



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

“CLONACIÓN DEL GEN NP DEL VIRUS DE LA
INFLUENZA A H1N1PDM 09 MEDIANTE EL SISTEMA
BAC-TO-BAC HBM TOPO®”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIATURA EN QUÍMICA
FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA:

PATRICIA JERÓNIMO PORRAS

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ESTEBAN MUÑOZ MEDINA

ASESOR INTERNO:

QFB FRANCISCO JAVIER PARADA GARCÍA

MÉXICO, D.F. 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a mi director de tesis, Esteban Muñoz Medina, por todo tú apoyo y paciencia durante la realización de esta tesis. Por todos los conocimientos que me transmitiste y la amabilidad que siempre me mostraste.

Gracias profesor Francisco Parada García por su apoyo y disponibilidad en la revisión de este trabajo. Por ayudarme a hacer más fácil este proceso.

Gracias a todos los miembros del Laboratorio Central de Epidemiología, porque de todos adquirí nuevos conocimientos y agradable compañía durante la realización de mi tesis.

Gracias a las profesoras asignadas como mis sinodales por su tiempo y asesoría en las correcciones del presente trabajo.

DEDICATORIA

No tengas miedo, porque estoy contigo. No mires por todos lados, porque soy tu Dios. Yo ciertamente te fortificaré. Yo cierta y verdaderamente te ayudaré. Sí, yo verdaderamente te mantendré firmemente asido con mi diestra de justicia (Is. 41:10). Gracias Jehová por tu continúa ayuda, por ser mi fortaleza y guía, por no dejarme tambalear y mantenerme asida a ti.

A mi Papá por estar siempre presente en mi vida, por toda tu ayuda y tus consejos tan valiosos que me han permitido llegar hasta este momento.

A mi Mamá por todo tu apoyo y consejos que me brindaste a lo largo de este proceso, gracias por no permitirme tirar la toalla y animarme a siempre seguir adelante.

A mi hermano por tu apoyo y comprensión, por brindarme tú ayuda siempre que la requerí.

A mi gran amor Erickcen por alentarme a continuar cuando parecía que me iba a rendir. Por ser mi amigo, mi cómplice, mi confidente, mi compañero, mi consejero y ahora mi esposo... GRACIAS POR TODO TU AMOR Y APOYO.

A mi amiga Ivonne, porque a pesar del tiempo y la distancia siempre me hiciste sentir tu apoyo y ayuda, gracias por alentarme a terminar este proyecto y gracias por brindarme tu amistad incondicional.

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Marco teórico.....	5
3.1 Antecedentes	5
3.2 El virus de la influenza A H1N1.....	6
3.3 Cambios antigénicos del virus de la influenza	9
3.4 Nucleoproteína.....	12
3.5 Vacuna profiláctica para el virus de influenza	13
3.6 Clonación	15
3.7 Clonación de DNA en vectores plásmidos	15
3.8 Vector TOPO.....	18
3.9 Sistema Bac-to-Bac	20
3.10 Retrotranscripción	21
3.11 Transposición y transposones.....	23
3.12 α -complementación y operón de la lactosa.....	26
4. Planteamiento del problema.....	29
5. Hipótesis.....	29
6. Objetivos	30
6.1 Objetivo general.....	30
6.2 Objetivos específicos	30
7. Materiales y métodos	30
7.1 Tipo de estudio.....	30
7.2 Materiales	31
7.3 Métodos	31

7.3.1 Análisis <i>in silico</i>	31
7.3.2 Extracción de RNA.....	32
7.3.2.1 Extracción con el estuche de Qiagen	32
7.3.2.2 Extracción automatizada (ROCHE)	33
7.3.3 Diseño de primers.....	34
7.3.4 RT-PCR y estandarización de la Tm.....	35
7.3.5 Comprobación de los productos de PCR.....	36
7.3.6 Generación de productos de extremos romos por PCR	37
7.3.7 Purificación de los fragmentos de interés amplificados.	37
7.3.8 Generación de plásmido recombinante pFastBac/HBMTopo/NPr	38
7.3.9 Clonación en células de <i>E. coli</i>	38
7.3.10 Análisis de clonas positivas	39
7.3.10.1 PCR.....	39
7.3.10.2 Análisis de restricción.....	40
7.3.10.3 Secuenciación	44
7.3.11 Purificación del plásmido recombinante pFastBac/HBMTopo/NPr	45
7.3.12 Generación del DNA bacmídico recombinante	45
7.3.13 Purificación del DNA bacmídico recombinante	46
7.3.14 Análisis del DNA bacmídico recombinante	47
7.3.14.1 PCR.....	47
7.3.14.2 Secuenciación	49
8. Resultados	50
9. Discusión.....	65
10. Conclusiones.....	67
11. Perspectivas.....	68
12. Referencias	69

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de virus respiratorios por semana epidemiológica 2013-2014..	6
Figura 2. Estructura del virus de la influenza A H1N1	7
Figura 3. Deriva antigénica.	10
Figura 4. Cambio antigénico.	11
Figura 5. Estructura de la proteína NP	12
Figura 6. Vector de clonación de DNA de doble cadena	16
Figura 7. Vector de expresión de DNA de doble cadena	17
Figura 8. Mapa del vector de expresión pFastBac HBM-TOPO	18
Figura 9. Acción de la topoisomerasa en la ligación del vector pFastBac HBM-TOPO	20
Figura 10. Célula competente de E.coli DH10Bac™	21
Figura 11. Retrotranscripción	22
Figura 12. Transpososoma	24
Figura 13. Mecanismo de corte de la transposasa	25
Figura 14. Represión del operón de la lactosa.	27
Figura 15. Activación del operón de la lactosa.	28
Figura 16. Secuencia de corte de las tres enzimas de restricción.	40

Figura 17. Análisis de restricción virtual con la enzima BamHI obtenido mediante el programa SerialCloner 2.1.	41
Figura 18. Mapa del vector pFastBac/HBM-TOPO/NPr que muestra análisis de restricción con la enzima BamHI.....	41
Figura 19. Análisis de restricción virtual con la enzima HindIII obtenido mediante el programa SerialCloner 2.1.	42
Figura 20. Mapa del vector pFastBac/HBM-TOPO/NPr que muestra análisis de restricción con la enzima HindIII.....	42
Figura 21. Análisis de restricción virtual con la enzima NdeI obtenido mediante el programa SerialCloner 2.1.	43
Figura 22. Mapa del vector pFastBac/HBM-TOPO/NPr que muestra análisis de restricción con la enzima NdeI.	43
Figura 23. Transposición y sitio de unión de primers en el DNA bacmídico.....	48
Figura 24. Gráfico comparativo de los epítomos encontrados experimentalmente y los determinados mediante software bioinformáticos.....	51
Figura 25. Extracción manual y por Robot.	52
Figura 26. Estandarización de la Tm de los primers	53
Figura 27. Comprobación de la presencia de la banda NP	54
Figura 28. Obtención del fragmento NP para purificación.....	55
Figura 29. Purificación del fragmento NP	56
Figura 30. PCR de colonia	57

Figura 31. Plásmidos purificados y presencia del fragmento NP.	58
Figura 32. Análisis de restricción colonia 4	59
Figura 33. Análisis de restricción colonia 1	60
Figura 34. Electroferograma de secuenciación del gen NP.	61
Figura 35. Esquema de la cobertura obtenida por la secuenciación.	61
Figura 36. Alineamiento múltiple entre la secuencia del vector pFAST con el inserto NP y la secuencia obtenida con el primer sentido Polhyedrin.	61
Figura 37. Alineamiento múltiple entre la secuencia del vector pFAST con el inserto NP y la secuencia reversa complementaria obtenida con el primer reverso SV 40.	62
Figura 38. Colonias obtenidas en la subclonación	62
Figura 39. Análisis por PCR del DNA bacmídico.....	63
Figura 40. Electroferograma de secuenciación del gen NP en el DNA bacmídico.	64
Figura 41. Esquema de la cobertura obtenida por secuenciación.....	64
Figura 42. Alineamiento múltiple entre la secuencia del DNA bacmídico con el inserto NP y la secuencia obtenida con el primer pUC/M13 forward.....	64
Figura 43. Alineamiento múltiple entre la secuencia del DNA bacmídico con el inserto NP y la secuencia reversa complementaria obtenida con el primer reverso pUC/M13 reverse.	64

Índice de cuadros

Cuadro 1. Proteínas del virus influenza.....	8
Cuadro 2. Subtipos del virus influenza tipo A y su relación con los seres humanos, los mamíferos y las aves.	9
Cuadro 3. Secuencia de primers utilizados para amplificar.....	35
Cuadro 4. Distribución de epítomos de influenza por proteína.....	50

Lista de abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>del inglés Deoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfato
dsRNA	Double-stranded RNA
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
HA	Hemaglutinina
HBM	Melitina de la abeja (<i>del inglés Honeybee Melittin</i>)
IEDB	Immune Epitope Database
InDRE	Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani, medio de cultivo
NA	Neuraminidasa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NP	Nucleoproteína
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>del inglés Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>del inglés Ribonucleic Acid</i>)
RNAsas	Ribonucleasa
RNP	Ribonucleoproteína
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (<i>del inglés Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
UV	Ultravioleta

1. Resumen

Introducción: Actualmente el virus de la influenza A H1N1 tiene un impacto significativo en la salud, llegando a provocar de 250 a 500 mil muertes al año a nivel mundial. Además, a lo largo de la historia se han presentado 4 pandemias ocasionadas por el virus de la influenza tipo A, que causaron millones de muertes en todo el mundo. Lo anterior se debe a los dos mecanismos de variación antigénica que presenta el virus de influenza, antigenic shift y antigenic drift, los cuales conducen a la aparición de nuevas cepas que evaden los mecanismos de defensa. De esta manera aunque la vacuna es el mejor método para el control de la influenza, las constantes mutaciones del virus generan la necesidad de producir nuevas vacunas cada temporada. Otro inconveniente es el proceso de producción, el cual es laborioso ya que requiere de huevos embrionados; y lento, ya que en respuesta a la aparición de una nueva cepa se requiere de varios meses para que esté disponible. Por ello existe la necesidad de buscar otras alternativas tanto en materia de vacunas como de producción. Una opción para el desarrollo de vacunas es la inmunidad celular inducida por epítopos virales altamente conservados que se encuentran en varias proteínas del virus influenza, como es el caso de la Nucleoproteína. Por ello, en el presente trabajo se utilizó el proceso de clonación para obtener la materia prima que pudiera ser utilizada en la producción de nuevas vacunas que ofrezcan una respuesta inmune más robusta.

Objetivo: Clonar el producto generado por RT-PCR del gen NP del virus de la influenza A H1N1pdm 09 utilizando el sistema Bac-to-Bac HBM TOPO.

Materiales y métodos: Se amplificó la secuencia completa del gen NP del virus de la influenza A H1N1pdm09 por RT-PCR utilizando primers específicos, el producto generado se resolvió y purificó en gel de agarosa, posteriormente se ligó en el vector pFastBac™/HBM-TOPO®, y se transformaron células de mantenimiento One Shot Match-1 T1, el análisis de las clonas positivas se realizó por PCR, análisis de restricción y secuenciación. Finalmente se llevó a cabo una sub-

clonación en células de expresión *E. coli* DH10, las cuales permitieron obtener DNA bacmídico mediante transposición con el vector pFastBac/HBMTopo/NPr, el análisis de las clonas positivas se llevó a cabo por PCR y secuenciación.

Resultados: Los análisis realizados al plásmido recombinante pFastBac/HBM-Topo/NPr indican la presencia del gen completo de la Nucleoproteína y en sentido correcto, por lo que se pudo utilizar para llevar a cabo una subclonación para generar DNA bacmídico.

Conclusiones: El sistema de expresión Bac-to-Bac HBM TOPO generó clonas que contienen el gen completo de la Nucleoproteína, aptas para producir la materia prima en nuevas iniciativas para proteger contra la infección por el virus de influenza A H1N1.

2. Introducción

Actualmente el virus de la influenza A H1N1 tiene un impacto significativo en la salud. Provoca epidemias estacionales recurrentes por enfermedades respiratorias agudas, las cuales afectan de 3 a 5 millones de personas aproximadamente y causa alrededor de 250 a 500 mil muertes en todo el mundo¹.

Además de las epidemias estacionales, se han presentado 4 pandemias provocadas por los subtipos A H1N1, H2N2 y H3N2 que causaron millones de muertes en todo el mundo². La más reciente se presentó en el año 2009 por el virus de influenza A H1N1, teniendo gran impacto a nivel global, a solo dos meses de su identificación 76 países presentaban casos de influenza pandémica³ y para finales del 2009 la OMS reportó casi 13 mil muertes en todo el planeta⁴.

La capacidad del virus de la influenza para provocar epidemias estacionales y pandemias se debe a sus dos mecanismos de variación antigénica. Estos mecanismos provocan cambios en su genoma, que van desde los que se producen por re-arreglos gracias a su naturaleza segmentada (antigenic shift) hasta los y las ocasionados al azar por errores de la RNA polimerasa (antigenic drift). De las 10 proteínas que conforman al virus, dos de ellas, la hemaglutinina y la neuraminidasa, son las más susceptibles a estos cambios. El gen de la HA presenta mutaciones genéticas frecuentes que conducen a la aparición de nuevas cepas virulentas³. Por esta razón, la vacuna contra la gripe estacional tiene que ser reformulada cada año con base a la predicción realizada con las estadísticas de circulación de la estación anterior⁵.

La vacunación es el mejor método para el control de la influenza, pero los cambios antigénicos que presenta el virus debilitan esta estrategia⁶ ya que genera la necesidad de producir nuevas vacunas cada temporada con la incertidumbre en la elección de las cepas correctas. Además, las vacunas presentan otros inconvenientes como el proceso de producción lento ya que requiere huevos

embrionados, así como la incapacidad para prevenir una pandemia de gripe o la aparición de una nueva cepa⁵.

Por ello aún existe la necesidad de buscar otras alternativas que contrarresten de manera más eficiente los efectos ocasionados por el virus de la influenza. Una opción es una vacuna universal capaz de conferir amplia protección cruzada contra múltiples subtipos del virus de influenza. Una de las muchas direcciones que se están tomando para el desarrollo de vacunas universal es la inmunidad celular inducida por epítomos virales altamente conservados que se encuentran en varias proteínas del virus influenza, incluyendo la nucleoproteína viral (NP)⁵.

Por lo anterior, en el presente trabajo se busca obtener la materia prima que pudiera ser utilizada en la producción de nuevas vacunas que ofrezcan una respuesta inmune más robusta, mediante la clonación del gen NP, una proteína que presenta poca variabilidad ante los cambios antigénicos. Para llevar a cabo la clonación del gen NP se utilizó el estuche Bac-to-Bac TOPO Cloning. Una vez determinado el éxito de la clonación se procedió a realizar una subclonación en células de *E. coli* DH10 para producir DNA bacmídico, el cual es capaz de infectar células de insecto permitiendo así la obtención de la proteína codificada por el gen clonado.

3. Marco teórico

3.1 Antecedentes

La influenza es una enfermedad viral aguda que afecta las vías respiratorias y se presenta en humanos, aves y otros mamíferos causando epidemias anuales. Según datos de la OMS anualmente se presentan unos 3 a 5 millones de casos de enfermedad grave, que originan unas 250 000 a 500 000 muertes⁷.

El virus de la influenza presenta modificaciones en su composición genética y se estima que aproximadamente cada 35 a 40 años estos cambios le confieren la capacidad de ocasionar pandemias de gran magnitud⁸. Históricamente, desde 1900 han existido 4 pandemias ocasionadas por el virus de la influenza tipo A.

En 1918 el virus A H1N1, conocido como “la gripe española” causó la muerte de 20 a 40 millones de personas e infectó al menos 20% de la población global, extendiéndose lentamente por vía marítima. En Singapur en 1957 un virus de influenza aviar H2N2, causó de 1 a 3 millones de defunciones. En Hong Kong en 1968 surgió la cepa H3N2, se estima que tomó casi un año para que se propagara desde Hong Kong hasta los últimos países infectados en América del Sur ocasionando 4 millones de muertes después de su completa diseminación⁹. Y por último, la pandemia de este siglo que se extendió rápidamente por el transporte internacional aéreo de pasajeros, infectó a 74 países de todos los continentes¹⁰ ocasionó casi 13 mil muertes en el mundo de las cuales el 50% fueron en el continente americano. En México se reportaron 70 mil casos confirmados y aproximadamente mil muertes⁴.

En los últimos años el virus de la influenza se ha mantenido bajo control en la mayoría de los países, sin embargo, existen algunos en los que aún se encuentra latente¹¹ (Fig.1). A inicios del 2014 el virus predominante en México fue el de influenza A H1N1 pdm09¹²; de acuerdo con el último reporte de la Organización

Panamericana de la Salud, a pesar de que la actividad de este virus ha ido disminuyendo considerablemente, no ocurre así con su mortalidad ya que de 729 fallecidos asociados con influenza el 90.4% se debió al virus A H1N1 pdm09¹³. Para finales de junio del 2014 el virus influenza tipo B es el que ha predominado en México seguido del virus influenza A H3N2¹³.

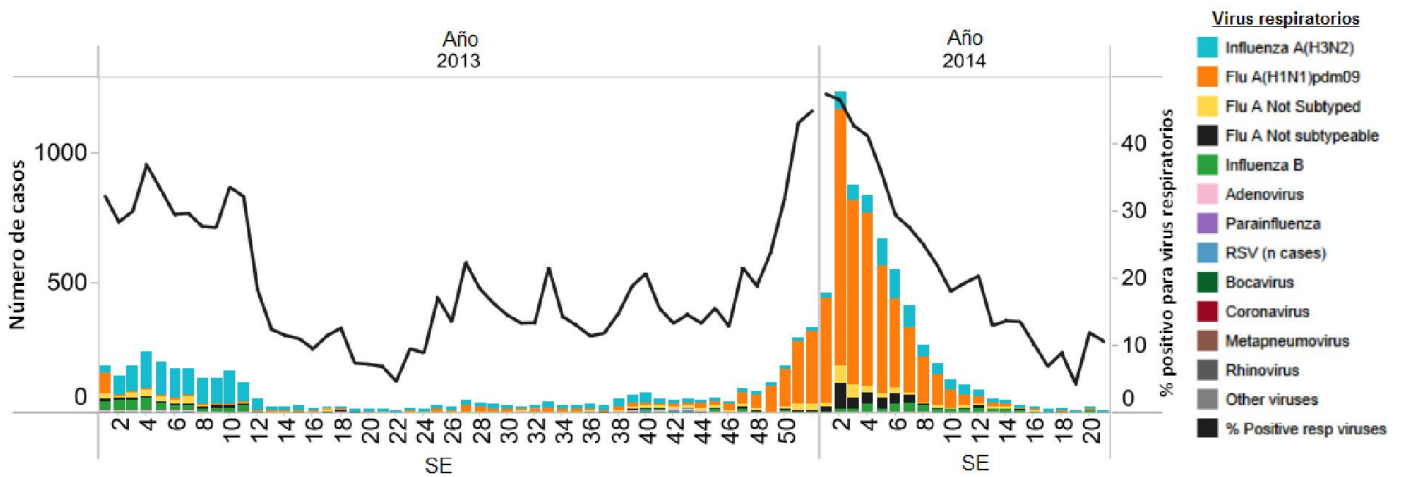


Figura 1. Distribución de virus respiratorios por semana epidemiológica 2013-2014. (Tomado de Actualización Regional SE 21, 2014. Organización Panamericana de la Salud http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2013_08_02_update_GIP_surveillance/en/index.html).

3.2 El virus de la influenza A H1N1

El agente causal de la influenza es un virus RNA envuelto, perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae*. Son virus pleomórficos, ya que se pueden encontrar como partículas esféricas de 80 a 120 nm o filamentosas de mayor tamaño. Su envoltura está formada por la membrana de la célula huésped¹⁴. En su interior se encuentra una nucleocápside, formada por la proteína M1, que contiene el genoma viral. Estos virus están constituidos por ocho segmentos de RNA de cadena sencilla de polaridad negativa, cada uno de ellos codifica para un

polipéptido, con excepción de los segmentos denominados M y NS que codifican para 2 polipéptidos, dando un total de 10 proteínas virales (Cuadro 1), siete de las cuales son proteínas internas: la nucleoproteína (NP), tres polimerasas (PA, PB1 y PB2), dos proteínas de matriz (M1) y dos proteínas no estructural (NS1 y NS2); así como 3 glicoproteínas externas: M2, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA)¹⁵ (Fig. 2). Estas últimas 2 se utilizan para clasificar en subtipos al virus de la influenza tipo A y son sus principales determinantes antigénicos. En la naturaleza existen 18 subtipos diferentes de HA (H1 a H18) y 11 de NA (N1 a N11)¹⁶.

