

Producción y evaluación catalítica de una Taq ADN polimerasa recombinante como alternativa para aplicaciones biotecnológicas¹

Luna Torres-Hichster²

Carlos Nieto-Clavijo³

Liliana Morales de la Pava⁴

Jacqueline Chaparro-Olaya⁵

Cómo citar este artículo / To reference this article / Para citar este artigo: Torres-Hichster, L., Nieto-Clavijo, C., Morales, L. y Chaparro-Olaya, J. (2026). Producción y evaluación catalítica de una Taq ADN polimerasa recombinante como alternativa para aplicaciones biotecnológicas. *Revista Criterios*, 33(1)

Resumen

La Taq ADN polimerasa recombinante es una herramienta esencial en biología molecular. La pandemia por COVID 19 evidenció la vulnerabilidad de los sistemas científicos frente a la dependencia de proveedores externos para la obtención de insumos críticos, como esta enzima. En este contexto, el presente estudio tuvo como objetivo desarrollar un protocolo optimizado para la producción, purificación y validación funcional de una Taq polimerasa recombinante, con el fin de

¹ Artículo resultado de investigación.

² Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque. Correo electrónico: litorresh@unbosque.edu.co

³ Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque. Correo electrónico: canieto@unbosque.edu.co Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8806-3270>

⁴ Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque. Correo electrónico: limoralesp@unbosque.edu.co Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0906-5383>

⁵ Laboratorio de Parasitología Molecular, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque. Correo electrónico: chaparrojacqueline@unbosque.edu.co Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9815-3459>

fortalecer la autosuficiencia de un laboratorio nacional. Para ello, se transformaron células *Escherichia coli* BL21(DE3) con el plásmido pOpenTaq y se evaluaron distintas condiciones de inducción para maximizar la expresión de la enzima. La purificación de la Taq polimerasa se hizo mediante una estrategia combinada de precipitación térmica y salina, seguida de cromatografía de exclusión molecular. Finalmente, la actividad enzimática se evaluó por PCR, en comparación con una Taq comercial. Los resultados mostraron que la expresión y rendimiento óptimos se alcanzaron a 37 °C con 1 mM de IPTG, a las 4 horas post-inducción. La Taq recombinante presentó una pureza superior al 90 % y exhibió una actividad catalítica comparable a la de la enzima comercial, permitiendo la amplificación eficiente de fragmentos de ADN, incluso desde muestras clínicas complejas. En conclusión, el protocolo desarrollado demostró ser eficiente, reproducible y escalable, representando un avance concreto hacia la producción local de reactivos estratégicos. Su implementación en diferentes sistemas de investigación puede fortalecer las capacidades en I+D+i y contribuir a una mayor autonomía científica y biotecnológica nacional.

Palabras clave: olimerasa Taq; Proteínas recombinantes; Expresión génica; Biotecnología; Reacción en Cadena de la Polimerasa; Autonomía científica y técnica

Production and catalytic evaluation of a recombinant Taq DNA polymerase as an alternative for biotechnological applications

Abstract

Recombinant Taq DNA polymerase is a key tool in molecular biology. The COVID-19 pandemic highlighted the vulnerability associated with dependence on imported critical reagents. This study aimed to develop an optimized protocol for the heterologous expression, purification, and functional validation of recombinant Taq polymerase to support local production capacity. *Escherichia coli* BL21(DE3) cells were transformed with the pOpenTaq plasmid, and expression was induced under varying IPTG concentrations and incubation temperatures to determine optimal conditions. The purification protocol combined heat and ammonium sulfate precipitation followed by size-exclusion chromatography. Enzymatic activity was assessed via endpoint PCR using various DNA templates and compared to a commercial Taq polymerase. Maximum

expression was achieved at 37 °C with 1 mM IPTG after 4 hours of induction. The purified enzyme reached >90% purity and exhibited comparable amplification efficiency to the commercial control, including with complex clinical samples. The developed method is efficient, reproducible, and amenable to scale-up, representing a viable approach for the local production of thermostable polymerases and other strategic molecular reagents.

Key words: Taq Polymerase; Recombinant proteins; Gene Expression; Biotechnology; Polymerase Chain Reaction; Scientific and Technical Autonomy

Produção e avaliação catalítica de uma Taq DNA polimerase recombinante como alternativa para aplicações biotecnológicas

Resumo

A Taq DNA polimerase recombinante é uma enzima amplamente utilizada em aplicações de biologia molecular, como a PCR. A pandemia de COVID-19 evidenciou a vulnerabilidade associada à dependência de reagentes críticos importados, incluindo polimerases termoestáveis. Este estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo otimizado para expressão heteróloga, purificação e validação funcional de Taq polimerase recombinante, visando a produção local. Células *Escherichia coli* BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo pOpenTaq, e diferentes condições de indução com IPTG e temperatura foram testadas para maximizar a expressão. A purificação foi realizada por precipitação térmica e com sulfato de amônio, seguida de cromatografia por exclusão molecular. A atividade enzimática foi avaliada por PCR em ponto final, utilizando diferentes templates de DNA, em comparação com uma Taq polimerase comercial. A expressão ótima foi obtida a 37 °C com 1 mM de IPTG, após 4 horas de indução. A enzima purificada apresentou pureza superior a 90% e desempenho equivalente ao da enzima comercial, incluindo na amplificação de amostras clínicas complexas. O protocolo demonstrou ser eficiente, reproduzível e escalável, configurando-se como uma alternativa viável para a produção nacional de polimerases termoestáveis e outros reagentes estratégicos.

Palavras-chave: Taq Polimerase; Proteínas recombinantes; Expressão Gênica; Biotecnologia; Reação em Cadeia da Polimerase; Autonomia científica e técnica.

Introducción

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una herramienta fundamental en biología molecular, ampliamente utilizada en investigación biomédica, diagnóstico clínico, ingeniería genética y tecnologías de secuenciación. Su capacidad para amplificar de forma rápida y precisa secuencias específicas de ADN o ADN complementario (cADN) a partir de transcritos específicos, ha revolucionado múltiples disciplinas científicas desde su desarrollo en 1983 (Mullis & Faloona, 1987; Innis et al., 1990).

En Colombia, como en muchos países en desarrollo, los laboratorios de investigación han dependido históricamente de la importación de insumos biotecnológicos para llevar a cabo actividades fundamentales en diagnóstico molecular, investigación básica y desarrollo tecnológico. Esta dependencia conlleva altos costos, ya que dichos insumos deben adquirirse en moneda extranjera, frente a la cual la moneda local es débil. Además, se suman fluctuaciones en la tasa de cambio, tiempos de espera prolongados y restricciones y costos aduaneros. Estas limitaciones se hicieron especialmente evidentes durante la pandemia de COVID-19, cuando la interrupción global de las cadenas de suministro afectó gravemente el acceso a reactivos esenciales, comprometiendo tanto proyectos de investigación como de diagnóstico (Artecona et al., 2021; Guzmán et al., 2024). Entre estos insumos está la Taq ADN polimerasa, una enzima termoestable derivada de *Thermus aquaticus*, esencial para la PCR.

Diversos estudios han descrito estrategias para la expresión heteróloga y purificación de Taq ADN polimerasa recombinante, con enfoques dirigidos principalmente a optimizar su rendimiento y ampliar su rango de aplicaciones. Entre estas aproximaciones se incluyen el desarrollo de variantes Hot Start, diseñadas para reducir la formación de productos inespecíficos (Noma et al., 2006) y la construcción de enzimas químéricas con mayor procesividad (Yamagami et al., 2014). Otros trabajos se han centrado en mejorar la amplificación de blancos difíciles, como regiones ricas en GC (Spibida et al., 2017), así como en generar mutantes con funciones específicas, como la resistencia aumentada a inhibidores comunes en la PCR (Kermekchiev et al., 2009) o con propiedades catalíticas mejoradas (Barnes et al., 2021).

