



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

“CLONACIÓN DE LA PROTEÍNA
HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE INFLUENZA A (H1N1)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA.

PRESENTA:

KARLA PENÉLOPE MONTOYA GAMA

México, D.F.

2015.





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María Benita Leonor Fernández Salgado

VOCAL: Profesor: Samuel Canizales Quinteros

SECRETARIO: Profesor: Juan Pablo Reyes Grajeda

1er. SUPLENTE: Profesor: Nancy Monroy Jaramillo

2° SUPLENTE: Profesor: Silvia Karina Godinez Palma

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA
GENÓMICA, INMEGEN.

ASESOR DEL TEMA: DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA

SUSTENTANTE (S): KARLA PENÉLOPE MONTOYA GAMA

CLONACIÓN DE LA PROTEÍNA
HEMAGLUTININA DEL VIRUS DE INFLUENZA: A H1N1



“El cambio es inherente a la vida”

Charles Darwin

Contenido

1. ABREVIATURAS	6
2. RESUMEN.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
4. MARCO TEÓRICO.....	9
4.1. Propiedades de los Ortomixovirus (virus de la Influenza).....	9
4.2. Estructura y composición.	9
4.3. Antecedentes del virus de Influenza.	10
4.4. Clasificación y nomenclatura.	13
4.5. Estructura y función de la Hemaglutinina.....	14
4.6. Desviación y cambios antigénicos.	15
4.7. Tratamiento.	17
4.8. Sobreexpresión de proteínas (Producción de proteínas recombinantes).....	19
4.8.1. Aspectos generales sobre la producción de proteínas recombinantes.....	20
4.8.2. Elección del sistema de expresión.	21
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
6. JUSTIFICACIÓN.....	23
7. OBJETIVOS	24
7.1. Objetivo General.....	24
7.2. Objetivo particular.....	24
8. METODOLOGÍA	25
8.1. Obtención de la muestra.....	25
8.2. Monitoreo de la integridad de las muestras.	25
8.2.1. Extracción y purificación del cDNA de las bandas.....	27
8.2.2. Poliadenilación de la muestra.	28
8.3. Clonación.....	29
A. Reacción de ligación de la muestra al vector.	29
B. Transformación química bacteriana.....	29
C. Análisis de las colonias positivas (plásmidos recombinantes).	30
D. Extracción y purificación del plásmido.....	32
8.4. Secuenciación.....	34
8.5. Análisis de las secuencias clonadas.....	35
8.6. Diseño de primers para el dominio globular de la hemaglutinina.	35
8.7. PCR de la secuencia globular.....	36

8.8. Clonación del dominio globular utilizando el vector pcDNA 3.1	37
8.8.1. Reacción de ligación de la muestra al vector.	37
8.8.2. Transformación química bacteriana.	37
8.9. Análisis de las colonias positivas.....	38
8.9.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	38
8.10. Extracción y purificación del plásmido.	39
8.11. Secuenciación.....	39
9. RESULTADOS.....	40
9.1. Monitoreo de la integridad de las muestras.	40
9.2. Clonación.....	41
9.2.1. Transformación química bacteriana.	41
9.2.2. Análisis de las colonias positivas.....	41
9.3. Extracción y purificación del plásmido.	43
9.4. Secuenciación.....	43
9.4.1. Secuenciación de la muestra del fragmento 4, colonia 4 con el primer XPRESS.	43
9.4.2. Secuenciación de la muestra del fragmento 4, colonia 4 con el primer BGH. 44	
9.5. Análisis de las secuencias clonadas.....	47
9.6. Diseño de primers para el dominio globular de hemaglutinina.	48
9.7. Clonación del dominio globular.....	50
9.7.1. Transformación química bacteriana.	50
9.7.2. Análisis de las colonias positivas.....	50
9.7.3. Extracción y purificación del plásmido.	51
9.8. Secuenciación.....	51
9.9 Análisis de las secuencias clonadas	53
10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	54
11. CONCLUSIÓN	57
12. PERSPECTIVAS	58
13. REFERENCIAS	59

1. ABREVIATURAS

A	Adenina
CA1	Determinante antigénico de la hemaglutinina
CA2	Determinante antigénico de la hemaglutinina
Cb	Determinante antigénico de la hemaglutinina
CDC	Centers of Disease Control (Centro para el control de enfermedades)
DNA/ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico recombinante
cDNA	Complement Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico complementario)
C	Citocina
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Guanina
µg	Micro gramos
HA / H	Hemaglutinina
H ₁	Carboxilo terminal de la Hemaglutinina
H ₂	Amino terminal de la Hemaglutinina
Kb	Kilobases
LB	Luria-Bertani (medio de agar)
µL	microlitros
M1	Proteína M1 del virus de influenza A H1N1
M2	Proteína M2 del virus de influenza AH1N1
NA / N	Neuraminidasa.
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína de exportación nuclear
OMS	Organización Mundial de la Salud
PA	Polimerasa A
PB1	Polimerasa B1
PB2	Polimerasa B2
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa.)
PDB	Protein Data Bank (Banco de datos de proteínas)
RNA	Ácido ribonucleico
RNA m	Ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa.)
Sa /b	Determinante antigénico de la hemaglutinina
T	Timina
Tm	Temperatura de fusión

2. RESUMEN

Luego de haber pasado ante el brote de epidemia de influenza AH1N1 que se presentó en México (Abril 2009), el gobierno tuvo que poner en marcha la respuesta ante tal crisis sanitaria internacional, la cual nos brindó un panorama más amplio en lo concerniente a organización, programas de prevención y vigilancia epidemiológica.

