

ANEXOS:

MATERIALES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE LA SECCIÓN

1 Amplificación y detección de la secuencia de ADN codificante de las proteínas Δ60Sa-SrtA, NcGRA7 y NcSAG4

1.1 Amplificación de la secuencia de ADN codificante de la proteína Δ60Sa-SrtA

Materiales biológicos:

- ADN total extraído de *S. aureus*

Materiales químicos y reactivos:

Agua grado biología molecular. Enzima Taq ADN polimerasa, con la Solución buffer de amplificación 10X y la Solución de 50 mM de MgCl₂ (Invitrogen, No. cat.: 10966-030). Solución de dNTP's a 10 mM de cada uno (c/u) (Thermo Scientific, Cat. no.: R0191). Solución del primers SRTA-F1, SRTA-R2.

Materiales de laboratorio y equipos:

Termociclador Eppendorf Mastercycler® nexus GSX1. Microcentrífuga Mikro120. Rotador orbital. Equipo de electroforesis horizontal Biometrica compact XS/S. Fuente de poder Edvotek Ac110. Refrigeradora. Congelador. Micropipetas de diferentes volúmenes y puntas. Incubadora Selecta Boxcult 3000957.

1.2 Detección, aislamiento y purificación del amplicón Δ60Sa-SrtA

Materiales biológicos:

- Amplicones de Δ60Sa-SrtA (Sa-SrtA1 y Sa-SrtA2)

Materiales químicos y reactivos:

Agarosa (Invitrogen, No. cat.: 16500-500). Solución buffer TAE 1X (40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA, pH 8.0) (Sigma, No. cat.: T4661, A6283, EDS, S8045). Solución de Bromuro de etidio a 10 mg/ml (Sigma, No. cat.: E7637). Solución Buffer de carga 6X para ADN (60 mM de Tris-HCl, pH 8.0, 6 mM de EDTA, pH 8.0, 0.3% de Azul de bromofenol, 0.3% de Xilencianol y 30 % de Glicerol) (Sigma, No. cat.: T4661, 320331, EDS, S8045, B8026, X1426, G5516). Solución con el marcador de peso molecular de ADN (MP) (100 pares de bases: abreviatura pb) ADN ladder, Invitrogen, No. cta.: 15628050). Kit Gene JET PCR Purification.

Materiales de laboratorio y equipos:

Micropipetas (2, 10, 100 y 1000 μ L) Puntas para las micropipetas. Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes Tubos de PCR. Vórtex. Equipo de electroforesis horizontal Biometrica compact XS/S. Fuente de poder Edvotek Ac110. Horno de microondas. Balanza analítica BXX30. Transiluminador. Fotodocumentador Bio Rad Molecular Imager Gel Doc xr+. Computadora de escritorio

1.3 Amplificación de la secuencia de ADN codificante de las proteínas NcGRA7 y NcSAG4

Materiales biológicos:

ADNc de *N. caninum*

Materiales químicos y reactivos:

Citados en la sección de anexos 1.1

Materiales de laboratorio y equipos:

Citados en la sección de anexos 1.1

1.4 Detección, aislamiento y purificación de los amplicones NcGRA7 y NcSAG4

Materiales biológicos:

- Amplicones NcGRA7 y NcSAG4

Materiales químicos y reactivos:

Citados en la sección de anexos 1.2

Materiales de laboratorio y equipos:

Citados en la sección de anexos 1.2

2. CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS PLÁSMIDOS PET15B-SRTA, PET-S4G, PET-S4G- NCGR A7 Y PET-S4G NCSAG4

2.1 Construcción y expresión del plásmido pET15b-SrtA

Materiales biológicos:

- Amplicón: Sa-SrtA1
- Plásmido: pET15b-NT- His(Novagen).
- Cepa de manipulación: *E. coli* Top 10.
- Cepa de expresión: *E. coli* Rosetta 2 (DE3)

Materiales químicos y reactivos:

