



Artículo Científico

Clonación, expresión y detección serológica de la putativa ARN polimerasa del Virus de la meleira de la papaya variante mexicana en *Escherichia coli*

Wendy Serra¹, Jeanin A. Arguelles-Quintal¹, Mildred Carrillo-Pech², Alethia F. Toriz¹, Enrique Castaño¹, Ignacio Islas-Flores¹, Luisa A. Lopez-Ochoa^{1*}. ¹Unidad de Biología Integrativa, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatán, México, CP 97205. ²Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatán, México, CP 97205.

*Autor de Correspondencia:
Luisa A. López-Ochoa
luisa_lopez@cicy.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
01 Mayo, 2024
Aceptado:
25 Abril, 2025
Publicado:
30 Abril, 2025

Cita:
Serra W, Arguelles-Quintal JA, Carrillo-Pech M, Toriz AF, Castaño E, et al., 2025. Clonación, expresión y detección serológica de la putativa ARN polimerasa del Virus de la meleira de la papaya variante mexicana en *Escherichia coli*. Revista Mexicana de Fitopatología 43(2): 70. <https://doi.org/10.18781/R.ME.X.FIT.2405-00>



RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. La enfermedad de la meleira en papaya en México está asociada al Virus de la meleira de la papaya variante mexicana (PMeV-Mx) y se caracteriza por la exudación espontánea de látex en los frutos. El ORF2 de PMeV-Mx codifica una proteína que tiene motivos de ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) la cual es esencial para la replicación viral. El objetivo de este estudio fue desarrollar un método para la producción y purificación de la proteína recombinante codificada por el ORF2 de PMeV-Mx (pORF2) en *Escherichia coli* y generar anticuerpos específicos para su detección.

Materiales y Métodos. El genoma de PMeV-Mx se analizó utilizando UGENE para predecir los ORFs e identificar el posible sitio deslizante. Se utilizaron plantas de papaya inoculadas con látex de frutos de plantas sintomáticas como reservorio del virus, la infección por PMeV-Mx se confirmó mediante RT-PCR. El ORF1 y ORF2 se amplificaron por PCR a partir de ADNc de papayas infectadas. Ambos se clonaron en el vector pGEM-T Easy y se transfirieron a pDONR221 y pDEST17 para su expresión en *E. coli*. La proteína recombinante 6xHis-pORF2 se expresó en la cepa BL21 de *E. coli* y se purificó bajo condiciones desnaturizantes. La proteína purificada se utilizó para generar anticuerpos policlonales. La especificidad del antisuero y sus diluciones óptimas de trabajo se evaluaron mediante ensayos de inmunodetección, utilizando la proteína recombinante como diana y proteínas etiquetadas con His como controles negativos.

Resultados. Se logró la expresión y purificación de la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx. Se detectó una banda de aproximadamente ~46,5 kDa, consistente con su peso molecular estimado. La expresión de la proteína se observó entre 2 y 6 horas después de la inducción. El análisis por western blot confirmó la presencia de la etiqueta de Histidinas y la integridad de la proteína recombinante. La purificación con resina Ni-NTA resultó en una banda intensa de ~46,5 kDa, junto con bandas menores de 15 a 150 kDa. Se generaron anticuerpos policlonales contra pORF2, los cuales reconocieron específicamente la proteína purificada en los ensayos de inmunodetección, con detección en diluciones de 1:500 a 1:3000. No se observó reactividad cruzada con los controles negativos, aunque se detectó una banda inespecífica de ~75 kDa en extractos de *E. coli*.

Conclusión. Se estableció un protocolo para la expresión, detección y purificación de la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx en *E. coli*. Los anticuerpos policlonales generados en conejo reconocieron la proteína de interés en extractos proteicos de células bacterianas, aunque se requiere una mayor optimización para mejorar la especificidad. Estos anticuerpos contribuirán al desarrollo futuro de herramientas de diagnóstico y a la caracterización de la proteína en plantas.

Palabras clave: Meleira de la papaya, proteína recombinante, anticuerpos, virus similares a umbravirus, PMeV-Mx.

INTRODUCCIÓN

La meleira de la papaya, también conocida como enfermedad pegajosa de la papaya, se caracteriza por la exudación espontánea de látex en frutos verdes (Figura 1). La oxidación del látex puede provocar la aparición de manchas necróticas en los frutos y darles una apariencia pegajosa. También se ha observado el desarrollo de lesiones necróticas en los ápices de las hojas jóvenes en variedades del grupo Solo en Brasil (Rodríguez *et al.*, 2009; Perez-Brito *et al.*, 2012). Esta enfermedad puede causar pérdidas económicas severas para los productores de papaya (Ventura *et al.*, 2004; Perez-Brito *et al.*, 2012). Su presencia se detectó por primera vez en Brasil a finales de la década de 1980 (Nakagawa *et al.*, 1987) y en la actualidad se ha extendido a varios países de América Latina, incluyendo México, Ecuador, Colombia y Costa Rica (Perez-Brito *et al.*, 2012; Quito-Avila *et al.*, 2023), así como a Australia (Pathania *et al.*, 2019). La meleira de la papaya es causada por complejos virales, compuestos por un virus con genoma de ARN de cadena doble, tentativamente asignado a la familia *Fusagraviridae*, y un virus similar a umbravirus, con genoma de ARN monocatenario de sentido positivo [ARNmc (+)], propuesto dentro de la familia *Tombusviridae* (Sa Antunes *et al.*, 2016; Maurastoni *et al.*, 2023; Quito-Avila *et al.*, 2023). Los virus similares a umbravirus asociados a esta enfermedad incluyen el Virus de la meleira de la papaya 2 (*Papaya meleira virus 2* - PMeV2) en Brasil, el Virus Q de la papaya (*Papaya virus Q* - PpVQ) en Ecuador y el Virus de la meleira de la papaya variante mexicana (*Papaya meleira virus Mexican variant* - PMeV-Mx) en México (Quito-Avila *et al.*, 2015; Zamudio-Moreno *et al.*, 2015;

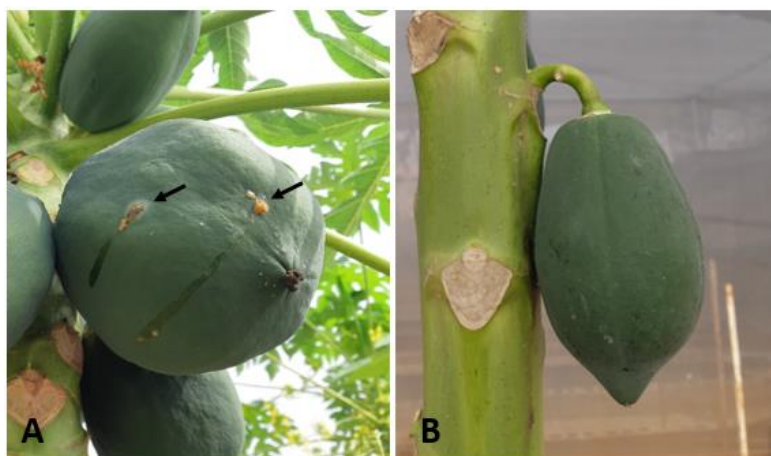


Figura 1. Frutos en plantas de papaya (*Carica papaya*) variedad Maradol cultivadas en casa sombra. A) Frutos de papayas que fueron inoculadas con látex de PMeV-Mx, mostrando los síntomas característicos de la enfermedad de la meleira, con exudación espontánea de látex. B) Frutos de plantas sanas de papaya, inoculadas solo con el amortiguador.