En conjunto, la literatura disponible se ha centrado principalmente en aspectos de ingeniería enzimática, optimización de variantes y caracterización bioquímica detallada de Taq ADN polimerasa. No obstante, son considerablemente menos frecuentes los trabajos que abordan la producción de Taq recombinante desde una perspectiva operativa, es decir, mediante protocolos diseñados para facilitar su implementación en laboratorios que requieren enzimas funcionales para uso rutinario. Esto es importante porque aunque el costo de las preparaciones comerciales de Taq ADN polimerasa ha disminuido con el tiempo, continúa representando una carga económica para laboratorios que utilizan la PCR de forma intensiva, particularmente aquellos que procesan grandes volúmenes de muestras. Esta situación ha impulsado a numerosos grupos a producir la enzima localmente.

En este contexto, el desarrollo de protocolos técnicamente accesibles para la producción de Taq recombinante constituye una contribución valiosa para laboratorios académicos y centros de investigación que buscan reducir su dependencia de insumos importados, fortalecer capacidades locales en biología molecular y avanzar hacia modelos de autosuficiencia biotecnológica. Es así como la expresión heteróloga de proteínas en *Escherichia coli* se ha consolidado como una plataforma robusta y de alto rendimiento para

la producción de proteínas recombinantes (Rosano & Ceccarelli, 2014; Berlec & Strukelj, 2013). Adicionalmente, la termoestabilidad de la Taq ADN polimerasa permite implementar métodos de purificación simplificados, como la precipitación por calor. Esta estrategia elimina la necesidad de equipos sofisticados o de agregar a la proteína recombinante secuencias adicionales que faciliten su purificación, lo cual permite su aplicación en laboratorios con infraestructura o recursos limitados (Teng et al., 2023; Vieille & Zeikus, 2001).

El presente estudio propone un protocolo funcional, escalable y económicamente accesible para la producción nacional de una Taq ADN polimerasa recombinante (*r_TaqDNA-pol*), cuya actividad enzimática, evaluada en términos de rendimiento en reacciones de PCR (cantidad y calidad del amplicón obtenido), resulte comparable a la de preparaciones comerciales. Esta estrategia no solo busca satisfacer las necesidades operativas de laboratorios nacionales, sino también ofrecer un modelo transferible a instituciones académicas e industriales, promoviendo la autosuficiencia en biotecnología y el fortalecimiento de capacidades locales.

En este marco, la investigación responde a una necesidad concreta del ecosistema científico colombiano: garantizar el acceso continuo a reactivos críticos, reducir la dependencia de insumos importados y fomentar la soberanía científica mediante la implementación racional de herramientas de biología molecular e ingeniería genética.

Metodología

El laboratorio responsable de este estudio cuenta con una reconocida trayectoria en el diseño y ejecución de protocolos para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, empleando técnicas de ADN recombinante ampliamente validadas. A lo largo de más de una década, ha desarrollado metodologías para la expresión de proteínas de alta complejidad estructural y funcional, evaluando estrategias orientadas a mejorar su expresión, solubilidad y rendimiento, incluyendo el uso de distintas cepas bacterianas, condiciones de inducción y sistemas de fusión (Castañeda et al., 2007; Guerra et al., 2016; Morales et al., 2017; Hernández et al., 2017; Morales et al., 2018). Con base en esta experiencia acumulada, se han consolidado protocolos robustos y reproducibles para cada etapa del proceso.

Salvo indicación explícita, los protocolos empleados aquí no presentaron modificaciones sustanciales respecto a los descritos convencionalmente en la literatura. No obstante, su aplicación efectiva requirió una cuidadosa evaluación, ya que la producción de cada proteína recombinante implica una combinación particular de condiciones que no pueden extrapolarse directamente de protocolos previos. En este caso, la estandarización de parámetros específicos para la producción de una enzima funcional, como la Taq ADN polimerasa, representa un desafío adicional, ya que no solo se busca una expresión eficiente, sino también la conservación de su actividad catalítica.

Estandarización de la expresión en pequeña escala

Transformación en cepas de *E. coli*

Bacterias *E. coli* BL21(DE3) (Thermo Scientific) químicamente competentes se transformaron con el plásmido pOpen_taq (AddGene: Plasmid#153315) mediante choque térmico (42°C durante 45 s, seguido de incubación en hielo por 5 min). A continuación, las bacterias transformadas se incubaron durante una hora a 37°C en medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂ y 20 mM glucosa)

y se sembraron en placas de Petri con LB-agar suplementado con ampicilina (100 µg/mL). Las placas se incubaron a 37°C durante la noche. Este ensayo se hizo dos veces de manera independiente.

Expresión de las proteínas recombinantes

Se tomó una colonia transformada con el plásmido recombinante y se inoculó en 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL). El cultivo se mantuvo en incubación a una temperatura constante de 37 °C durante toda la noche, con el fin de favorecer el crecimiento óptimo de las colonias bacterianas. Posteriormente, se realizó una dilución 1:50 del cultivo y se continuó el crecimiento hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de aproximadamente 0,6. La inducción de la expresión de la proteína recombinante se realizó adicionando isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG), evaluando dos concentraciones: 0,5 mM y 1 mM. El cultivo se mantuvo en agitación a 200 rpm y se ensayaron dos temperaturas de inducción: 37°C y 22°C. Se tomaron alícuotas a las 2, 4, 6 y 16 horas posteriores a la inducción para analizar la expresión de la proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Finalmente, las bacterias fueron colectadas por centrifugación a 4000 rpm por 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se determinó el peso húmedo de las bacterias. Cada condición se evaluó en dos ensayos independientes.

Lisis celular

Los sedimentos bacterianos se suspendieron en 5 mL de tampón de lisis por cada gramo de peso húmedo bacteriano. El tampón de lisis contenía 50 mM fosfato de sodio (pH 7,8), 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10% glicerol y 0,5% Triton X-100. A esta suspensión se añadió lisozima (1 mg/mL), un cóctel de inhibidores de proteasas 1X (Sigma P8340: 1 mM AEBSF, 14 µM E64, 15 µM Pepstatina A, 40 µM Bestatina, 20 µM Leupeptina, 0,8 µM Aprotinina), DNasa I (5 µg/mL) y CaCl₂ (1 mM). La mezcla se sometió a un ciclo de congelamiento a -80 °C, seguido de una incubación a 37 °C durante 2 horas sin agitación.

Purificación por calor

El lisado celular fue sometido a un proceso de incubación a 75 °C durante una hora, seguido de una centrifugación a 14.000 rpm por un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se recuperó la fracción soluble obtenida, la cual fue analizada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % para verificar la presencia y pureza de las proteínas.

Estandarización de la purificación a gran escala

Con base en las condiciones óptimas establecidas en pequeña escala, se realizó la expresión recombinante en 500 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL). La lisis bacteriana se llevó a cabo según el protocolo previamente descrito.

Purificación térmica secuencial

El extracto crudo fue sometido a una primera incubación a 75 °C durante 1 hora y centrifugado a 14000 rpm por 10 min. La fracción soluble obtenida fue luego sometida a un segundo tratamiento térmico a 85 °C durante 1 hora, seguido de centrifugación bajo las mismas condiciones, se recuperó la fracción soluble.

Precipitación con sulfato de amonio

A la fracción soluble obtenida en la etapa anterior se le adicionó sulfato de amonio hasta alcanzar una concentración del 30% p/v. Posteriormente, la mezcla fue sometida a

centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos. El precipitado resultante se resuspendió en 3 mL de tampón de almacenamiento compuesto por 50 mM Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT y 10% glicerol.

Purificación por filtración en gel

Se inyectaron 200 μ L de la suspensión proteica en una columna Enrich SEC 650 (Bio-Rad), previamente equilibrada con tampón Tris-HCl pH 8,6 (al menos dos volúmenes de columna). La cromatografía se realizó con un flujo constante de 1 mL/min a temperatura ambiente utilizando un sistema Biologic DuoFlow (BioRad). Durante la elución, el sistema registró en tiempo real el perfil de absorbancia a 280 nm, lo que permitió identificar las fracciones con mayor concentración proteica. Las fracciones seleccionadas se analizaron mediante SDS-PAGE al 12%, empleando un marcador de peso molecular precoloreado (PageRuler™ Plus, Thermo Fisher) como referencia para estimar el tamaño de las bandas.

