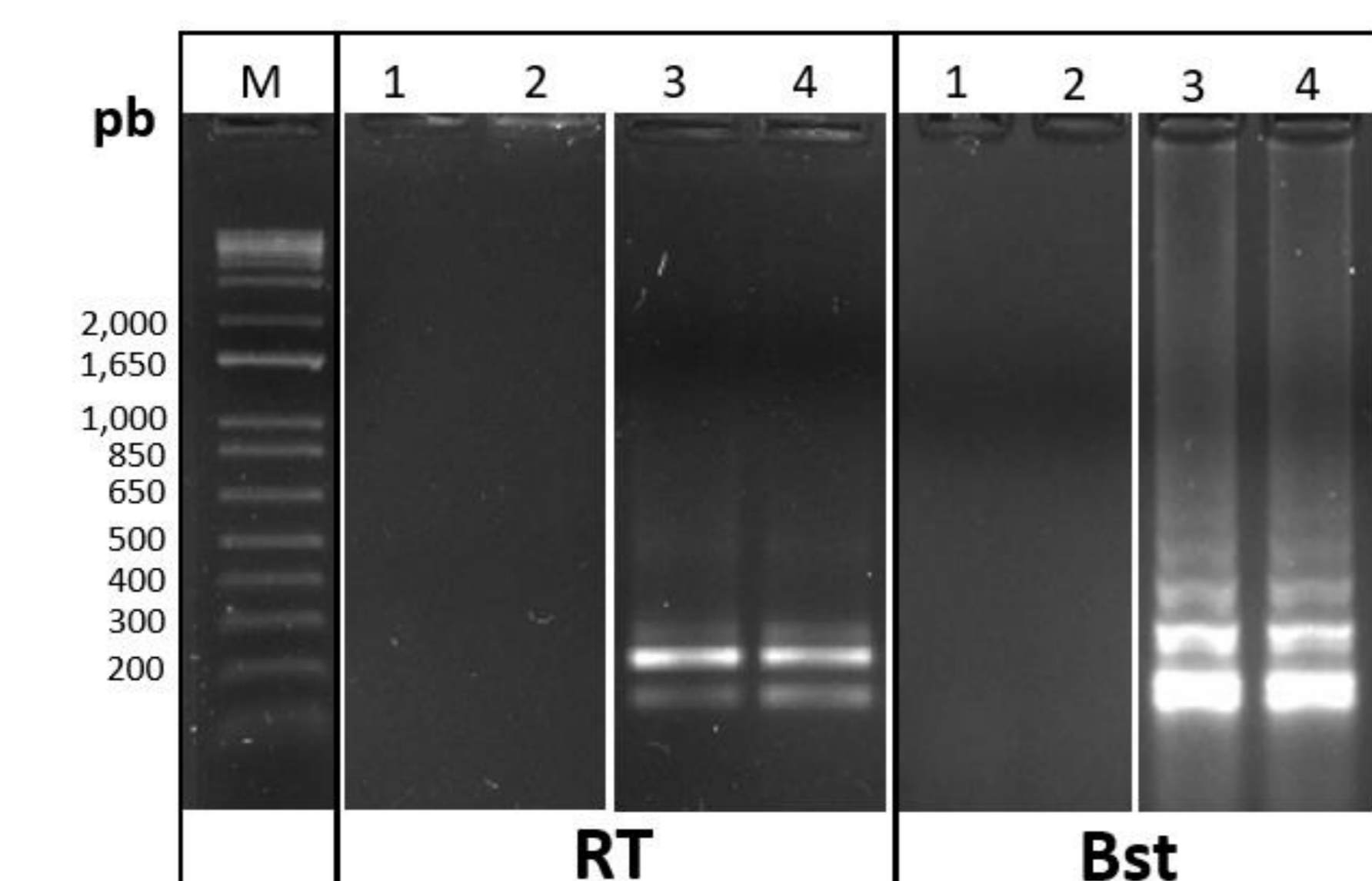