Los antivirales disponibles en esos momentos no eran eficaces en algunas poblaciones o a la aparición de cepas resistentes. Sin embargo, la pandemia del 2009 nos deja claro que se deben continuar los estudios científicos sobre la biología evolutiva y la patogenia que nos lleven a búsquedas de nuevos fármacos para los brotes de gripe en el futuro.

El presente trabajo hace uso de métodos de biología molecular para clonar la secuencia de DNA que codifica para la hemaglutinina del virus de influenza AH1N1, posteriormente se diseñan los cebadores que nos permiten levantar la secuencia de la parte globular de la proteína.

3. INTRODUCCIÓN

En abril del 2009, una nueva cepa virulenta de la gripe infecto a miles de personas en México y los Estados Unidos y se extendió rápidamente por todo el mundo, declarándose como pandemia por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 11 de junio del mismo año, anunciando el más alto nivel, la fase 6, que indica la transmisión en al menos dos continentes.

Estas epidemias (de los años 1918, 1957, 1968 Y 2009) son causadas por la variación antigénica, dando como resultado un nuevo virus con una nueva variante. Y es debido a que la población no posee una inmunidad previa contra las nuevas cepas, que la enfermedad se expande rápidamente causando gran mortalidad.

Así, para poder enfrentar un problema de tal envergadura, es necesaria la rápida producción de vacunas a escala masiva, ya que ésta es la manera más efectiva hasta la fecha para prevenir la morbilidad y mortalidad a gran escala.

Sin embargo, el proceso tradicional de producción de vacunas contra influenza ante una nueva variante es un proceso lento y laborioso. Estas limitaciones hacen difícil satisfacer los requerimientos globales y reducir una pandemia de influenza.

Basados en estas premisas, nos hemos enfocado mediante técnicas moleculares a la clonación de la proteína Hemaglutinina (HA) del virus de la influenza AH1N1, el cual es el principal antígeno de superficie del virus, pudiendo así usarse como blanco terapéutico y/o para el diseño de nuevos fármacos.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. Propiedades de los Ortomixovirus (virus de la Influenza).

Los Ortomixoviridae (virus de la influenza) son el principal determinante de la morbilidad y mortalidad causadas por la enfermedad respiratoria, y a veces se presentan brotes de infección en forma de pandemias. El nombre de esta enfermedad ha sido adoptado del italiano “*Influenza*” que significa “Influencia” o “Influjo”. Ya que se creía, en el siglo XV, que las epidemias se atribuían a la “influencia de las estrellas”. URL^{1,2}

La mutabilidad y la gran frecuencia de reordenamiento genético característico de los ortomixovirus, con los cambios antigénicos resultantes de las glucoproteínas de la superficie viral, son un desafío a los esfuerzos para controlar los virus de la influenza. La influenza tipo A es antigénicamente muy variable y es la causa de la mayor parte de los casos de epidemias de influenza. La influenza tipo B puede mostrar cambios antigénicos y a veces es causa de epidemias. La influenza tipo C es antigénicamente estable y en individuos inmunocompetentes sólo es causa de enfermedad leve.

4.2. Estructura y composición.

Las partículas virales de la influenza por lo general son pleomórfica, esféricas o filamentosa, su diámetro oscila entre 80 y 120 nm.

Los virus de la influenza A y B contienen genomas con 8 segmentos separados de RNA viral antisentido de cadena sencilla. Estos incluyen: tres transcriptasas (PB1, PB2 y PA), dos glucoproteínas de superficie, Hemaglutinina (HA) y Neuroaminidasa (NA), dos proteínas de matriz (M1 y M2), y una nucleoproteína (NP).

Los de tipo A son sensibles al calor (56° C 30 minutos), a pH \leq 3 y a los disolventes de lípidos así como a detergentes. Se inactivan con formol, beta-propiolactona, luz ultravioleta y radiaciones gamma sin alterar la especificidad antigénica. Suelen tener una gran inestabilidad genética dando lugar a variaciones antigénicas.

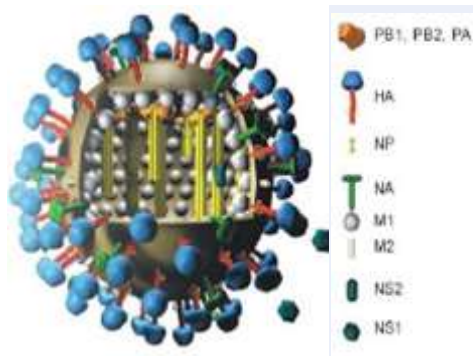


Figura 1. Estructura del virus de la Influenza *AH1N1, perteneciente a la familia Orthomyxoviridae.

*Virus de Influenza tipo A Hemaglutinina 1 Neuroaminidasa 1.

4.3. Antecedentes del virus de Influenza.

Las epidemias de influenza aparecen comúnmente en los meses de invierno con predominio en lugares donde el clima es frío y seco, lo que permite que el virus permanezca por más tiempo en el ambiente. Cada año, alrededor de 500 millones de personas (10% de la población total), se enferman de influenza, ocasionando entre 3 y 5 millones de casos severos y de 250 a 500 mil defunciones cada año.