Verificación de la actividad catalítica

La actividad catalítica de la Taq ADN polimerasa recombinante (r_TaqDNA-pol) se evaluó mediante PCR semicuantitativa dirigida a la amplificación de un fragmento de 234 pb del gen de β -actina de ratón (*Mus musculus*), usando oligonucleótidos diseñados y reportados previamente (Westin et al., 2004; Zhang et al., 2020). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15 μ L, empleando 0,1 μ L de Taq polimerasa comercial (5 U/ μ L) (GoTaq®, Promega) o 0,1 μ L de r_TaqDNA-pol. Como plantilla se utilizaron 50 ng de ADN genómico de ratón proveniente del banco de ADN del laboratorio. Este material fue obtenido de ratones BALB/c silvestres mediante extracción con fenol-cloroformo seguida de precipitación etanólica (Sambrook & Russell, 2001). Los procedimientos de obtención del material biológico original y de la extracción de ADN no formaron parte del presente estudio, y en su momento fueron realizados bajo los principios éticos de experimentación con animales establecidos por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad El Bosque (Acta 017 de 2022) (Rozo et al., 2025). Se incluyó un control negativo, sin ADN. Las secuencias de los oligonucleótidos, las condiciones de reacción y el programa de amplificación se describen en el Material Suplementario. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador T100 (BioRad). Para comparar el rendimiento de ambas enzimas, se prepararon seis réplicas por grupo y se retiró una alícuota cada cinco ciclos. Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, teñido con bromuro de etidio. Los geles fueron fotodocumentados en un sistema Gel Doc XR+ (Bio-Rad) y cuantificados mediante el software ImageLab (Bio-Rad).

Eficacia de amplificación de la r_TaqDNA-pol

La eficacia de la r_TaqDNA-pol se evaluó mediante diversas reacciones de PCR, empleando tres plantillas provenientes del banco de ADN del laboratorio. Se usó ADN genómico de *Enterococcus faecalis* y ADN genómico de *Blastocystis*, ambos obtenidos a partir de cultivos mediante extracción con fenol-cloroformo seguida de precipitación etanólica (Sambrook & Russell, 2001). Adicionalmente, se usó ADN total extraído de muestras fecales humanas con el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Los procedimientos de obtención del material biológico original y de la extracción de ADN no formaron parte del presente estudio. Para los ensayos de PCR se usaron oligonucleótidos descritos previamente para amplificar un fragmento de 397 pb del gen 16S de *E. faecalis* (Hyman et al., 2005; Palmer et al., 2007), el gen completo 18S de *Blastocystis* (1750 pb) (Scicluna et al., 2006; Stensvold et al., 2012) y un fragmento de 500 pb del mismo gen (Santin et al., 2011). Las secuencias de los oligonucleótidos, las condiciones de reacción y el programa de amplificación se describen en el Material Suplementario.

Evaluación de la sensibilidad de la r_TaqDNA-pol

Se realizaron ensayos de PCR para amplificar el gen 18S ribosomal completo de *Blastocystis*. Para evaluar la sensibilidad de la r_TaqDNA-pol, se emplearon diluciones seriadas de ADN total extraído de una muestra de materia fecal positiva para *Blastocystis*, proveniente del banco de ADN del laboratorio, y obtenido previamente mediante el kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Los oligonucleótidos utilizados fueron los descritos en la sección anterior (Scicluna et al., 2006; Stensvold et al., 2012). Las reacciones se prepararon añadiendo a cada tubo las siguientes cantidades de ADN: 71,6 ng, 7,1 ng, 0,7 ng, 0,007 ng y un control sin ADN. A cada reacción se agregó 0,1 μ L de r_TaqDNA-pol. Como referencia, se realizaron ensayos paralelos bajo las mismas condiciones experimentales, pero utilizando 0,1 μ L de GoTaq® (Promega). Las secuencias de los oligonucleótidos, así como las condiciones de reacción y el programa de amplificación, se describen en el Material Suplementario.

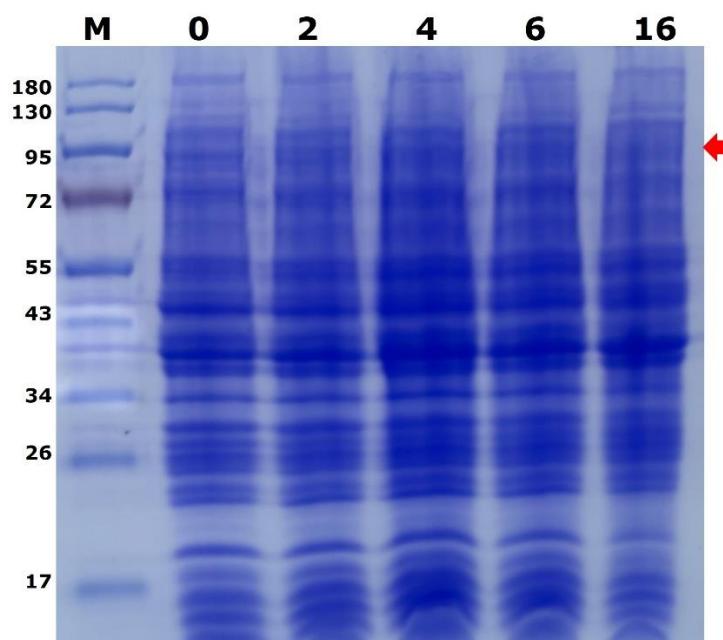
Resultados

Estandarización de la expresión de la r_TaqDNA-pol

La expresión de la r_TaqDNA-pol en *E. coli* BL21(DE3) fue inducida utilizando dos concentraciones de IPTG (0,5 y 1 mM) y dos temperaturas de incubación (22 °C y 37 °C). No obstante, en el primer ensayo, usando 1 mM de IPTG y temperatura de 37 °C, el análisis por SDS-PAGE de proteínas totales no reveló una banda evidentemente distingible al peso esperado (93,2 kDa), lo que sugiere una expresión baja o enmascarada por proteínas endógenas de pesos moleculares similares (Figura 1).

Figura 1

Expresión en *E. coli* BL21(DE3) a diferentes horas posinducción



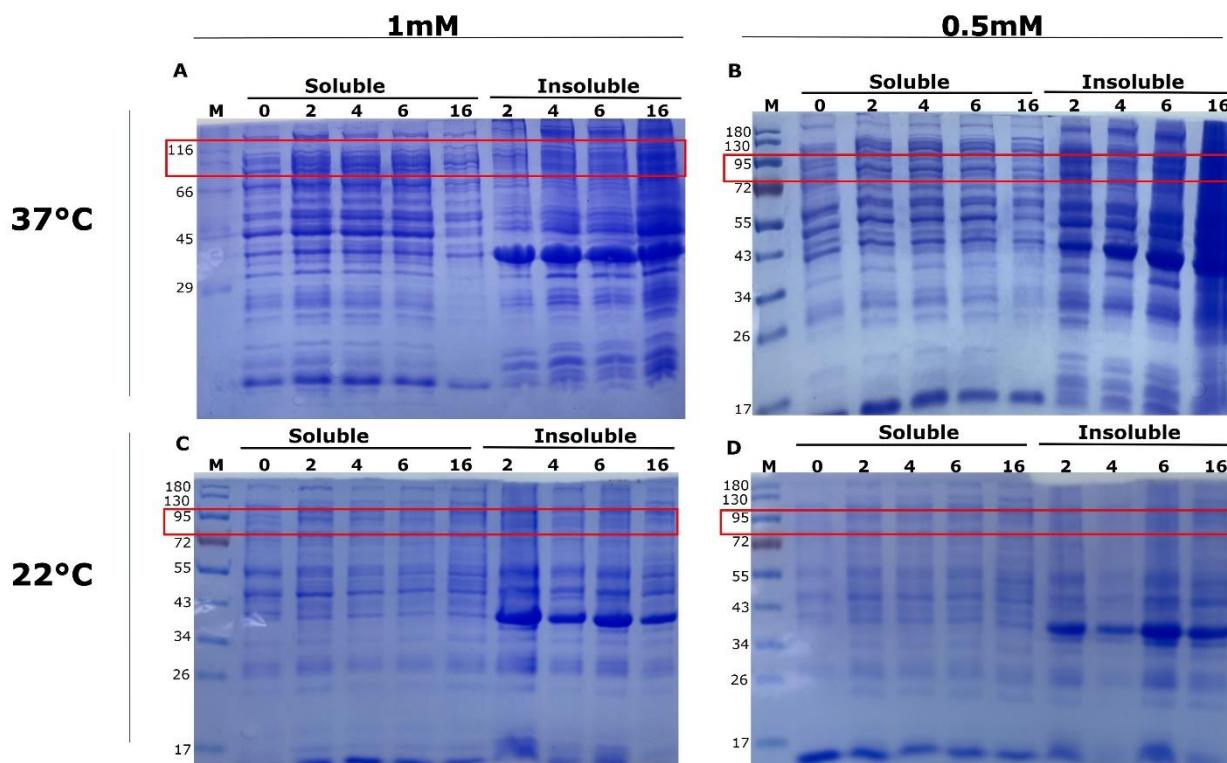
M: marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™). Se evaluó la expresión de la Taq polimerasa recombinante a los tiempos 0 h, 2 h, 4 h, 6 h y 16 h, usando 1 mM de IPTG y temperatura de inducción a 37°C. La flecha roja indica la posición esperada de la banda correspondiente a la