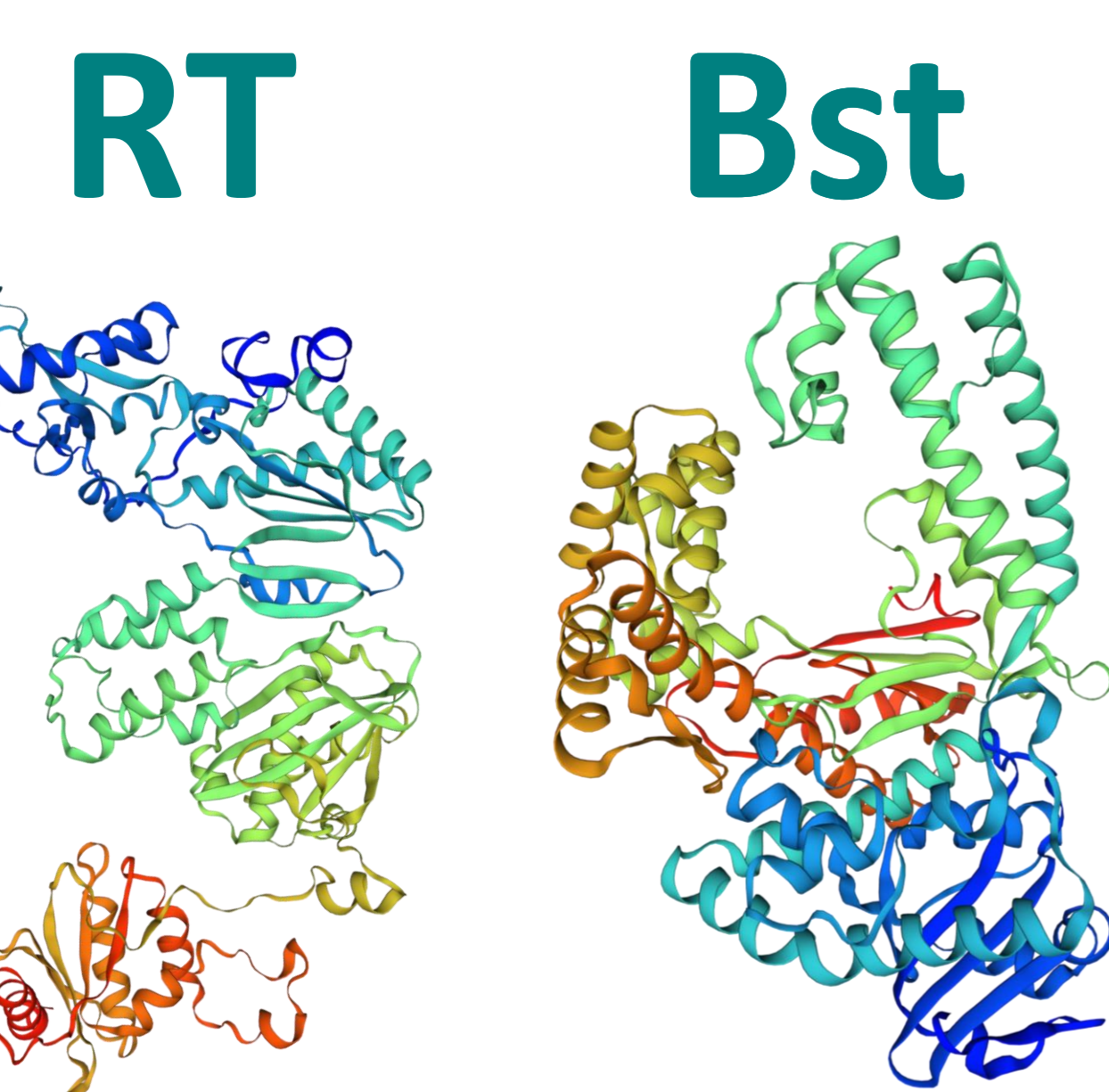