URL1

Se ha observado que aproximadamente cada 40 años se presentan cambios mayores en los virus de la influenza, dando lugar a pandemias que afectan a millones de personas de todos los grupos de edad. URL1

Pandemias devastadoras tienen lugar cuando las poblaciones están expuestas a un nuevo subtipo vírico en ausencia de inmunidad pre-existente, como lo fue en los casos de la gripe española (1918-1919), la gripe asiática (1957-1958) y la gripe de Hong Kong (1968-1969) las cuales dejaron millones de muertes (Tabla. 1). La capacidad infecciosa de estos nuevos subtipos surge por mecanismos de reordenamiento genético.

La historia de las amenazas y pandemias previas demuestran que los nuevos subtipos de virus influenza A no aparecen a intervalos definidos como se tenía

reportado y que no todos los episodios de infecciones humanas con un nuevo subtipo de virus influenza pueden conducir a una pandemia.

Tabla 1. Pandemias de la Influenza del siglo XX. Tomada de Sami Al Hajjar & McIntosh [2]

Fecha	Cepa	Estimación del número de muertos	Comentarios
1918-1919 Gripe Española	H1N1	Más de 50 millones	Tres fases: una primera onda suave en la primavera de 1918, fue sustituida por una segunda ola, de Septiembre a Noviembre de 1918, que resultó en una tasa de mortandad superior al 2.5%. La tercera ola, igualmente con tasas de mortandad altas en el mundo en 1919. El virus probablemente se originó en E.U, hasta la propagación de Europa
1957-1958 Gripe Asiática	H2N2	1-1.5 millones	Dos fases: el virus originado en el sur de china (Kwichow, provincia de China) en Febrero de 1957 y se extendió por encima de tres meses a Singapur, Hong Kong, y Japón. Y en Octubre de 1957 alcanzó el Reino Unido y los Estados Unidos. Una segunda ola fue detectada en Enero de 1958.
1968-1969 Gripe de Hong Kong	H3N2	750,000 mil	Dos fases: en el invierno de 1968-1969 y 1969-1970. El virus se originó en Hong Kong en Julio de 1968. Su difusión fue más lenta e irregular que las anteriores

La temporada invernal, la humedad ambiental, el hacinamiento, los lugares públicos además de la globalización y facilidad para viajar, son factores que favorecen el contagio del virus de la influenza. Los virus se propagan en individuos que poseen niveles variables de inmunidad a partir de infecciones adquiridas tempranamente en la vida.

Cuando los virus pandémicos aparecen, puede haber varias ondas de brotes con un intervalo de 6 a 9 meses entre ellas, antes que el impacto total del nuevo virus sea experimentado. Esto sugiere que los programas de prevención que involucran vacunas o fármacos antivirales deben ser implementados más extensamente.

Esta enfermedad es causante de un aumento en la incidencia de neumonías y enfermedades de vías respiratorias bajas, incrementando de forma súbita el número de hospitalizaciones o muertes. Las personas de la tercera edad o aquellos con enfermedades crónicas pulmonares, están más expuestos a experimentar complicaciones, sin embargo los niños menores de cinco años pueden sufrir una enfermedad severa.

El cuadro clínico para la infección por el subtipo H1N1 se manifiesta de forma similar y con síntomas clásicos a cualquier otro caso de infección por gripe común, con aumento de la rinorrea, tos, odinofagia, fiebre mayor a 38° C, malestar general, hiporexia, artralgias, mialgias vómitos, diarrea y, en casos de mala evolución, desorientación y pérdida de la conciencia URL2

El virus de influenza AH1N1del 2009 es antigénicamente muy similar al del virus de influenza de 1918. Los cuales tienen como origen un ancestro común.

De 1930 a finales de la década de los 90, el virus de la influenza A era llamado “gripe porcina clásica” y se han mantenido antigénicamente estables. Alrededor de 1998 la gripe porcina clásica tuvo un reordenamiento con el virus de influenza humana A H3N2 y con un virus aviar del Norte de América (subtipo desconocido), resultando en la aparición de un virus porcino H3N2. Este reordenamiento ha estado circulando en la población de cerdos en toda América del Norte.

Alrededor de 1998 la triple reasociación de H3N2 tuvo una nueva reasociación con el virus de influenza clásico. Esto generó dos nuevos subtipos de la especie porcina, los virus H1N1 y la H1N2. Los cuales circulaban en la población porcina de Asia.