Sa Antunes *et al.*, 2016). Adicionalmente, se encontró otro virus similar a umbravirus en plantas de babaco, un pariente silvestre de papaya en Ecuador, denominado Virus Q de babaco (*Babaco virus Q* - BabVQ) (Cornejo-Franco *et al.*, 2021). De acuerdo a los criterios de demarcación de los umbravirus (Talianky *et al.*, 2003), los virus similares a umbravirus de papaya se consideran especies distintas (Cornejo-Franco *et al.*, 2021).

Dado que los genomas de los virus similares a umbravirus (ULVs) no codifican una proteína de la cápside se han considerado como entidades subvirales denominadas ARNs similares a umbravirus (*ulaRNAs*) (Liu *et al.*, 2021). Existen tres clases de ULVs en plantas, cuyos genomas varían en tamaño de 3500 a 4500 nt y contienen entre dos y cinco marcos de lectura abiertos (ORFs) (Cornejo-Franco *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021; Redila *et al.*, 2021; Tahir *et al.*, 2021). Los ULVs de papaya pertenecen a la clase 1, con genomas de 4376 a 4515 nts que incluyen dos ORFs, seguidos de una región larga de ARN no codificante. El ORF1 codifica para una proteína putativa de 31 a 38 kDa, cuya función es desconocida. Por otro lado, el ORF2 codifica una proteína putativa de 45 a 54 kDa que contiene los ocho motivos característicos de las ARN polimerasas dependientes de ARN (RdRp) presente en los virus con genoma de ARNmc (+), filogenéticamente relacionada con la RdRp de los umbravirus (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015; Sa Antunes *et al.*, 2016; Cornejo-Franco *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021). Se han identificado dos señales en el genoma viral, entre el ORF1 y ORF2, asociados con el mecanismo de cambio de marco de lectura para que el ribosoma retroceda un nucleótido (-1 FS). Una región deslizante con la secuencia consenso X XXY YYZ (el heptanucleótido) (Cornejo-Franco *et al.*, 2021) seguida de una estructura secundaria de ARN en forma de horquilla o pseudonudo (Liu *et al.*, 2021). Este mecanismo contribuye al control de la estequiometría de las proteínas bajo su regulación, por lo que es crucial para una infección viral exitosa (Penn *et al.*, 2020). El cambio de marco de lectura del ribosoma es común en miembros de la familia *Tombusviridae*. Su ocurrencia se demostró experimentalmente para el Virus del mosaico de la enación del chícharo 2 (*Pea enation mosaic virus 2* - PEMV2) del género *Umbravirus* (Gao y Simon, 2016; Liu *et al.*, 2021) y para el Virus asociado al amarillamiento de las venas de los cítricos (*Citrus yellow vein associated virus* - CYVaV) de los ULVs de clase 2. Para este último se identificó una proteína de 81 kDa, producto del ORF1 y del ORF2, mediante la técnica de transcripción/traducción *in vitro* (Liu *et al.*, 2021). Sin embargo, el mecanismo de -1FS aún no se demuestra para los ULVs de papaya.

A la fecha, no ha sido posible detectar las proteínas virales en plantas con meleira de la papaya (Rodrigues *et al.*, 2009) y no se han obtenido anticuerpos para su diagnóstico. La obtención de anticuerpos contra proteínas virales, como la RdRp, resulta valioso para el estudio y monitoreo de enfermedades en plantas. Además, son fundamentales en epidemiología, ya que permiten rastrear la propagación y evolución de patógenos virales en poblaciones vegetales, lo que resulta crucial para el desarrollo de estrategias de manejo eficientes y la predicción de futuros brotes (Rubio *et al.*, 2020; Buja *et al.*, 2021). Asimismo, el desarrollo de anticuerpos permite realizar estudios funcionales de proteínas virales, como las polimerasas, incluyendo su expresión y su interacción con elementos del hospedante, lo que resulta esencial para el desarrollo de estrategias antivirales y la comprensión de las bases moleculares de la replicación viral (Bolanos-García y Davies, 2006; Trier *et al.*, 2019; Rubio *et al.*, 2020). Sin embargo, cabe desatacar que la purificación de las RdRps a partir de células del hospedante resulta difícil debido a sus

bajos niveles de expresión (Cevik *et al.*, 2008). Además, estas enzimas suelen estar asociadas con membranas, lo que complica su aislamiento debido a problemas de estabilidad del péptido (Laliberté y Sanfaçon, 2010; Hull, 2014). Una alternativa para superar estas dificultades la constituye la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (Cevik *et al.*, 2008). En este sentido, se ha demostrado previamente la viabilidad de esta estrategia para el desarrollo de anticuerpos contra la RdRp del Virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* - CTV), lo que permitió la detección y localización de la proteína en tejidos de cítricos infectados con CTV (Cevik, 2001; Cevik *et al.*, 2008). De manera similar, las polimerasas del Virus del moteado de las venas de tabaco (*Tobacco vein mottling virus* - TVMV), Virus del mosaico del bambú (*Bamboo mosaic virus* - BaMV) y SARS-CoV-2 han sido expresadas en *E. coli*, obteniéndose anticuerpos que han facilitado avances en la caracterización de sus funciones y actividad catalítica (Hong y Hunt, 1996; Li *et al.*, 1998; Dangerfield *et al.*, 2021; Madru *et al.*, 2021). Este estudio tuvo como objetivo desarrollar un método para la producción y purificación de la proteína recombinante codificada por el ORF2 de PMeV-Mx en *E. coli* y generar anticuerpos específicos para su detección, un paso clave para avanzar en el diagnóstico y la investigación básica del virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plantas de papaya como reservorio del virus. Las semillas de papaya variedad Maradol se germinaron y las plántulas fueron trasladadas a un invernadero con malla antiáfidos y suelo como sustrato. Las plántulas de tres meses de edad fueron inoculadas con látex de frutos obtenidos de plantas sintomáticas de la enfermedad de la meleira de la papaya. Se confirmó la presencia de PMeV-Mx en seis de estas plantas mediante RT-PCR, de acuerdo con el procedimiento previamente establecido (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015).

Análisis de secuencias. Se empleó el programa UGENE para analizar la región codificante del genoma de PMeV-Mx (Número de acceso KF214786 de la base de datos GenBank del NCBI). Se predijeron los marcos de lectura abiertos, así como los productos proteicos de ORF1 y ORF2 de manera independiente y como una proteína de fusión del ORF1/ORF2. Se identificó la secuencia heptamérica, también denominada sitio deslizante, de acuerdo a los parámetros establecidos previamente (Cornejo-Franco *et al.*, 2021).

Construcción de plásmidos. Las regiones correspondientes tanto al ORF1 como al ORF2 de PMeV-Mx se amplificaron por PCR con los cebadores CB157/CB158 y CB183/CB184 (Cuadro 1), respectivamente. Para ello se emplearon 2 µL de ADNc de plantas de papaya infectadas, obtenido como se reportó previamente (Zamudio-Moreno *et al.*, 2015). La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µL [solución de PCR (1x); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTPs; 0,2 µM de cebadores; 2 Unidades de Platinum™ Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, Massachusetts, USA)]. El producto de PCR se purificó con el estuche comercial QIAquick PCR Purification (Qiagen, Hilden, Alemania). Posteriormente se ligó en pGEM-T Easy siguiendo las instrucciones del

fabricante (Promega, Wisconsin, USA) para producir los plásmidos pCB251 (pGEM-T Easy:ORF1) y pCB233 (pGEM-T Easy:ORF2). La presencia del inserto se corroboró mediante PCR, con cebadores dirigidos a las regiones promotoras SP6 y T7 de pGEM-T Easy (Cuadro 1). El ADN plasmídico se purificó con el estuche comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemania) y se secuenció en ambas direcciones (Macrogen Inc., Seúl, Corea).