proteína recombinante, peso teórico de 93,2 KDa. Los extractos fueron analizados mediante SDS-PAGE al 12% y teñidos con azul de Coomassie R-250

Con el objetivo de aumentar la resolución y reducir la interferencia de otras proteínas, se procedió con la lisis bacteriana. El SDS-PAGE permitió identificar una banda tenue en la fracción soluble de las cuatro condiciones de inducción evaluadas (Figura 2A, B, C y D), cuya migración fue compatible con el peso esperado de la r_TaqDNA-pol, lo que sugiere una posible expresión en forma soluble.

Figura 2

Evaluación de diferentes condiciones de expresión de la r_TaqDNA-pol en *E. coli* BL21(DE3)



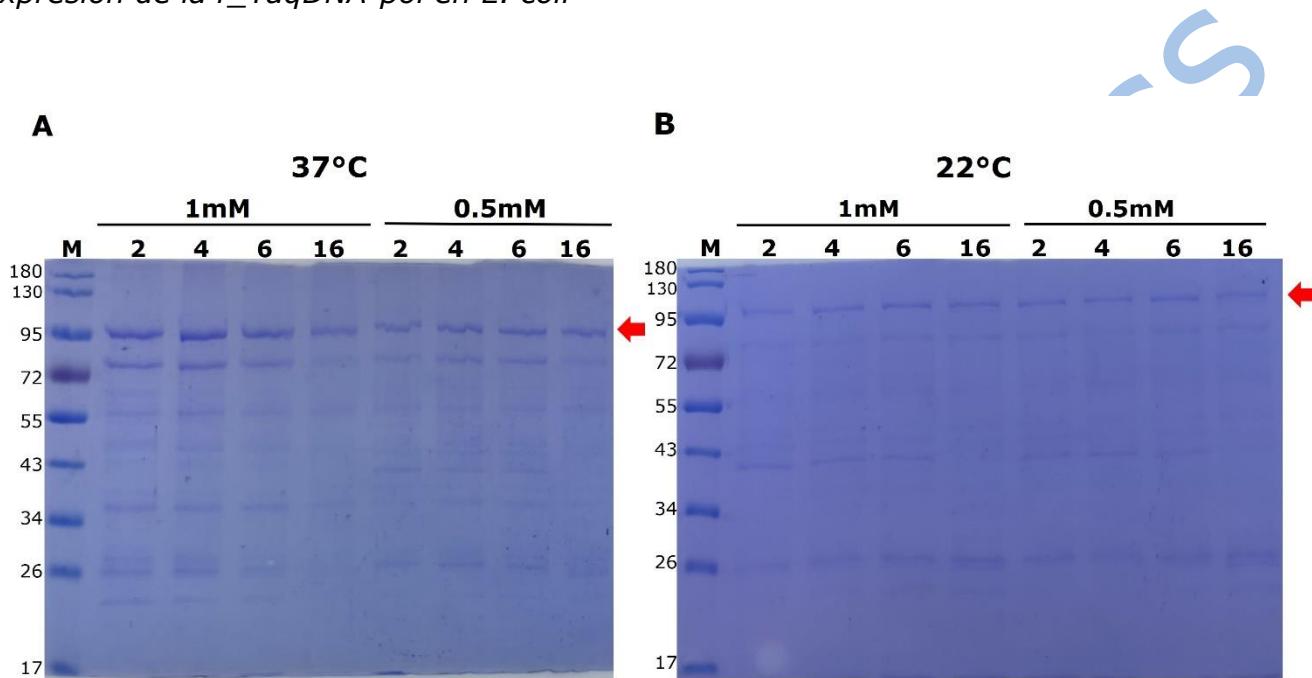
P: marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™). A) Fracciones solubles e insolubles bajo condiciones de inducción con A. 1 mM IPTG a 37 °C. B. 0,5 mM IPTG a 37 °C. C. 1 mM IPTG a 22 °C. D. 0,5 mM IPTG a 22 °C.). La flecha roja indica la posición esperada de la proteína recombinante (peso teórico de 93,2 KDa). SDS-PAGE. Geles de poliacrilamida (12%) teñidos con azul de Coomassie.

Con el fin de tener una mayor certeza, se implementó una estrategia preliminar de purificación basada en precipitación térmica, aprovechando la termoestabilidad de la Taq ADN polimerasa. El tratamiento a 75 °C permitió un enriquecimiento selectivo de la proteína en los sobrenadantes de inducción a 37°C (Figura 3A), en comparación con las

inducciones a 22°C (Figura 3B). Sin embargo, la comparación de las concentraciones de inductor reveló una mayor concentración cualitativa de la proteína cuando se utilizó 1mM de IPTG, específicamente a las 4h post-inducción (Figura 3A).

Figura 3

Evaluación de la purificación térmica a 75 °C de las fracciones solubles obtenidas tras la expresión de la r_TaqDNA-pol en E. coli



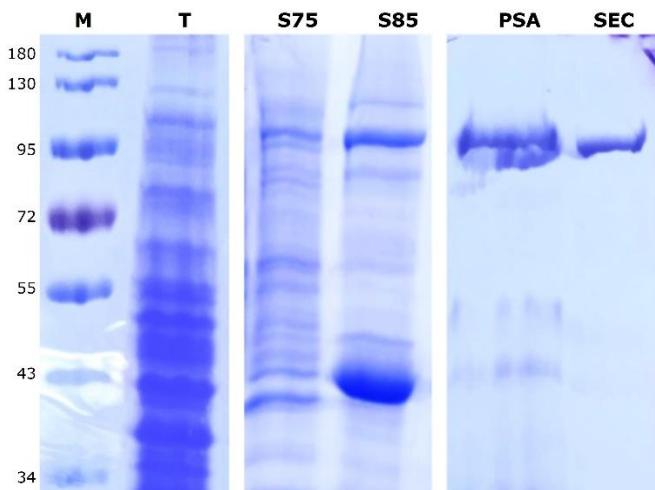
M: marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™). A) Fracción soluble e insoluble bajo condiciones de inducción con A. 1 mM y 0,5 mM de IPTG a 37°C. B. 1 mM y 0,5 mM IPTG a 22 °C. Se recolectaron muestras a las 2, 4, 6 y 16 horas. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína recombinante después de un primer ensayo de purificación, peso teórico de 93,2 KDa. Los extractos fueron analizados mediante SDS-PAGE al 12% y teñidos con azul de Coomassie R-250.

Estandarización de la purificación de la r_TaqDNA-pol

Con el objetivo de obtener una mayor pureza de la proteína recombinante, se realizó una segunda precipitación térmica, orientada a eliminar contaminantes termoestables remanentes (Figura 4). No obstante, el análisis por SDS-PAGE evidenció la presencia de impurezas menores, tanto de peso molecular superior como inferior al esperado. Por esta razón, se implementó una estrategia adicional de purificación mediante precipitación con sulfato de amonio al 30% p/v, seguida de cromatografía de exclusión por gel (SEC). El monitoreo de la elución a 280 nm reveló un mayor enriquecimiento proteico en las fracciones 13 y 14, las cuales, según el análisis por SDS-PAGE, correspondieron a la proteína r_TaqDNA-pol purificada (Figura 4).