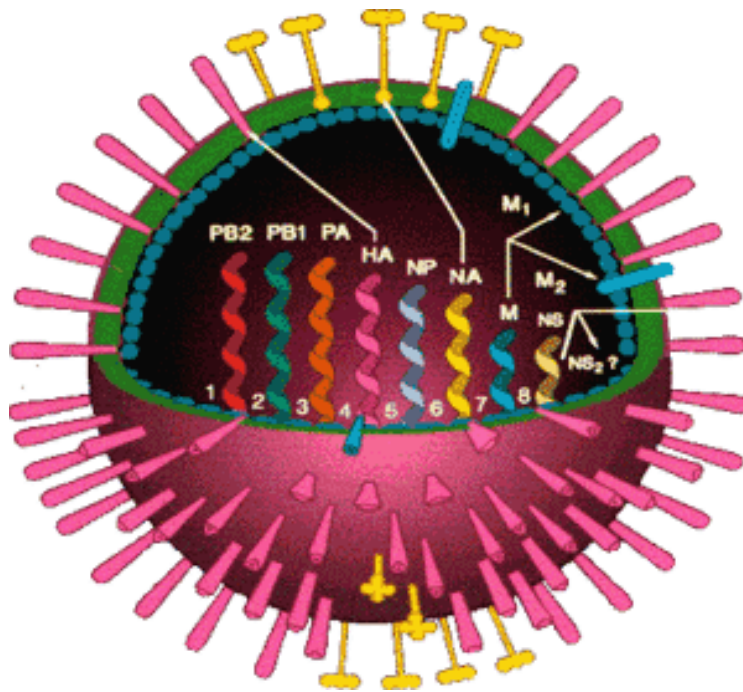


Figura 2. Estructura del virus de la influenza A H1N1 con sus ocho genes segmentados y dos glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) (Tomada de <http://www.thedoctorwillseeyounow.com/content/infections/art2103.html>).

Cuadro 1. Proteínas del virus influenza.

Segmento	Proteína	Función
PB1	PB1	Componentes de la RNA polimerasa, participa en la transcripción (elongación)
PB2	PB2	Componentes de la RNA polimerasa, participa en la transcripción (unión a cap)
PA	PA	Componentes de la RNA polimerasa, participa en la transcripción (actividad proteasa)
HA	HA	Se enlaza a glicoproteínas y glicolípidos de la membrana celular que contienen residuos de ácido siálico, usados como receptores para la infección viral
NP	NP	Se asocia al RNA genómico; parte del complejo transcriptasa; transporte nuclear/citoplasmático del RNA viral.
NA	NA	Degrada el ácido siálico de las glicoproteínas y glicolípidos usados como receptores para la infección viral.
M	M1	Participa en la integración de la nucleocápside.
	M2	Proteína integral de la membrana, participa en la acidificación del endosoma y la liberación de las ribonucleoproteínas.
NS	NS1	Proteína no estructural; efecto en el transporte de RNA celular y en la traducción.
	NS2	Proteína no estructural; función desconocida.

Los virus influenza se clasifican en tres tipos: A, B y C. La diferencia principal entre los géneros radica en las variaciones antigénicas en la proteína de la matriz y de la nucleoproteína que se utilizan para la caracterización del virus y que son específicas para cada género¹⁷. Los virus influenza tipo B y C infectan exclusivamente a humanos. Existe sólo un subtipo de virus influenza tipo B por lo que tienen un bajo potencial de causar pandemias, aunque si provocan enfermedades respiratorias serias. Los virus de influenza tipo C causan enfermedades respiratorias moderadas y han sido poco estudiados¹⁵. El virus influenza tipo A puede infectar a humanos y animales, como ballenas, cerdos, caballos y aves (Cuadro 2). Los virus de las diferentes especies pueden

combinarse entre ellos, dando como resultado una variedad antigénica diferente, con la consecuente aparición de un brote pandémico¹⁴.

Cuadro 2. Subtipos del virus influenza tipo A y su relación con los seres humanos, los mamíferos y las aves.

Gripe Humana	Gripe Porcina	Gripe equina	Gripe aviar
H3N2	H1N1	H7N7	H5N1
H2N2*	H3N2**	H3N8	H9N2
H1N1			H7N7
H1N2			
H7N7			
H5N1			
*1957-1958			
**En 1998 los H3N2 humanos fueron introducidos en los cerdos			

3.3 Cambios antigénicos del virus de la influenza

Existen dos mecanismos por los cuales el virus de la influenza genera variabilidad antigénica, estos mecanismos se conocen como deriva antigénica y cambio antigénico (antigenic drift y antigenic shift). El primero hace referencia a mutaciones introducidas en el genoma viral por los errores frecuentes de copiado de la RNA polimerasa viral, los cuales al cabo de un año son suficientes para que el virus escape al sistema inmune¹⁸ (Fig. 3). Este tipo de mutación es la responsable de las cepas estacionales y ocurre todo el tiempo.

Por otro lado el cambio antigénico involucra rearrreglos de los segmentos de RNA entre diferentes cepas, en células infectadas por múltiples virus resultando en la generación de variantes de virus conocidos como virus rearrreglantes. Estos rearrreglos son favorecidos por la estructura segmentada del genoma viral. Este tipo de cambio es menos frecuente y puede ocurrir entre virus de influenza provenientes de diferentes especies animales (incluyendo virus humanos, aviares y porcinos)¹⁹ (Fig. 4).

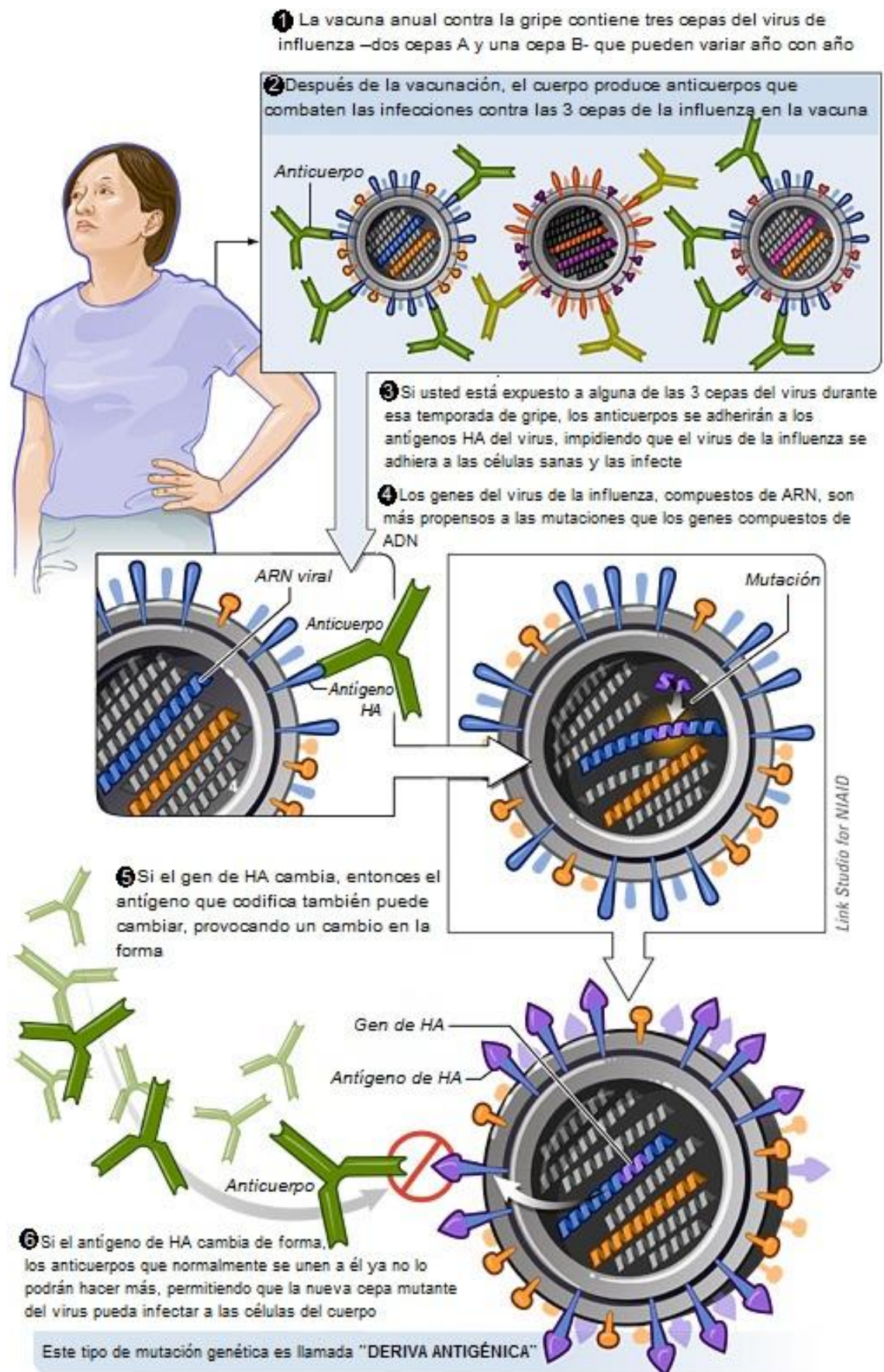


Figura 3. Deriva antigénica (Tomada del NIAID)

<http://www.niaid.nih.gov/topics/Flu/Research/basic/Pages/AntigenicDriftIllustration.aspx>.

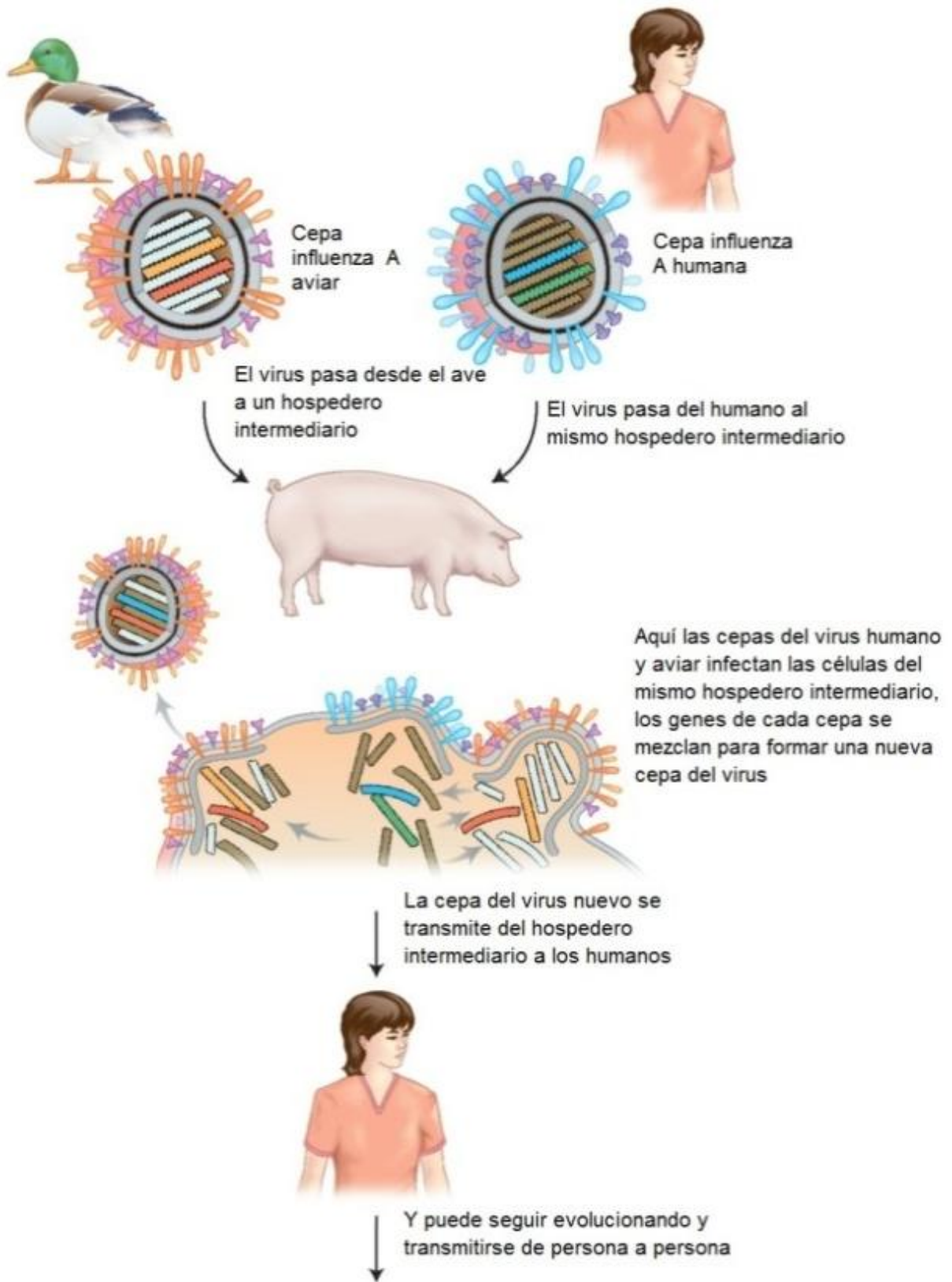


Figura 4. Cambio antigénico (Tomado de http://www.evolution-textbook.org/content/free/figures/12_EVOW_Art/25_EVOW_CH12.jpg).

3.4 Nucleoproteína

La región 5 del genoma del virus RNA de la influenza codifica para una nucleoproteína constituida de 498 aminoácidos de longitud, rica en arginina, glicina y residuos de serina. La NP se compone de un dominio de cabeza (color azul), un dominio de cuerpo (color verde), y un bucle de cola flexible (color amarillo)¹ (Fig. 5).

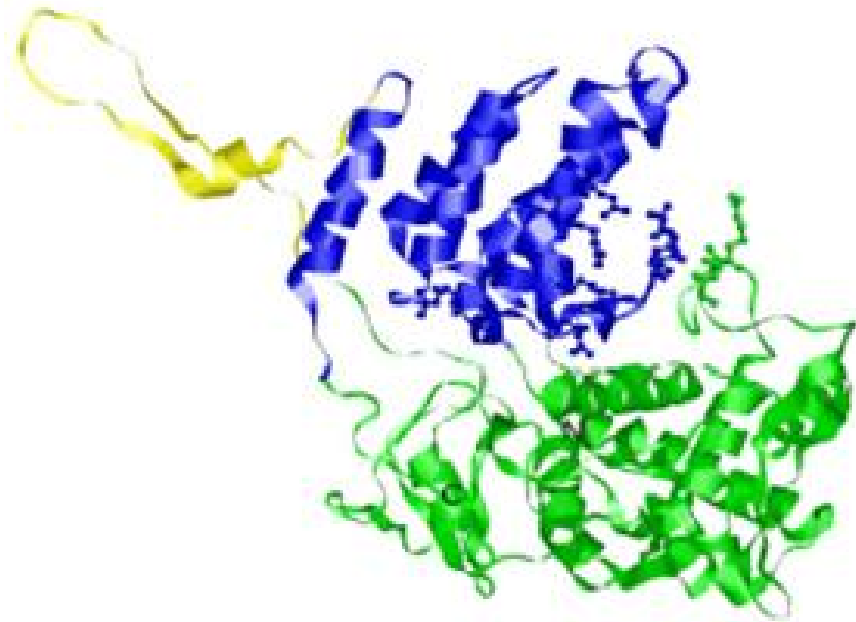


Figura 5. Estructura de la proteína NP. (Tomado de Large-scale analysis of Influenza A virus nucleoprotein sequence conservation reveals potential drug-target sites¹).

La función principal de la NP es formar la cápside y contener el genoma del virus para los propósitos de transcripción, replicación y empaquetamiento del RNA²⁰. Dichos procesos los lleva a cabo mediante los complejos que forma llamados Ribonucleoproteína (RNP), que consisten en RNA, NP y RNA polimerasa. La característica más importante de estos complejos es la flexibilidad que presenta, ya que los brazos que se utilizan para oligomerizar las nucleoproteínas en los RNAs del genoma son muy flexibles, permitiendo que los complejos RNPs puedan asumir geometrías prácticamente ilimitadas, esto no solo le permite al virus llevar

a cabo la replicación, sino que también la posibilidad de seleccionar una copia de cada segmento para el empaquetado en partículas virales²¹.

La nucleoproteína es una proteína multifuncional, no solo encapsida el RNA viral para protegerlo de la degradación y forma homo-oligómeros para mantener la estructura del complejo RNP, también se piensa que es la pieza clave para la interacción entre virus y célula huésped²². Además evita la formación de dsRNA entre los RNA virales de polaridad opuesta²¹.

NP es la proteína más abundante expresada durante el curso de la infección¹, además esta proteína es altamente conservada entre todas las cepas del virus de influenza y se ha explorado como un antígeno para el desarrollo de una vacuna universal²³.

En un estudio de 4430 secuencias de nucleoproteína se reveló una alta conservación de las secuencias y se estableció que el sitio de unión del bucle de la cola o la región cerca de la unión de RNA es un blanco factible para dirigir a los antivirales, ya que los sitios de unión se conservan entre los diferentes subtipos y hospederos. Además, antivirales dirigidos a estos sitios es probable que sean universalmente eficaces contra los virus de influenza aviar, porcina o de origen humano¹.

3.5 Vacuna profiláctica para el virus de influenza

Hoy por hoy existen diversas estrategias para contrarrestar la infección del virus de la influenza, la más efectiva es la vacunación profiláctica. La mayoría de las vacunas que existen son trivalentes, es decir, preparadas con los virus completos de dos subtipos del virus de la influenza A (H1N1 y H3N2) y uno de influenza tipo B²⁴. Los virus de la influenza contenidos en la vacuna son seleccionados cada año, según un pronóstico basado en la vigilancia que determina que virus son los

que más probablemente causen la enfermedad ese año. Dicho método para la elección de las cepas compromete la efectividad de la vacuna ya que hay años en que ciertos virus de la influenza pueden no circular hasta bien entrada la temporada, pueden cambiar a fines de ésta o bien de una temporada a la otra, lo que dificulta la predicción de cuáles cepas predominarán en la temporada siguiente, o bien provocan que la cepa no sea identificada a tiempo para ser incluida en la vacuna de la próxima temporada²⁵.

Las vacunas presentan principalmente dos desventajas. La primera es que inducen principalmente anticuerpos contra las proteínas externas HA y NA de las cepas con las que fueron preparadas, la protección no se extiende para cepas heterólogas con HA antigénicamente distintas. Además, el virus evoluciona acumulando mutaciones en las proteínas HA y NA creando una nueva cepa epidémica que difiere típicamente por un pequeño número de aminoácidos en la proteína HA²⁶ por lo que hace indispensable el desarrollo de una vacuna anual²⁷. Así mismo, dichas vacunas son ineficaces ante la aparición de virus pandémicos, los cuales aparecen por cambios dramáticos en el subtipo de HA con o sin cambio de la NA²⁶, por lo que ante dicha situación es indispensable la elaboración de una nueva vacuna que contenga el virus pandémico.

La segunda gran desventaja es el tiempo de producción. Para que las vacunas estén disponibles en la temporada invernal, la OMS organiza una reunión desde el mes de febrero en el cual se escogen las cepas que formaran dicha vacuna. La tecnología actual para su producción se basa en cultivos en embrión de pollo, haciendo demasiado lenta su fabricación. El tiempo desde la identificación de una nueva cepa del virus hasta comenzar con la producción de la vacuna oscila de 2 a 3 meses, y los primeros lotes de producción están disponibles entre 4 y 5 meses después de la inoculación de los huevos embrionados²⁶. Por lo que ante la aparición de una pandemia es un método muy ineficaz para contrarrestarla, ya que tendrán que pasar al menos 8 meses para que la nueva vacuna esté disponible.

Por lo anterior es indispensable buscar sistemas alternativos de multiplicación viral como un cultivo celular. En este campo existen diferentes métodos de producción de virus, partículas o proteínas¹⁵. Sin embargo, en este camino queda mucho por investigar y el punto en común de todas estas estrategias es la necesidad de materia prima para la realización de nuevos ensayos.

3.6 Clonación

La clonación se refiere al proceso de producir muchas copias idénticas de una región del DNA, teniendo la opción de clonar toda la región o un fragmento en concreto (a menudo un gen en particular)²⁸.

La técnica de clonación depende en gran medida de la capacidad para fragmentar la molécula de DNA²⁸ y unir estos fragmentos en nuevas combinaciones. Para lo anterior son necesarias dos enzimas que lleven a cabo dichas funciones, las nucleasas de restricción que pueden escindir a la molécula de DNA en fragmentos más cortos y la DNA ligasa que pueden unir dos fragmentos de DNA sin importar la fuente de la que provengan dado que el DNA tiene la misma estructura química en todos los organismos. Si esta nueva molécula de DNA recombinante se introduce en el genoma de una célula huésped, cada vez que ésta replique su material genético replicará también el DNA introducido²⁸.

3.7 Clonación de DNA en vectores plásmidos

Los plásmidos existen naturalmente en muchas especies de bacterias y eucariontes unicelulares y son moléculas de DNA circulares relativamente pequeñas que pueden replicarse dentro de una bacteria²⁸.

Los plásmidos se pueden usar como vectores, es decir, como vehículos moleculares en donde se introduce el DNA a clonar y se reproduce dentro de un organismo hospedero, a los cuales se les conoce como vector de clonación (Fig. 6). Sin embargo, existe otro tipo de vectores, los de expresión, los cuales permiten que un inserto de DNA adyacente que codifica una proteína se transcriba de manera eficiente en las células²⁸ (Fig. 7).