Cuadro 1. Cebadores utilizados para la obtención de los plásmidos pCB252 y pCB253, mediante la clonación del ORF1 y ORF2 de PMeV-Mx en el vector pDEST17.

Cebador	Secuencia (5' a 3') ^y	Región a la que se unen ^z
CB135	TAATACGACTCACTATAGGG	Promotor T7 de pGEM-T Easy
CB136	ATTTAGGTGACACTATAGAA	Promotor SP6 de pGEM-T Easy
CB157	ATGAACATTT CGAACATTCCC	Sentido ORF1
CB158	GGATCCTTACGGGCAACCAGAAAA	Antisentido ORF1
CB183	aattagatc ATGGTTT TATACCTTCATCAAA	Sentido ORF2
CB184	taattaagctt CTAAGGG GTTAAGATAAGC	Antisentido ORF2
CB107	aaaaagcaggcttc ATGAACATTT CGAACATTCCCGT	Sentido ORF1 y sitio <i>attB</i> 1
CB108	agaaagctgggtc TTACGGG CAACCAGAAAAGGACGA	Antisentido ORF1 y sitio <i>attB</i> 2
CB191	aaaaagcaggcttc ATGGTTT TATACCTTCATCAAA	Sentido ORF2 y sitio <i>attB</i> 1
CB193	agaaagctgggtcAGGGGTTAAGATAACCCTAGG	Antisentido ORF2 y sitio <i>attB</i> 2
CB194	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct	Adaptador <i>attB</i> 1
CB195	ggggaccactttgtacaagaagctgggt	Adaptador <i>attB</i> 2

^yLetras en minúscula indican secuencias no virales, como sitios de restricción y nucleótidos extras (CB183 y CB184), o sitios recombinantes (CB107, CB108, CB191, CB193, CB194 y CB195). Letras en negritas indican codones de inicio y de parada.

^zORF, marco de lectura abierto; *attB*, sitio de unión específica para recombinación por tecnología Gateway.

Los amplicones del ORF1 y ORF2 de PMeV-Mx se recombinaron con pDONR221 empleando la tecnología de Gateway (Invitrogen, Massachusetts, USA) para generar pCB247 (pDONR221:ORF1) y pCB249 (pDONR221:ORF2), respectivamente. Posteriormente, estos plásmidos se recombinaron en pDEST17 (Invitrogen, Massachusetts, USA) para generar pCB252 (pDEST17:ORF1) y pCB253 (pDEST17:ORF2). La recombinación mediante la tecnología Gateway se realizó mediante dos reacciones de PCR, el primero con cebadores específicos para los ORF1 y ORF2 de PMeV-Mx, respectivamente que agregaron la mitad de los sitios *attB* (CB107/CB108 y CB191/CB193), y el segundo, con un par de cebadores que permitieron completar los sitios *attB* (CB194/CB195) (Cuadro 1). La mezcla de reacción y las dos reacciones de PCR se realizaron de acuerdo al manual de tecnología Gateway (2021) (Invitrogen, Massachusetts, USA). Los productos finales de PCR fueron recombinados con el vector de entrada pDONR221 (Invitrogen, Massachusetts, USA), empleando la mezcla de enzimas BP CLONASE (Invitrogen, Massachusetts, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos de recombinación fueron introducidos en células competentes de *E. coli* DH5 α y seleccionados en placas de agar Luria Broth (LB) suplementadas con 100 mg mL⁻¹ de kanamicina. Los vectores de entrada resultantes, pCB247 y pCB249, se secuenciaron en ambas direcciones (Macrogen Inc., Seúl, Corea). El ADN plasmídico se extrajo y se utilizó para la recombinación con el vector de destino pDEST17 (Invitrogen, Massachusetts, USA) para generar pCB252 y pCB253, respectivamente, con la mezcla de enzimas LR CLONASE (Invitrogen, Massachusetts,

USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos fueron introducidos en células de *E. coli* DH5 α , seleccionados en placas de agar LB suplementadas con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina. El ADN plasmídico se secuenció y se utilizó para transformar la cepa *E. coli* BL21.

Expresión y purificación de proteínas recombinantes en *E. coli*. Se evaluaron las condiciones de temperatura óptimas para la expresión de la RdRp de PMeV-Mx, realizando un seguimiento temporal de su expresión. Para ello se utilizaron células de *E. coli* BL21 portadoras de pCB253 que se inocularon en 5 mL de medio LB con 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina e incubaron a 37 °C y 200 rpm, durante 14 horas. De este preinóculo, se transfirieron 500 μL a 300 mL de medio LB bajo las mismas condiciones, hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,6. Posteriormente, se retiraron 40 mL de medio y se almacenaron como control no inducido. Se añadió IPTG 1 mM al resto del inóculo y se incubó durante 6 h a 37 °C y 200 rpm. Cada hora, se retiraron 40 mL de cultivo. Ambos cultivos, inducidos y no inducidos, se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos, el precipitado se resuspendió en 2 mL de solución de extracción de proteínas bajo condiciones desnaturalizantes (100 mM de NaH_2PO_4 ; 10 mM de Tris-Cl; 8 M de Urea, pH 8,0), como se describe en el Manual QIAexpressionist, 2003 (QIAGEN, 2003). La suspensión se mantuvo en hielo y se sonicó empleando ciclos de 20 segundos hasta que perdió la viscosidad. Posteriormente, se trató con 0,2 mM de fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) y se centrifugó a 12000 rpm y 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se almacenó a -80 °C y el precipitado se resuspendió en 3 mL de solución de extracción de proteínas.

Para el ensayo de inmunodetección de proteínas recombinantes, los extractos proteicos de *E. coli* se incubaron durante 3 h a 92 °C, se separaron en un gel de poliacrilamida al 12 % con dodecil sulfato de sodio (SDS) y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), aplicando 100 voltios durante 1 h. Las membranas se bloquearon mediante incubación con 0,1 % PBS-T/5 % de leche (w/v) durante 1 h a temperatura ambiente, seguidas de tres lavados de 20 minutos cada uno con 0,1 % PBS-T. Posteriormente, se incubaron durante 12 h a 4 °C, con una dilución 1:1000 del anticuerpo monoclonal Anti-His acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Invitrogen #R931, Massachusetts, USA). Después, se realizaron dos lavados con 0,1 % PBS-T. Tras la incubación con el sustrato (ECL, Thermo Fisher Scientific, Pierce, Massachusetts, USA), se registraron las imágenes en el sistema de documentación Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA). Para este ensayo, se utilizó como control positivo la proteína 6xHis-GST-8xHis, expresada a partir de pET42b (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Para purificar las proteínas recombinantes se partió de cultivos de *E. coli* BL21 con los plásmidos en 500 mL de medio LB a las 2 h después de la inducción. La purificación se llevó a cabo según lo descrito previamente y siguiendo las instrucciones del Manual QIAexpressionist (Qiagen, 2003), con la excepción de la cantidad de solución de extracción utilizada (6 mL). Las proteínas recombinantes se purificaron por afinidad en una columna empaquetada con resina de nitrilotriacetato de níquel (Ni-NTA) (Qiagen) y se lavaron tres veces con solución de lavado a pH 6,3. Para las eluciones se emplearon soluciones de elución con pH 5,9 y 4,5, respectivamente.