Figura 4

Resumen del proceso de purificación de la r_TaqDNA-pol



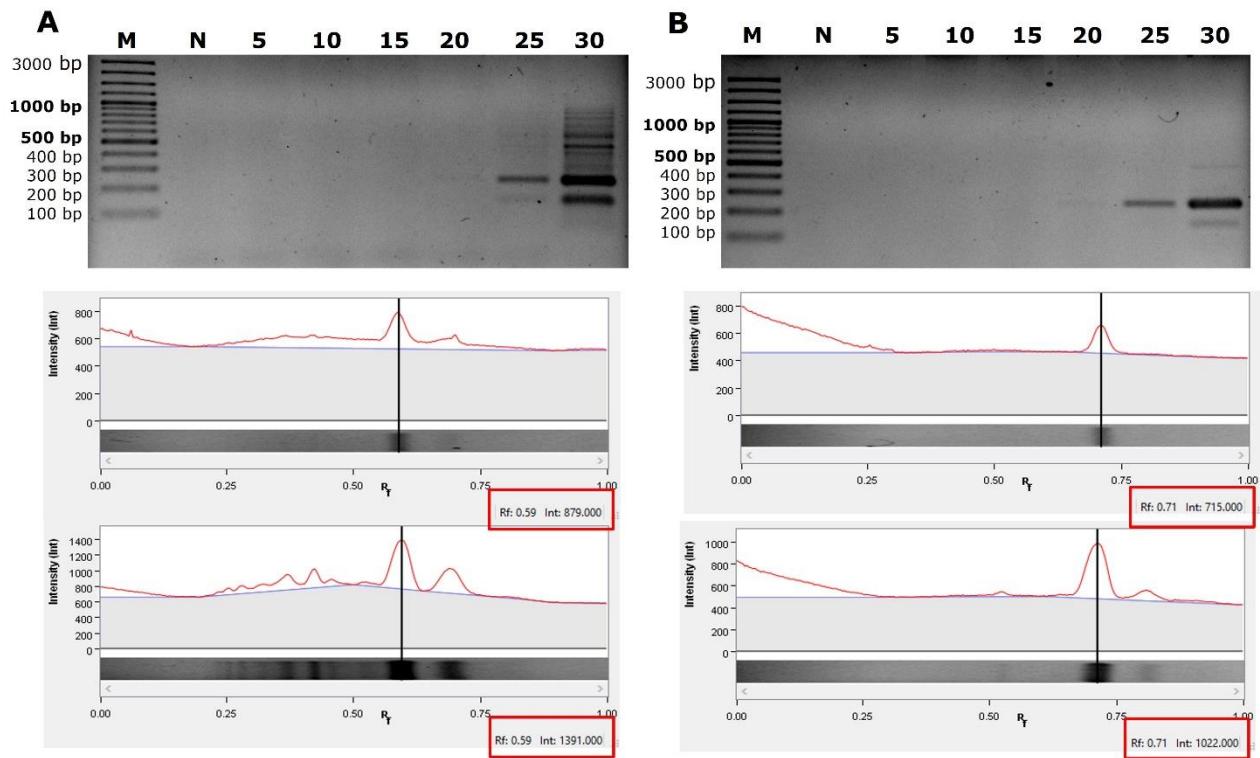
M: marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific™). T. Proteínas totales de *E. coli* BL21(DE3) que expresa la r_TaqDNA-pol. S75: Proteínas solubles después de la precipitación con calor a 75°C por 1 hora. S85: Proteínas solubles después de la precipitación con calor a 85°C por 1 hora. PSA: Proteínas resuspendidas en buffer de almacenamientos posterior de la precipitación con sulfato de amonio al 30% p/v. SEC. Proteína purificada mediante cromatografía de exclusión en gel, fracción 14I. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%, teñido con azul de Coomassie R-250.

Evaluación catalítica de la r_TaqDNA-pol

La actividad catalítica de la r_TaqDNA-pol purificada se evaluó mediante PCR semicuantitativa amplificando un fragmento de 234 pb del gen β -actina a partir de ADN genómico de ratón. La enzima recombinante mostró una cinética de amplificación comparable e incluso superior a la Taq ADN polimerasa comercial, con una intensidad de banda 36 % mayor al ciclo 30 (1391 vs 1022 UA) y 22 % mayor al ciclo 25 (879 vs 715 UA), según análisis densitométrico (Figura 5).

Figura 5

Cuantificación de la actividad de la r_TaqDNA-pol mediante PCR semicuantitativa

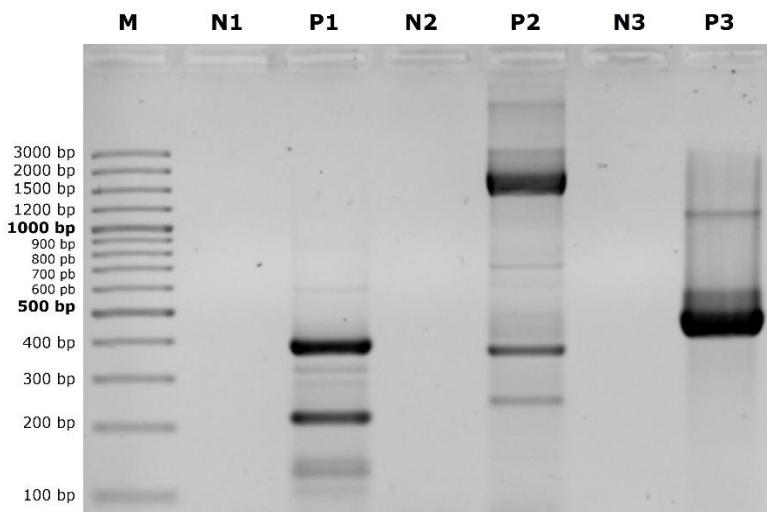


Amplificación del fragmento de 234 pb del gen β -actina de ratón, utilizando ADN genómico como plantilla. M: marcador de peso molecular de 100pb (GeneRuler). N: control negativo de la PCR. 5–30: productos de PCR obtenidos entre los ciclos 5 a 30. A) Resultados de la PCR del producto amplificado con Taq polimerasa recombinante (r_TaqDNA-pol) con su respectiva cuantificación en el ciclo 25 (879 UA) y ciclo 30 (1391 UA). B) Resultados de la PCR del producto amplificado con la Taq polimerasa comercial con su respectiva cuantificación en el ciclo 25 (715 UA) y ciclo 30 (1022 UA). Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

Con el objetivo de evaluar la versatilidad funcional de la enzima obtenida, se realizó un ensayo de eficacia mediante la amplificación de blancos genéticos de diferente tamaño y complejidad, con el fin de determinar su aplicabilidad en diversos escenarios experimentales. En los carriles correspondientes a las muestras P1, P2 y P3, se observaron bandas claramente definidas en las posiciones esperadas: \sim 397 pb, \sim 1750 pb y \sim 500 pb, respectivamente. Estos resultados demuestran la capacidad de la r_TaqDNA-pol para amplificar eficazmente fragmentos de ADN de distintas longitudes (Figura 6).

Figura 6

Verificación de la eficacia de la r_TaqDNA-pol



M: marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler). N1, N2 Y N3: Controles negativos de las reacciones. P1. Amplificación de un fragmento del gen SSuRNA 16S de *E. faecalis* (~397 pb), utilizando ADN genómico de *E. faecalis* como plantilla. P2. Amplificación completa del gen SSuRNA 18S de *Blastocystis* (~1750 pb), utilizando ADN extraído de materia fecal positiva para *Blastocystis* como plantilla. P3. Amplificación de un fragmento del gen SSuRNA 18S de *Blastocystis* (~500 pb), utilizando ADN genómico de *Blastocystis* como plantilla. Los productos de amplificación fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

Particularmente destacable fue su desempeño en la amplificación del gen completo SSU rRNA 18S de *Blastocystis* (~1750 pb), a partir de ADN total extraído de materia fecal, una matriz de alta complejidad en la que predomina el ADN bacteriano. La capacidad de amplificación en estas condiciones indica no solo una buena eficiencia catalítica, sino también una posible tolerancia a inhibidores presentes en muestras biológicas complejas.