Así, el virus de la influenza A H1N1, contiene una combinación de segmentos genéticos que no han sido identificados previamente en cerdos o de virus de influenza humana. Los genes PB2 y PA se originaron de un virus aviar que se introdujo en el virus de la especie porcina alrededor del año de 1998. El origen de PB1 fue del virus humano H3N2 que adquirió el gen del virus aviar en 1968. Los genes HA, NP, NS vienen del virus de la gripe porcina clásica y estos tres genes están estrechamente relacionados con la influenza humana de 1918. Los otros dos genes NA y M eran del virus porcino euroasiático que los adquirió de la influenza aviar. [1]

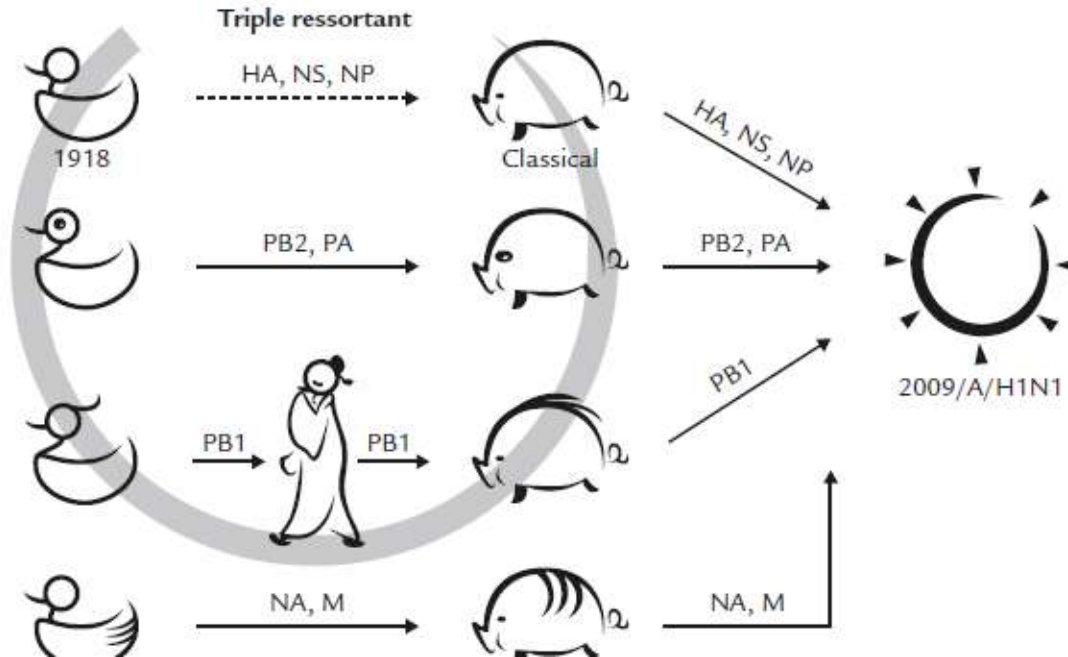


Figura 2. Origen de cada uno de los segmentos de los genes del virus de influenza *AH1N1 *Virus de Influenza tipo A Hemaglutinina 1 Neuroaminidasa 1. Imagen tomada de Luan-Yin Chan [1]

4.4. Clasificación y nomenclatura.

El virus de la influenza A es clasificado en subtipos basados en las diferencias antigénicas entre sus dos superficies glucoproteicas, hemaglutinina (HA) y neuroaminidasa (NA). Se han identificado 15 subtipos de hemaglutinina (H1-H15) y 9 subtipos de neuroaminidasa (N1-N9). De donde tan sólo tres subtipos de hemaglutinina (H1, H2 y H3) y dos subtipos de neuroaminidasa se establecieron en el linaje de la población humana desde 1918. (Figura 3) [3].

Según la nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada cepa del virus se define por su hospedador animal de origen (especificado si es distinto del ser humano), su origen geográfico, el número de cepa, el año de su aislamiento y la descripción antigénica de sus HA y NA (Los tipos B y C no se clasifican por subtipos HA y NA [5]. Por ejemplo A/Sw/lowa/15/30(H1N1) designa el aislamiento de la cepa A15 que se identificó en cerdos (“swine”) en Iowa en 1930 y que tiene los subtipos 1 de HA y NA.

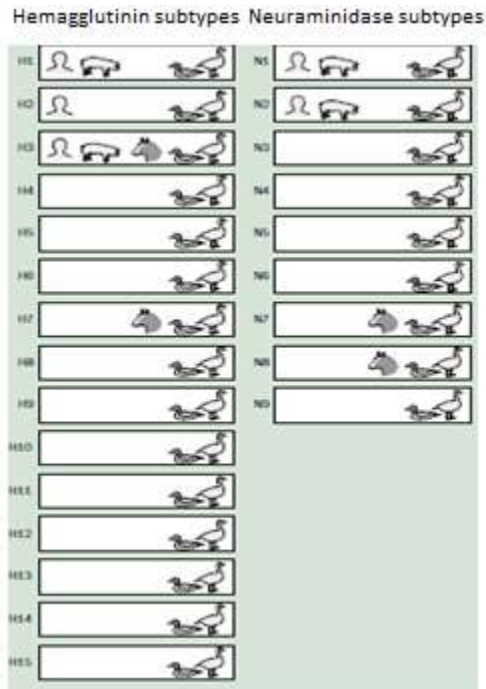


Figura 3. Hospedadores naturales del virus de influenza. Imagen tomada de Karl G. Nicholson. [3]

4.5. Estructura y función de la Hemaglutinina.

Las tres principales funciones de la hemaglutinina en el ciclo de infección del virus son: **1.** La interacción con el ácido siálico, carbohidrato terminal que se encuentra frecuentemente en glicoproteínas y glicolípidos de las células epiteliales respiratorias o intestinales, a las que se adhiere el virus [7-8]. **2.** Modula la internalización del virus al citoplasma de la célula huésped por la fusión de la membrana, evento denominado como endocitosis [7-8]. La iniciación de la fusión vírica con la del endosoma requiere de la disminución del pH, el cual es proporcionado por la proteína M1 del virus que facilita la entrada de iones hidrógeno, permitiendo la liberación del material genético y su transporte hacia el núcleo de la célula huésped donde se llevan a cabo los procesos de replicación y transcripción. Posteriormente los ribosomas traduce la información codificando a las 10 proteínas virales [6-7-9-10]. Finalmente se produce el ensamblaje y la liberación de nuevos virus por gemación y lisis de las células infectadas. **3.** Es el mayor antígeno de superficie del virus, contra la cual se han diseñado anticuerpos neutralizantes [8].