Fig. 2. Evaluación de actividad enzimática de las enzimas purificadas: RT y Bst. M: marcador de peso molecular; 1-2: Control negativo (sin templado); 3-4: Control positivo. RT: Transcrito del gen endógeno RNasa P. Bst: DNA plasmídico con fragmento del gen N1 de SARS-CoV-2.

Sistemas de Detección

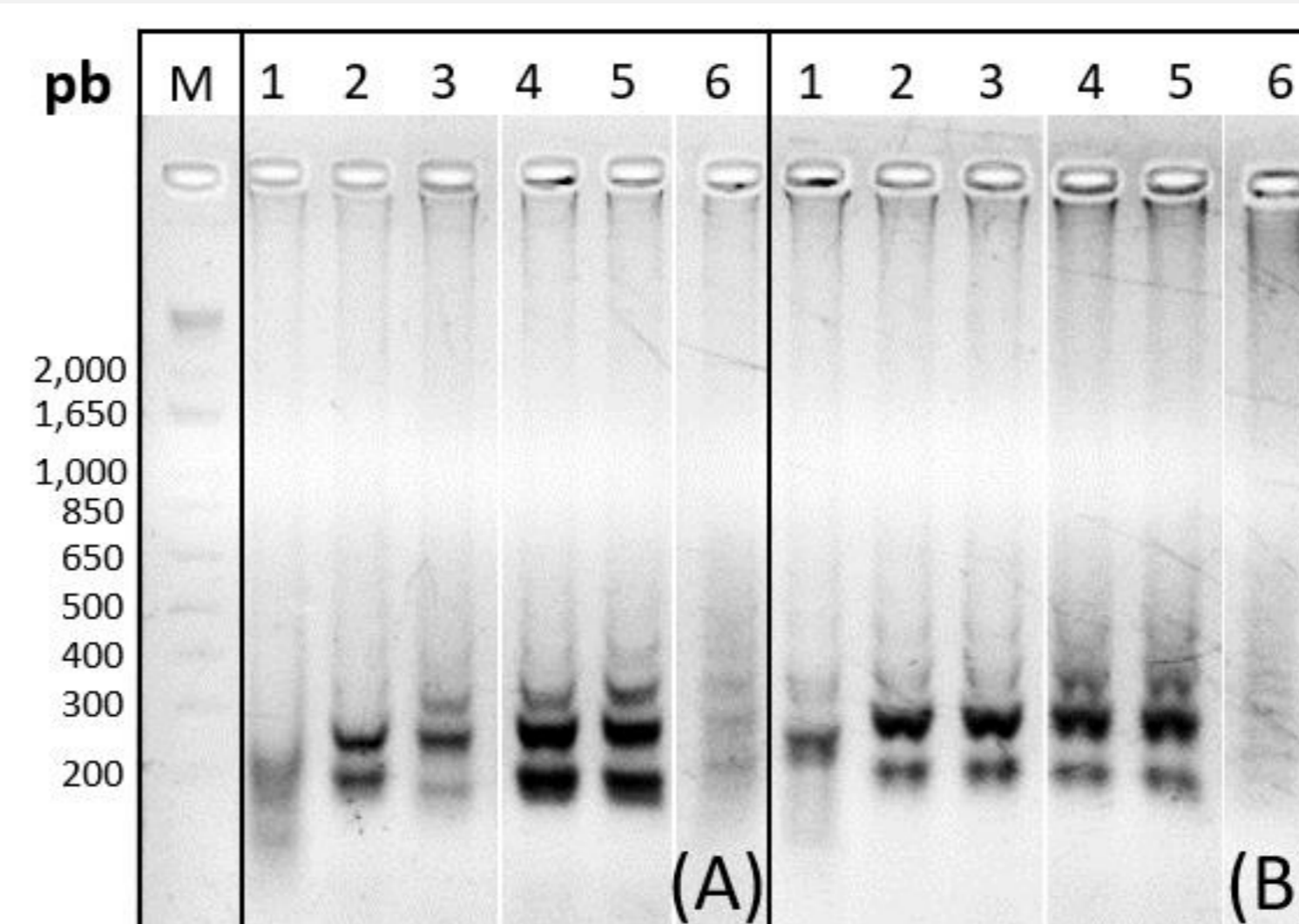


Fig. 3. Ensayo de RT-LAMP utilizando las enzimas purificadas RT y Bst. (A) Gen N1 de SARS-CoV-2; (B) Gen endógeno RNasa P. M: marcador de peso molecular; 1-3: muestras de RNA positivas para SARS-CoV-2; 4-5: control positivo; 6: control negativo (sin templado).