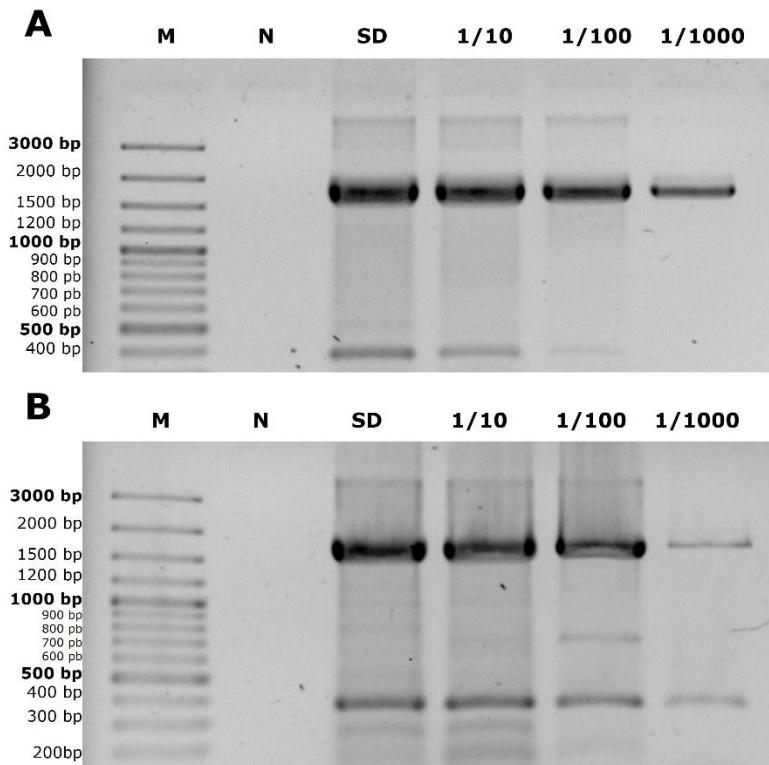
Sensibilidad de la r_TaqDNA-pol

Con el objetivo de evaluar la sensibilidad de la r_TaqDNA-pol, se realizó un ensayo de PCR convencional dirigido a la amplificación del gen ribosomal 18S de *Blastocystis*, usando como plantilla diluciones seriadas de ADN extraído a partir de una muestra de materia fecal, positiva para el parásito.

Los resultados evidenciaron amplificación exitosa en todas las diluciones evaluadas, incluso en la menor cantidad de ADN ensayada (0,07 ng), tanto con la r_TaqDNA-pol como con la Taq polimerasa comercial. Es importante señalar que, en este tipo de muestras, la proporción de ADN correspondiente a *Blastocystis* es relativamente baja, ya que el ADN bacteriano constituye la mayor fracción del material genético presente en las heces. La capacidad de la r_TaqDNA-pol para amplificar la secuencia blanco en un contexto altamente complejo, caracterizado por una gran abundancia de ADN ajeno al parásito y por la posible presencia de inhibidores, proporciona evidencia sólida de su sensibilidad y de su desempeño robusto bajo condiciones desafiantes.

Figura 7

Ensayos de sensibilidad de la r_TaqDNA-pol



A) Amplificación utilizando r_TaqDNA-pol. B) Amplificación utilizando Taq polimerasa comercial. Se realizó una PCR para la amplificación del gen completo 18S de *Blastocystis* a partir de ADN extraído de una muestra de materia fecal de un tamaño de 1750 pb. M: marcador de peso molecular de 100pb (GeneRuler). N: control negativo. SD: reacción sin dilución del ADN plantilla (71,6 ng). Diluciones del ADN plantilla: 1:10, 1:100 y 1:1000: dilución 1:1000. Los productos fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio.

Se logró la producción de un lote funcional de r_TaqDNA-pol, conformado por 30 alícuotas de 100 μ L cada una, con una concentración de 9,4 μ g/mL, equivalente a más de 5 unidades por microlitro, según la comparación funcional con una enzima comercial. Este lote garantiza el suministro del insumo para diversas aplicaciones de biología molecular dentro del Laboratorio de Parasitología Molecular.

Asimismo, se estableció y documentó un protocolo estandarizado para la expresión, purificación y conservación de la r_TaqDNA-pol, lo cual permitirá reproducir el proceso en futuros ciclos de producción, asegurando la continuidad operativa y promoviendo la autosuficiencia del laboratorio en la obtención de esta enzima clave.

Estimación del costo de producción de la r_TaqDNA-pol

Para obtener una estimación reproducible del costo directo del lote producido, se realizó un cálculo detallado basado en los precios vigentes de los insumos empleados durante las etapas de expresión, purificación y almacenamiento de la enzima. Se consideraron los costos de medios de cultivo, antibióticos, inductores, tampones y sales para lisis y precipitación, enzimas auxiliares, reactivos de cromatografía y consumibles, a los cuales se sumó el valor correspondiente a la mano de obra técnica requerida para ejecutar el

protocolo completo. La suma de estos componentes resultó en un costo aproximado de 9,2 millones COP por lote, equivalente a 30 alícuotas funcionales de 100 µL cada una. Para contextualizar este valor frente a opciones importadas, se consultó el precio actualizado de una Taq ADN polimerasa comercial con características comparables de actividad y estabilidad. Con base en esta referencia, se estimó que un lote con volumen equivalente tendría un costo comercial cercano a 52,2 millones COP. Esta comparación evidencia un ahorro aproximado del 80 % asociado a la producción local.

Discusión

La producción de enzimas recombinantes como la Taq ADN polimerasa constituye una estrategia clave para fortalecer la autosuficiencia biotecnológica. Este estudio desarrolló y validó un protocolo optimizado para la expresión funcional de Taq polimerasa en *E. coli*, evaluando su rendimiento en términos de expresión, purificación y actividad enzimática.

La expresión inicial de la proteína fue moderada, probablemente debido al uso del promotor híbrido tac del plásmido pOpenTaq, cuya eficiencia transcripcional es menor que la de los sistemas basados en T7 (Rosano & Ceccarelli, 2014; Studier, 2005). Sin embargo, la estrategia de producción y purificación permitió obtener la enzima en forma abundante y catalíticamente activa, lo que demuestra la efectividad y robustez del protocolo diseñado.

La estrategia de purificación, basada en tratamiento térmico y precipitación con sulfato de amonio (Teng et al., 2023; Wingfield, 2017), seguida de exclusión por tamaño, permitió aislar la enzima con >90 % de pureza, sin recurrir a etiquetas de afinidad ni equipamiento especializado. Este enfoque es reproducible y de bajo costo, lo cual lo hace adecuado para entornos con recursos limitados. Adicionalmente, durante los análisis por SDS-PAGE fue posible observar, en algunas fracciones de purificación, la presencia de bandas adicionales con pesos moleculares distintos al esperado para la r_TaqDNA-pol. Este patrón es común en procesos de producción *in house* de enzimas recombinantes, especialmente cuando se utilizan metodologías de purificación sin etiquetas de afinidad y basadas en propiedades generales como la termoestabilidad. Estas bandas pueden corresponder a productos de degradación, isoformas truncadas o proteínas bacterianas coenriquecidas durante los pasos térmicos y salinos (Schein, 1989; Gaberc-Porekar & Menart, 2001). Aunque estas impurezas no afectaron la funcionalidad de la enzima en los ensayos de PCR, su identificación resulta relevante para la estandarización de futuros lotes y sugiere que podrían incorporarse pasos adicionales si se requieren mayores niveles de pureza para aplicaciones más exigentes.