Producción de antisuero. Las proteínas recombinantes purificadas se separaron en geles de poliacrilamida al 12 % con SDS. La banda correspondiente a la proteína recombinante 6xHis-pORF2 se cortó del gel y se liofilizó. Posteriormente, la proteína liofilizada se mezcló con 200 µL de PBS, se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Para la primera inoculación, esta solución se mezcló con 200 µL de adyuvante completo, y para las siguientes, con adyuvante incompleto (Amero *et al.*, 1988). Posteriormente, las emulsiones se inocularon por vía subcutánea en uno o dos puntos del dorso de dos conejos. Antes de la inmunización, se extrajeron 500 µL de sangre para verificar la ausencia de reactividad al antígeno en el suero preinmune. La primera inmunización se realizó con 100 µg de proteína, y se repitió dos semanas después (500 µg de proteína), seguida de una primera recolección de 3 mL de sangre diez días después. Posteriormente, los conejos descansaron durante cuatro semanas, tras lo cual se administró una inmunización final (100 µg de proteína), seguida de una recolección de 5 mL de sangre siete días después empleando un catéter neonatal. La sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 20 minutos a 4 °C y los antisueros se almacenaron a -20 °C (Amero *et al.*, 1988; Pihl *et al.*, 2015).

Se realizó un dot blot para verificar la reactividad del suero e identificar la dilución óptima de trabajo. Para ello se evaluaron las siguientes diluciones: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000 y 1:4000. El ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: se añadieron 10 µL de antisuero a una membrana de nitrocelulosa (1 cm²), que luego se bloqueó con una solución de 5 % de leche en polvo descremada en PBS-T 1X durante 1 h, con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó toda la noche, a 4 °C con las diferentes diluciones del anticuerpo primario. Luego, se realizaron tres lavados con PBS-T, seguidos de una incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a HRP (dilución 1:3000) durante 2 h, a temperatura ambiente.

Para confirmar la especificidad de los antisueros y anticuerpos, se realizaron ensayos de inmunodetección. En este caso, la detección se llevó a cabo con una dilución 1:1000 de anti-pORF2 como anticuerpo primario y una dilución 1:3000 del anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a HRP (PROMEGA #W401B), con membrana de nitrocelulosa. Para este ensayo, se emplearon dos proteínas fusionadas a etiquetas de histidina (His) como controles negativos: 6xHis-GST-8xHis, expresada a partir del plásmido pET42b (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), y 6xHis-pORF1, codificada por el ORF1 de PMeV-Mx y expresada a partir de pCB252 (Invitrogen, Massachusetts, USA).

RESULTADOS

Predicción de las proteínas putativas de PMeV-Mx. El genoma parcial de PMeV-Mx contiene dos ORFs, el primero se ubica desde el nucleótido 1 hasta el 963 (ORF1) y el segundo desde el nt 1231 hasta el 2437 (ORF2). Estos marcos de lectura codifican dos proteínas putativas de 35 y 45,6 kDa, respectivamente, denominadas pORF1 y pORF2 (Figura 2). Se detectó, igualmente, un sitio de desplazamiento (heptanucleótido) en la posición 942-948 (UCCUUUU), que constituye una señal putativa para el -1 FS (Figura 2). Este elemento en *cis* podría participar para generar una proteína de fusión entre el ORF1 y el ORF2, como se ha propuesto para BabVQ (Cornejo-Franco *et al.*, 2021). Sin

embargo, el análisis de secuencia del genoma de PMeV-Mx en el presente estudio no respalda dicha premisa, en virtud de que existen codones de paro, generando en su lugar una proteína putativa truncada.

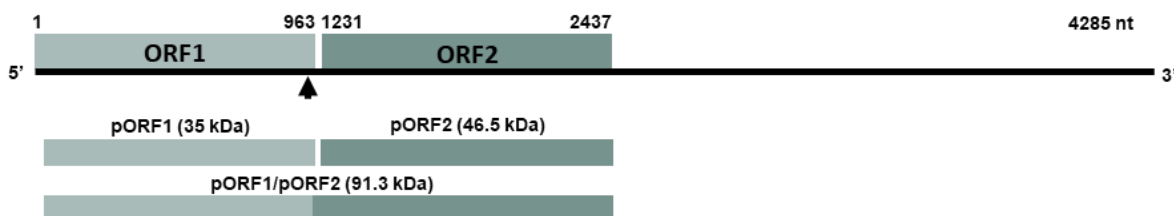


Figura 2. Organización genómica de PMeV-Mx. Los números indican la posición en nucleótidos (nt) y la cantidad total de nt en el genoma parcial. Los cuadros en el genoma representan el ORF1 y el ORF2, respectivamente. Los cuadros debajo representan los productos putativos del ORF1 y ORF2 (pORF1 y pORF2, respectivamente), así como el producto de fusión putativo que se podría obtener a partir de desplazamiento ribosomal en -1 nt (pORF1/pORF2). La flecha indica la posición de la secuencia deslizante.

Expresión y purificación de la proteína de fusión recombinante 6xHis-pORF2. Se realizó un ensayo de curso temporal para determinar las mejores condiciones para la expresión de la proteína recombinante 6xHis-ORF2. En este sentido, se observó a partir de 1 h después de la inducción con IPTG una proteína muy abundante que migraba entre los marcadores de 37 y 50 kDa, contrario a lo observado en el tratamiento sin inducir (Figura 3). Estos resultados son consistentes con la masa estimada (~46,5 kDa) para la proteína codificada por el ORF2 de PMeV-Mx y la etiqueta His. Cabe destacar también que se observa un aumento notable en la expresión a partir de las 2 h y hasta las 6 h después de la inducción (Figura 3).

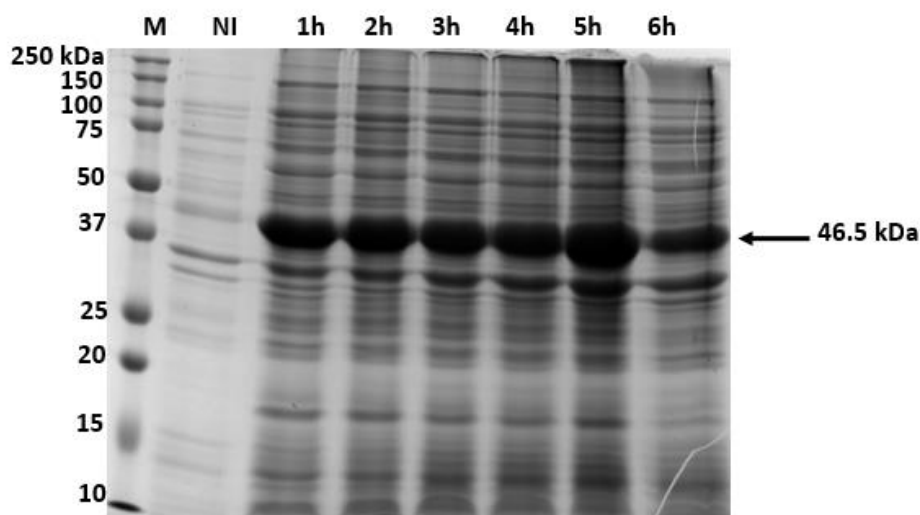


Figura 3. Ensayo de expresión temporal de la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx empleando la fracción proteica correspondiente a los cuerpos de inclusión de *E. coli*. La expresión de 6xHis-pORF2 se indujo con 1 mM IPTG a 37 °C. Se retiraron alícuotas en los tiempos indicados (1 a 6 h después de la inducción con IPTG) y las proteínas se visualizaron mediante gel SDS teñido con Coomassie. M, marcador Bio-Rad 10-250 kDa; NI, control no inducido. La flecha indica la proteína 6xHis-pORF2 de 46,5 kDa.