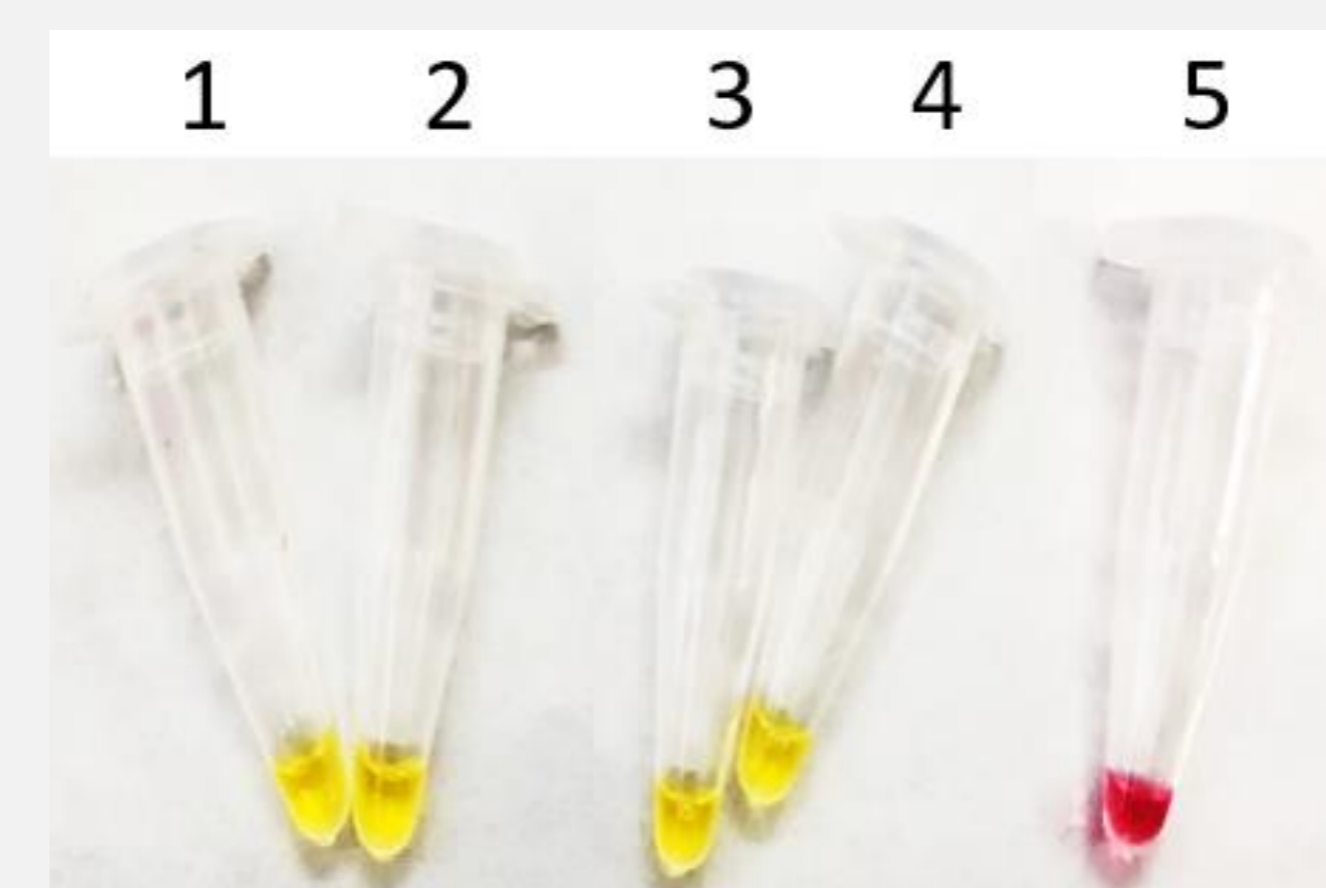


Fig. 4. Detección colorimétrica (rojo fenol) de SARS-CoV-2 mediante ensayo de RT-LAMP. 1-2: Gen N1 de SARS-CoV-2; 3-4: Gen endógeno RNasa P. 1 y 3: muestras de RNA positivas para SARS-CoV-2; 2 y 4: control positivo; 5: control negativo (sin templado).