Funcionalmente, la r_TaqDNA-pol mostró un desempeño comparable, y en algunas pruebas superior al de formulaciones comerciales, incluso sobre matrices complejas como ADN extraído de materia fecal, lo que respalda su aplicabilidad en contextos diagnósticos reales (Schrader et al., 2012; Hoofar et al., 2004).

Los resultados obtenidos demuestran tanto la viabilidad técnica como el impacto estratégico de producir Taq polimerasa a nivel local, al reducir la dependencia de insumos importados y fortalecer la capacidad de respuesta del sistema científico ante posibles interrupciones en el suministro. La producción en *E. coli* BL21(DE3) constituye una plataforma replicable y escalable, especialmente relevante en países en desarrollo como Colombia. La pandemia por SARS-CoV-2, como ejemplo concreto de este tipo de situaciones, evidenció cómo eventos globales pueden limitar o incluso cortar el acceso a insumos biotecnológicos esenciales (Artecona et al., 2021; Berlec & Strukelj, 2013; Guzmán et al., 2024; Ivanov, 2020).

El protocolo propuesto ofrece una base para desarrollar otras enzimas clave, facilitando la creación de una plataforma nacional de producción de reactivos estratégicos, como ya se ha implementado exitosamente en Asia y Europa del Este (Vásárhelyi et al., 2023; Zhang et al., 2024). Futuras optimizaciones podrían incluir sistemas de expresión con otros promotores y la incorporación de etiquetas de purificación, así como la estandarización bajo normas GMP para su potencial transferencia al sector diagnóstico.

Además, resulta pertinente considerar la viabilidad de implementar este protocolo en un laboratorio convencional. Las etapas de expresión, lisis y purificación térmica pueden ejecutarse con infraestructura básica de biología molecular (incubadora, centrífuga, baño térmico y equipamiento estándar) y no requieren instrumentación especializada. Aunque la cromatografía de exclusión molecular optimiza la pureza final, es el único paso que demanda un equipo robusto; sin embargo, la enzima obtenida previamente a este proceso, pese a presentar un nivel de pureza menor, mantiene actividad catalítica suficiente para aplicaciones rutinarias de PCR, como se evidenció en los ensayos comparativos. Esto implica que laboratorios con recursos limitados pueden adoptar una versión simplificada del protocolo sin comprometer la funcionalidad de la enzima. A nivel de personal, el procedimiento requiere únicamente formación básica en técnicas de manipulación bacteriana y SDS-PAGE, por lo que puede ser implementado por equipos con competencias estándar en biología molecular. Aunque los resultados aquí presentados demuestran la robustez del método, la validación externa en otros contextos operativos y con distintos tipos de matrices biológicas contribuirá a fortalecer su reproducibilidad y facilitar su adopción en entornos de investigación y diagnóstico.

Finalmente, el análisis económico realizado, aunque exploratorio y no orientado a establecer un precio de mercado, permitió dimensionar el impacto de producir la enzima a nivel local. La estimación del costo por lote reveló una diferencia sustancial respecto al valor de una formulación comercial con características equivalentes, lo que se traduce en una reducción cercana al 80% en los costos operativos del laboratorio. Evaluaciones similares han sido reportadas en otros modelos de producción biotecnológica a pequeña escala, donde el aprovechamiento de plataformas bacterianas y protocolos de purificación basados en termoestabilidad permiten disminuir de manera significativa los costos totales (Teng et al., 2023; Berlec & Strukelj, 2013).

Es importante señalar que esta aproximación no constituye un análisis económico formal, sino una estimación del beneficio de la producción *in house*, lo cual está en concordancia con estudios que destacan la utilidad de evaluaciones de costo simplificadas en contextos de biotecnología aplicada (Sahakijpajarn et al., 2019). Aunque la estimación fue intencionalmente cautelosa, el ahorro calculado es congruente con reportes internacionales en los que la producción local de enzimas recombinantes ha demostrado mejorar la estabilidad operativa de laboratorios de diagnóstico e investigación (Mendoza-Rojas et al., 2021).

En el contexto latinoamericano, donde los costos de importación y los tiempos de entrega están sujetos a una alta incertidumbre en la disponibilidad de insumos, la capacidad de producir enzimas estratégicas representa una ventaja significativa. La pandemia por COVID-19 reforzó esta necesidad, al exponer la vulnerabilidad de las cadenas globales de suministro y el riesgo que supone depender exclusivamente de productos importados para actividades críticas de diagnóstico molecular (Artecona & Jorge, 2021; Guzmán et al., 2024). En este sentido, la reducción observada en los costos no solo evidencia la eficiencia del protocolo desarrollado, sino que respalda la pertinencia de avanzar hacia modelos de

autosuficiencia biotecnológica, alineados con recomendaciones internacionales para sistemas científicos de países en desarrollo.

En síntesis, este trabajo no solo valida una alternativa técnica funcional, sino que aporta una solución tangible para avanzar hacia la soberanía científica en biotecnología.

Conclusiones

Este estudio demuestra la viabilidad de establecer sistemas locales de producción de insumos biotecnológicos clave, como la enzima Taq ADN polimerasa recombinante (r_TaqDNA-pol), mediante el uso de equipamiento accesible y protocolos de bajo costo. Además de establecer un procedimiento técnico confiable, los resultados constituyen una contribución concreta frente a la problemática de la dependencia estructural de insumos biotecnológicos importados.

El enfoque desarrollado evidencia que la autosuficiencia tecnológica en biotecnología es factible, a través de metodologías adaptables a contextos con recursos limitados. La capacidad de sintetizar reactivos críticos a nivel local representa una ventaja estratégica, tanto frente a posibles interrupciones en las cadenas de suministro globales —como las experimentadas durante la pandemia por COVID-19— como para asegurar la continuidad operativa de laboratorios que realizan actividades de diagnóstico e investigación en forma rutinaria.

Asimismo, la plataforma diseñada para la producción de r_TaqDNA-pol ofrece un modelo escalable que puede ser adaptado para la expresión y purificación de otras proteínas de uso frecuente en biología molecular, sentando así las bases para el establecimiento de líneas locales de producción de insumos biotecnológicos esenciales.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

Fuentes de financiación

Esta investigación fue financiada por la Universidad El Bosque (PCI-2024-001).

Referencias

- Artecona, R., & Jorge, M. F. (2021). *United States supply chains resiliency: The key role Latin America and the Caribbean could play*. CEPAL. <https://repositorio.cepal.org/bitstreams/3202daef-c586-4652-add3-c33cc55af4f2/download>
- Artecona, R., & Jorge, M. F. (2021). *United States supply chains resiliency: The key role Latin America and the Caribbean could play*. CEPAL. <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/47121>
- Barnes, W. M., Zhang, Z., & Kermekchiev, M. B. (2021). A Single Amino Acid Change to Taq DNA Polymerase Enables Faster PCR, Reverse Transcription and Strand-Displacement. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 553474. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.553474>

- Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. In J. M. S. Bartlett & D. Stirling (Eds.), PCR protocols (Vol. 226, pp. 3–6). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3>
- Berlec, A., & Strukelj, B. (2013). Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(3–4), 257–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0>
- Berlec, A., & Strukelj, B. (2013). Current state and recent advances in biopharmaceutical production in *Escherichia coli*, yeasts and mammalian cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 40(3–4), 257–274. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1235-0>
- Castañeda, N. Y., Chaparro-Olaza, J., & Castellanos, J. E. (2007). Producción y caracterización de un anticuerpo políclonal dirigido contra la fosfoproteína del virus de la rabia [Production and characterization of a polyclonal antibody against rabies virus phosphoprotein]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 27(2), 257–267.
- Corredor-Rozo, Z.-L., Marquez-Ortiz, R., Velandia-Romero, M. L., Abril, D., Madroñero, J., Prada, L. F., Vanegas-Gomez, N., García, B., Echeverz, M., Calderón-Peláez, M.-A., Chaparro-Olaza, J., Morales, L., Nieto-Clavijo, C., & Escobar-Perez, J. (2025). Deciphering the function of Com_YlbF domain-containing proteins in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 207(9), e0006125. <https://doi.org/10.1128/jb.00061-25>
- Gaberc-Porekar, V., & Menart, V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 49(1–3), 335–360. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00200-7](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00200-7)
- Guerra, Á. P., Calvo, E. P., Wasserman, M., & Chaparro-Olaza, J. (2016). Production of recombinant proteins from *Plasmodium falciparum* in *Escherichia coli*. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 36(0), 97–108. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i3.3011>
- Guzman C, Mattar S, Alvis-Guzman N, Hoz F, Arias E. Biotechnological sovereignty is not a mere nationalist concept, it is a necessity for Colombia and Latin America. *Cad Saude Publica*. 2024 Sep 20;40(9):e00202323. doi: 10.1590/0102-311XEN202323. PMID: 39319948; PMCID: PMC11415050.
- Guzmán, C., Mattar, S., & Alvis-Guzmán, N. (2024). *Biotechnological sovereignty is not a mere nationalist concept, it is a necessity for Colombia and Latin America. Cadernos de Saúde Pública*, 40(9), e00202323. <https://www.scielosp.org/article/csp/2024.v40n9/e00202323/>
- Hernández, P. C., Wasserman, M., & Chaparro-Olaza, J. (2018). In vitro interaction between *Plasmodium falciparum* myosin B (PfMyoB) and myosin A tail interacting protein (MTIP). *Parasitology research*, 117(11), 3437–3446. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6039-8>