La hemaglutinina nativa tiene una masa molecular relativa de 220 KDa, es un trímero de subunidades idénticas cada una de las cuales comprende dos glicopolipéptidos unidos por un puente disulfuro, la cual se escinde (por lo que entonces resultan 6 cadenas, tres H₁ y tres H₂) URL 5- 6, activándose para iniciar el siguiente paso de la infección. El corte de la molécula se lleva a cabo por la acción de proteasas presentes en la misma célula del huésped (si la célula blanco carece de estas proteasas para escindir a la HA, el virus no se replica).

Esto da lugar a la formación del extremo carboxilo terminal o H₁ (328 residuos), que conserva la capacidad de reconocer al ácido siálico, y el extremo amino terminal ó H₂ (221 residuos) que es necesario para que el virus se fusione a la membrana de la célula hospedera [5-6-7].

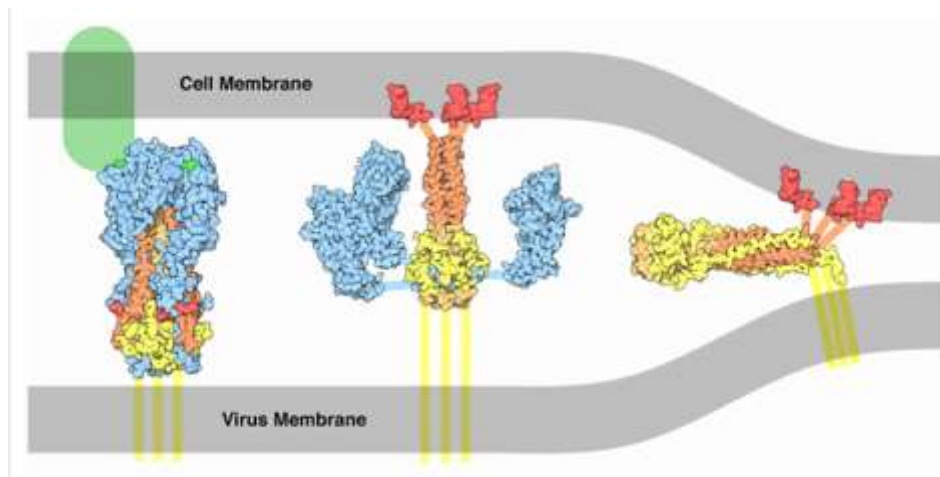


Figura 4. Acción de la hemaglutinina. Ocurre en varios pasos: Primero, los tres sitios de unión en la parte superior del tallo se unen a los monosacáridos de ácido siálico los cuales se presentan en color verde en la parte superior izquierda de la figura. Posteriormente, el virus completo es llevado dentro de la célula formando una estructura denominada endosoma, el cual tiene un ambiente ácido propicio para degradar el material en su interior, sin embargo este pH induce cambios conformacionales en la estructura de la hemaglutinina, provocando una alta afinidad entre las membranas y el péptido fusión. Finalmente, asemejando a una cremallera las membranas se fusionan y el RNA fluye al interior de la célula, empezando el proceso de infección. Imagen tomada de PDB (Protein Data Bank) <http://www.pdb.org>

4.6. Desviación y cambios antigénicos.

La HA es una estructura proteica compleja. Cada dímero se compone de dos cadenas, una H₁ y una H₂ que en su conjunto forman un tallo alargado el cual se encuentra fijo a membrana. Por otra parte, existe un dominio globular en uno de

sus extremos (el cual pertenece a la cadena H1), que contiene el sitio de unión al ácido siálico, el cual se encuentra rodeado por sitios antigénicos denominados Sa, Sb, CA₁, CA₂ y Cb, los cuales participan en la neutralización viral.

Por tal motivo, estas zonas tienden a tener altas tasas de mutación acumulando cambios que provocan la denominada deriva antigénica [4]. Para entender las bases de la alta antigenicidad de los virus pandémicos se han hecho estudios asociados con la determinación de la estructura tridimensional de la HA como en el ensayo de Rui Xu y cols. [11], estos autores determinaron la estructura cristalina de A/California/04/2009 H1N1, y sus análisis revelaron que el virus del 2009 conserva epitopes antigénicos con virus H1 de humano y porcino del siglo XX.

Estas observaciones son apoyadas por la estructura cristalina del virus de 1918 en un complejo neutralizante que presenta reacción cruzada con los virus de pandemias. Estas estructuras arrojan una luz sobre la base de la inmunidad preexistente contra el virus pandémico en gente que nació en el siglo XX [11].

Los dos antígenos de superficie de la influenza son objeto de variación antigénica independiente entre sí. Los cambios antigénicos menores se denominan deriva antigénica (Antigenic Drift), en tanto que las alteraciones antigénicas importantes en la HA o NA son llamadas recambios antigénicos (Antigenic Shift) que conducen a la aparición de un nuevo subtipo.