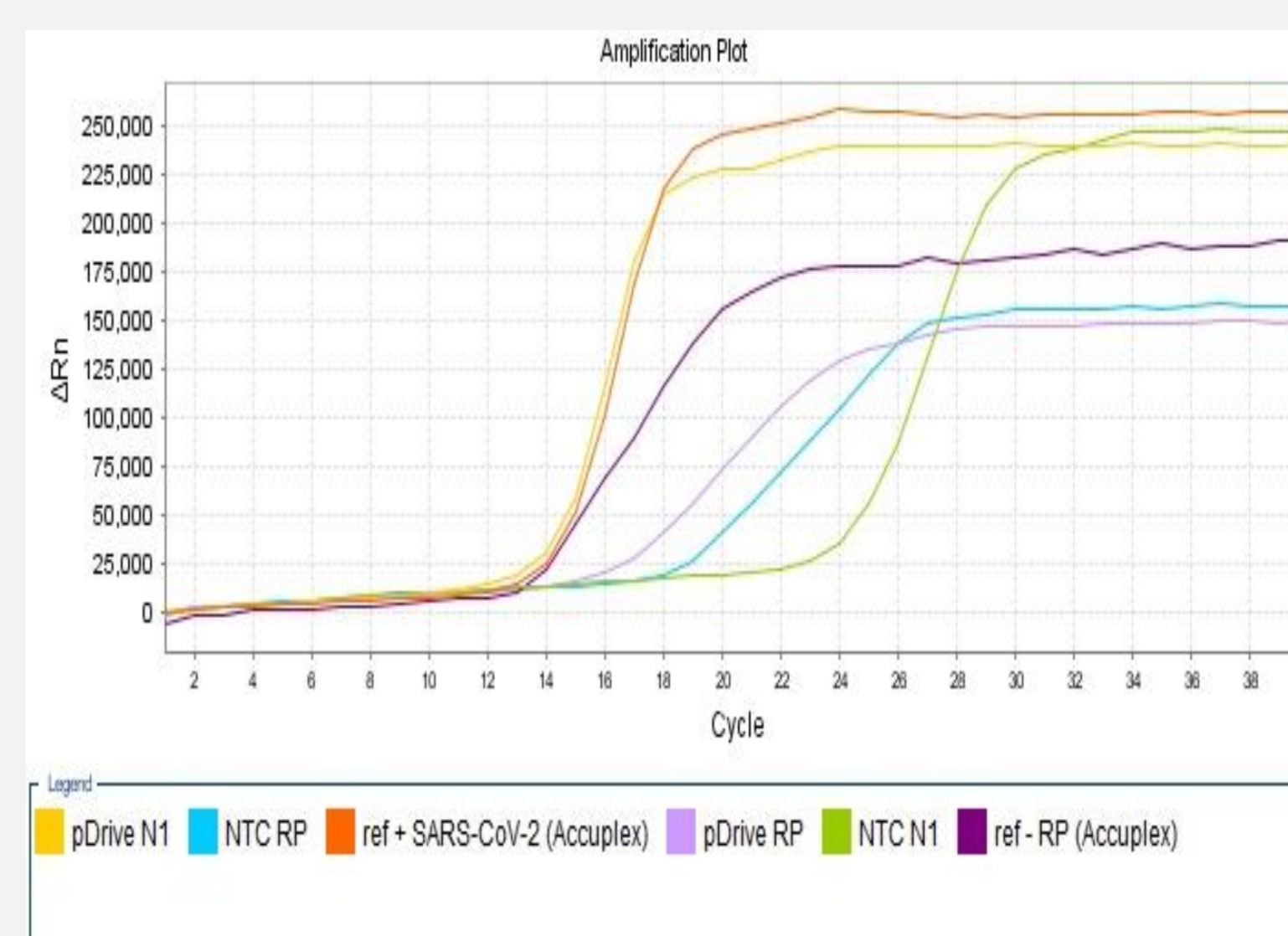


Fig. 5. Detección por fluorescencia en tiempo real de SARS-CoV-2 mediante ensayo de RT-LAMP.