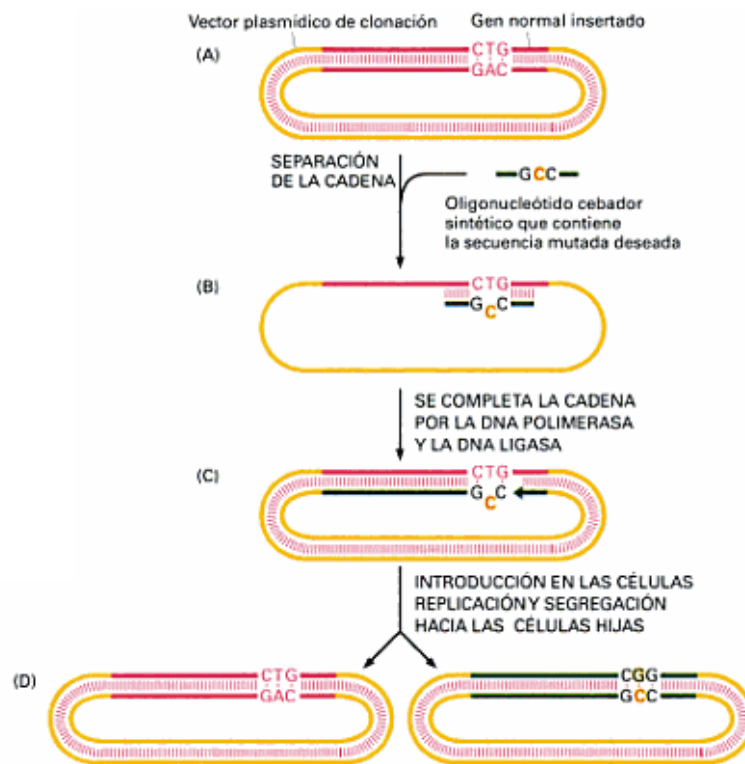


Figura 6. Vector de clonación de DNA de doble cadena (Tomado de Introducción a la biología celular²⁵).

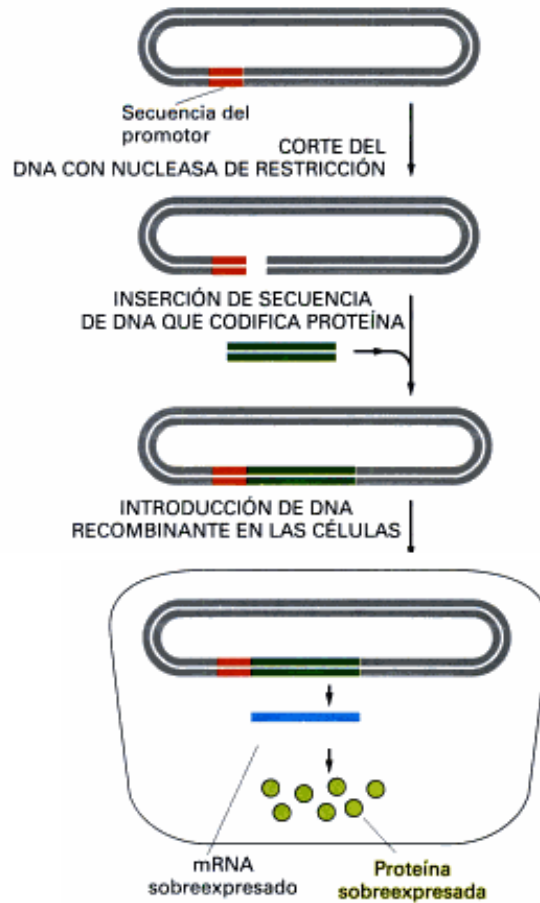


Figura 7. Vector de expresión de DNA de doble cadena (Tomado de Introducción a la biología celular²⁵).

Los plásmidos en general presentan los siguientes elementos:

- Un origen de replicación que le permite replicarse en una célula bacteriana de forma independiente del cromosoma bacteriano.
- Un sitio de corte para enzima de restricción específica que permite abrir el plásmido e insertar el fragmento de DNA extraño.
- Gen para propiedades seleccionables como la resistencia a antibióticos, que permite identificar las bacterias que ingresan el DNA recombinante.

Una de las ventajas que tiene el usar vectores plásmidos para llevar a cabo la clonación es que facilita la manipulación, copiado y purificación de DNA recombinante ya que se mantiene como una molécula independiente, separada del cromosoma bacteriano.

3.8 Vector TOPO

El siguiente mapa muestra los elementos del vector pFastBac™/HBM-TOPO®

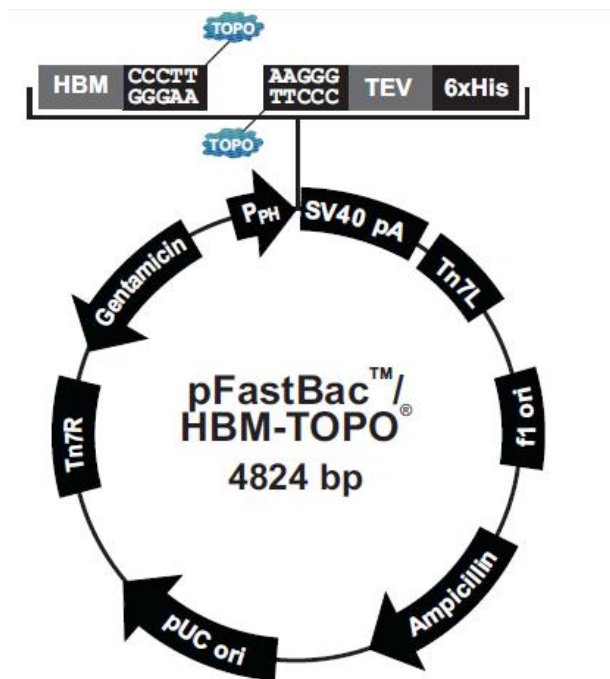


Figura 8. Mapa del vector de expresión pFastBac HBM-TOPO (Tomado de Bac-to-Bac® TOPO® Cloning Kit).

Cada uno de estos elementos cuenta con una función específica e importante que se describe a continuación:

- El promotor fuerte de Polihedrina (P_H) para generar niveles altos de expresión de la proteína en células de insecto.

- Señal N-terminal HBM de secreción, que es una secuencia que codifica para la secreción del producto del gen clonado en el medio extracelular.
- Bandera de histidinas terminal para facilitar la purificación del gen expresado mediante columnas de Ni⁺ - Sefarosa.
- Una proteasa de escisión TEV que facilita la eliminación de la etiqueta de histidinas una vez purificada la proteína.
- SV40 le proporciona una señal para la terminación eficiente de la transcripción.
- Tn7 le provee la capacidad al gen de llevar a cabo una transposición en sitios específicos.
- Ampicilina y gentamicina son genes de resistencia para la selección de transformantes que contienen el DNA recombinante.
- pUC para el mantenimiento del plásmido en *Escherichia coli*.

Este tipo de vectores utiliza la enzima topoisomerasa I del virus *Vaccinia* para llevar a cabo la ligación del fragmento de DNA al vector, por lo que no existe la necesidad de generar extremos cohesivos. La enzima actúa en sitios específicos de la doble cadena de DNA, únicamente donde se localiza la secuencia 5'-CCCTT, dicha secuencia está contenida en el sitio de unión del vector (Fig. 8). Este es el punto en donde la topoisomerasa va a escindir la doble cadena de DNA formando una cadena sencilla. El nucleótido de Timina, de la cadena escindida, se une a través de un enlace covalente 3'-fosfodiéster a Tyr-274 de la enzima²⁹. La ligación en el vector se da cuando el 5'-OH del fragmento de DNA ataca el enlace 3'-fosfotirosil y expulsa la topoisomerasa como grupo saliente²⁹ (Fig. 9).

De esta manera todos los elementos anteriores le confieren al vector ventajas sobre otros plásmidos. Además los vectores TOPO proporcionan los medios para llevar a cabo una ligación directa de fragmentos de DNA con extremos romos en una reacción de un solo paso, es altamente eficiente y con duración de 5 minutos³⁰ con un máximo de 95% de recuperación de la clona deseada, en

comparación con otros vectores cuyo tiempo de ligación es de 1 hora en adelante y con una eficiencia menor.

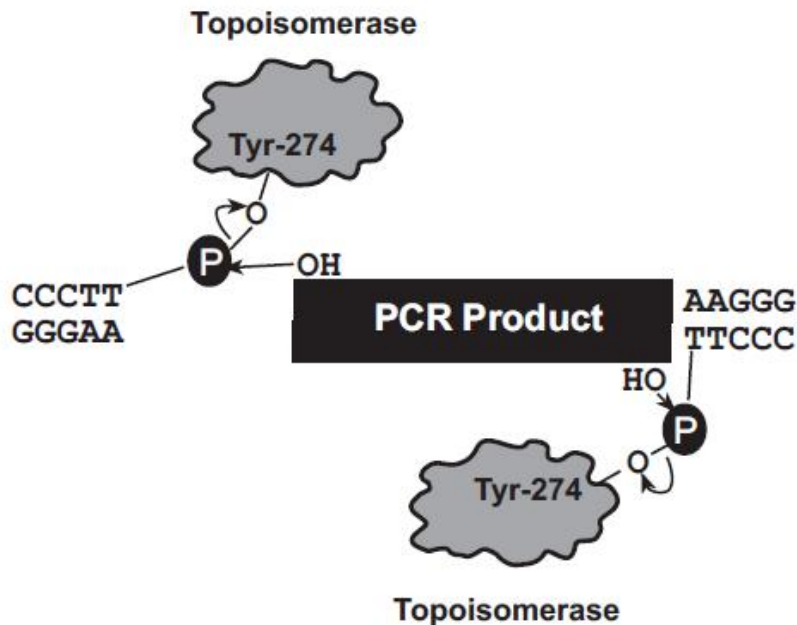


Figura 9. Acción de la topoisomerasa en la ligación del vector pFastBac HBM-TOPO (Tomado de Bac-to-Bac HBM TOPO Secreted Expression System³⁰).

3.9 Sistema Bac-to-Bac

Un componente muy importante del sistema Bac-to-Bac son las células de *E.coli* DH10 Bac™ a partir de las cuales se obtiene DNA bacmídico. Estas células contienen un vector transportador de baculovirus (bacmid) con un sitio blanco mini- attTn7 y un plásmido auxiliar (Helper) (Fig. 10).

El vector transportador de baculovirus o “bacmid” presente en las células DH10Bac contiene:

- Un replicón Mini-F que le permite replicarse de manera independiente al genoma de *E.coli*^{31;32} y la expresión estable de plásmidos en bajo número de copias³².

- Un marcador de resistencia a la kanamicina.
- Segmento de DNA que codifica para el péptido LacZ α en el que ha sido insertado el sitio de unión mini-attTn7 para el transposón bacteriano Tn7.

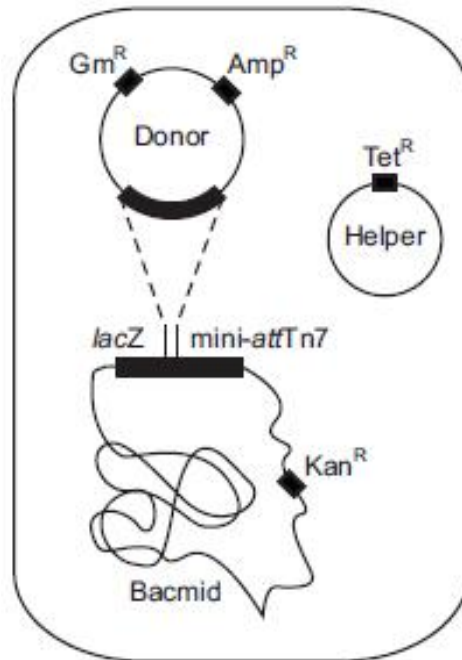


Figura 10. Célula competente de E.coli DH10Bac™ (Tomado de Bac-to-Bac® HBM TOPO® Secreted Expression System).

3.10 Retrotranscripción

Como se sabe, el virus influenza es un RNA virus. El RNA no puede ser amplificado mediante PCR debido a que las taq polimerasas son incapaces de copiar una molécula de RNA³³. Además, su manejo es más complejo debido a la rápida degradación por las RNAsas ambientales. Por ello es indispensable llevar a cabo un retrotranscripción, en la cual el RNA es convertido en cDNA, o DNA complementario, el cual puede ahora ser usado como templado para la amplificación por PCR.

El proceso de retrotranscripción se inicia mediante la adición de oligoDT, que es DNA sintético y actúa como primer hibridando en la cola poli (A) del RNA, este oligoDT es fosforilado en la terminación 5' para facilitar la síntesis de cDNA llevada a cabo por una enzima retrotranscriptasa, o transcriptasa inversa. La enzima va utilizando los dNTP's que se adicionaron a la mezcla de reacción, para ir formando la cadena sencilla de DNA o cDNA (Figura 11).

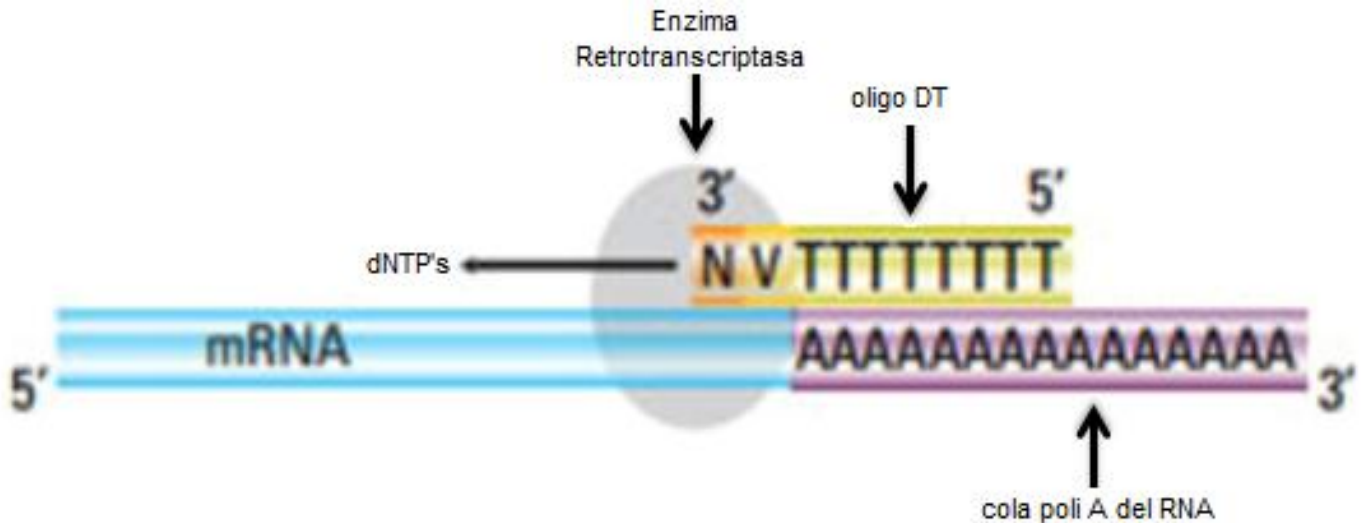


Figura 11. Retrotranscripción (Tomado de <http://www.thermoscientificbio.com/applications/basic-rt-qpcr/>)

En el presente trabajo se utilizó la enzima retrotranscriptasa SuperScript II, esta enzima ofrece diversas ventajas, una de ellas es el inhibidor que viene incluido en el estuche llamado RNAsa out, el cual evita la degradación del RNA por las RNAsas, de esta manera se puede tener la certeza de que el RNA viral se mantiene estable durante todo el proceso. Además al ser diseñada con una mayor estabilidad térmica, puede sintetizar cDNA en un rango de temperatura de 45-60 °C, permitiendo llevar a cabo una retrotranscripción con mayor especificidad y, de acuerdo al fabricante, con mayores rendimientos de cDNA para ser utilizados en la PCR.

3.11 Transposición y transposones

La transposición entre el plásmido donador y el DNA bacmídico, con ayuda de un plásmido auxiliar, es el mecanismo que permite obtener DNA bacmídico recombinante, capaz de infectar células de insecto para obtener la proteína de interés. La transposición es el movimiento de un elemento transponible de un sitio a otro, los elementos transponibles, o transposones, son secuencias de DNA móviles que se hallan en los genomas de todos los organismos³⁴.

Algunos transposones tienen estructuras simples y sólo cuentan con las secuencias necesarias para su propia transposición³⁵, mientras que otros poseen estructuras más complejas. Sin embargo, existen ciertas características que tienen en común, como las repeticiones directas flanqueantes que se hayan a ambos lados de la mayoría de los elementos transponibles³⁴, como es el caso de Tn7, que es un transposón bacteriano de 14 kb descubierto originalmente en *Escherichia coli*³⁶, se distingue por su capacidad para reconocer un sitio específico llamado attTn7³⁷.

Existen transposones autónomos que acarrean genes que codifican su propia transposasa, enzima necesaria para que se produzca el salto o transposición³⁵, y llevan un par de repeticiones terminales invertidas que los provee de todo lo necesario para promover su propia transposición. Sin embargo, existen otros transposones conocidos como no autónomos, estos elementos llevan sólo las repeticiones invertidas terminales, es decir, las secuencias que actúan en cis necesarias para la transposición y únicamente podrán ser transponibles con ayuda de un plásmido conocido como “helper”, el cual codifica una transposasa que reconoce las repeticiones invertidas terminales. Sin este plásmido, los elementos no autónomos permanecen congelados, sin poder moverse³⁸.

La transposasa reconoce las secuencias flanqueantes en cada extremo del transposón atrayéndolos para formar un complejo estable de DNA–proteína,

llamado transpososoma (Fig. 12). De esta forma la enzima genera cortes en los extremos del transposón en ambas hebras, de tal manera que la secuencia del transposón termina con grupos 3'OH libres en cada extremo, los cuales se unen covalentemente a los enlaces fosfodiéster de la cadena de DNA en el sitio de la nueva inserción (sitio diana)³⁸ (Fig. 13).

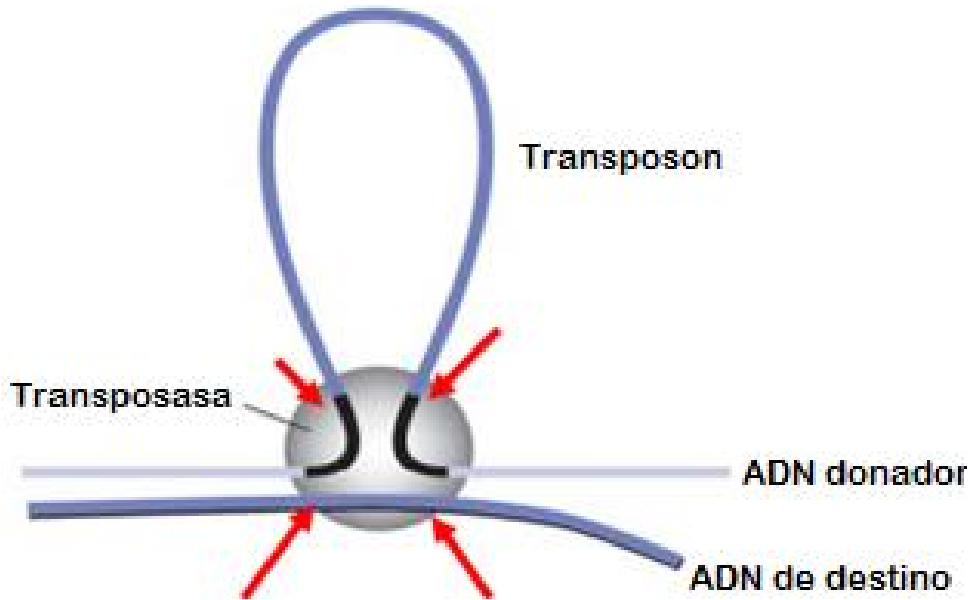


Figura 12. Transpososoma (Tomado de http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/106112/mod_resource/content/1/Clase-Tn-2013.pdf).

El vector pFastBac HBM-TOPO actúa como un plásmido donante que acarrea el gen de interés, el cual se encuentra flanqueado en extremo derecho e izquierdo por el transposón Tn7³², el DNA bacmídico contiene el sitio diana para este transposón (attTn7). Este sistema usa una transposición sitio específico para insertar genes extraños en el DNA bacmídico, propagándolo en *E. coli*^{32;39}. Las funciones de transposición son provistas *in trans* por un plásmido auxiliar, dicho plásmido también confiere la enzima transposasa, la cual reconoce las secuencias flanqueadas⁴⁰ y permite que se lleve a cabo la transposición de Tn7 junto con el gen que porta, obteniendo como resultado DNA Bacmídico recombinante.