Así entonces las pandemias son consecuencia de variaciones mayores o recambios antigénicos, que implica la aparición de un nuevo subtipo de virus de la gripe A con una HA y, en ocasiones, una NA diferentes al virus difundido hasta entonces en la población, frente a la cual esta carece totalmente de experiencia inmunológica. El cambio antigénico refleja cambios drásticos en la secuencia de una proteína en la superficie viral, cambios demasiado grandes para ser explicados por mutación. Los genomas segmentados del virus de influenza sufren un fenómeno de reordenamiento genético (genetic reassortment) entre cepas humanas y animales.

Los brotes epidémicos anuales son producidos por virus del mismo subtipo que presentan variaciones menores, caracterizados por la acumulación de mutaciones

puntuales en el gen, las cuales producen cambios en aminoácidos de la proteína, fundamentalmente de la HA, que dificultará la unión a los anticuerpos y, consecuentemente, reducirán la inmunidad a la infección por las nuevas variantes antigénicas.

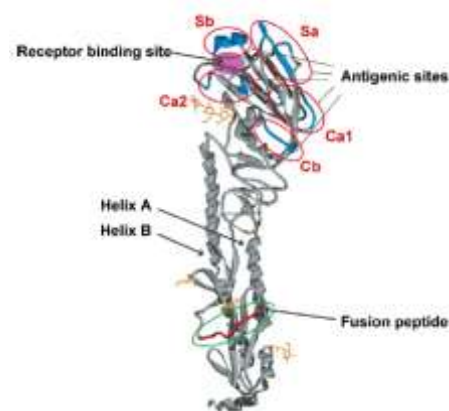


Figura 5. Diagrama de un monómero de hemaglutinina del virus de Influenza *AH1N1, causante de la gripe española en 1918. Se puede observar en la parte globular el sitio receptor del ácido siálico, rodeado por los 5 determinantes antigénicos (en rojo). * Virus de Influenza tipo A Hemaglutinina 1 Neuroaminidasa 1. Tomada de James Stevens & Ian Wilson

4.7. Tratamiento.

Durante la pandemia del 2009 se creía que se podía utilizar la vacuna para la influenza estacional, sin embargo está no era efectiva para este subtipo de influenza. Por lo que diversas compañías farmacéuticas, se dieron a la tarea de la formación de una vacuna capaz de generar una respuesta inmunológica ante ésta variante antigénica, inmunizando así a la población altamente expuesta.

Los medicamentos antivirales, que se prescriben frente a síntomas de influenza AH1N1, recomendados por el Centro de Enfermedades y Control para la Prevención, (CDC por sus siglas en inglés; Centres for Disease Control and Prevention) son el Tamiflu y el Relenza cuyos nombres genéricos son Oseltamivir y Zanamivir, respectivamente. Después de confirmada la enfermedad es de suma importancia empezar el tratamiento inmediatamente, dentro de las 48 horas de la presentación de los síntomas, ya que después del tercer día no modifican la evolución clínica de la infección. Es importante resaltar que el uso innecesario del medicamento genera resistencia viral.

El virus se ha mostrado sensible in Vitro a Oseltamivir y a Zanamivir, pero resistente a Amantadina y a Rimantadina.

Oseltamivir y Zanamivir inhiben la neuroaminidasa, enzima necesaria para la diseminación de los virus de célula a célula. La unión del oseltamivir, requiere que la NA sufra cambios conformacionales pero no la unión al zanamivir. La temporada de gripe del 2010 se caracteriza por una mutación espontánea en el gen de la neuraminidasa H274Y, que sería responsable de la resistencia al oseltamivir. Esta mutación impide la unión del oseltamivir, pero todavía permite la del zanamivir. URL9.

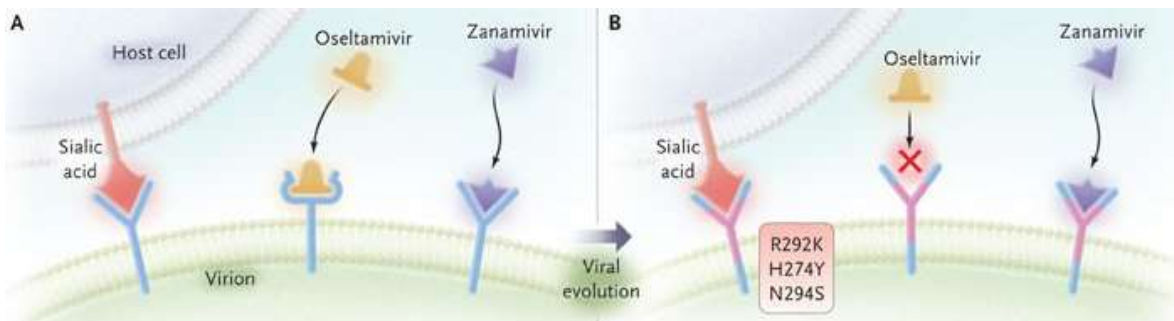


Figura 6. A. Se muestra el cambio conformacional que sufre el sitio activo de la neuroaminidasa para que la molécula del fármaco (oseltamivir) se acople. B. Diversas mutaciones en la neuroaminidasa, como lo puede ser H274Y, impiden el cambio conformacional, por lo que no se acopla a la molécula del oseltamivir, no así para receptores de ácido siálico (en la célula hospedera) ni para el zanamivir. Tomada de Anne Moscona [18].