Especificidad

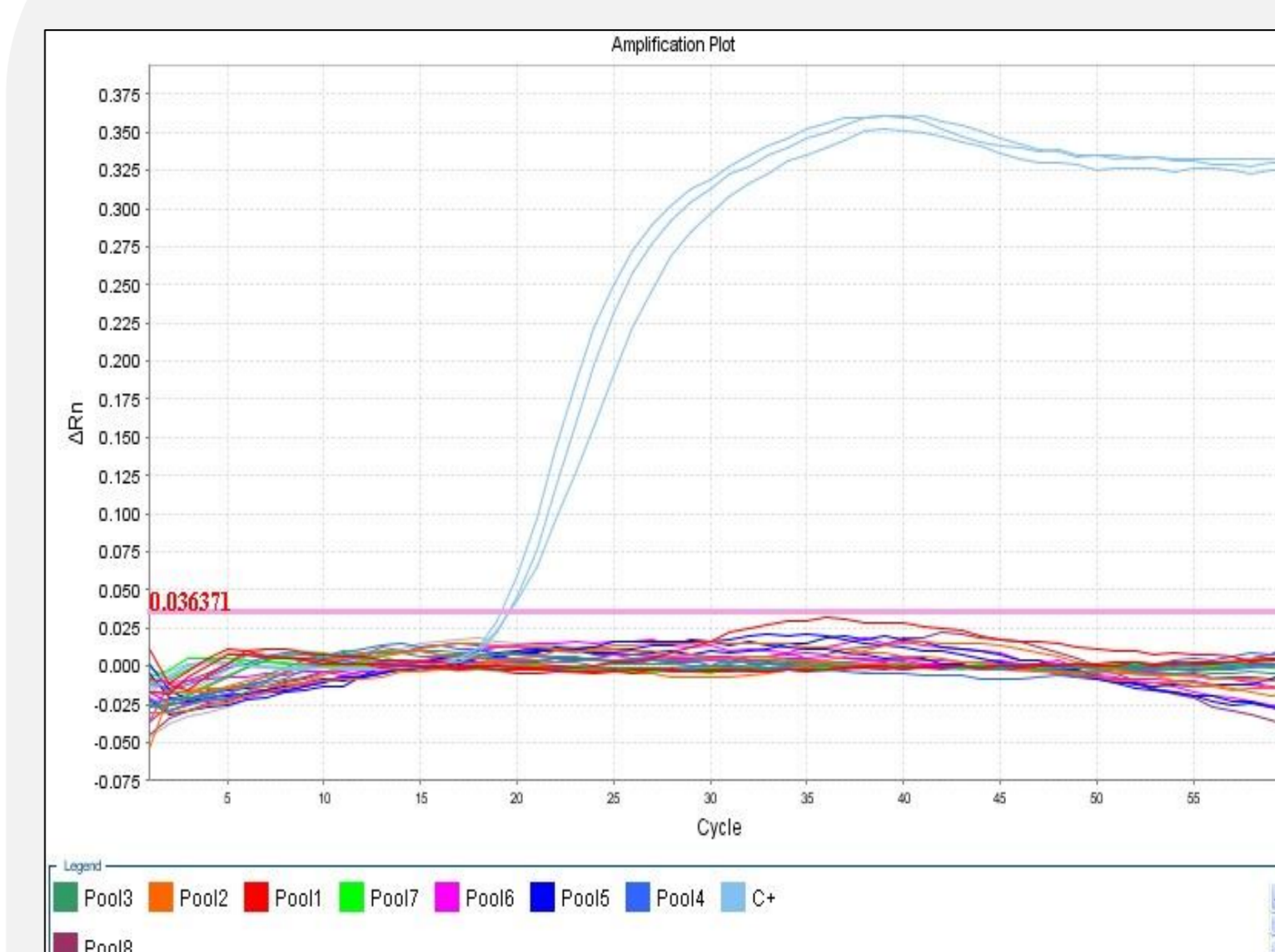


Fig. 6. Análisis de especificidad de ensayo de RT-LAMP para detección de SARS-CoV-2. Detección por fluorescencia en tiempo real. Pool 1-8: Panel de patógenos respiratorios Zeptomatrix NATrolTM Respiratory Pathogen Panel-1 y NATrolTM Respiratory Panel 2 (RP2) Controls. C+: DNA plasmídico con gen N1 de SARS-CoV-2.