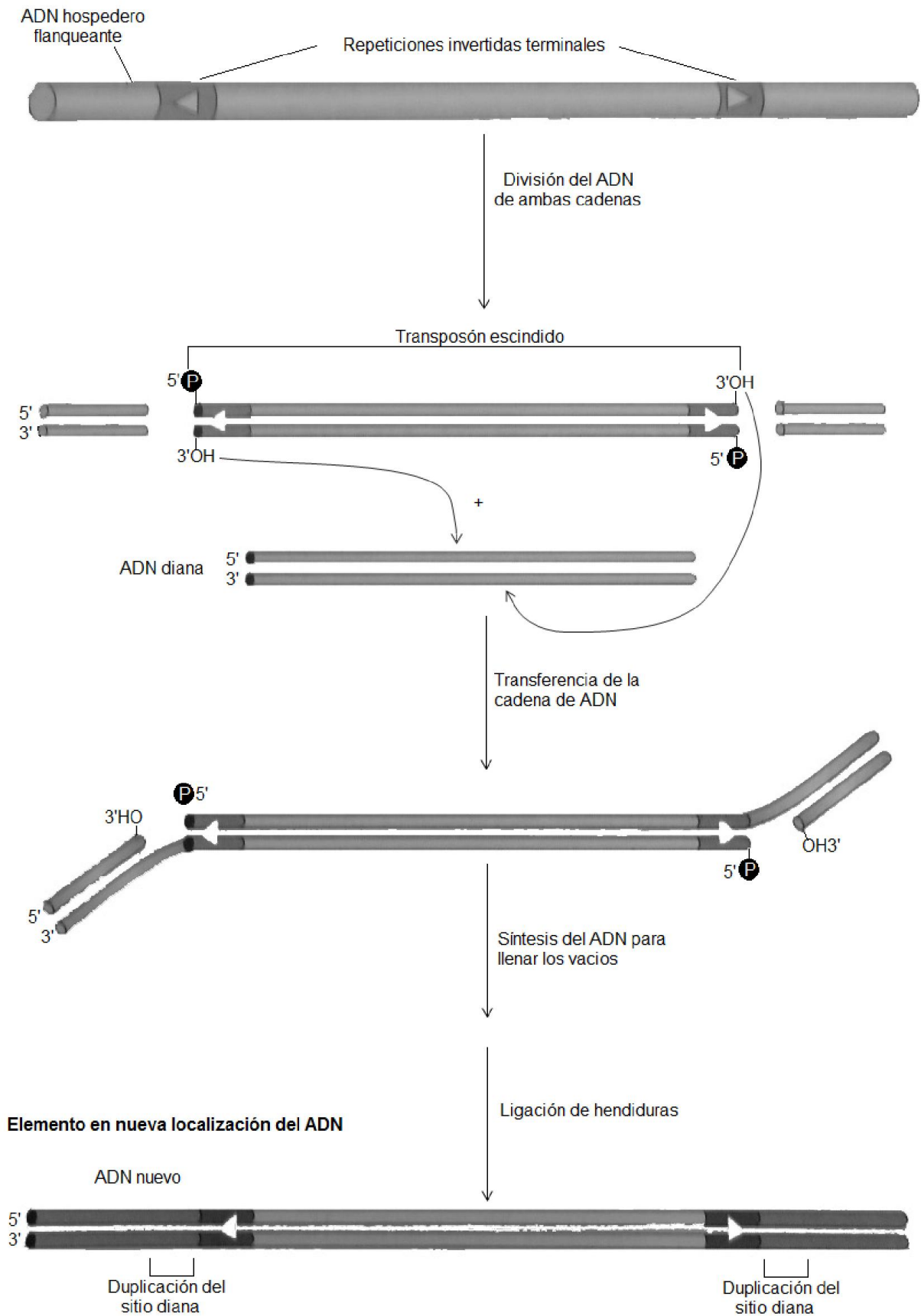


Figura 13. Mecanismo de corte de la transposasa (Tomado de Molecular biology³⁵).

3.12 α -complementación y operón de la lactosa

La alfa complementación es el mecanismo que permite la distinción entre las clonas positivas, aquellas que han insertado el fragmento de DNA de interés, de las clonas negativas. Esta distinción es posible por la coloración que presentan las colonias, que van de un tono blanco al azul. La alfa complementación se refiere a la capacidad de la enzima β -galactosidasa para ser expresada como dos fragmentos proteicos, que se reúnen para formar una proteína funcional⁴¹. El gen LacZ codifica para una enzima denominada β -galactosidasa, la cual es un tetrámero y cada monómero que lo conforma está constituido por lacZ- α y lacZ-omega, si se elimina el fragmento α , el fragmento omega no es funcional y por lo tanto la enzima no es activa. Su función es hidrolizar la lactosa en galactosa y glucosa, sin embargo existen sustancias sintéticas que pueden reemplazar la lactosa y al mismo tiempo poner en evidencia la complementación de la enzima, X-gal es un sustrato cromogénico que puede ser hidrolizado por la β -galactosidasa formando galactosa, un compuesto incoloro, y 5-bromo-4-cloro-3-hidroxyindol, que al ser oxidado forma 5,5'-dibromo-4,4' dicloro-indigo, un compuesto insoluble azul intenso⁴².

La tecnología recombinante ocupa una delección del gen LacZ, generalmente el fragmento del gen que codifica para la porción α de la enzima es insertado dentro de un vector, mientras que en el cromosoma de la bacteria se encuentra la porción omega. Si se lleva a cabo la complementación, las subunidades se combinan para formar una enzima funcional, capaz de degradar el X-gal formando colonias azules. Sin embargo, si un fragmento de DNA es insertado dentro del vector, interrumpiendo el gen que codifica para el fragmento α , las subunidades no se complementarán y la β -galactosidasa no se producirá, por lo que no habrá enzima capaz de degradar el X-gal obteniendo así colonias blancas⁴¹.

Para que todo lo anterior se lleve a cabo es necesario un inductor que promueva la transcripción de la β -galactosidasa dentro del operón de la lactosa. Dicho

operón es un conjunto de genes que codifican proteínas requeridas para importar y digerir la lactosa, en ausencia de glucosa²⁸. Se encuentra constituido de un promotor, un operador y tres genes estructurales. Los genes estructurales son LacZ que codifica para la enzima β -galactosidasa, el gen LacY que codifica la enzima permeasa responsable del transporte de la lactosa a la célula y el gen LacA que se transcribe en la enzima transacetilasa, la cual metaboliza ciertos disacáridos diferentes a la lactosa⁴³. El promotor es la región del DNA donde la RNA polimerasa inicia la transcripción y el operador es el responsable de emitir una señal de avance o detención para la transcripción de los genes estructurales. Cerca del operón de la lactosa se ubica un gen represor, el LacI, que codifica una proteína represora capaz de unirse al operador impidiendo que la RNA polimerasa transcriba los genes estructurales⁴⁴ (Fig. 14). Sin embargo, cuando la lactosa se hace presente es transportada al interior de la célula convirtiéndose así en el inductor, se une a la proteína reguladora y altera su conformación, de esta manera evita su unión al operador y promueve que la RNA polimerasa transcriba los genes estructurales en mRNA traduciéndolos posteriormente en las enzimas correspondientes⁴³ (Fig. 15).



Figura 14. Represión del operón de la lactosa. (Tomado de <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio101/chap15/chap15.htm>).

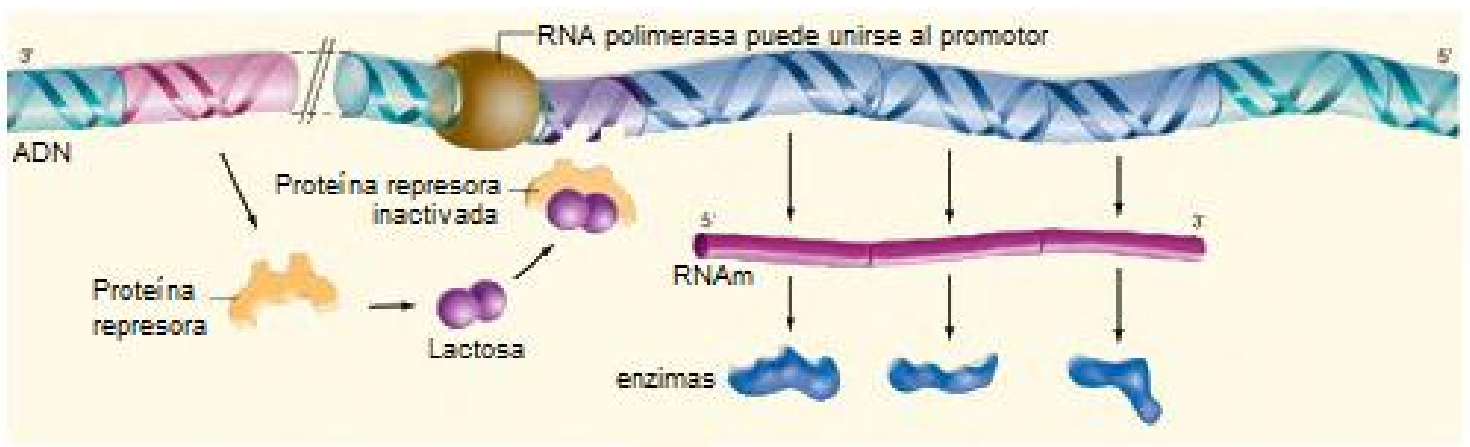


Figura 15. Activación del operón de la lactosa. (Tomado de <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio101/chap15/chap15.htm>).

En el caso del sistema Bac-to-Bac no utiliza lactosa como inductor, sino IPTG. Este compuesto sintético se une a la proteína represora del operón de la lactosa, induciendo así la transcripción de los genes, tales como el gen que codifica para la enzima β -galactosidasa.

4. Planteamiento del problema

En la actualidad, a pesar de las campañas de vacunación el virus de la influenza causa entre 250 y 500 mil muertes a nivel mundial cada año. Esto se debe principalmente a dos factores. El primero de ellos asociado al diseño de la vacuna la cual debe re-formularse cada año, además de que no es efectiva contra cepas pandémicas y el segundo asociado con la gran variabilidad genética del virus, resultado de sus dos mecanismos de mutación, la deriva y el cambio antigénico. Por lo que la investigación y el diseño de nuevas estrategias para combatir al virus son indispensables, sin embargo, para cualquiera que ésta sea, es necesario contar con la materia prima, por lo que en este trabajo se propone utilizar el sistema Bac-to-Bac HBM TOPO para clonar la proteína NP del virus de influenza A H1N1 pdm 09 la cual es una proteína altamente conservada y una fuerte candidata para el desarrollo de estrategias vacunales.

5. Hipótesis

El sistema de expresión Bac-to-Bac HBM TOPO incluye el vector de clonación pFastBac™/HBM-TOPO® y debido a las características que éste presenta, tales como; un origen de replicación, que le permite replicarse independientemente al genoma de la bacteria; genes de resistencia para la selección de clones positivas; una señal SV40 para la terminación eficiente de la transcripción; una bandera de histidinas terminal; un sitio de clonación TOPO que facilita la clonación de productos de PCR de extremos romos que codifican el gen de interés; será capaz de generar las clones que contengan el genoma completo de la proteína NP más una bandera de histidinas para facilitar su purificación.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Clonar el producto generado por RT-PCR del gen NP del virus de la influenza A H1N1pdm 09 utilizando el sistema Bac-to-Bac HBM TOPO.

6.2 Objetivos específicos

Obtener el plásmido pFastBac/HBM Topo/NPr.

Purificar el plásmido pFastBac/HBM Topo/NPr mediante el estuche Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two.

Analizar las clonas positivas mediante PCR, análisis de restricción y secuenciación.

7. Materiales y métodos

7.1 Tipo de estudio

Experimental

7.2 Materiales

- Termociclador Select Bioproducts
- Equipo para electroforesis Bio-Rad
- Centrifuga Beckman Coulter
- Micropipetas Rainin
- Puntas para micropipetas
- Tubos Eppendorf
- Cajas Petri
- Estuche Bac-to-Bac[®] TOPO[®] Cloning
- Estuche Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two
- Estuche PureLink[®] HiPure Plasmid DNA purification
- Enzima retrotranscriptasa SuperScript II
- Enzima PlatinumR *Pfx*

7.3 Métodos

7.3.1 Análisis *in silico*

Con la finalidad de determinar el potencial vacunal y de diagnóstico de la proteína NP, se llevó a cabo un análisis bioinformático de los determinantes antigénicos presentes en ella mediante tres algoritmos diferentes: Kolaskar, Emini y Bepipred.

Emini se basa en la accesibilidad de la secuencia y la probabilidad de que éste sea encontrado en la superficie.

Kolaskar es un método semi empírico que se basa en las propiedades fisicoquímicas de los aminoácidos y su frecuencia de ocurrencia en epítomos conocidos experimentalmente, ha sido aplicado a un gran número de proteínas de las cuales ya se conocen sus epítomos y ha mostrado una exactitud del 75%.

Bepipred es la unión de uno de los mejores modelos para predecir epítomos lineales de B el modelo oculto de Markov y uno de las mejores métodos de escala propensivas.

7.3.2 Extracción de RNA

La extracción se llevó a cabo por dos métodos: Mediante el estuche de extracción Qiagen y por la tecnología automatizada ROCHE. La extracción se realizó a partir de cultivo viral en embrión de pollo, el cual fue donado por el InDRE al Laboratorio Central de Epidemiología del Centro Médico Nacional la Raza.

7.3.2.1 Extracción con el estuche de Qiagen

En un tubo Eppendorf estéril de 1.8 mL, previamente rotulado con el número de muestra correspondiente, se adicionaron 560 μ L de buffer de lisis AVL con acarreador de RNA y 140 μ L del cultivo viral, se mezclaron por vortex (20 segundos al máximo) y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 560 μ L de etanol absoluto y se mezcló por vortex suavemente por 15 segundos. Se centrifugó a 6000 x g por 30 segundos (dar un spin) para remover pequeñas partículas.

Se añadieron 630 μ L de la muestra a la columna de extracción previamente rotulada con el número de muestra correspondiente, se centrifugó a 6000 x g por 1 minuto se transfirió la columna a un tubo colector nuevo (camisa) y el sobrenadante se desechó.

Los pasos del párrafo anterior se repitieron hasta pasar todo el líquido por la columna. La columna se lavó con 500 μ L de buffer AW1 y se centrifugó inmediatamente a 6000 x g por 1 minuto. La columna se transfirió a un tubo

colector nuevo (camisa) y se adicionaron 500 μ L de buffer AW2, se centrifugó a 20000 x g por 3 minutos.

La columna se colocó en un tubo Eppendorf previamente rotulado con el número de la muestra correspondiente y se adicionaron 70 μ L de buffer de elusión (AVE), se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 6000 x g por 1 minuto. La columna se desechó y el RNA obtenido se conservó a -70°C para su uso posterior.

7.3.2.2 Extracción automatizada (ROCHE)

El equipo utilizado fue el Robot de Roche MagNA Pure LC Instrument LC 2.0 que requirió del uso del estuche MagNa Pure Total Nucleic Acid Isolation. El contenido del estuche es el siguiente:

- Buffer de lavado I: Frasco con tapa color negro Número 1
- Buffer de lavado II: Frasco con tapa color azul Número 2
- Buffer de lavado III: Frasco con tapa color rojo Número 3
- Buffer de lisis y unión: Frasco con tapa color verde Número 4
- Proteinasa K: Frasco con tapa color rosa Número 5
- Partículas magnéticas (MGP'S): Frasco con tapa color caramelo Número 6
- Buffer de elusión: Frasco con tapa color amarillo Número 7

En una canastilla del Robot se agregaron 200 μ L del cultivo viral y 200 μ L del buffer del Robot, la canastilla se cubrió con un film plástico y se rotuló con el número de muestra. Los consumibles y reactivos se colocaron en el robot de acuerdo a su código de color y se revisaron los accesorios para desechos sólidos y líquidos. Se introdujo la información de la muestra, se seleccionó el protocolo a seguir y los parámetros a considerar, indicando el volumen de muestra y volumen

de elución. Una vez que se corroboró todo lo anterior se dio inicio al proceso de purificación.

Al término del proceso se tomó la canastilla en el que se encuentra el RNA purificado y se transfirió a tubos Eppendorf previamente rotulados. El RNA obtenido se conservó a -70°C para su uso posterior.

7.3.3 Diseño de primers

Para el diseño de los iniciadores se buscó la secuencia del genoma del virus de la influenza A (A/Mexico/InDRE13495/2009(H1N1)), ya que es la cepa con la que cuenta el Laboratorio Central de Epidemiología, en la base de datos de la página NCBI.

Una vez conocida la secuencia del gen NP y con la ayuda del programa *Primer select* se diseñaron los primers que contemplaron los 1509 pb que conforman dicho gen. Los iniciadores fueron diseñados con las siguientes características:

- Primer forward: Sin la secuencia ATG de inicio ni la secuencia Kozak (es una secuencia consenso que rodea el condón de iniciación AUG facilitando su identificación⁴⁵)
- Primer reverso: Sin codón de término para evitar que interfiera con la cadena de histidinas que aporta el vector.

Dicho programa además de proporcionar la secuencia de los primers, también proporcionó información importante para cada iniciador, tales como la T_m teórica, el %GC y el número de bases que los conforman (Cuadro 3).

Cuadro 3. Secuencia de primers utilizados para amplificar.

	Secuencia	Tm	%GC	Número de bases
Primer Forward	AGTGACATCGAAGCCATGGC	54.8°C	55%	20
Primer Reverse	ACTGTCATACTCCTCTGCATTGTCTC	54.8°C	46.1%	26

Una vez diseñados los primers virtualmente se mandaron a sintetizar

7.3.4 RT-PCR y estandarización de la Tm

Para la reacción de RT-PCR se utilizaron una mezcla de las enzimas SuperScript II Reverse Transcriptase y Platinum *Pfx* DNA Polymerase.

La retrotranscripción se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se preparó una mezcla de reacción con 1 µL de oligoDT, 1 µL de dNTP's, 5 µL de RNA y 13 µL de agua, se colocó a 65°C por 5 minutos y se enfrió rápidamente en hielo. A la mezcla de reacción se le adicionó 4 µL de buffer 5X First-Strand y 1 µL de RNAsa out, se calentó a 42°C por 2 minutos. Terminado este tiempo se añadió 1 µL de la enzima Super Script II RT, se mezcló cuidadosamente y se incubó a 42°C por 50 minutos y por último la reacción se inactivó a 70°C por 15 minutos.

Para la PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción:

- 2.5 µL de Buffer de amplificación Pfx 10X
- 0.75 µL de dNTP 10Nm
- 0.5 µL de MgSO₄ 50 Nm
- 1 µL de primer forward
- 1 µL de primer reverse
- 0.2 µL de DNA polimerasa Pfx
- 2 µL de cDNA
- 17.05 µL de agua

El programa Primer Select estableció una T_m para cada primer. Sin embargo, otra temperatura fue proporcionada al mandar a sintetizar los iniciadores (T_m Primer Forward 57.9°C y T_m Primer Reverse 58.0°C). Por lo que se decidió determinar la T_m experimental mediante un programa de PCR con gradiente de temperatura. El gradiente fue determinado con base a la T_m establecida por el fabricante de los primers $\pm 3^\circ\text{C}$, de esta manera el equipo (Termociclador Select Bioproducts) nos permitió establecer las siguientes temperaturas: 54.4°C , 56.2°C , 57.9°C , 58.7°C y 60.2°C .

El programa de amplificación utilizado fue el siguiente:

Activación de la enzima polimerasa	Amplificación (PCR)	Extensión final
1 Ciclo	35 Ciclos	1 Ciclo
50°C por 15 min	94°C por 30 s	72°C por 5 min
95°C por 2 min	Gradiente de $54.4\text{-}60.2^\circ\text{C}$ por 30 s	
	68°C por 1 min 45 s	

7.3.5 Comprobación de los productos de PCR

Para comprobar la integridad del producto de PCR se llevó a cabo una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X. Las muestras y el marcador de peso molecular se mezclaron con regulador de carga (glicerol 5%, EDTA 10 mM, SDS 0.1%, azul de bromofenol 0.01%) y la electroforesis se corrió en una cámara para electroforesis horizontal con regulador de TBE a 85 V. Para visualizar los amplificados se empleó Gel Red como intercalante de bases y se observó a través de luz UV.

7.3.6 Generación de productos de extremos romos por PCR

Una vez determinada experimentalmente la T_m se corrió una PCR con 8 reacciones de 25 μL cada una. Al término de la PCR se hizo un “pool” con los productos de todas las reacciones y se mezcló perfectamente. Se tomaron 3 μL y se corrió un gel de agarosa para verificar la presencia de la banda NP. El resto del producto de la reacción de PCR se cargó en un gel con 4 pozos unidos y se corrió a 85 V obteniendo una banda larga del fragmento NP. Con la ayuda de luz UV la banda fue cortada para su posterior purificación.

7.3.7 Purificación de los fragmentos de interés amplificados.

Para la purificación de las bandas de interés amplificadas por RT-PCR, se utilizó el estuche Quick Gel Extraction (Invitrogen) el cual se basa en la unión del DNA de doble cadena a una matriz de fibra de vidrio. Las bandas de interés se cortaron del gel de agarosa con ayuda de una hoja de bisturí estéril y los fragmentos se depositaron en un tubo de tipo Eppendorf de 1.7 mL, se pesó y se adicionó 3 volúmenes del regulador L3, se incubó 10 min a 50°C. Una vez disuelta la agarosa, se incubó 5 minutos adicionales a la misma temperatura, al término de la incubación se adicionó un volumen de isopropanol. Se adicionaron 700 μL dentro la columna de extracción la cual se colocó previamente en un tubo colector y se centrifugó a 12000 x g por 1 minuto, se repitió este paso dos veces más hasta pasar todo el volumen por la columna, el filtrado del tubo colector entre cada ronda de centrifugado fue desechado. A la columna se le adicionaron 500 μL de regulador de lavado (W1) y se centrifugó nuevamente durante 1 minuto a 12000 x g. Se centrifugó una vez más a 12000 x g por 2 minutos para eliminar totalmente el etanol presente en el regulador. Finalmente la columna se eluyó con 30 μL de agua libre de RNAsas en el centro de la columna, se incubó 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 x g por 1 minuto. Para comprobar la recuperación de la banda de interés, 1 μL de la alícuota obtenida se sometió a

electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% bajo las mismas condiciones de corrida y visualización que se mencionaron anteriormente.