Figura 7. A. Tamiflu en presentación de capsulas de 75 mg, de ROCHE.

B. Relenza en presentación de inhalador. Por GlaxoSmithXline

Como ha quedado de manifiesto anteriormente, la resistencia a los diferentes fármacos antivirales es propio de los mecanismos para evadir al sistema inmune

del hospedero, sin embargo los antivirales como el tamiflu y relenza no son la única manera de obtener protección en contra de estos agentes patógenos. Por otro lado las aproximaciones basadas en las tecnologías de DNA recombinante son alentadoras al poder obtenerse proteínas virales con el fin de ser utilizadas de manera terapéutica.

Dichas tecnologías se basan en la clonación de genes en un vector de expresión, con la finalidad de obtener proteína recombinante expresada en un sistema heterólogo, la cual, la cual es la aproximación usada en este trabajo.

4.8. Sobreexpresión de proteínas (Producción de proteínas recombinantes).

En las últimas décadas ha sido de gran importancia la biotecnología para la industria farmacéutica y la investigación, ya que por un lado en la industria farmacéutica ha aumentado la demanda para producir más proteínas activas en menor tiempo, y por otro lado la investigación trabaja en la función y estructura de los genes. Sin embargo, ambas convergen en la búsqueda de nuevos medicamentos. De esta forma cada vez se producen más moléculas o proteínas en sistemas biológicos para usarse en el tratamiento contra enfermedades.

La tecnología del DNA recombinante ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de la biotecnología de proteínas ya que gracias a la manipulación de genes ha sido posible producir grandes cantidades de proteína, muchas de las cuales se encuentran en concentraciones muy bajas en su ambiente natural. Se considera una proteína recombinante o proteína heteróloga, aquella proteína cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo nativo. [14]

Los biofármacos son principalmente proteínas recombinantes. Estas proteínas se obtienen a partir de organismos vivos, los organismos hospedadores, en los que se ha introducido material genético procedente de otro organismo mediante técnicas de ADN recombinante, de tal manera que el organismo hospedero, emplea su maquinaria biológica para producir la proteína cuya secuencia está codificada en el ADN introducido artificialmente.

Los sistemas celulares de expresión de genes heterólogos son generalmente sistemas procariotas o eucariotas, con sus ventajas e inconvenientes. Para seleccionar un sistema óptimo de expresión hay que tener en cuenta el rendimiento, bioactividad, características fisicoquímicas de la proteína de interés, el costo y la bioseguridad del sistema.

4.8.1. Aspectos generales sobre la producción de proteínas recombinantes.

Para la producción de proteínas recombinantes se hace uso de los múltiples sistemas de expresión disponibles comercialmente o de aquellos desarrollados con fines de investigación, o bien se pueden diseñar y construir sistemas de expresión según necesidades específicas.

Para la selección de un sistema de expresión adecuado para la síntesis de una proteína recombinante se debe considerar el origen biológico y las propiedades químicas y biológicas de la proteína de interés, su aplicación posterior y el bioproceso que se empleará para su producción. El origen biológico de la proteína es importante ya que generalmente un sistema de expresión eucariota es más eficiente para sintetizar una proteína de origen eucariota que un sistema de expresión procariota. Respecto a las propiedades químicas y biológicas de la proteína es importante analizar su secuencia nucleotídica codificante para evaluar el uso de codones preferenciales y la presencia de secuencias de finalización prematura de la transcripción, la secuencia aminoacídica para evaluar el peso molecular, punto isoeléctrico y tipo de modificaciones postraduccionales presentes, la estabilidad al pH, temperatura y proteólisis, la posible toxicidad sobre el hospedero, el destino celular deseado (extracelular o intracelular) y el grado de pureza deseado. [14]

En términos generales, la producción de proteínas recombinantes sigue el siguiente esquema: 1) tratamiento con enzimas de restricción de un vector de clonación y del DNA que contiene el gen que codifica la proteína de interés, 2) ligamiento del gen con el vector para obtener el DNA recombinante (ADNr), 3)

internalización y replicación (clonación) del ADNr en una célula hospedera y 4) traducción del gen a proteína. [15]

4.8.2. Elección del sistema de expresión.

Los sistemas de expresión se pueden clasificar en dos categorías: procariotas y eucariotas.

Los sistemas de expresión procariotas son generalmente más fáciles para trabajar y son útiles en la mayoría de las aplicaciones, sin embargo tienen importantes limitaciones para expresar proteínas eucariotas completamente funcionales. Esto es debido a que no realizan la mayoría de las modificaciones postraduccionales que realizan las células eucariotas (por ejemplo: fosforilación, glicosilación, y/o ácilación de los ácidos grasos) [13] y que permite a las proteínas plegarse de forma correcta para ser plenamente funcionales.

4.8.2.1. E. coli (sistema de expresión procariote).

E.coli es el sistema más ampliamente usado para la expresión de proteínas heterólogas debido a la facilidad de manejo, disponibilidad de vectores, crecimiento en fuentes de carbono, su alta fase de crecimiento, capacidad para el cultivo continuo y bajo coste de cultivo. [17].