Sensibilidad

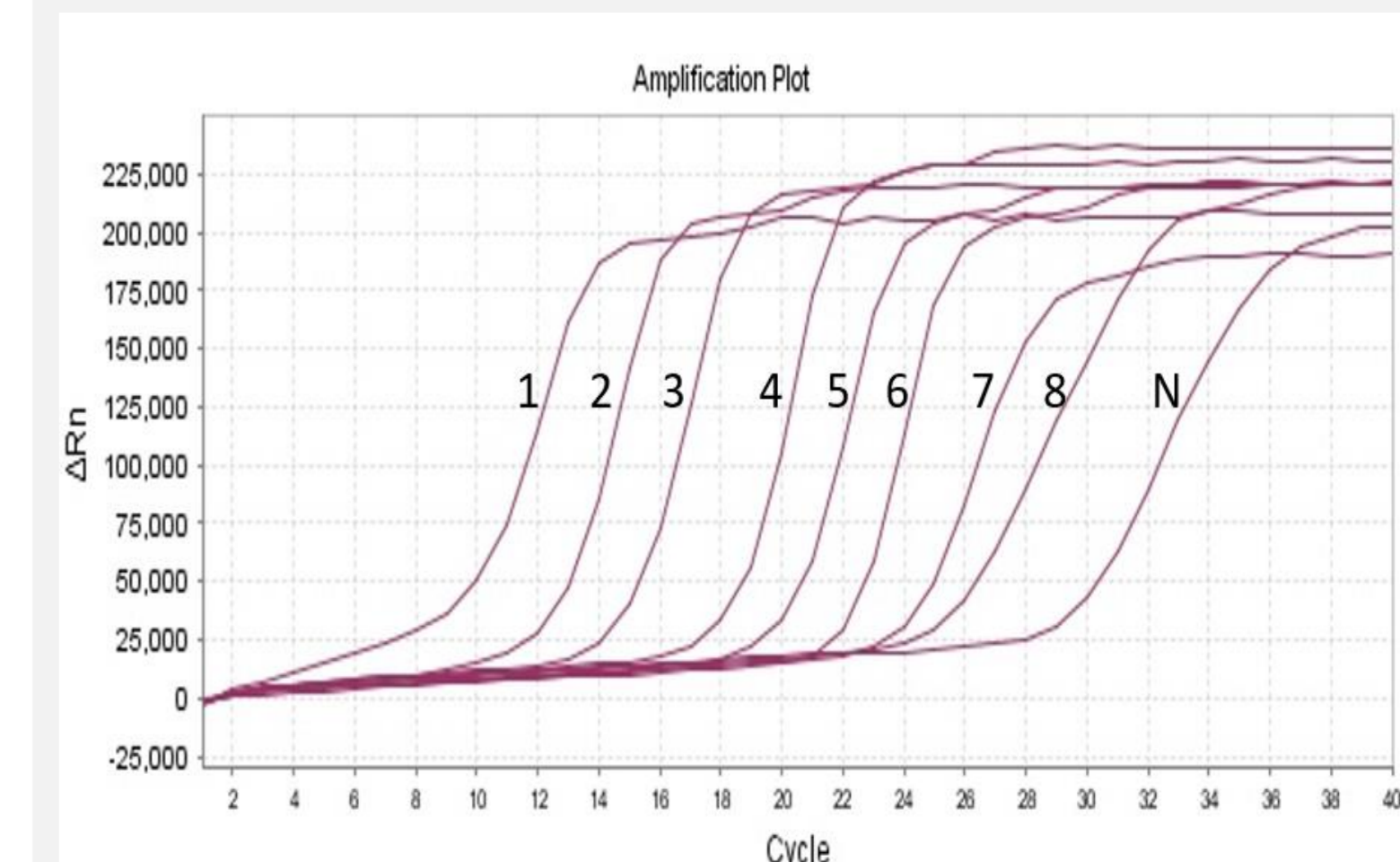


Fig. 7. Análisis de sensibilidad de ensayo de RT-LAMP para detección de SARS-CoV-2. Detección por fluorescencia en tiempo real. 1-8: Diluciones de transcrito del gen N1 de SARS-CoV-2 (1.2×10^{10} a 1.2×10^2 copias); N: control negativo (sin templado).