7.3.8 Generación de plásmido recombinante pFastBac/HBMTopo/NPr

Para generar un plásmido recombinante que contiene el gen de interés para su uso en el sistema de expresión Bac-to-Bac HBM[®] TOPO[®] se realizó una ligación del producto de PCR de extremos romos en el vector pFastBac[™]/HBM-TOPO[®] de la siguiente manera:

- Se mezcló en el siguiente orden 1 μ L de agua, 1 μ L de solución de sal, 3 μ L del producto purificado de PCR y 1 μ L del vector pFastBac[™]/HBM-TOPO[®]

La reacción de ligación se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente (22°C a 23°C). Se colocó la mezcla en hielo y se procedió a la transformación en células de *E. coli* One Shot[®] Mach1[™]T1^R químicamente competentes.

7.3.9 Clonación en células de *E. coli*

La transformación se llevó a cabo en cepas de *E. coli* One Shot[®] Mach1[™] T1^R químicamente competentes para lo cual un vial se descongeló lentamente en hielo y posteriormente se adicionaron 2 μ L del plásmido y se mezcló suavemente. Las células se incubaron en hielo por 30 minutos, al término de ese tiempo fueron sometidas a un choque térmico durante 30 segundos a 42°C sin agitación. Inmediatamente se transfirió el vial en hielo por 5 minutos. Se añadieron 250 μ L de medio S.O.C. a temperatura ambiente y el tubo se dejó en agitación horizontal a 225 rpm a 37°C por una hora. Terminado este tiempo se sembraron 50 μ L y 200 μ L respectivamente en 4 cajas de agar LB con 100 μ g/mL de ampicilina. Se

incubaron por 16 horas a 37°C, al término de este tiempo se seleccionaron aquellas colonias aisladas para su análisis.

7.3.10 Análisis de clonas positivas

7.3.10.1 PCR

El primer análisis realizado fue una PCR de colonia, para esto se tomó una muestra con la ayuda de un asa bacteriológica de cada colonia obtenida y se colocó dentro de un tubo Eppendorf con 40 µL de agua inyectable agitando para homogenizar. Se colocó a 98°C durante 10 minutos y posteriormente en hielo por 5 minutos. Se centrifugó por 2 minutos a 12000 x g y se tomaron 20 µL de la superficie para llevar a cabo el análisis. Para cada colonia la mezcla de reacción de PCR se preparó de la siguiente manera:

- 2.5 µL de 10Pfx buffer de amplificación
- 0.75 µL de 10 nM dNTP's
- 0.5 µL de 50 nM MgSO₄
- 1 µL primer forward
- 1 µL primer reverse
- 5 µL del templado
- 0.2 µL de DNA polimerasa Platinum Pfx
- 14.05 µL de agua

El programa de amplificación se muestra a continuación:

Pre-desnaturalización	Amplificación (PCR)	Extensión final
1 Ciclo	35 Ciclos	1 Ciclo
94°C por 5 min	94°C por 15 s	68°C por 10 min
	58°C por 30 s	
	68°C por 1 min 45 s	

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X y, de acuerdo al peso de las bandas obtenidas, se identificó en cuales colonias el inserto se ligó al vector.

7.3.10.2 Análisis de restricción

A las muestras que dieron bandas del tamaño esperado para el inserto ligado al vector se les realizó un análisis de restricción.

Para llevar a cabo este análisis se seleccionaron 3 enzimas de restricción con ayuda del programa SeqBuilder y con el mapa de restricción del vector pFastBac™/HBM-TOPO® proporcionado por el fabricante (Invitrogen). Cada enzima cuenta con una secuencia específica de corte, como se muestra en la Figura 16.



Figura 16. Secuencia de corte de las tres enzimas de restricción. A la izquierda, secuencia de corte de la enzima Hind III; en medio, secuencia de corte de la enzima BamHI; A la derecha, secuencia de corte de la enzima NdeI.

Posteriormente se realizó un análisis *in silico* de la ligación y restricción con el programa SerialCloner 2.1. Obteniendo los siguientes mapas:

- BamHI

Restriction analysis of ANALISIS DE RESTRICCIÓN.txt.xdna [Circular]
Incubated with BamHI

2 fragments generated.

- 1: 5,755 bp - From BamHI[707] To BamHI[129]
- 2: 578 bp - From BamHI[129] To BamHI[707]

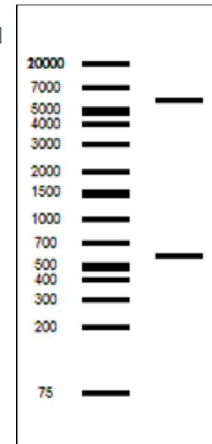


Figura 17. Análisis de restricción virtual con la enzima BamHI obtenido mediante el programa SerialCloner 2.1.

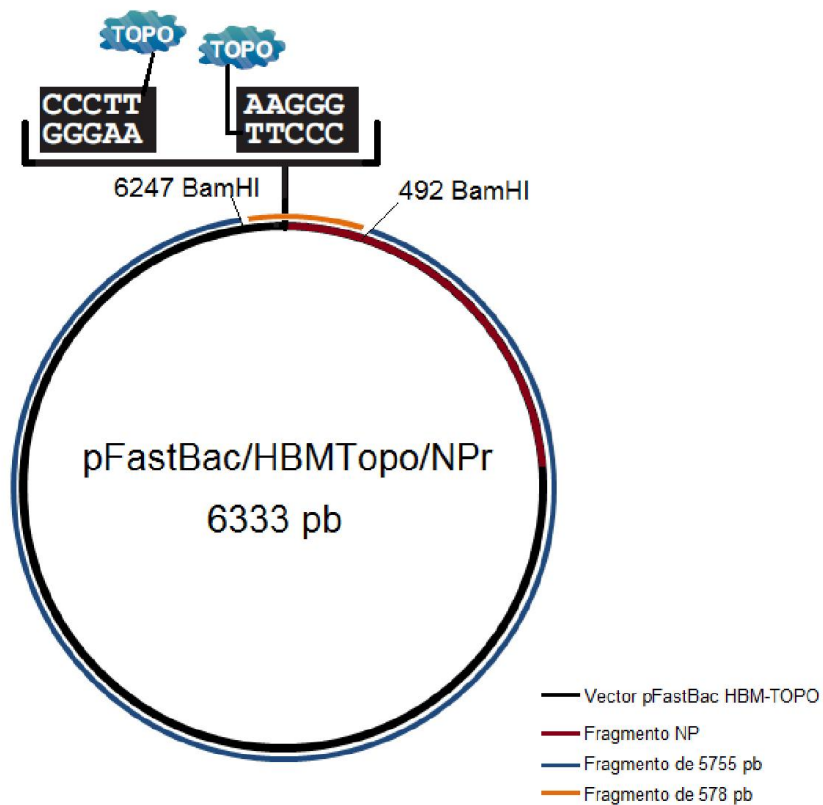


Figura 18. Mapa del vector pFastBac/HBM-TOPO/NPr que muestra análisis de restricción con la enzima BamHI.

- HindIII

Restriction analysis of ANALISIS DE RESTRICCIÓN.txt.xdna [Circular]
Incubated with HindIII

2 fragments generated.

- 1: 5,841 bp - From HindIII[1791] To HindIII[1299]
- 2: 492 bp - From HindIII[1299] To HindIII[1791]

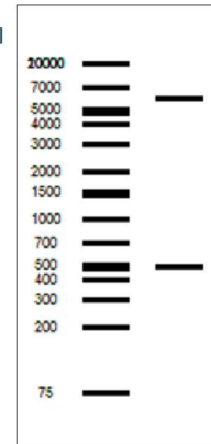


Figura 19. Análisis de restricción virtual con la enzima HindIII obtenido mediante el programa SerialCloner 2.1.

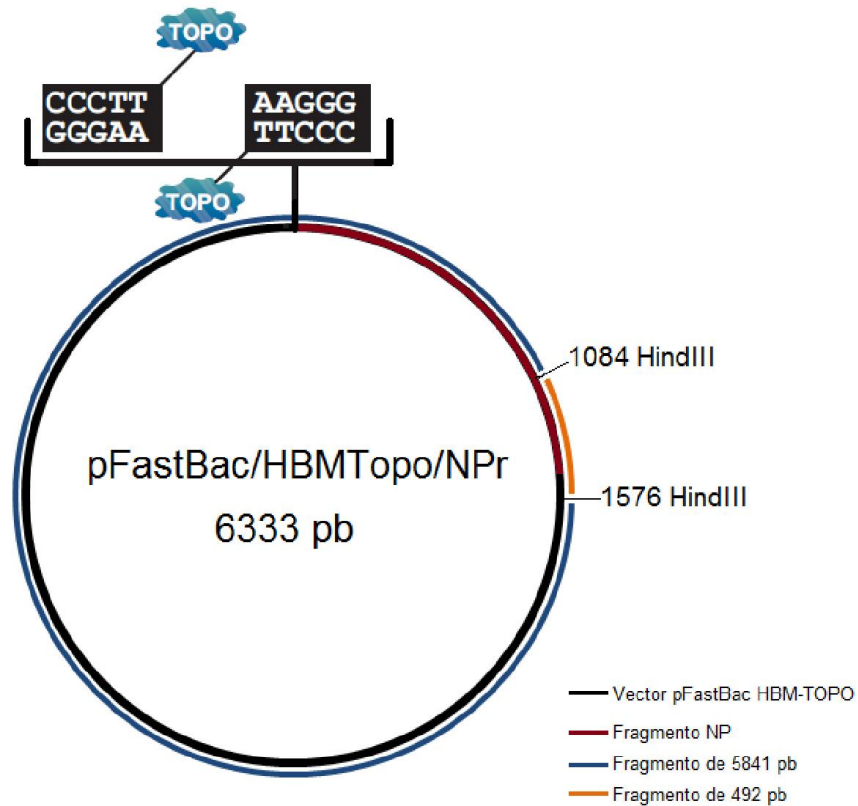


Figura 20. Mapa del vector pFastBac/HBM-TOPO/NPr que muestra análisis de restricción con la enzima HindIII.

- NdeI

Restriction analysis of ANALISIS DE RESTRICCIÓN.txt.xdna [Circular]
Incubated with NdeI

1 fragment generated.

1: 6,333 bp - Linearized by NdeI[256]

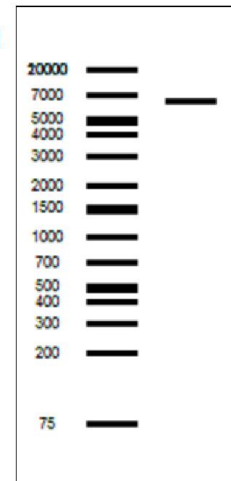


Figura 21. Análisis de restricción virtual con la enzima NdeI obtenido mediante el programa SerialCloner 2.1.

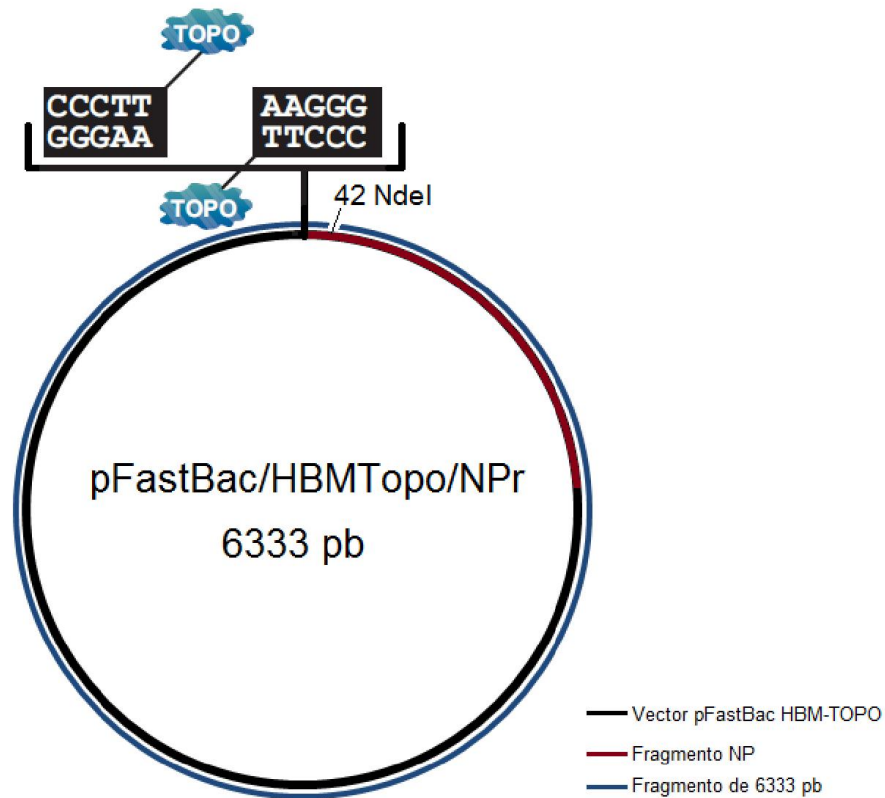


Figura 22. Mapa del vector pFastBac/HBM-TOPO/NPr que muestra análisis de restricción con la enzima NdeI.

El análisis de restricción se realizó de la siguiente manera:

- BamHI

Se mezclaron 13 μL de agua, 2 μL de buffer 10 X, 4 μL del plásmido y 1 μL de la enzima BamHI. La reacción se dejó a 30°C por 18 horas.

- HindIII

Se mezclaron 40 μL de agua, 5 μL de buffer #2, 4 μL del plásmido y 1 μL de la enzima HindIII. La reacción se dejó a 37°C por 18 horas.

- NdeI

Se mezclaron 40 μL de agua, 5 μL de buffer #4, 4 μL del plásmido y 1 μL de la enzima NdeI. La reacción se dejó a 37°C por 18 horas.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X y se identificó si las bandas obtenidas tienen los pesos esperados.

7.3.10.3 Secuenciación

Aquellas muestras que dieron positivo al análisis de restricción se enviaron a secuenciar. La secuenciación es un procedimiento destinado a determinar la secuencia nucleotídica en una cadena de DNA⁴⁶. Para observar el total de la secuencia de la proteína NP se utilizó el primer sentido Polyhedrin, el cual se ancla 181 aminoácidos río abajo del sitio de inserción y el primer antisentido SV 40 el cual se ancla 89 aminoácidos río arriba del sitio de inserción.

Una vez obtenidas las secuencias, se realizó un alineamiento múltiple con ayuda del programa Megalign para comprobar homología.

7.3.11 Purificación del plásmido recombinante pFastBac/HBMTopo/NPr

Se utilizó el estuche Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two. Una vez que se determinó cuales colonias contenían el fragmento NP ligado al vector, se tomó una muestra de dichas colonias y se depositó en un tubo Falcón de 50 mL con 5 mL de medio líquido LB más 100 µg/mL de ampicilina. Se dejó en agitación a 37°C por 16 h, pasado este tiempo se transfirieron 1000 µL de la suspensión de células a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 4000 x g por 5 minutos desechando el sobrenadante, este paso se repitió hasta centrifugar todo el volumen y obtener un botón. Se resuspendió completamente el botón de células en 250 µL de solución A por pipeteo y se le adicionaron 250 µL de solución B mezclando cuidadosamente por inversión del tubo 5 veces. A los 3.5 minutos se le adicionaron 250 µL de solución C mezclando por inversión 5 tiempos y se centrifugó a 16000 x g. El sobrenadante se transfirió por decantación dentro de una columna colocada en un tubo receptor, se dejó incubar por 1 minuto y se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto eliminando el sobrenadante del tubo receptor. Posteriormente se adicionaron a la columna 750 µL de solución de lavado y se centrifugó por 1 minuto a 10000 x g eliminando el sobrenadante del tubo receptor. Para eliminar cualquier traza de etanol se centrifugó por 3 minutos a 16000 x g. La columna se transfirió a un tubo Eppendorf y se le adicionaron 50 µL de agua directamente en el centro de la columna, se dejó incubar por 10 minutos y se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto. La columna se desechó y el sobrenadante se guardó a -20°C ya que contenía el plásmido purificado.

7.3.12 Generación del DNA bacmídico recombinante

Para la generación del DNA bacmídico se utilizaron células de *E. coli* MAX Efficiency[®] DH10Bac[™] químicamente competentes. Un vial de dichas células se descongeló lentamente en hielo y se le adicionó 1 µL del plásmido recombinante mezclando suavemente. Las células se incubaron en hielo por 30 minutos, al término de ese tiempo se sometieron a un choque térmico durante 45 segundos a

42°C sin agitación. Inmediatamente se transfirió el vial en hielo por 2 minutos. Se añadieron 900 µL de medio S.O.C. a temperatura ambiente y el tubo se dejó en agitación horizontal a 225 rpm a 37°C por 4 horas. Se prepararon diluciones en serie de las células (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) con medio S.O.C. y se sembraron 100 µL de cada dilución en cajas de agar LB con 50 µg/mL de kanamicina, 7 µg/mL de gentamicina, 10 µg/mL de tetraciclina, 100 µg/mL de X-gal y 40 µg/mL de IPTG. Se incubaron por 48 horas a 37°C y se seleccionaron las colonias blancas para su análisis, ya que éstas representan las bacterias en cuyo plásmido se llevó a cabo la transposición obteniendo DNA bacmídico.

7.3.13 Purificación del DNA bacmídico recombinante

Para este paso se utilizó el estuche PureLink® HiPure Plasmid DNA Purification. De las colonias blancas obtenidas, con ayuda de un palillo, se tomó una muestra y se depositó en un tubo Falcón de 50 mL con 5 mL de medio líquido LB más 50 µg/mL de kanamicina, 7 µg/mL de gentamicina, 10 µg/mL de tetraciclina. Se dejó en agitación a 37°C por 16 h, pasado este tiempo se transfirieron 1000 µL de la suspensión de células a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 4000 x g por 5 minutos desechando el sobrenadante, este paso se repitió hasta centrifugar todo el volumen y obtener un botón. Se adicionaron 400 µL de buffer de resuspensión R3 con RNAsa al botón de células y se resuspendió hasta homogenizar. Se añadieron 400 µL de buffer de lisis L7 mezclando por inversión 5 veces y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 minutos. Se adicionaron 400 µL de buffer de precipitación N3 mezclando por inversión hasta que la mezcla se encontraba homogénea. Se centrifugó a 12000 x g por 10 minutos.

La columna se colocó dentro de un Falcón de 15 mL y se añadieron 2 mL de buffer EQ1 dentro de la columna permitiendo que drenara por gravedad. Se adicionó el sobrenadante a la columna, una vez que la solución drenó por gravedad se lavó la columna dos veces con 2.5 mL de buffer de lavado W8 y

finalmente se eluyó con 900 µL de buffer de elución E4 obteniendo el producto en un tubo Eppendorf.

Se añadieron 630 µL de isopropanol al eluido y se centrifugó a 12000 x g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y se añadió 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 12000 x g por 5 minutos a 4°C desechando el sobrenadante. Se eliminó por completo cualquier traza de etanol y se resuspendió en 50 µL de agua.

7.3.14 Análisis del DNA bacmídico recombinante

7.3.14.1 PCR

Dado que el tamaño del DNA bacmídico recombinante es mayor a 135 kb el análisis de restricción se dificulta, por lo que se realizó una PCR para verificar la presencia del gen NP en el DNA bacmídico. Dado que la secuencia del DNA bacmídico no fue encontrada en la base de datos se confió en la información que ofrece el manual de expresión Bac-to-Bac HBM-TOPO, donde proporciona la secuencia de los primers Forward y Reverse a usar y un mapa que establece el sitio de unión para los primers y el lugar en donde se lleva a cabo la transposición (Fig. 23). Los primers fueron diseñados con las siguientes secuencias:

pUC/M13 Forward 5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'

pUC/M13 Reverse 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGG-3'

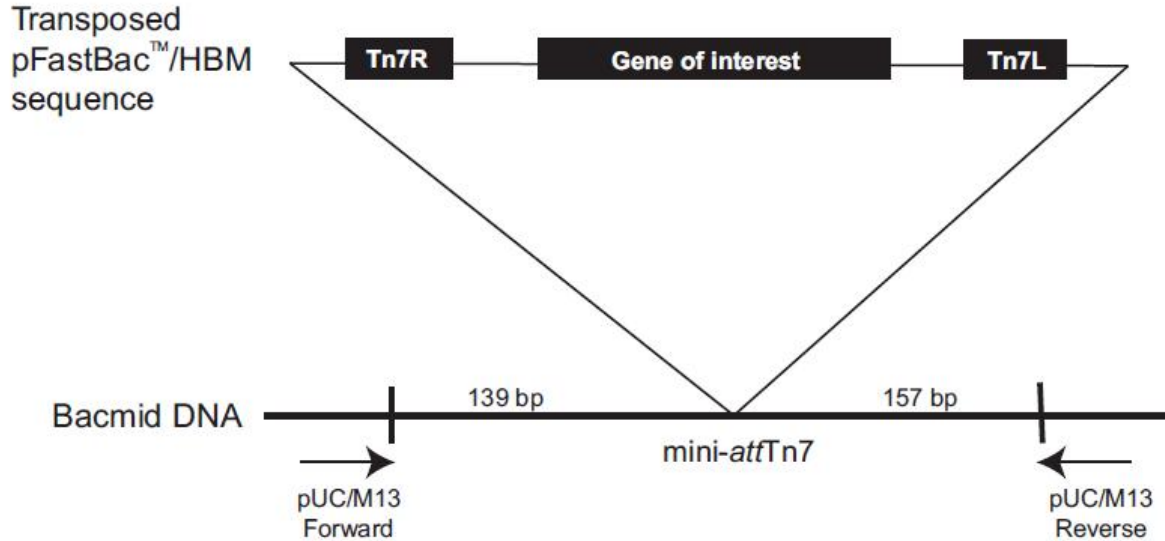


Figura 23. Transposición y sitio de unión de primers en el DNA bacmídico (Tomado de Bac-to-Bac HBM TOPO Secreted Expression System⁴⁷).