Enzimas de restricción: BamHI (Thermo Scientific™ ER0051), NdeI (Thermo Scientific™ ER0581), ADN Ligasa T4 (10339509). Kit Gene JET Plasmid Miniprep (K0503). Agarosa (Promega V3121). kit Gene JET PCR purification. Ampicilina (11593027). Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) (Sigma Cat no.: I6758). Agarosa (Promega V3121). Buffer de carga para proteínas 2X (Buffer de gel concentrador 25%, SDS 4%, 2-BME 5%, Glicerol 20%, Azul de bromofenol 0,0025%, Rojo de pironina 0,0025%) (Sigma Cat. no.: A8887,71725. M3148, G5516, S8045, B8026, 1.07518). Azul de Coomassie G-250 (Sigma Cat no.: 1.12553)

Materiales de laboratorio y equipos:

Micropipetas (2, 10, 100 y 1000 μ L) Puntas para las micropipetas. Microtubos eppendorf de diferentes volúmenes Tubos de PCR. Vórtex. Equipo de electroforesis horizontal Biometrica compact XS/S. Fuente de poder Edvotek Ac110. Horno de microondas. Balanza analítica BXX30. Transiluminador. Fotodocumentador Bio Rad Molecular Imager Gel Doc xr+. Computadora de escritorio. Termobloque (Thermo Scientific™) Cabina de flujo laminar Aura Vertical SD4. Rotador orbital. Incubadora Selecta Boxcult 3000957. Sonicador Qsonica Q125. Baño de Agua Memmert WBN10. Autoclave Vertical Quimis Microprocess ADA Q190M23. Placa calefactora corning pc-620d

2.2 Construcción y expresión del plásmido pET-S4G

Materiales biológicos:

- Amplicón: Sa-SrtA2
- Cepa de manipulación: *E. coli* Top 10.
- Cepa de expresión: *E. coli* Rosetta 2 (DE3)

Materiales químicos y reactivos:

Citados en la sección de anexos 2.1

Materiales de laboratorio y equipos

Citados en la sección de anexos 2.1

2.3 Construcción de los plásmidos pCR2.1- NcGRA7 y pCR2.1- NcSAG4

Materiales biológicos:

- Amplicones NcGRA7 y NcSAG4
- Plásmido: pCR2.1
- Cepa de manipulación: *E. coli* Top 10.



- Cepa de expresión: *E. coli* Rosetta 2(DE3)

Materiales químicos y reactivos:

Citados en la sección de anexos 2.1

Materiales de laboratorio y equipos

Citados en la sección de anexos 2.1

2.4 CONSTRUCCIÓN Y EXPRESIÓN DEL PLÁSMIDO PET-S4G-NCGRA7 Y PET-S4G-NCSAG4

Materiales biológicos:

- Plásmido: pCR2.1-NcGRA7 y pCR2.1-NcSAG4
- Plásmido: pET-S4G
- Cepa de manipulación: *E. coli* Top 10.
- Cepa de expresión: *E. coli* Rosetta 2 (DE3)

Materiales químicos y reactivos:

Además de los citados en la sección de anexos 2.1, se usó EDTA al 50 uM (S8045), Carbenicilina (10177012).

Materiales de laboratorio y equipos

Citados en la sección de anexos 2.1

3. PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS HIS-TAG-Δ60SA-SRTA-LPET4G, 4G-NCGRA7 Y 4G-NCSAG4

3.1 Purificación mediante Cromatografía de Afinidad a metales (IMAC) de la proteína His-tag-Δ60Sa-SrtA-LPET4G:

Materiales biológicos:

- Extracto de la proteína His-tag-Δ60Sa-SrtA-LPET4G obtenida en la sección de anexos 2.2

Materiales químicos y reactivos:

Además de los citados en la sección 2.4.3.1, los siguientes: Resina Ni-NTA Superflow. Columna Ni-NTA (Qiagen). Buffer A o Buffer de lisis (20mM Tris-HCl, pH 7.6, 50mM NaCl, y 5mM 2-Beta-mercptoethanol [2-BME]) (Sigma Cat.no.: T4661,320331, S3014, M3148). Buffer B o Buffer de lavado (20mM Tris-HCl, pH 7.6, 500 Mm NaCl y 5Mm 2-