Considerando los datos obtenidos en el ensayo de expresión temporal, se seleccionó un período de inducción de 2 h para maximizar el rendimiento de la expresión proteica. Para corroborar estos resultados, la proteína recombinante de PMeV-Mx 6xHis-pORF2 se detectó por western blot con el anticuerpo anti-His acoplado a HRP. Como se esperaba, se observaron bandas de ~46,5 y ~28 kDa (Figura 4B, carriles 3 y 4), correspondientes a las proteínas 6xHis-ORF2 y 6xHis-GST-8xHis, respectivamente. Este resultado confirma la presencia de la etiqueta de His en la proteína recombinante 6xHis-pORF2 y la integridad de la misma (Figura 4). Los resultados obtenidos a partir de la purificación con resina Ni-NTA se muestran en la Figura 5. En este sentido, se observó una banda intensa del tamaño esperado, ~46,5 kDa, en cada elución. Igualmente, se observaron bandas tenues que van desde 15 hasta 150 kDa, tanto en la elución como en la resina Ni-NTA. Manteniendo las condiciones previamente establecidas, se realizaron ocho purificaciones de fracciones celulares de 20 mL. Como resultado, se obtuvieron 800 µg de la proteína 6xHis-pORF2 purificada que se usaron posteriormente para la producción de anticuerpos.

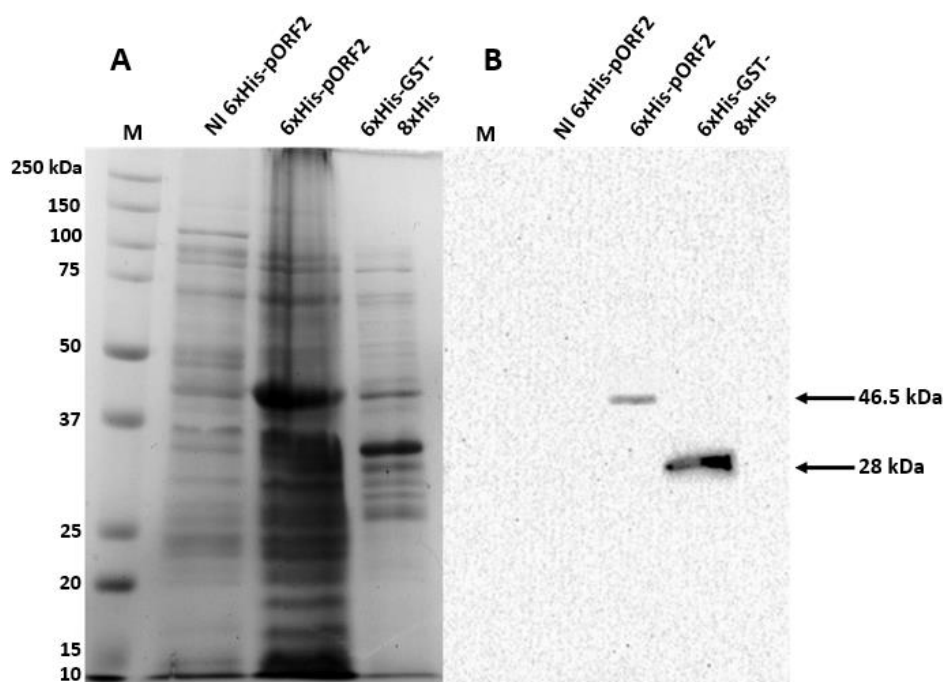


Figura 4. Detección de la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx en extractos proteicos de *E. coli* empleando el anticuerpo monoclonal anti-His. A) Gel de SDS teñido con Coomassie. B) Western blot en membranas de PVDF incubadas con una dilución 1:1000 del anticuerpo monoclonal anti-His acoplado a peroxidasa de rábano (HRP). M, marcador Bio-Rad 10-250 kDa; NI y 6xHis-GST-8xHis, control no inducido y positivo, respectivamente; 6xHis-pORF2, fracción celular con la proteína recombinante pORF2 de PMeV-Mx expresada en células BL21. Las flechas indican las proteínas 6xHis-pORF2 (~46,5 kDa) y 6xHis-GST-8xHis (~28 kDa), respectivamente.

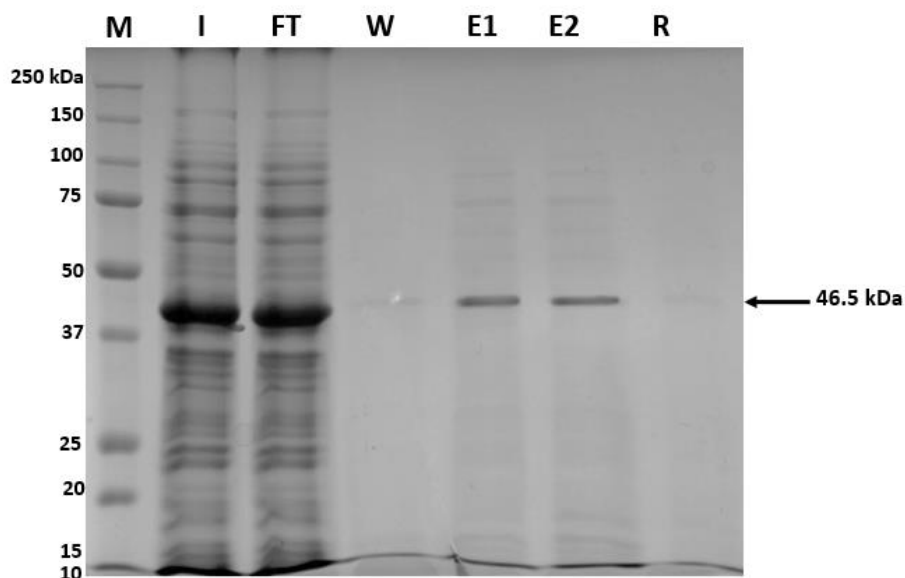


Figura 5. Purificación de la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx con resina de Ni-NTA en condiciones desnaturalizantes. M, marcador Bio-Rad 10-250 kDa; I, *input*; Ft, *flow-through*; E1 y E2: primera y segunda elución, respectivamente; R, resina. La flecha indica la proteína 6xHis-pORF2 (~46,5 kDa).