El tamaño de la banda a obtener fue determinado de acuerdo a la siguiente información, proporcionada por el manual del estuche:

Transposición del “Bacmid” con:	Tamaño del producto de PCR
pFastBac™/HBM-TOPO®	~ 2500 pb + tamaño del inserto

Considerando la información anterior y conociendo el tamaño del inserto del gen NP (1509 pb) se calculó el tamaño del producto de PCR, siendo de 4009 pb aproximadamente.

Para la reacción de PCR se utilizó el estuche PCR Master Mix 2x (Promega). Para obtener los productos de PCR se realizó la siguiente mezcla de reacción:

- 12.5 μ L del reactivo PCR Master Mix 2X
- 1 μ L de primer forward
- 1 μ L de primer reverse
- 3 μ L de DNA bacmídico
- 7.5 μ L de agua

El programa de amplificación utilizado fue el siguiente:

Pre-desnaturalización	Amplificación (PCR)	Extensión final
1 Ciclo	35 Ciclos	1 Ciclo
94°C por 3 min	94°C por 45 s	72°C por 7 min
	55°C por 45 s	
	72°C por 5 min	

Para comprobar la integridad del producto de PCR se llevó a cabo una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en TBE 1X, esperando observar una banda de 4000 pb.

7.3.14.2 Secuenciación

Aquellas muestras que dieron una banda de 4000 pb se enviaron a secuenciar para verificar que se trata del segmento de interés.

8. Resultados

Al realizar una búsqueda en la IEDB se encontró con el último reporte donde se establece la presencia de epítomos reportados por proteína del virus de influenza⁴⁸.

Cuadro 4. Distribución de epítomos de influenza por proteína.

Protein	B cell		T cell, CD8 ⁺		T cell, CD4 ⁺		Overall		
	Total	Cons.	Total	Cons.	Total	Cons.	Total	Cons.	Cons %
HA	5	1	4	1	34	3	43	5	12
NA	1	0	2	1	3	0	6	1	17
M1	4	1	17	13	28	14	49	28	57
M2	4	1	1	0	3	0	8	1	13
NS1	1	0	2	1	2	1	5	2	40
NS2	0	0	1	1	1	0	2	1	50
NP	9	4	19	15	43	21	71	40	56
PA	0	0	7	4	1	1	8	5	63
PB1	2	1	23	17	21	16	46	34	74
PB1-F2	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
PB2	0	0	2	1	3	1	5	2	40

Sin embargo, al realizar un análisis bioinformático de los posibles epítomos lineales en las proteínas M1, M2 y NP se encontró que el número de epítomos reportados experimentalmente hasta la fecha es muy bajo comparado con los encontrados de manera virtual como se muestra en la Figura 24.

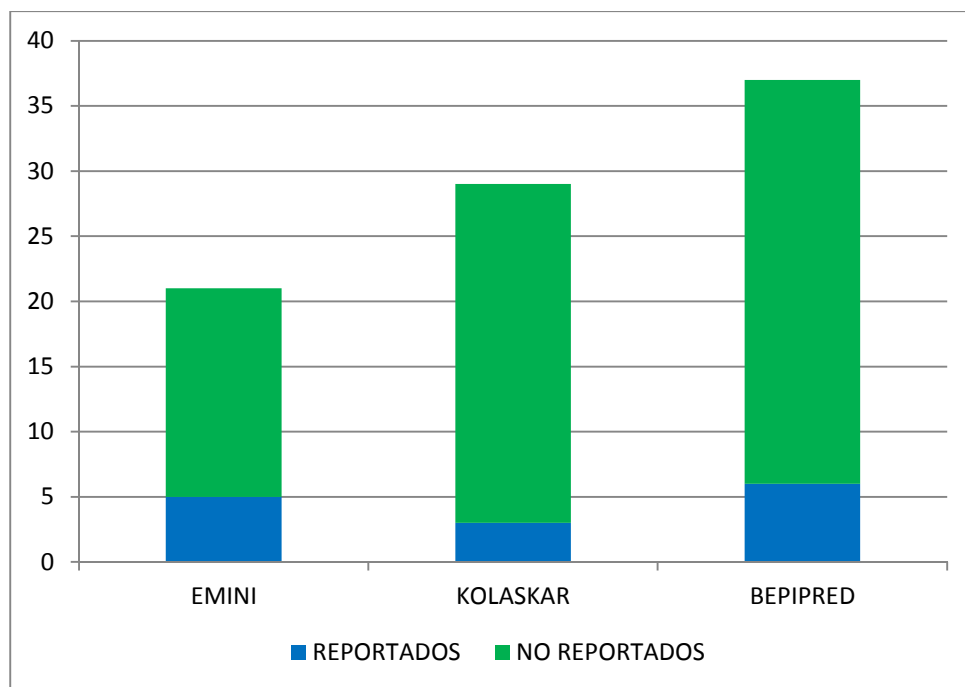


Figura 24. Gráfico comparativo de los epítomos encontrados experimentalmente y los determinados mediante software bioinformáticos.

En cuanto a los métodos de extracción ayudaron a identificar, mediante electroforesis, cuál de los dos ofrece mayor rendimiento. De esta manera en la Fig. 25 se observa que ambos métodos permitieron la obtención de bandas de un alto peso molecular con poca presencia de bandas de menor tamaño, lo que nos habla de una buena integridad del material obtenido. En el extracto obtenido por robot se observa una mayor concentración del producto, ya que la banda se muestra más intensa y, aunque en la extracción manual no se observan bandas inespecíficas, a diferencia de la extracción por robot, no se puede asegurar que estas no existan, ya que puede ser debido a un efecto de concentración.

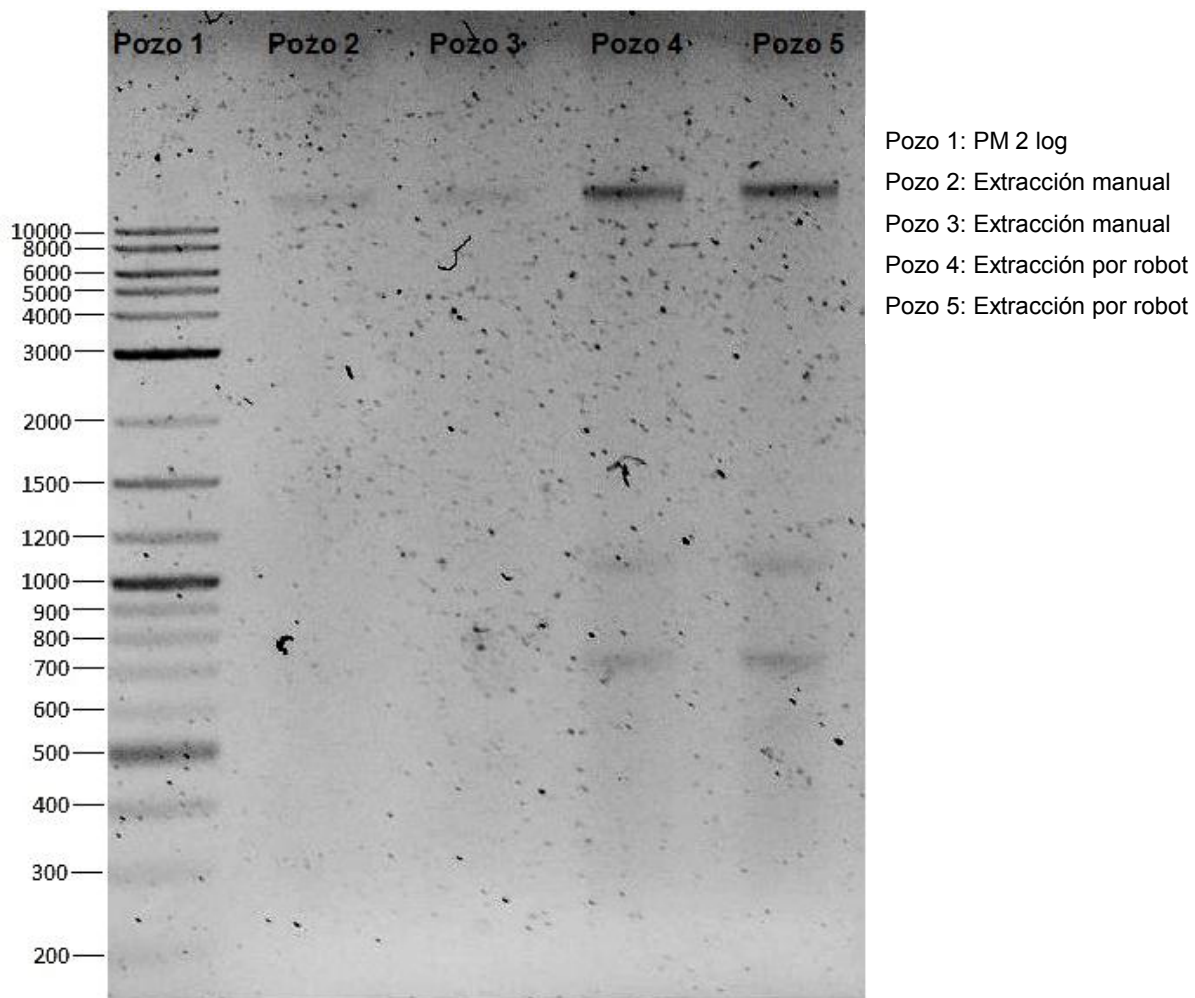


Figura 25. Extracción manual y por Robot. Gel de agarosa al 1.5% en TBE corrido a 85 volts que muestra las bandas obtenidas por extracción manual y por Robot.

El producto de la reacción de PCR con gradiente de temperatura se corrió en un gel de agarosa al 1.5% rediseuelto en TBE 1X para determinar la temperatura óptima (Fig. 26). Observando cada banda, se decidió seleccionar la temperatura de 57.9°C, ya que es la que muestra menos presencia de bandas inespecíficas.

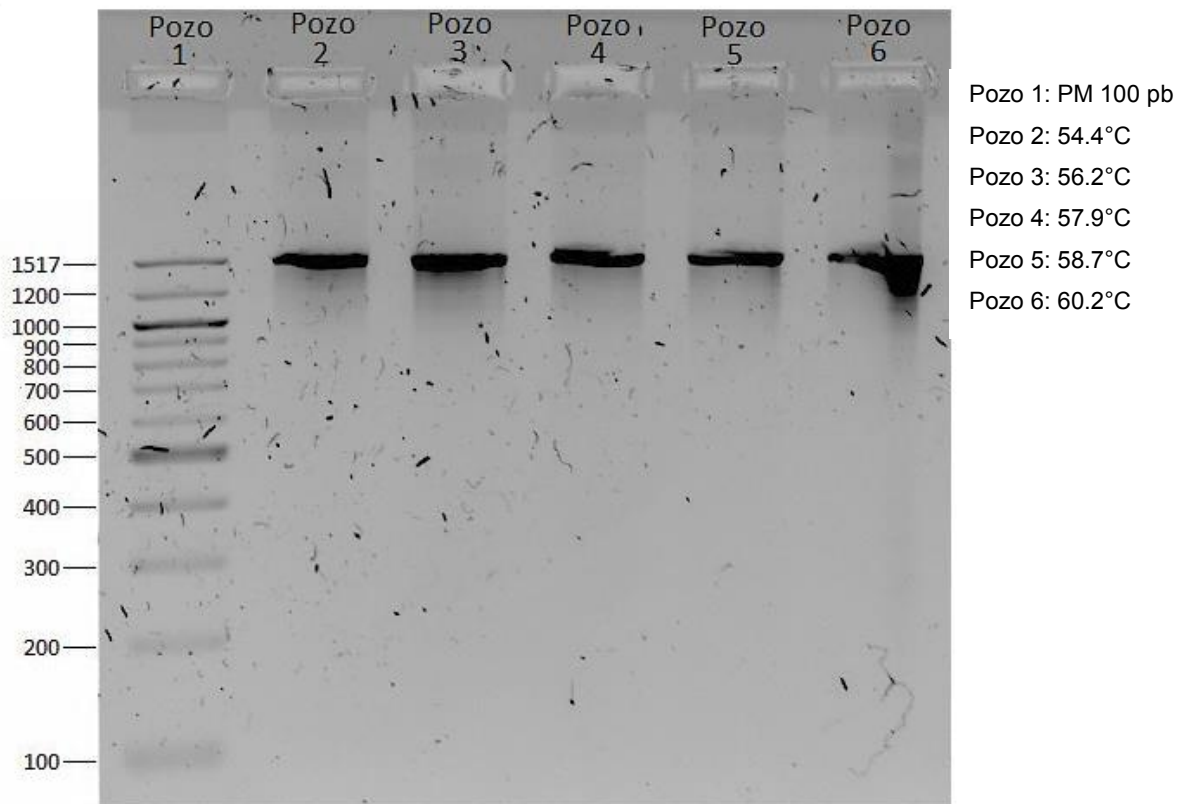


Figura 26. Estandarización de la T_m de los primers. Gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X corrido a 85 volts que muestra las bandas obtenidas a partir de las reacciones de RT-PCR con gradiente de temperatura para determinar la T_m experimental.

En la Fig. 27 se observa un gel de agarosa en TBE 1X al 1.5% que demuestra la presencia de la banda representativa del gen de la Nucleoproteína. De esta manera se tuvo la certeza que el gel de agarosa en TBE 1X al 1.5% donde se corrieron las 8 reacciones de PCR contiene el fragmento que codifica para el gen NP, a pesar de que la banda muestra un tamaño menor (Fig. 28).

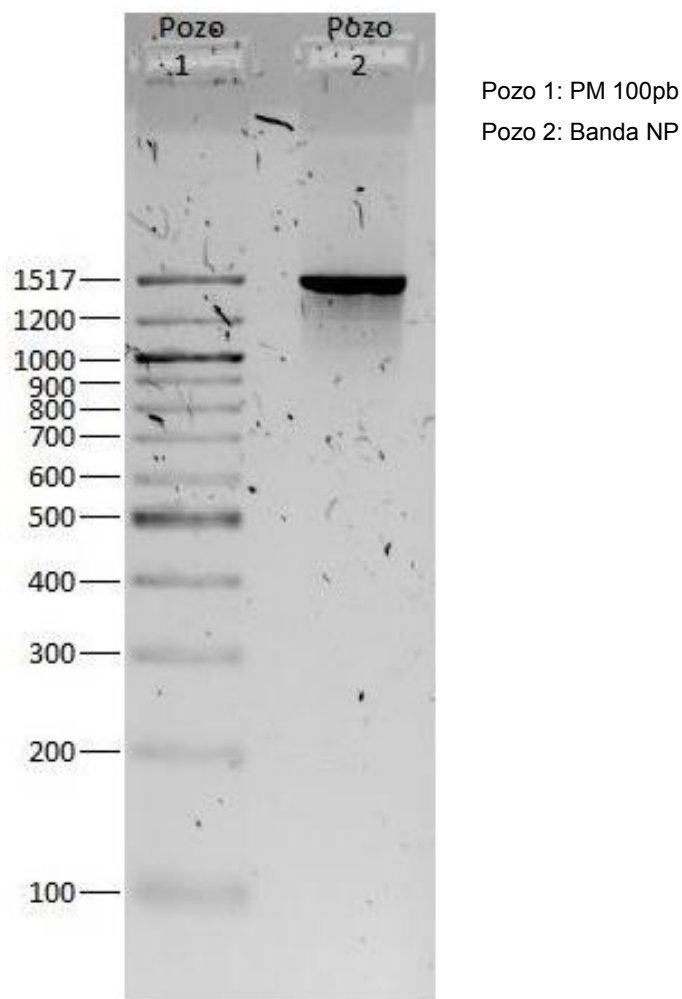


Figura 27. Comprobación de la presencia de la banda NP. Gel de agarosa en TBE 1X al 1.5% corrido a 85 Volts que muestra la banda obtenida por PCR que corresponde al fragmento que codifica para la nucleoproteína.

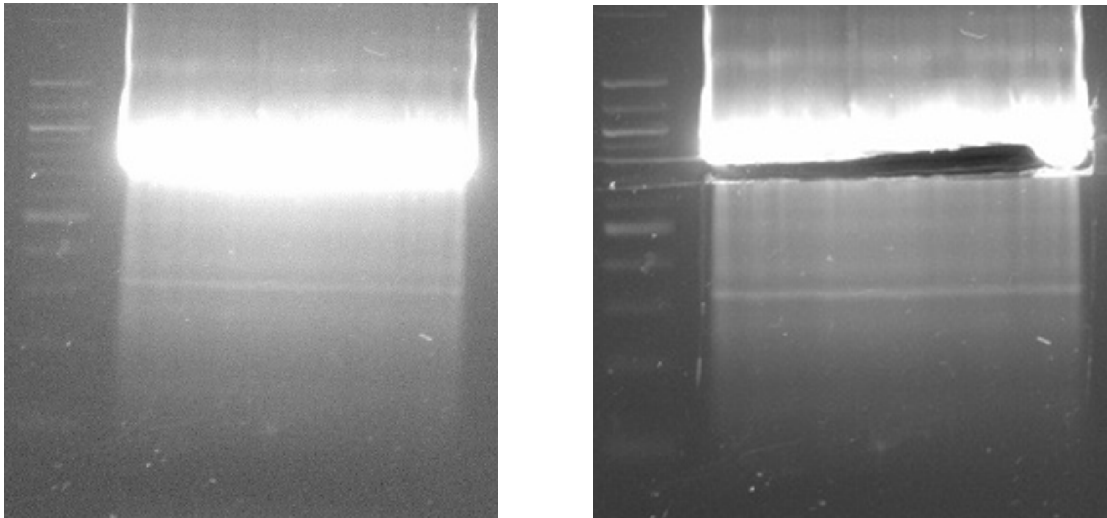


Figura 28. Obtención del fragmento NP para purificación. Gel de agarosa en TBE 1X al 1.5% corrido a 85 Volts que muestra; a la izquierda banda larga de NP, obtenida por PCR, a la derecha, corte de la banda larga de NP para su purificación.

Una vez purificada la porción del gel que contiene el fragmento NP se corrió un gel de agarosa para corroborar el éxito de la purificación (Fig. 29), observando que no existen bandas inespecíficas y que su tamaño corresponde al esperado.

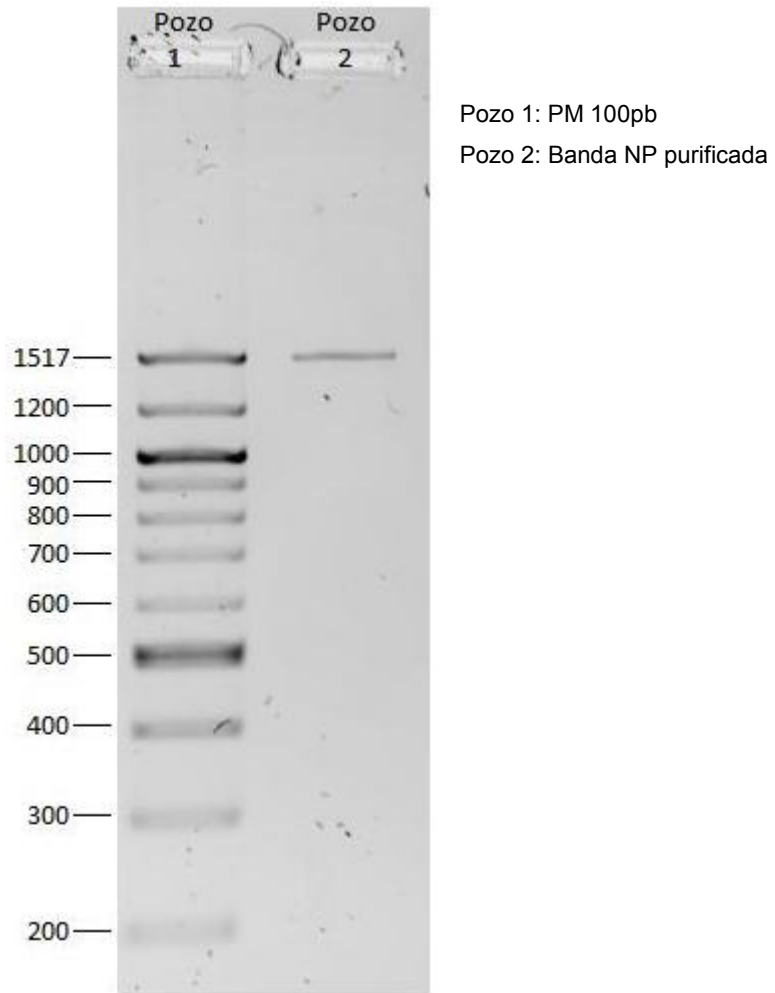


Figura 29. Purificación del fragmento NP. Gel de agarosa en TBE 1X al 1.5% corrido a 85 Volts que muestra el éxito de la purificación de la banda NP.

Con el fragmento NP purificado se llevó a cabo la ligación dentro del vector y posteriormente la clonación, donde se obtuvieron 5 colonias aisladas, las cuales se analizaron por PCR para determinar si se trataban de clonas positivas (Fig. 30). Se observa que en todas las colonias se ligó el segmento NP en el vector, sin embargo 3 de ellas se encuentran contaminadas (colonias 2, 3 y 5), ya que se observa mucho bandedo. Únicamente 2 colonias muestran el fragmento NP sin contaminación (colonia 1 y 4) (Fig. 30).