BME) (Sigma Cat. no.: T4661, 320331, S3014, M3148) Buffer C o Buffer de elución (20mM Tris-HCl, pH 7.6, 50mM NaCl, 300mM imidazol, y 5mM 2-BME) (Sigma Cat.no.: T4661, 320331, S3014, I5513, M3148). Buffer de escisión (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 50mM, NaCl, 5mM BME, 5mM CaCl₂, and 5mM Gli₃). (Sigma Cat. no.: T4661, 320331, S3014, M3148, C1016, 50239)

Materiales de laboratorio y equipos

Citados en la sección de anexos 2.1

3.2. Purificación mediante Cromatografía de Afinidad a metales (IMAC) de las proteínas 4G-NcGRA7 y 4G-NcSAG4

Materiales biológicos: Extracto de proteínas His-tag-Δ60Sa-SrtA-LPET4G-NcGRA7 y His-tag-Δ60Sa-SrtA-LPET4G-NcSAG4 obtenidas en la sección 2.4.2.4

Materiales químicos y reactivos:

Citados en la sección de anexos .3.1

Materiales de laboratorio y equipos

Citados en la sección anexos 3.1

4 Ensayo ELISA para evaluar capacidad antigenica de la proteína 4G-NcGRA7

Materiales biológicos: Proteína 4G-NcGRA7 purificada en la sección 2.4.3.2 de procedimientos

Materiales químicos y reactivos:

Además de los citados en la sección 2.4.3.2 los siguientes:

Para la electrotransferencia de las proteínas a la membrana PVDF

Solución buffer de transferencia 10X (250 mM de Tris base; 1.91 M de Glicina (Sigma, No. Cat T4661, Bio-Rad, No. cat.161-0718). Membranas PVDF (Thermo scientific, No. cat.: 88520). Alcohol etílico (Sigma, No. cat.: E7023).

Para la tinción de las proteínas transferidas a la membrana PVDF

Solución para la tinción de las membranas de PVDF con azul de Coomassie (1 % de Azul de Coomassie R-250, 10% de Metanol, 7 % de Ácido acético glacial (Bio-Rad, No. cat.: 1610400, Sigma, No. cat.: E7023, Fisher, No. Cat 64-19-7) Solución para destear las membranas teñidas con azul de Coomassie (10% de Metanol;10% de Ácido acético glacial (Sigma, No. cat.: E7023, Fisher, No. cat.: 64-19-7)

Para la inmunodetección de los anticuerpos

Solución para el bloqueo de las membranas (PBS-T0.05-BSA3) (10 mM de NaH₂PO₄; 1.8 mM de KH₂PO₄; 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl; 0.05% de Tween 20, 3% de BSA fracción V, pH 7.4 (Fisher, No. Cat S369-1, Sigma, No. Cat P0662, S3014, 746436, P1379, Roche, Cat. no.: 10735078001)

Para la solución para la dilución de los sueros sanguíneos (PBS-T0.05-BSA3)

Solución para el lavado de las membranas (PBS-T0.05) (10 mM de NaH₂PO₄; 1.8 mM de KH₂PO₄; 137 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl; 0.05% de Tween 20, pH 7.4 (Fisher, No. cat S369-1, Sigma, No. Cat P0662, S3014, 746436, P1379) Solución para la detección de anticuerpos (PBS-T0.05-BSA3; 1:2000 de Proteína AHRP-(Horseradish peroxidasa) (MPI, No. cat.: 55901 Solución del sustrato para la peroxidasa (500 µg/ml de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) en PBS-T0.05 (Sigma, No. Cat D5637) y 1:10,000 (v/v) de una solución de H₂O₂ al 30% (Fisher, No. Cat H325-4)

Materiales de laboratorio y equipos

Citados en la sección de anexos 3.1