Especificidad de los anticuerpos policlonales anti-pORF2. Se empleó suero preinmune para corroborar la ausencia de reactividad contra la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx. Posteriormente, se determinó el título del suero después de la inmunización, detectándose señal en el rango de diluciones de 1:500 a 1:3000. Se seleccionó la dilución 1:1000 para los siguientes análisis. Una vez establecido este parámetro, la especificidad de los anticuerpos anti-pORF2 se evaluó mediante inmunoensayos (Figura 6). Como resultado, se detectó una señal de ~46,5 kDa en las fracciones celulares correspondientes a 6xHis-pORF2, confirmando la presencia de la proteína de interés en las fracciones purificadas y demostrando la capacidad de los anticuerpos para reconocerla específicamente. La ausencia de señal en los controles negativos, correspondientes a la altura de ~28 kDa para 6xHis-GST-8xHis y de ~35 kDa para 6xHis-pORF1 de PMeV-Mx, reafirmó la especificidad de los anticuerpos. Estos controles negativos se incluyeron para descartar interacciones inespecíficas ya sea con otras proteínas presentes en las fracciones celulares o con la etiqueta de His. Sin embargo, se observó que el anticuerpo también presentó reactividad inespecífica con proteínas de *E. coli*, ya que se detectó una señal a la altura de ~75 kDa en las fracciones celulares no inducidas y en las inducidas para 6xHis-pORF1, 6xHis-GST-8xHis y 6xHis-pORF2 (Figura 6, B).

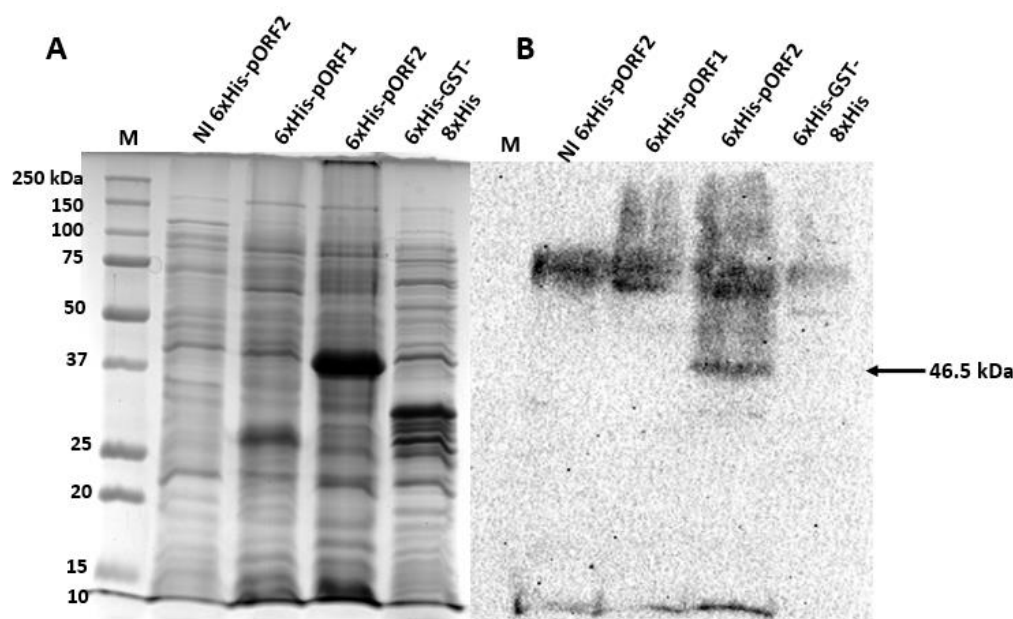


Figura 6. Detección de la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx en extractos proteicos de *E. coli* empleando el anticuerpo policlonal anti-RdRp. A) Gel de SDS teñido con Coomassie. B) Western blot en membrana de Nitrocelulosa, incubada con el anticuerpo policlonal anti-RdRp de PMeV-Mx (dilución 1:1000) y el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (dilución 1:3000). M, marcador Bio-Rad 10-250 kDa; NI, fracción celular no inducida. 6xHis-pORF1 y 6xHis-GST-8xHis controles negativos. La flecha indica la proteína 6xHis-pORF2 (~46,5 kDa).

DISCUSIÓN

En este estudio se describe por primera vez la expresión en *E. coli* de la proteína recombinante codificada por el ORF2 de PMeV-Mx, su purificación y la generación de anticuerpos policlonales de conejo. *E. coli* es un sistema de expresión ampliamente utilizado para proteínas recombinantes, conocido por su alto rendimiento y procesos de purificación simplificados (Jia y Jeon, 2016). El uso de este enfoque, al permitir la obtención de grandes cantidades de proteína, resulta útil para estudios bioquímicos y biofísicos. En contraste, la extracción de proteínas directamente desde tejidos vegetales puede ser un desafío debido a los bajos niveles de expresión de la RdRp y la presencia de proteínas contaminantes. Además, en comparación con los sistemas *in vitro* libres de células, la expresión en *E. coli* ofrece ventajas como costos reducidos, mayor simplicidad y la posibilidad de modificaciones postraduccionales y ensamblaje de proteínas (Rosano y Ceccarelli, 2014; Jia y Jeon, 2016).

Durante este estudio, la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx (~46,5 kDa) se detectó en los extractos proteicos insolubles de *E. coli* a partir de la primera hora de inducción y hasta las 6 h posteriores. Su acumulación en la fracción insoluble era esperada, ya que las ARN polimerasas virales suelen estar asociadas a membranas (Laliberté y Sanfaçon, 2010; Hull, 2014). Aunque la mayor expresión se observó a las 5 h post-inducción (Figura 3), se seleccionó un tiempo de 2 h para la purificación con el fin de minimizar la formación de cuerpos de inclusión, un fenómeno común cuando se

presentan altos niveles de expresión de proteínas, así como de proteínas asociadas a membranas (Qiagen, 2003). La identidad de la proteína recombinante se confirmó mediante western blot con anticuerpos anti-His (Figura 4), y su purificación fue exitosa (Figura 5), permitiendo su uso en la generación de anticuerpos policlonales en conejo.

Los anticuerpos obtenidos detectaron específicamente la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx en extractos de *E. coli*, sin reconocer las proteínas 6xHis-pORF1 de PMeV-Mx ni 8xHis-GST-6x, lo que demuestra su especificidad (Figura 6). Sin embargo, también se observó una banda de ~75 kDa en todos los extractos proteicos, lo que sugiere la posible unión inespecífica de proteínas bacterianas a la resina Ni-NTA durante la purificación, como se ha informado previamente (Ryan y Henehan, 2013). Para reducir esta interferencia, sería recomendable optimizar las condiciones de la resina ajustando factores como la concentración de sal, pH e imidazol, además de evaluar diferentes tipos de resinas con mayor selectividad (Wang *et al.*, 2020). Asimismo, la inclusión de un paso adicional de cromatografía, como exclusión por tamaño o intercambio iónico, podría mejorar la pureza de la proteína de interés (Saraswat *et al.*, 2013; Soltaninasab *et al.*, 2022). Por otro lado, el uso de un paso extra de cromatografía de afinidad podría incrementar la especificidad y sensibilidad de los anticuerpos, lo que facilitaría su aplicación en el diagnóstico de plantas infectadas (Saraswat *et al.*, 2013).