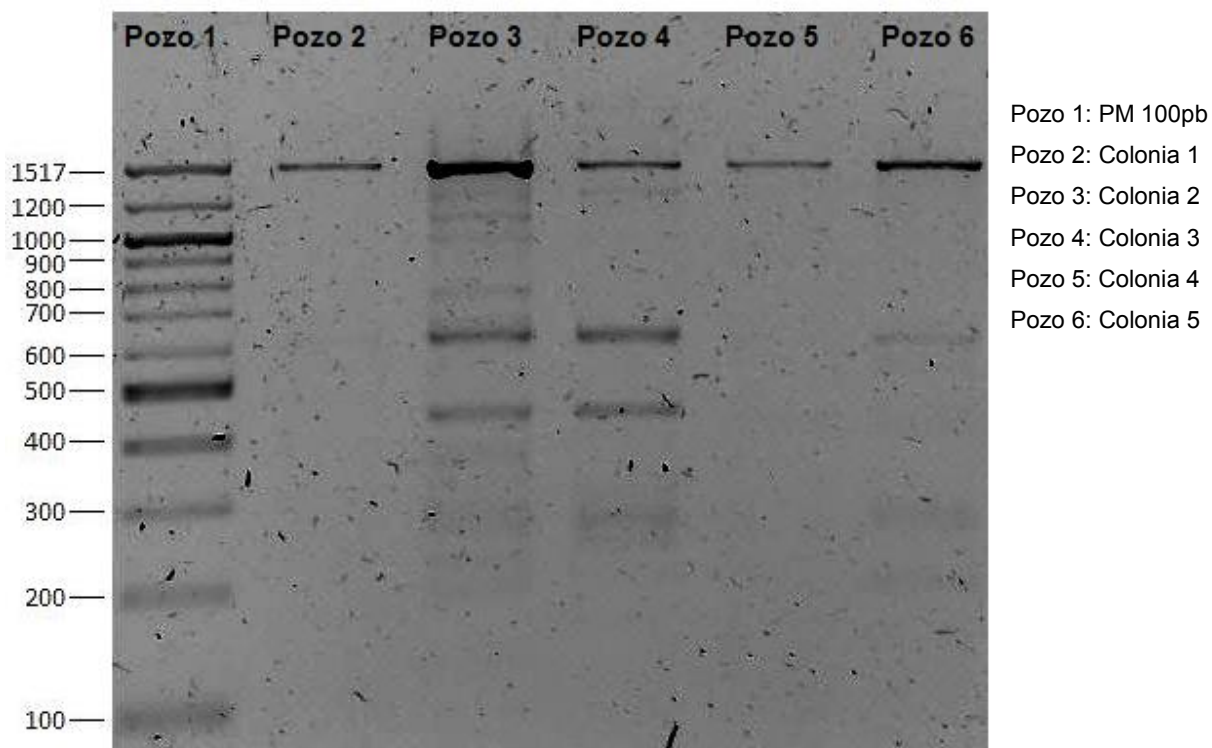


Figura 30. PCR de colonia. Gel de agarosa en TBE 1X al 1.5% corrido a 85 Volts que muestra las bandas obtenidas a partir de los productos de PCR de colonia.

Partiendo de lo anterior, se tomaron muestras de las colonias 1 y 4, se procesaron como se indica en sección de métodos y se purificaron los plásmidos recombinantes mediante el estuche Invisorb® Spin Plasmid Mini Two. La purificación se analizó mediante PCR para determinar la presencia del fragmento NP mediante su amplificación. Se decidió correr un gel de agarosa con el producto de PCR y el plásmido purificando, observando que la banda se encuentra en el peso correcto para NP y el plásmido muestra sus tres bandas correspondientes (Fig. 31).

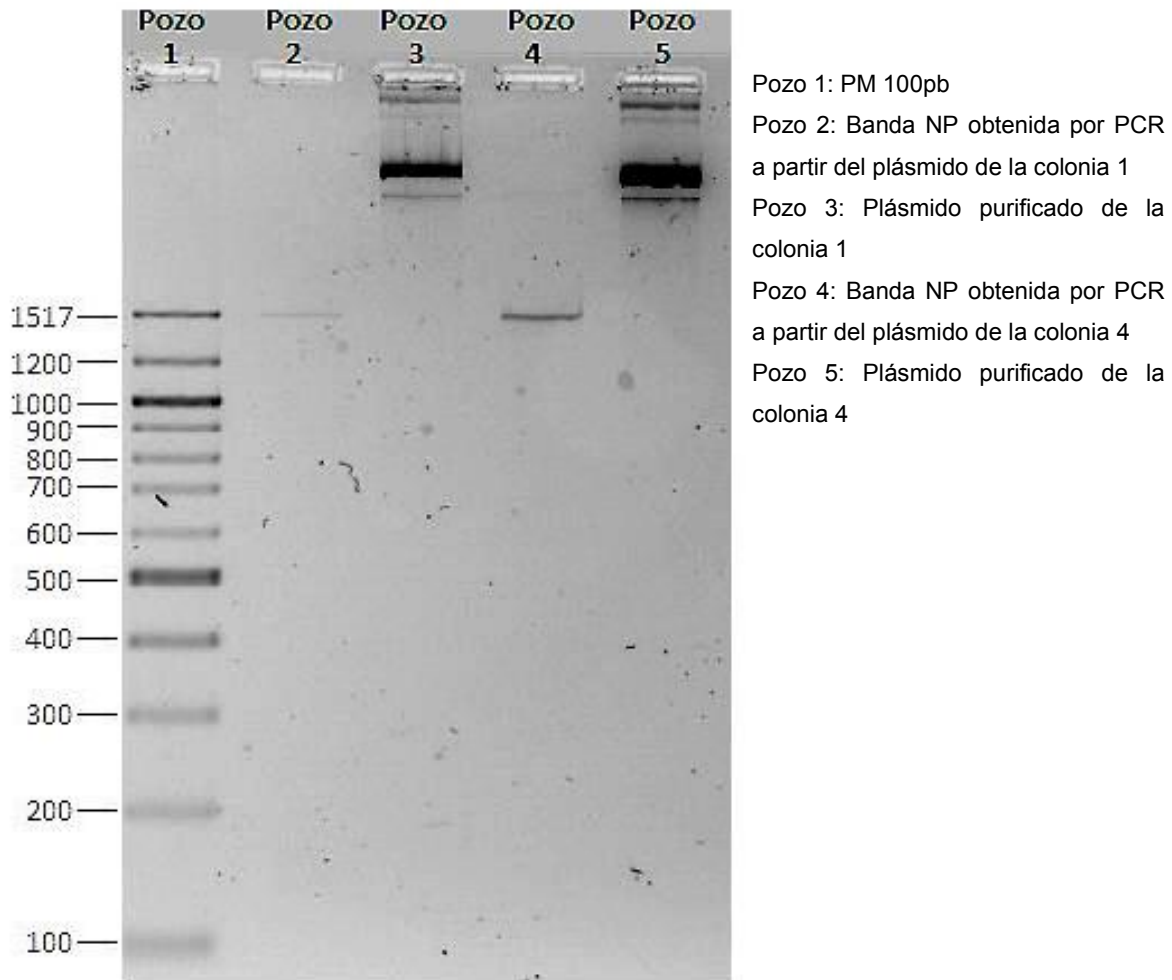


Figura 31. Plásmidos purificados y presencia del fragmento NP. Gel de agarosa en TBE 1X al 1.5% corrido a 85 Volts que muestra las bandas del fragmento NP obtenidas por PCR a partir de los plásmidos obtenidos y bandas representativas de los plásmidos purificados.

Una vez que se obtuvieron los plásmidos purificados y se corroboró la presencia del gen NP, se realizó el análisis de restricción. Se observó que únicamente el plásmido purificado de la colonia 4 mostraba las bandas esperadas para dicho análisis (Fig. 32), mientras que el plásmido purificado de la colonia 1 mostró bandas que no corresponden a los pesos esperados (Fig. 33).

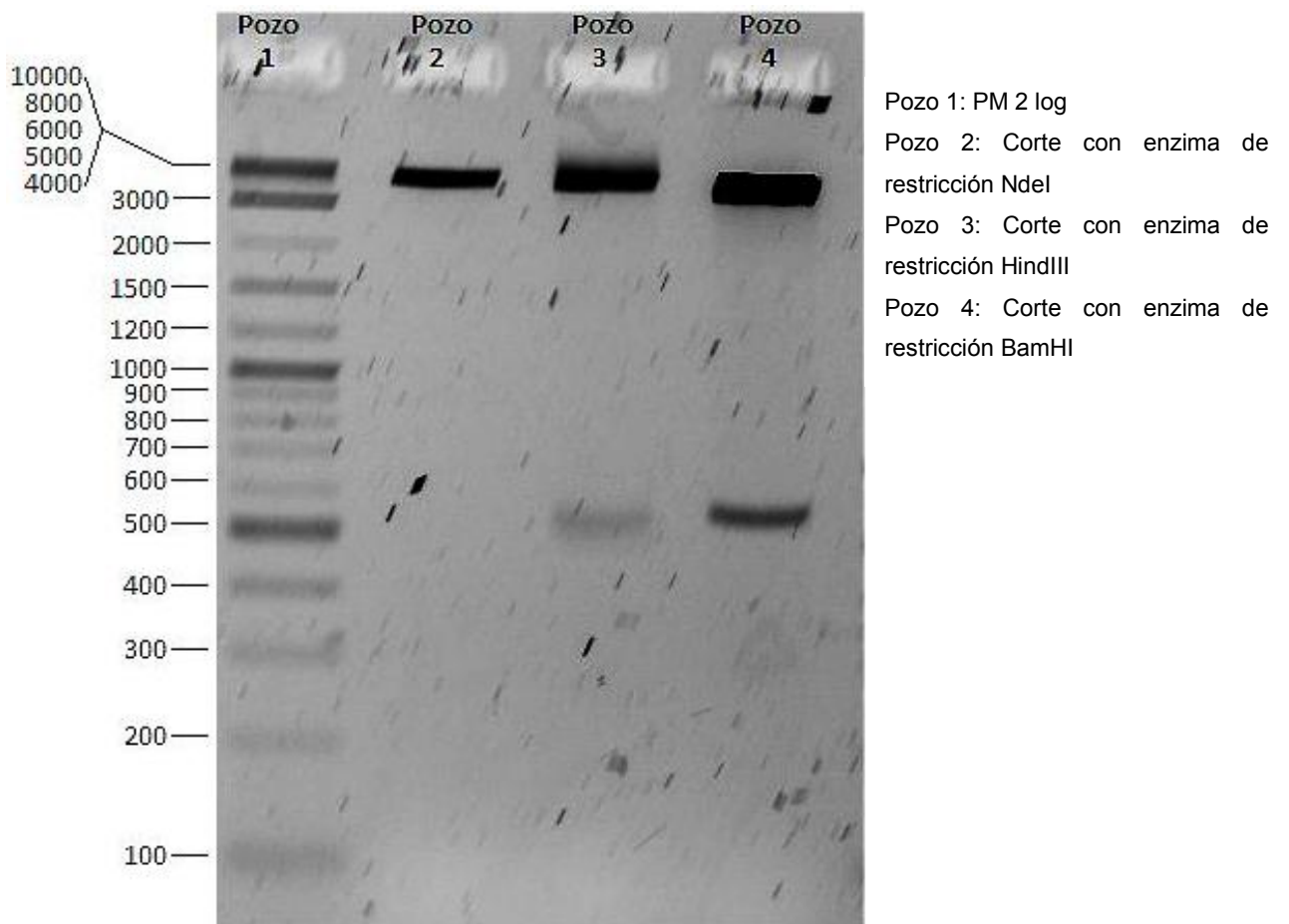


Figura 32. Análisis de restricción colonia 4. Gel de agarosa en TBE 1X al 1.5% corrido a 85 Volts que muestra el análisis de restricción para NP, tomado de la colonia 4.

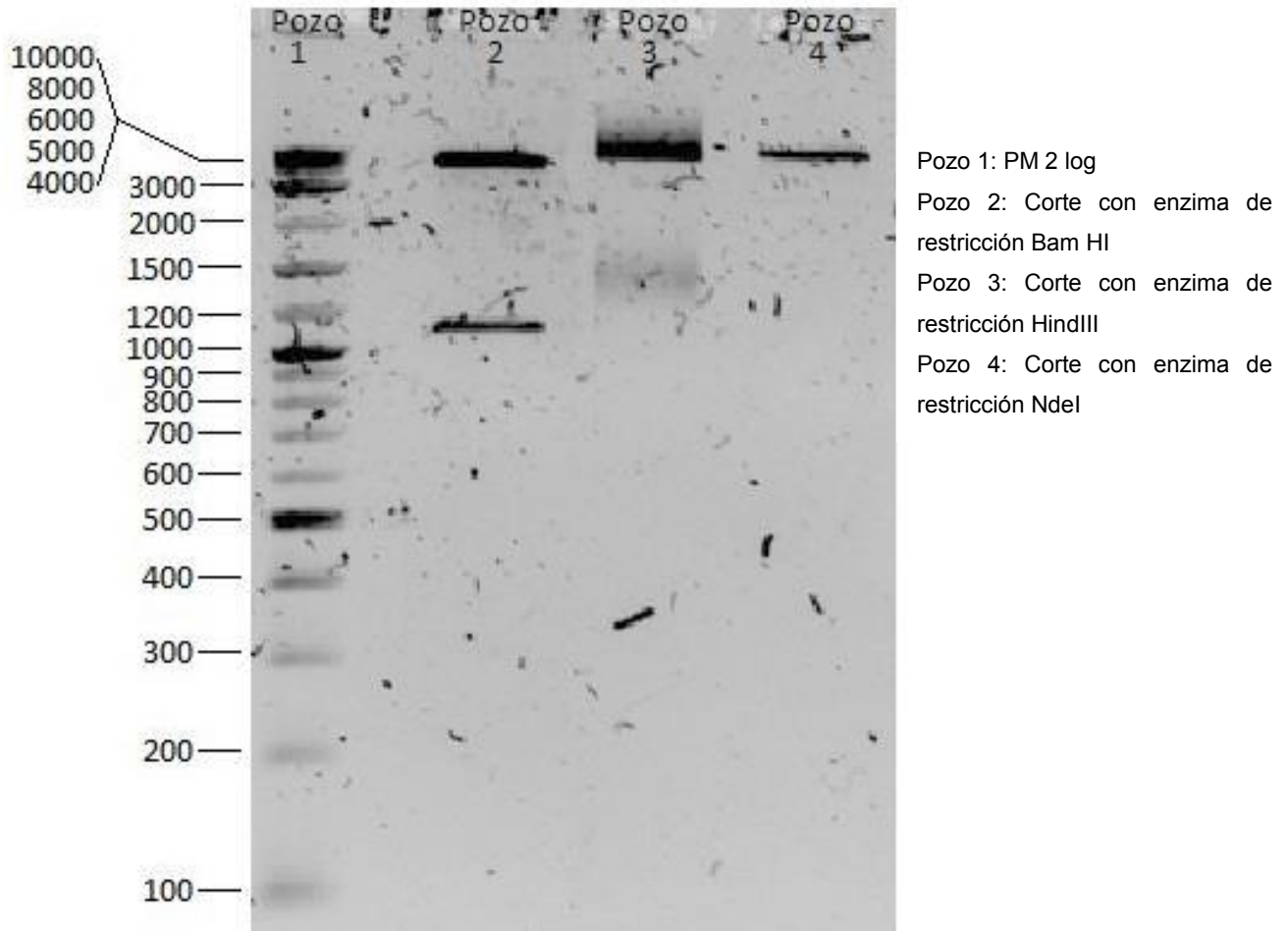


Figura 33. Análisis de restricción colonia 1. Gel de agarosa en TBE 1X al 1.5% corrido a 85 Volts que muestra el análisis de restricción para NP, tomado de la colonia 1.

Debido a que la colonia 1 mostró el mapa de restricción esperado se mandó a secuenciar para demostrar que el inserto se encuentra en el sentido correcto, por lo que no fue necesario mandar a secuenciar todo el plásmido. El tamaño del fragmento a secuenciar fue de 1831 pb. Para observar el total de la secuencia de la proteína NP se utilizó el primer sentido Polyhedrin, el cual se ancla 181 aminoácidos río abajo del sitio de inserción y el primer reverso SV 40 el cual se ancla 89 aminoácidos río arriba del sitio de inserción.

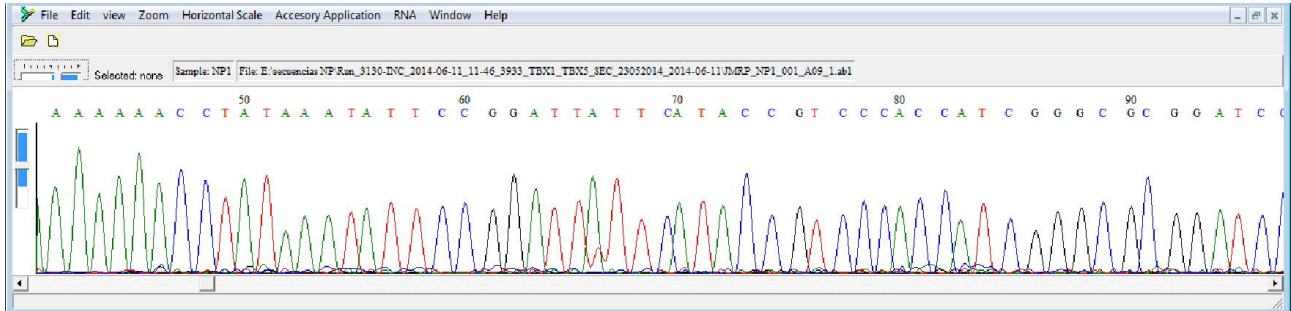


Figura 34. Electroferograma de secuenciación del gen NP.

Una vez obtenidas las secuencias, se realizó un alineamiento múltiple con ayuda del programa Megalign para comprobar homología

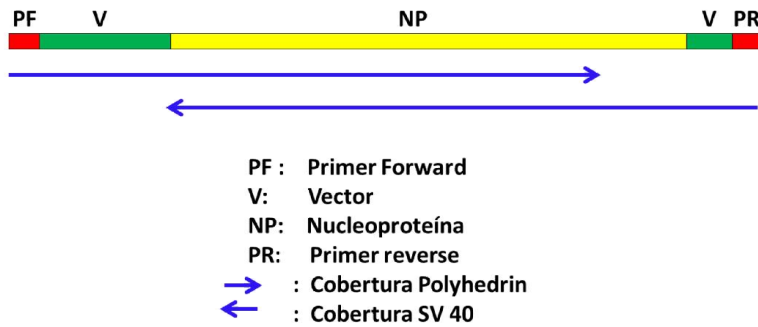


Figura 35. Esquema de la cobertura obtenida por la secuenciación.

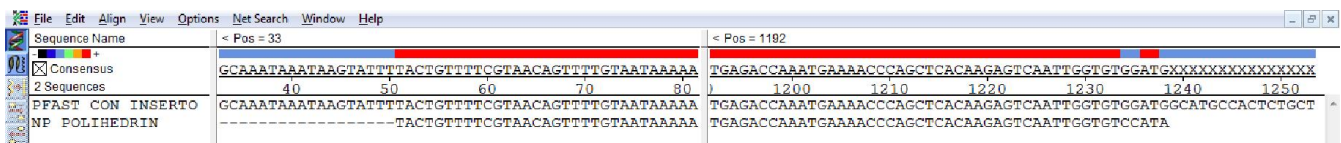


Figura 36. Alineamiento múltiple entre la secuencia del vector pFAST con el inserto NP y la secuencia obtenida con el primer sentido Polhyedrin.



Figura 37. Alineamiento múltiple entre la secuencia del vector pFAST con el inserto NP y la secuencia reversa complementaria obtenida con el primer reverso SV 40.

Como se observa en el alineamiento, el plásmido contiene la secuencia completa del gen NP y ésta se encuentra en sentido correcto, por lo que se pudo proceder con la subclonación obteniendo 3 colonias con fenotipo característico de clona positiva (Fig. 38). De las colonias seleccionadas se purificó el DNA bacmídico con el estuche PureLink® HiPure Plasmid DNA Purification y se procedió a su análisis.

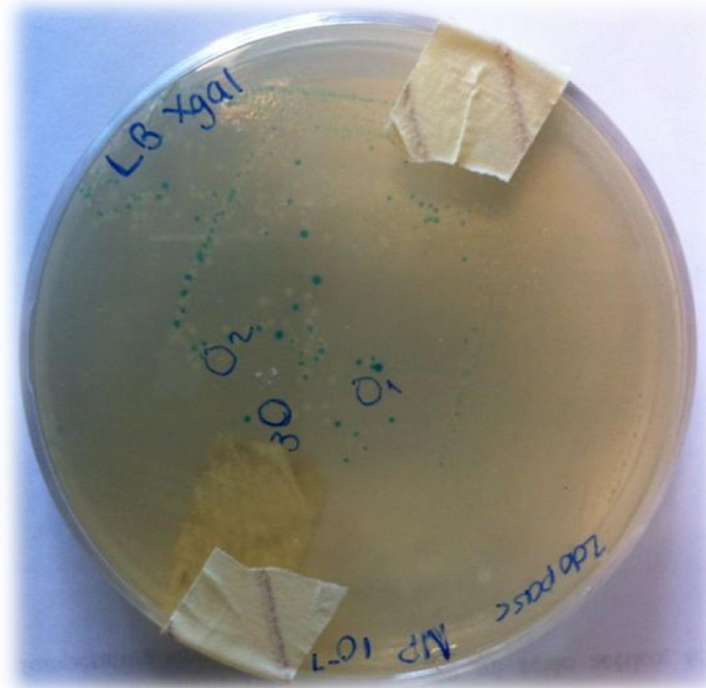


Figura 38. Colonias obtenidas en la subclonación. Placa de agar LB con kanamicina, gentamicina, tetraciclina, X-gal e IPTG. Muestra colonias azules y colonias blancas que fueron seleccionadas, ya que contienen el DNA bacmídico.