- Hooffar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., & Fach, P. (2004). Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6), 1863–1868. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.1863-1868.2004>
- Hyman, R. W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Giudice, L. C., & Davis, R. W. (2005). Microbes on the human vaginal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), 7952–7957. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503236102>.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.). (1990). *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press.
- Ivanov, D. (2020). Predicting the impacts of epidemic outbreaks on global supply chains: A simulation-based analysis on the coronavirus outbreak (COVID-19/SARS-CoV-2) case. *International Journal of Production Economics*, 227, 107663. <https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2020.107663>
- Kermekchiev, M. B., Kirilova, L. I., Vail, E. E., & Barnes, W. M. (2009). Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic acids research*, 37(5), e40. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1055>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., ... & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Lawyer, F. C., Stoffel, S., Saiki, R. K., Myambo, K., Drummond, R., & Gelfand, D. H. (1989). High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods and Applications*, 2(4), 275–287. <https://doi.org/10.1101/gr.2.4.275>
- Lozano Terol, G., Gallego-Jara, J., Sola Martínez, R. A., Martínez Vivancos, A., Cánovas Díaz, M., & de Diego Puente, T. (2021). Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in Microbiology*, 12, 682001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.682001>
- Mendoza-Rojas G, Sarabia-Vega V, Sanchez-Castro A, Tello L, Cabrera-Sosa L, Nakamoto JA, Peñaranda K, Adaui V, Alcántara R, Milón P. A low-cost and open-source protocol to produce key enzymes for molecular detection assays. *STAR Protoc.* 2021 Nov 1;2(4):100899. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100899. PMID: 34766029; PMCID: PMC8571801.
- Morales, L., Hernández, P., & Chaparro-Olaya, J. (2018). Systematic Comparison of Strategies to Achieve Soluble Expression of *Plasmodium falciparum* Recombinant Proteins in *E. coli*. *Molecular biotechnology*, 60(12), 887–900. <https://doi.org/10.1007/s12033-018-0125-0>

- Morales, L., Velandia, M. L., Calderon, M. A., Castellanos, J. E., & Chaparro-Olava, J. (2017). Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud, 37(1), 131–140. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i1.3249>
- Mullis, K., & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335–350. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55023-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55023-6)
- Noma, T., Sode, K., & Ikebukuro, K. (2006). Characterization and application of aptamers for Taq DNA polymerase selected using an evolution-mimicking algorithm. *Biotechnology letters*, 28(23), 1939–1944. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9178-4>
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5(7), e177. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050177>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Sahakijpijarn, S., Moon, C., Koleng, J. J., & Williams, R. O. (2019). Formulation composition and process affect counterion for CSP7 peptide. *Pharmaceutics*, 11(10), 498. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100498>
- Sahakijpijarn, S., Moon, C., Koleng, J. J., & Williams, R. O. (2019). Formulation composition and process affect counterion for CSP7 peptide. *Pharmaceutics*, 11(10), 498. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100498>
- Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Santín, M., Gómez-Muñoz, M. T., Solano-Aguilar, G., & Fayer, R. (2011). Development of a new PCR protocol to detect and subtype *Blastocystis* spp. from humans and animals. *Parasitology research*, 109(1), 205–212. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2244-9>
- Schein, C. H. (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology*, 7(11), 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/nbt1189-1141>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Scicluna, S. M., Tawari, B., & Clark, C. G. (2006). DNA barcoding of *blastocystis*. *Protist*, 157(1), 77–85. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2005.12.001>
- Śpibida, M., Krawczyk, B., Olszewski, M., & Kur, J. (2017). Modified DNA polymerases for PCR troubleshooting. *Journal of applied genetics*, 58(1), 133–142. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0371-4>

- Stensvold, C. R., Ahmed, U. N., Andersen, L. O., & Nielsen, H. V. (2012). Development and evaluation of a genus-specific, probe-based, internal-process-controlled real-time PCR assay for sensitive and specific detection of *Blastocystis* spp. *Journal of clinical microbiology*, 50(6), 1847–1851. <https://doi.org/10.1128/JCM.00007-12>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Teng, X. C., Nag, S. Y., Citartan, M., & Tang, T. H. (2023). Simple approach for expression and rapid purification of Taq DNA polymerase in three *Escherichia coli* strains. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. <https://www.researchgate.net/publication/368659214>
- Teng, X. C., Nag, S. Y., Citartan, M., & Tang, T. H. (2023). Simple approach for expression and rapid purification of Taq DNA polymerase in three *Escherichia coli* strains. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.35118/apjmbb.2023.004>
- UniProt Consortium. (2024). UniProt: the Universal Protein knowledgebase in 2024. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D1–D7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1010>
- Vásárhelyi, B., Kappelmayer, J., Miseta, A., & Nagy Jr, B. (2023). *61st National Congress of the Hungarian Society of Laboratory Medicine. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. <https://doi.org/10.1515/cclm-2023-0485>
- Vieille, C., & Zeikus, J. G. (2001). Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.65.1.1-43.2001>
- Westin, M. A., Alexson, S. E., & Hunt, M. C. (2004). Molecular cloning and characterization of two mouse peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α)-regulated peroxisomal acyl-CoA thioesterases. *The Journal of biological chemistry*, 279(21), 21841–21848. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313863200>.
- Wingfield, P. T. (2017). Protein precipitation using ammonium sulfate. *Current Protocols in Protein Science*, 89, 4.1.1–4.1.9. <https://doi.org/10.1002/cpps.30>
- Yamagami, T., Ishino, S., Kawarabayasi, Y., & Ishino, Y. (2014). Mutant Taq DNA polymerases with improved elongation ability as a useful reagent for genetic engineering. *Frontiers in microbiology*, 5, 461. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00461>
- Zhang, F., Icyuz, M., Bartke, A., & Sun, L. Y. (2020). The effects of early-life growth hormone intervention on tissue specific histone H3 modifications in long-lived Ames dwarf mice. *Aging*, 13(2), 1633–1648. <https://doi.org/10.18632/aging.202451>
- Zhang, L., Guo, W., & Lv, C. (2024). Modern technologies and solutions to enhance surveillance and response systems for emerging zoonotic diseases. *Science in One Health*, 3, 100061. <https://doi.org/10.1016/j.soh.2023.100061>

Contribución

Luna Torres-Hichster: metodología, análisis formal, visualización, redacción.

Carlos Nieto-Clavijo: conceptualización, metodología, análisis formal, visualización, redacción.

Liliana Morales: conceptualización, análisis formal, redacción.

Jacqueline Chaparro-Olaya: conceptualización, análisis formal, redacción, revisión, supervisión, administración del proyecto, adquisición de financiación.

Todos los autores participaron en la elaboración del manuscrito, lo leyeron y aprobaron.

Declaración uso inteligencia artificial

En la elaboración de este artículo, los autores no utilizaron ninguna herramienta o servicio de inteligencia artificial para elaborar el manuscrito.