El uso de anticuerpos constituye una herramienta esencial en estudios básicos, particularmente en la detección y caracterización de proteínas virales. En el caso de PMeV-Mx y los ULVs de papaya de clase 1, la proteína codificada por el ORF2 presenta los ocho motivos característicos de las ARN polimerasas dependientes de ARN; sin embargo, su expresión y función en plantas aún no han sido caracterizadas. En contraste, la replicación de otros virus pertenecientes al género *Tombusvirus* (familia *Tombusviridae*) ha sido ampliamente estudiada. Por ejemplo, la RdRp del Virus del enanismo ramificado del tomate (*Tomato bushy stunt virus* - TBSV), de 92 kDa, se produce mediante una lectura continua del codón de paro del ORF1 (*readthrough*) continuando la traducción del ORF2 (Salonen *et al.*, 2005; Rubino y Scheets, 2021). Mientras que la replicasa se forma de la interacción entre la proteína auxiliar de replicación p33 (producto de ORF1) y p92 (Salonen *et al.*, 2005; den Boon *et al.*, 2010). Se ha propuesto que en los ULVs de clase 1, de papaya, se podría producir una proteína de aproximadamente 90 kDa, correspondiente a la RdRp, mediante -1FS, similar a lo demostrado *in vitro* para los ULVs de clase 2 y los umbravirus (Liu *et al.*, 2021). No obstante, esta hipótesis aún no ha sido confirmada en plantas y se requiere hacer más estudios. En este contexto, el uso de anticuerpos podría ser clave para detectar proteínas virales y profundizar en la expresión y función de la RdRp.

CONCLUSIONES

En este estudio, se estableció un protocolo para la expresión, detección y purificación de la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx en *E. coli*, su RdRp putativa. Los anticuerpos en conejo detectaron la proteína de interés en fracciones celulares de *E. coli*; sin embargo, aún es necesaria la optimización del protocolo para mejorar su especificidad en extractos celulares de bacterianos.

Limitaciones

El presente estudio logró la expresión y purificación de la proteína recombinante 6xHis-pORF2 de PMeV-Mx en *E. coli*. Además, se generaron anticuerpos específicos para la misma, proporcionando una herramienta valiosa para la caracterización de proteínas virales y aplicaciones diagnósticas futuras. Sin embargo, aunque el enfoque empleado ha demostrado ser eficaz, ajustes adicionales podrían potenciar su alcance y aplicabilidad. En cuanto al sistema de expresión, *E. coli* puede no replicar completamente el plegamiento y modificaciones postraduccionales nativas en células vegetales. La presencia de bandas no específicas en los ensayos de western blot, resalta la necesidad de mejorar las condiciones de purificación con Ni-NTA para aumentar la pureza de la proteína. Además, aunque los anticuerpos generados detectaron la proteína recombinante en extractos de *E. coli*, aún falta evaluar su desempeño en tejidos vegetales. Estudios futuros deberán investigar la expresión y función de la RdRp codificada por ORF2 de PMeV-Mx en plantas infectadas para esclarecer su papel en la replicación viral.

Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no tienen conflicto de intereses en relación con esta investigación.

Financiamiento

Este proyecto contó con el financiamiento AS-1-19850 otorgado por CONAHCYT a LLO. CONAHCYT también otorgó becas a WS, JAAQ y AFT.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a M.C. Roberto Ku-Cauich, Dr. Ligia Brito-Argaez, y M.C. Miguel Ztzec-Simá por la ayuda técnica ofrecida.

Contribución de los autores

Concepción del estudio, LLO; diseño del experimento, WSH, EC, IIF, LLO; ejecución del experimento, WSH, JAAQ, MCP, AFT, LLO; verificación del experimento, JAAQ, MCP, LLO; análisis / interpretación de datos, WSH, EC, LLO; preparación del manuscrito, WSH, LLO; edición y revisión del manuscrito, WSH, JAAQ, MCP, AFT, EC, IIF, LLO. Todos los autores han leído y aprobado la versión publicada del manuscrito.

REFERENCIAS

- Amero SA, James TC and Elgin SC. 1988. Production of antibodies using proteins in gel bands. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 3: 355-362. <https://dx.doi.org/10.1385/0-89603-126-8:355>
- Arur S and Schedl T. 2014. Generation and purification of highly specific antibodies for detecting post-translationally modified proteins in vivo. *Nature Protocols* 9: 375-395. <https://dx.doi.org/10.1038/nprot.2014.017>
- Bolanos-Garcia VM and Davies OR. 2006. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760: 1304-1313. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.03.027>
- Buja I, Sabella E, Monteduro AG, Chiriaco MS, De Bellis L, Luvisi A and Maruccio G. 2021. Advances in plant disease detection and monitoring: From traditional assays to in-field diagnostics. *Sensors* (Basel, Switzerland) 21. <https://dx.doi.org/10.3390/s21062129>
- Cevik B. 2001. Characterization of the RNA-dependent RNA polymerase gene of Citrus tristeza Closterovirus. (PhD), Florida University, USA. Retrieved from <http://ufdcimages.uflib.ufl.edu/UF/00/10/07/35/00001/DissertationBC.PDF>
- Cevik B, Lee RF and Niblett CL. 2008. *In vivo* and *in vitro* expression analysis of the RNA-dependent RNA polymerase of Citrus tristeza virus. *Archives of Virology* 153: 315-321. <https://dx.doi.org/10.1007/s00705-007-1060-8>
- Cornejo-Franco JF, Flores F, Mollov D and Quito-Avila DF. 2021. An umbra-related virus found in babaco (*Vasconcellea × heilbornii*). *Archives of Virology* 166: 2321-2324. <https://dx.doi.org/10.1007/s00705-021-05117-8>
- Dangerfield TL, Huang NZ and Johnson KA. 2021. Expression and purification of tag-free SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase in *Escherichia coli*. *STAR Protocols* 2: 100357. <https://dx.doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100357>
- den Boon JA, Ahlquist P. 2010. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annual Review of Microbiology*, 64: 241-256, <https://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134012>
- Gao F and Simon AE. 2016. Multiple Cis-acting elements modulate programmed -1 ribosomal frameshifting in Pea enation mosaic virus. *Nucleic Acids Research* 44: 878-895. <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1241>
- Hong Y and Hunt AG. 1996. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 226: 146-151. <https://dx.doi.org/10.1006/viro.1996.0639>
- Hull R. 2014. Chapter 7 - Replication of Plant Viruses. In Hull R (Ed.), *Plant Virology* (Fifth Edition) (pp. 341-421). Boston: Academic Press. <https://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384871-0.00007-8>
- Jia B and Jeon CO. 2016. High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: current status and future perspectives. *Open Biology* 6. <https://dx.doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Laliberté JF and Sanfaçon H. 2010. Cellular remodeling during plant virus infection. *Annual Review of Phytopathology* 48: 69-91. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114239>
- Li YI, Cheng YM, Huang YL, Tsai CH, Hsu YH and Meng M. 1998. Identification and characterization of the *Escherichia coli*-expressed RNA-dependent RNA polymerase of bamboo mosaic virus. *Journal of Virology* 72: 10093-10099. <https://dx.doi.org/10.1128/jvi.72.12.10093-10099.1998>
- Liu J, Carino E, Bera S, Gao F, May JP and Simon AE. 2021. Structural analysis and whole genome mapping of a new type of plant virus subviral RNA: Umbravirus-like associated RNAs. *Viruses* 13. <https://dx.doi.org/10.3390/v13040646>
- Liu J and Simon AE. 2022. Identification of Novel 5' and 3' Translation Enhancers in Umbravirus-Like Coat Protein-Deficient RNA Replicons. *Journal of Virology* 96: e0173621. <https://dx.doi.org/10.1128/jvi.01736-21>
- Madru C, Tekpinar AD, Rosario S, Czernecki D, Brûlé S, Sauguet L and Delarue M. 2021. Fast and efficient purification of SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase complex expressed in *Escherichia coli*. *PLOS One*. 16: e0250610. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0250610>