El análisis por PCR de las tres clonas obtenidas muestra que únicamente la colonia 2 presenta la banda que corresponde al tamaño esperado (Fig. 39).

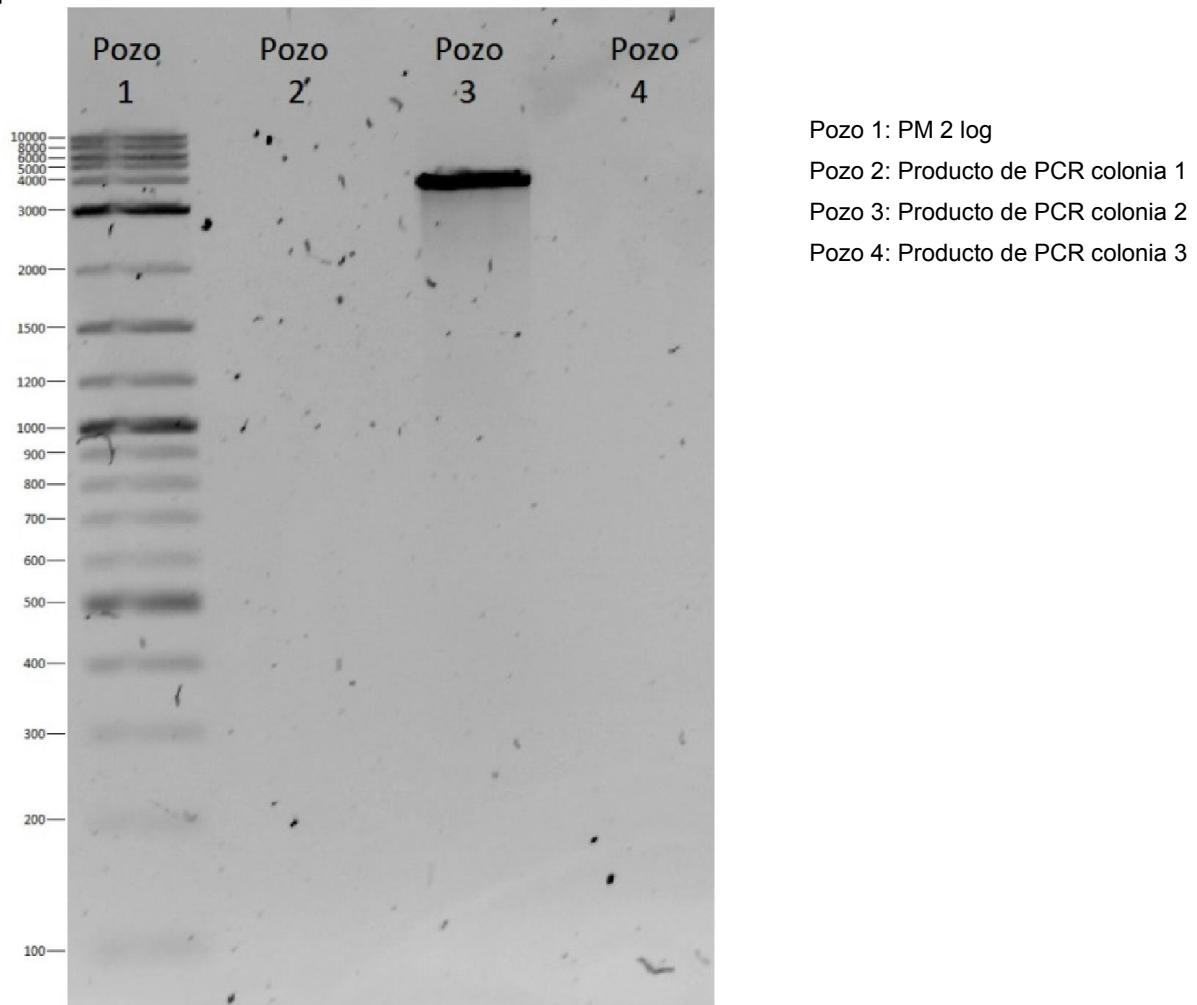


Figura 39. Análisis por PCR del DNA bacmídico. Gel de agarosa en TBE 1X al 1% que muestra la banda obtenida a partir de los productos de PCR del DNA bacmídico.

Por lo que dicha clona se mandó a secuenciar demostrando que el DNA bacmídico tiene el inserto y en el sentido correcto (Fig. 40-43).

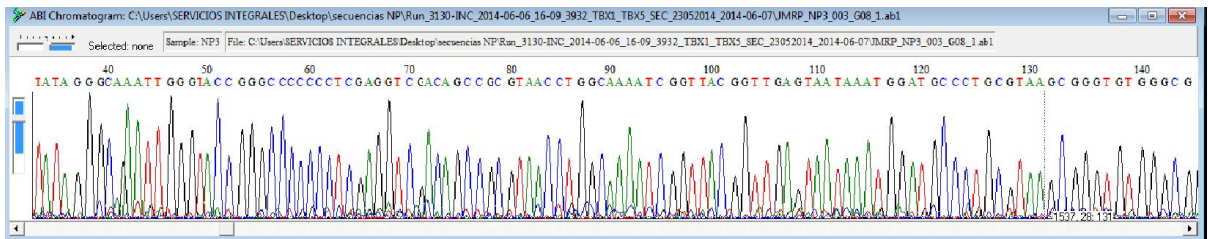


Figura 40. Electroferograma de secuenciación del gen NP en el DNA bacmídico.

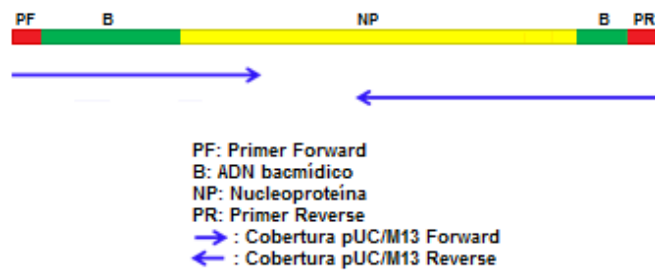


Figura 41. Esquema de la cobertura obtenida por secuenciación.

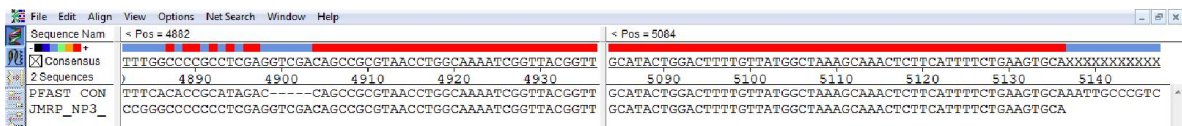


Figura 42. Alineamiento múltiple entre la secuencia del DNA bacmídico con el inserto NP y la secuencia obtenida con el primer pUC/M13 forward.

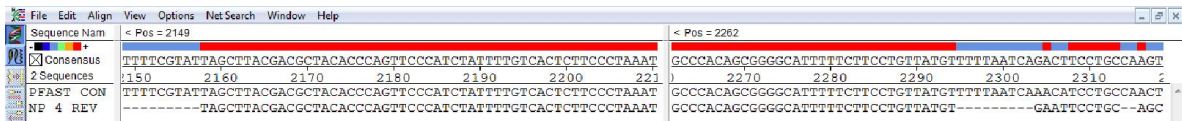


Figura 43. Alineamiento múltiple entre la secuencia del DNA bacmídico con el inserto NP y la secuencia reversa complementaria obtenida con el primer reverso pUC/M13 reverse.

9. Discusión

La búsqueda en la base de datos IEDB junto con el análisis *in silico* realizados fueron pieza clave en la elección de la Nucleoproteína sobre otras proteínas del virus de influenza. Primero es importante señalar que los software bioinformáticos usados (Emini, Kolaskar y Bepipred) son capaces de predecir incluso epítomos que ya se han descrito experimentalmente, por lo que la predicción realizada por estos algoritmos son una buena evidencia para seleccionar a la proteína NP como una fuerte candidata para realizar investigación. Como se observa en la Tabla 2 sobre la distribución de epítomos de influenza por proteína, la NP es una de las que muestra mayor presencia de epítomos y además, por el análisis *in silico* realizado, se sabe que el número de epítomos reportados es por mucho inferior a los encontrados virtualmente, por lo que aún quedan diversos determinantes antigénicos por dilucidar. Además, un estudio indica que los anticuerpos dirigidos a la nucleoproteína pueden actuar en la inmunidad contra diferentes subtipos del virus influenza A⁴⁹, lo que sitúa a la nucleoproteína como una nueva proteína blanco para el desarrollo de nuevas estrategias para abatir el impacto que ocasiona el virus de influenza. Y cualquiera que sea la estrategia a seguir es importante contar con un punto de partida, es decir, con el gen que codifica la Nucleoproteína clonado.

El método de extracción por robot permitió obtener la materia de partida con una buena integridad y con una concentración adecuada para llevar a cabo la clonación. Mientras que el diseño de los primers permitió una amplificación delimitada en la región deseada, sin observarse bandas inespecíficas debidas a una mala hibridación o a amplicones producidos durante la PCR. De esta manera se obtuvieron productos de PCR cuyos extremos son romos, evitando así las uniones inespecíficas, ya sea entre los propios extremos del vector o entre los mismos fragmentos de DNA, teniendo la certeza de que únicamente se ligará un fragmento de DNA al sitio de unión del vector. A pesar de que esto representa una gran ventaja frente a otros tipos de vectores, aún quedan dos puntos por resolver;

determinar si el fragmento insertado corresponde al gen de interés y determinar el sentido en el que se ligó, por lo que fue necesario realizar análisis de las clonas positivas. El éxito de la clonación se pudo corroborar mediante tres pruebas realizadas; PCR de colonia, análisis de restricción y secuenciación. La PCR de colonia estableció la presencia de un gen dentro del vector cuyo tamaño era 1500 pb aproximadamente. El análisis de restricción permitió esclarecer que dicho gen se trataba del fragmento NP, mediante el mapa de restricción obtenido para las tres enzimas utilizadas. Y por último, la secuenciación determinó el sentido correcto del gen dentro del plásmido pFastBac HBM-Topo.

De esta manera, una vez corroborado que el fragmento NP se encontraba dentro del plásmido y en el sentido indicado, se pudo proceder a realizar una subclonación. La importancia de esta subclonación radica en dejar dispuesta la materia prima para el siguiente paso, para ello es necesario obtener DNA bacmídico recombinante, con el que es posible transfectar células de insecto obteniendo un baculovirus capaz de producir la proteína. En esta parte las clonas presuntamente positivas fueron seleccionadas de acuerdo a su fenotipo, es decir, el color blanco de la colonia, ya que en ellas el marco de lectura del gen lacZ se interrumpió debido a la inserción del fragmento transponible dentro del DNA bacmídico, evitando así la formación de la enzima capaz de metabolizar el sustrato cromógeno observando colonias blancas en el cultivo.

Por último, se realizaron dos análisis al DNA bacmídico recombinante: PCR y secuenciación. En donde la PCR nos demostró la presencia de un segmento de 1500 pb aproximadamente dentro del DNA bacmídico y con la secuenciación fue posible corroborar que dicha secuencia en efecto se trataba del gen de la nucleoproteína.

De esta forma, se deja la materia prima lista para proceder con la obtención de la proteína NP recombinante para posteriores estudios que se deseen realizar.

10. Conclusiones

El diseño de iniciadores y las condiciones de amplificación permitieron obtener el material genético adecuado para ligarse exitosamente en el plásmido pFastBac obteniendo así el plásmido recombinante pFastBac/HBM-Topo/NPr.

El estuche Invisorb[®] Spin Plasmid Mini Two permitió purificar el plasmido pFastBac/HBM Topo/NPr a partir de un cultivo de células *E. coli*.

El plásmido recombinante pFastBac/HBM-Topo/NPr fue analizado por tres métodos. La PCR de colonia estableció la presencia del inserto NP dentro de los plásmidos recuperados. Mientras que el análisis de restricción y secuenciación permitieron tener la certeza de que el inserto clonado en el plásmido pFastBac corresponde a la secuencia completa del gen NP del virus de la influenza A H1N1pdm/09, y que se encuentra en sentido correcto.

Por todo lo anterior se establece que el sistema de expresión Bac-to-Bac HBM TOPO generó clonas que contienen el gen completo de la Nucleoproteína, aptas para ser usada como materia prima en nuevas iniciativas para contrarrestar los efectos causados por el virus de influenza A H1N1.

11. Perspectivas

Las perspectivas de trabajos futuros se orientan en dos direcciones:

Hacia la utilización de la proteína recombinante NP en la búsqueda de nuevos sitios antigénicos constantes que permitan elaborar una vacuna que ofrezca una respuesta inmune más duradera y con mayor cruce antigénico con cepas emergentes.

En segundo término la implementación de un nuevo sistema para la producción de antígenos virales que no requiera de huevos embrionados y que sea fácilmente escalable. Esto ayudaría a reducir el tiempo de espera para la generación de vacunas y sería especialmente útil en el caso de brotes de nuevas cepas del virus influenza.

12. Referencias

1. Kukol A, Hughes DJ. Large-scale analysis of influenza A virus nucleoprotein sequence conservation reveals potential drug-target sites. *Virology* 2014; 454-455:40-47.

2. Xu R, McBride R, Paulson JC, Basler CF, Wilson IA. Structure, receptor binding, and antigenicity of influenza virus hemagglutinins from the 1957 H2N2 pandemic. *J Virol* 2010; 84(4):1715-1721.

3. Kasowski EJ, Garten RJ, Bridges CB. Influenza pandemic epidemiologic and virologic diversity: reminding ourselves of the possibilities. *Clin Infect Dis* 2011; 52 Suppl 1:S44-S49.

4. Malaquías López-Cervantes. La influenza A/H1N1 2009. Una crónica de la primera pandemia del siglo XXI. *Revista Digital universitaria* 11[04], 1-17. 1-4-2010.

Ref Type: Magazine Article

5. Zhang H, Wang L, Compans RW, Wang BZ. Universal influenza vaccines, a dream to be realized soon. *Viruses* 2014; 6(5):1974-1991.

6. Noah DL, Noah JW. Adapting global influenza management strategies to address emerging viruses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 305(2):L108-L117.

7. World Health Organization. Fact Sheet 211. 14-4-2009.

Ref Type: Internet Communication

8. Centro Nacional de Programas Preventivos y control de Enfermedades. Influenza A H1N1 y fortalecimiento en la red de laboratorios. 31-10-2012. 27-8-2013.

Ref Type: Internet Communication

9. García García J., Ramos C. La influenza, un problema vigente de salud pública. Salud Pública de México 40[3], 244-267. 2006.

Ref Type: Magazine Article

10. Risk Management Solutions. Learning from the 2009 H1N1 Influenza pandemic. 2010. 27-8-2013.

Ref Type: Internet Communication

11. World Health Organization. Influenza Update N° 191 . 19-1-2013. 27-8-2013.

Ref Type: Internet Communication

12. Organización Panamericana de la Salud. Actualización regional SE 3, 2014. 28-1-2014. 27-4-2014.

Ref Type: Internet Communication

13. Organización Panamericana de la Salud. Actualización regional SE 21, 2014. 3-6-2014. 30-6-2014.

Ref Type: Internet Communication

14. Romero Cabello Raúl. Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3 ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007.

15. Cordova Villalobos, Valdespino Gómez, Ponce de León. La Epidemia de Influenza A/H1N1 en México. Editorial Médica Panamericana; 2010.

16. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog* 2013; 9(10):e1003657.
17. Dirección General de Epidemiología. Influenza: Documento técnico. 5-2-2014. Ref Type: Internet Communication
18. Jordi Rello, Martin H.Kollef, Emilio Díaz, Alejandro Rodríguez. Infectious diseases in critical care. 2 ed. Germany: Springer; 2010.
19. Doherty PC, Turner SJ, Webby RG, Thomas PG. Influenza and the challenge for immunology. *Nat Immunol* 2006; 7(5):449-455.
20. Portela A, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 2002; 83(Pt 4):723-734.
21. Reguera J, Cusack S, Kolakofsky D. Segmented negative strand RNA virus nucleoprotein structure. *Curr Opin Virol* 2014; 5:7-15.
22. Ng AK, Wang JH, Shaw PC. Structure and sequence analysis of influenza A virus nucleoprotein. *Sci China C Life Sci* 2009; 52(5):439-449.
23. Li Z, Gabbard JD, Mooney A, Gao X, Chen Z, Place RJ et al. Single-dose vaccination of a recombinant parainfluenza virus 5 expressing NP from H5N1 virus provides broad immunity against influenza A viruses. *J Virol* 2013; 87(10):5985-5993.
24. Skowronski DM, De SG, Dickinson J, Petric M, Mak A, Fonseca K et al. Component-specific effectiveness of trivalent influenza vaccine as monitored through a sentinel surveillance network in Canada, 2006-2007. *J Infect Dis* 2009; 199(2):168-179.

25. Centers for Disease Control and Prevention. Selección de virus en la vacuna contra la influenza estacional. 22-9-2014.

Ref Type: Internet Communication

26. Alexander Piñón Ramos, Suset Oropesa Fernández, Carlos Aragonés López, Belkis Galindo, Belsy Acosta Herrera, Bárbara Hernández Espinosa. Influenza y vacunación. *Rev Biomed* 2005; 16(1):45-53.

27. Risk Management Solutions. Learning from the 2009 H1N1 Influenza pandemic. 2010. 27-8-2013.

Ref Type: Internet Communication

28. Bruce Alberts, Dannis Bray, Karel Hopkin, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff et al. Introducción a la biología celular. 3 ed. México, D.F.: Médica Panamericana; 2011.

29. Petersen BO, Shuman S. DNA strand transfer reactions catalyzed by vaccinia topoisomerase: hydrolysis and glycerololysis of the covalent protein-DNA intermediate. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(11):2091-2097.

30. Invitrogen. Bac-to-Bac® TOPO® Cloning Kit. 15-7-2009. 28-8-2013.

Ref Type: Internet Communication

31. Takashi Tokino, Tomoaki Murotsu, Kenichi Matsubara. Purification and properties of the mini-F plasmid-encoded E protein needed for autonomous replication control of the plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:4109-4113.

32. Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J Virol* 1993; 67(8):4566-4579.

33. Terry A Brown. Genomes. 3 ed. Argentina: Médica Panamericana; 2008.
34. Benjamin A Pierce. Genética: Un enfoque conceptual. 3 ed. España: Editorial Médica Panamericana; 2009.
35. Thomas M.Devlin. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. 4 ed. España: Editorial Reverté; 2004.
36. Parks AR, Peters JE. Transposon Tn7 is widespread in diverse bacteria and forms genomic islands. *J Bacteriol* 2007; 189(5):2170-2173.
37. Mitra R, McKenzie GJ, Yi L, Lee CA, Craig NL. Characterization of the TnsD-attTn7 complex that promotes site-specific insertion of Tn7. *Mob DNA* 2010; 1(1):18.
38. A.V.S.S.Sambamurty. Molecular biology. India: Alpha science International; 2008.
39. Invitrogen. Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems. 2002. 25-6-2014.
Ref Type: Internet Communication
40. Mark Wheelis. Principles of Modern Microbiology. E.U.A: Jones & Bartlett Learning; 2011.
41. David P.Clark, Nanette J.Pazdernik. Biotechnology. China: Elsevier; 2012.
42. Leland J.Cseke, Ara Kirakosyan, Peter B.Kaufman, Margaret V.Westfall. Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine. 3 ed. USA: CRC Press; 2011.

43. Gerard J.Tortora, Berdell R.Funke, Christine L.Case. Introducción a la microbiología. 9 ed. Argentina: Médica Panamericana; 2007.

44. Eberhard Passarge. Genética: Texto y atlas. 3 ed. España: Médica Panamericana; 2010.

45. Benjamin A.Pierce. Genética: Un enfoque conceptual. 3 ed. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2009.

46. José María Teijón Rivera, Amando Garrido Pertierra, Dolores Blanco Gaitán, et al. Fundamentos de bioquímica estructural. 2 ed. Madrid: Editorial Tebar; 2006.

47. Invitrogen. Bac-to-Bac® HBM TOPO® Secreted Expression System. 15-7-2009. 28-8-2013.

Ref Type: Internet Communication

48. Immune Epitope Database. Antibody Epitope Prediction. 2013. 11-10-2013.

Ref Type: Online Source

49. Bodewes R, Geelhoed-Mieras MM, Wrammert J, Ahmed R, Wilson PC, Fouchier RA et al. In vitro assessment of the immunological significance of a human monoclonal antibody directed to the influenza A virus nucleoprotein. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20(8):1333-1337.