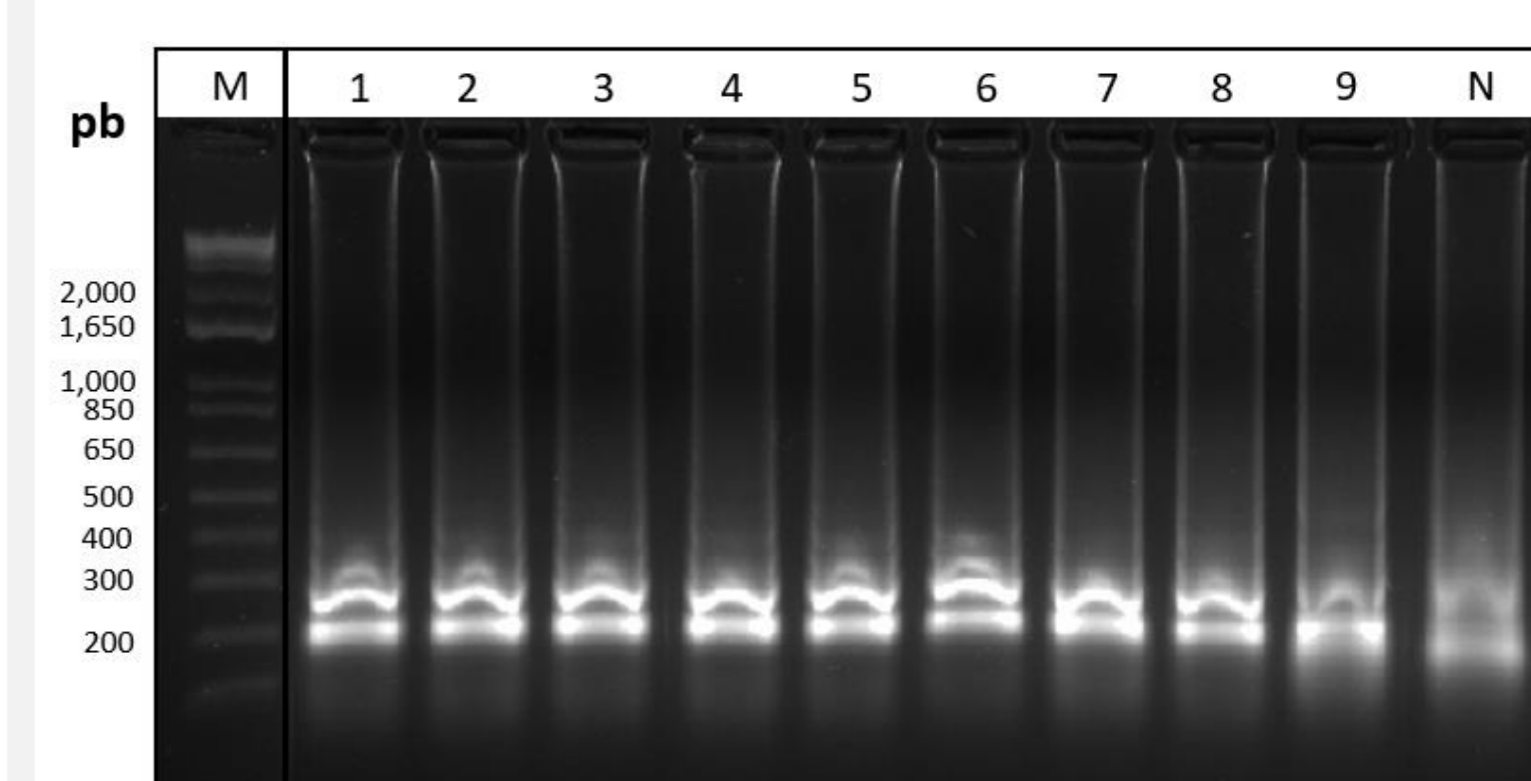


Fig. 8. Análisis de sensibilidad de ensayo de RT-LAMP para detección de SARS-CoV-2. Detección por fluorescencia en tiempo real. M: marcador de peso molecular 1-9: Diluciones de transcrito del gen N1 de SARS-CoV-2 (1.2×10^{10} a 1.2×10^1 copias); N: control negativo (sin templado).

Conclusiones

- Las enzimas purificadas Bst DNA polimerasa y reverso transcriptasa, en conjunto con los oligos diseñados por nuestro grupo, han permitido establecer un ensayo de RT-LAMP para la detección de SARS-CoV-2 mediante colorimetría y fluorescencia.
- El sistema de detección ha demostrado tener alta especificidad y sensibilidad.

Agradecimiento. Se agradece a CONACYT y a Biopure® por el apoyo y los insumos brindados para esta investigación.

Bibliografía

1. JHU. COVID-19 Map. Johns Hopkins Coronavirus Resource Center. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
2. Esbin, M. N., Whitney, O. N., Chong, S., Maurer, A., Darzacq, X., & Tjian, R. (2020). *RNA*. 26(7): 771-783.
3. Keikha, M. (2018). *Malays J Med Sci*. 25(1): 121-123.
4. Nagamine, K., Hase, T., Notomi, T. (2002). *Mol Cell Probes*. 16(3): 223-229.
5. Tanner, N. A., Zhang, Y., Evans, T. C. (2015). *BioTechniques*. 58(2): 59-68.