- Maurastoni M, TF SA, Abreu EFM, Ribeiro SG, Mehta A, Sanches MM, Fontes W, Kitajima EW, Cruz FT, Santos AMC, Ventura JA, Gomes A, Zerbini FM, Sosa-Acosta P, Nogueira FCS, Rodrigues SP, Aragão FJL, Whitfield AE and Fernandes PMB. 2023. A capsid protein fragment of a Fusagra-like virus found in *Carica papaya* latex interacts with the 50s ribosomal protein L17. *Viruses* 15. <https://dx.doi.org/10.3390/v15020541>
- Pathania N, Justo V, Magdalita P, de la Cueva F, Herradura L, Waje A, Lobres A, Cueto A, Dillon N, Vawdrey L, Hucks L, Chambers D, Sun G., Cheesman J. 2019. Integrated disease management strategies for the productive, profitable and sustainable production of high quality papaya fruit in the southern Philippines and Australia (FR2019-89). Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), Canberra, Australia. https://www.aciar.gov.au/sites/default/files/project-page-docs/final_report_hort.2012.113.pdf
- Penn WD, Harrington HR, Schlebach JP, Mukhopadhyay S. 2020. Regulators of Viral Frameshifting: More Than RNA Influences Translation Events. *Annual Review of Virology*, 7(1): 219-238. <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-virology-012120-101548>
- Perez-Brito D, Tapia-Tussell R, Cortes-Velazquez A, Quijano-Ramayo A, Nexticapan-Garcez A and Martín-Mex R. 2012. First report of Papaya meleira virus (PMeV) in Mexico. *African Journal of Biotechnology* 11: 13564-13570. <https://dx.doi.org/10.5897/AJB12.1189>
- Pihl TH, Illigen KE and Houen G. 2015. Polyclonal peptide antisera. In Houen G (Ed.), *Peptide Antibodies: Methods and Protocols* (pp. 103-107). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2999-3_11
- Qiagen I. 2003. The QIAexpressionist. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged protein Qiagen I (Ed.) (pp. 128). <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en>
- Quito-Avila DF, Alvarez RA, Ibarra MA and Martin RR. 2015. Detection and partial genome sequence of a new umbra-like virus of papaya discovered in Ecuador. *European Journal of Plant Pathology* 143: 199-204. <https://dx.doi.org/10.1007/s10658-015-0675-y>
- Quito-Avila DF, Reyes-Proañó E, Cañada G, Cornejo-Franco JF, Alvarez-Quinto R, Moreira L, Grinstead S, Mollov D and Karasev AV. 2023. Papaya sticky disease caused by virus "couples": A challenge for disease detection and management. *Plant Disease* 107: 1649-1663. <https://dx.doi.org/10.1094/pdis-11-22-2565-fe>
- Redila CD; Prakash V; Nouri S. 2021. Metagenomics Analysis of the Wheat Virome Identifies Novel Plant and Fungal-Associated Viral Sequences. *Viruses* 13. <https://dx.doi.org/10.3390/v13122457>.
- Riguero V, Clifford R, Dawley M, Dickson M, Gastfriend B, Thompson C, Wang SC and O'Connor E. 2020. Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. *Journal of Chromatography. A* 1629:461505. <https://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461505>
- Rodrigues SP, Ventura JA, Aguilar C, Nakayasu ES, Almeida IC, Fernandes PM and Zingali RB. 2011. Proteomic analysis of papaya (*Carica papaya* L.) displaying typical sticky disease symptoms. *Proteomics* 11: 2592-2602. <https://dx.doi.org/10.1002/pmic.201000757>
- Rodrigues SP, Ventura JA, Aguilar C, Nakayasu ES, Choi H, Sobreira TJ, Nohara LL, Wermelinger LS, Almeida IC, Zingali RB and Fernandes PM. 2012. Label-free quantitative proteomics reveals differentially regulated proteins in the latex of sticky diseased *Carica papaya* L. plants. *Journal of Proteomics* 75: 3191-3198. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.021>
- Rodrigues SP, Ventura JA, Zingali RB and Fernandes PM. 2009. Evaluation of sample preparation methods for the analysis of papaya leaf proteins through two-dimensional gel electrophoresis. *Phytochemical Analysis* 20: 456-464. <https://dx.doi.org/10.1002/pca.1147>
- Rosano GL and Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology* 5: 172. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Rubio L, Galipienso L and Ferriol I. 2020. Detection of plant viruses and disease management: Relevance of genetic diversity and evolution. *Frontiers in Plant Science* 11: 1092. <https://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.01092>

- Rubino L, Scheets K. 2021. *Tombusviruses (Tombusviridae)*. In Encyclopedia of Virology (Fourth Edition), Bamford, D.H., Zuckerman, M., Eds.; Academic Press: Oxford, pp. 788-796.
- Ryan BJ and Hennehan GT. 2013. Overview of approaches to preventing and avoiding proteolysis during expression and purification of proteins. Current Protocols in Protein Science 5: Unit5.25. <https://dx.doi.org/10.1002/0471140864.ps0525s71>
- Sá Antunes TF, Amaral RJ, Ventura JA, Godinho MT, Amaral JG, Souza FO, Zerbini PA, Zerbini FM and Fernandes PM. 2016. The dsRNA virus Papaya meleira virus and an ssRNA virus are associated with papaya sticky disease. PLOS One 11: e0155240. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0155240>
- Salonen A, Ahola T, Kääriäinen L. 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. Current Topics in Microbiology and Immunology, 285: 139-173. https://dx.doi.org/10.1007/3-540-26764-6_5
- Saraswat M, Musante L, Ravidá A, Shortt B, Byrne B and Holthofer H. 2013. Preparative purification of recombinant proteins: current status and future trends. BioMed Research International 312709. <https://dx.doi.org/10.1155/2013/312709>
- Soltaninasab S, Ahmadzadeh M, Shahhosseini S and Mohit E. 2022. Evaluating the efficacy of immobilized metal affinity chromatography (IMAC) for host cell protein (HCP) removal from anti-HER2 scFv expressed in *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification 190: 106004. <https://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2021.106004>
- Tahir MN; Bolus S; Grinstead SC; McFarlane SA; Mollov D. 2021. A new virus of the family Tombusviridae infecting sugarcane. Archives of Virology 166: 961-965, <https://dx.doi.org/10.1007/s00705-020-04908-9>
- Taliansky ME and Robinson DJ. 2003. Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors. Journal of General Virology 84: 1951-1960. <https://dx.doi.org/10.1099/vir.0.19219-0>
- Trier N, Hansen P and Houen G. 2019. Peptides, antibodies, peptide antibodies and more. International Journal of Molecular Sciences 20. <https://dx.doi.org/10.3390/ijms20246289>
- Ventura JA, Costa H and Tatagiba JdS. 2004. Papaya diseases and integrated control. In Naqvi SAMH (Ed.), Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II: Diagnosis and Management (pp. 201-268). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:128132558>
- Wang W, Zhou F, Cheng X, Su Z and Guo H. 2020. High-efficiency Ni²⁺-NTA/PAA magnetic beads with specific separation on His-tagged protein. IET Nanobiotechnology 14: 67-72. <https://dx.doi.org/10.1049/iet-nbt.2019.0271>
- Zamudio-Moreno E, Ramirez-Prado JH, Moreno-Valenzuela OA and Lopez-Ochoa LA. 2015. Early diagnosis of a Mexican variant of Papaya meleira virus (PMeV-Mx) by RT-PCR. Genetics and Molecular Research 14: 1145-1154. <https://dx.doi.org/10.4238/2015.February.6.18>