En términos generales, los vectores de clonación para E.coli contienen: el gen que codifica la proteína de interés, un origen de replicación que determina el número de copias del vector, un marcador de selección que puede ser un gen de resistencia a antibióticos (como ampicilina, kanamicina y tetraciclina) el cual es necesario para identificar y seleccionar las colonias transformantes, es decir solo las células que tienen al plásmido evitando las que no lo incorporaron, un promotor que regula la transcripción del gen insertado y una secuencia de terminación de la transcripción. [16- 17]

Los sistemas de expresión en E.coli que favorecen la secreción del producto hacia el sobrenadante del cultivo suelen con frecuencia, ser aplicados a escala industrial debido a que no se requiere el rompimiento de la bacteria para su

obtención. La desventaja de este sistema estriba en el efecto de dilución del producto.

Por otra parte, se han diseñado vectores plasmídicos de clonación para *E. coli* que propician la exportación del producto recombinante hacia el espacio periplásmico. Este proceso facilita el aislamiento del producto pero dificulta su proceso de purificación por el exceso de contaminantes provenientes de la célula hospedera como son proteínas y DNA.

En función de los objetivos de clonación (amplificación y expresión), se suele hablar de dos grandes grupos de vectores. Por un lado, los vectores de clonación, que se emplean únicamente para amplificar el DNA de interés; también se les llama vectores de inserción o vectores de propagación. Por otro lado los vectores de expresión, que poseen además características que facilitan la expresión por la célula anfitriona del DNA de interés.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a las alteraciones antigénicas que presentan los dos antígenos de superficie del virus es que se dan nuevos subtipos, llegando a desarrollar incluso pandemias, frente a grupos de personas que se presentan susceptibles ante estas nuevas variantes, el estudio de éstas nos dará nuevas bases en las estructuras futuras que funcionen como biofármacos ante el ataque de nuevas variantes antigénicas.

6. JUSTIFICACIÓN

Muchas de las proteínas (como es el caso de la hemaglutinina) se encuentran en concentraciones muy bajas en su ambiente natural, es por ello que ha sido necesario realizar técnicas que nos permitan obtener grandes cantidades de ellas para poder realizar los estudios necesarios.

Así entonces se podrá utilizar la proteína clonada para el uso de ingeniería de proteínas con el fin de proponer estructuras como blanco terapéutico.

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo General.

- Clonar la secuencia de DNA que codifica para la hemaglutinina del virus de influenza A H1N1.

7.2. Objetivo particular.

- Clonar la secuencia de DNA que codifica para la parte globular de la HA mediante el diseño de primers (cebadores) específicos para este fin.

8. METODOLOGÍA

8.1. Obtención de la muestra.

Las muestras de RNA del virus de influenza A (H1N1) fueron proporcionadas por el INDRE (Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica) a la unidad de microarreglos del INMEGEN (Instituto Nacional de Medicina Genómica), quienes realizaron una reacción de reverso-transcripción (RT-PCR) para la obtención de cDNA a partir de RNA viral. Las muestras se tomaron de seis pacientes verificados como positivos al virus A H1N1 mediante qPCR (PCR en tiempo real) por duplicado. Estas muestras fueron secuenciadas mediante la plataforma Nimblegen en una cooperación interinstitucional con el Instituto de Genómica de Singapur (A-STAR), obteniéndose las secuencias completas de los 8 fragmentos pertenecientes al genoma completo del virus.

Dicha plataforma tiene como objetivo dar seguimiento de la trayectoria evolutiva de la gripe AH1N1. Permitiendo así un desarrollo más rápido de diagnóstico para cualquier posible variante nueva.

NimbleGen, es un microarreglo (matrices de alta densidad de sondas de oligonucleótidos largos) que puede proporcionar un mayor contenido de información necesaria para el estudio de la variación genómica. Pueden revelar la secuencia completa del virus de la gripe a partir de muestras de paciente (hisopos nasales / lavado nasofaríngeo). Lo cual permite la detección de mutaciones de una sola base en las regiones del genoma, que es importante para la sensibilidad de los medicamentos. Así cuando se presente reasociación, será capaz de identificar qué cepa de la gripe A se ha recombinado, así como la localización genómica de la reasociación para comprender mejor y seguir las variantes y la trayectoria evolutiva del virus.

8.2. Monitoreo de la integridad de las muestras.

La integridad de las muestras fue monitoreada mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. Las muestras de los seis pacientes por duplicado fueron agrupadas (pooledas) para cada uno de los 8 fragmentos, y así ser cargadas en el gel en el orden que se menciona en la tabla 2.

Se cargó un gel comercial pre-hecho al 2% de agarosa (marca “Reliant gel system”, el cual contiene bromuro de etidio), con 12µL de cDNA y dos marcadores de peso molecular (100 pb y 1Kb “New England Biolabs”). El gel se corrió en una cámara de electroforesis horizontal “Cleaver Scientific Ltd” a 60 V durante 1 hora 46 minutos en buffer TBE 1X.

Tabla 2. Posición de las muestras en el gel, para los 8 genes del virus.

Pozo	Muestra
1	Marcador de peso molecular 1 Kb
2	F1
3	F2
4	F3
5	F4
6	F5
7	F6
8	F7
9	F8
10	Marcador de peso molecular 100 pb

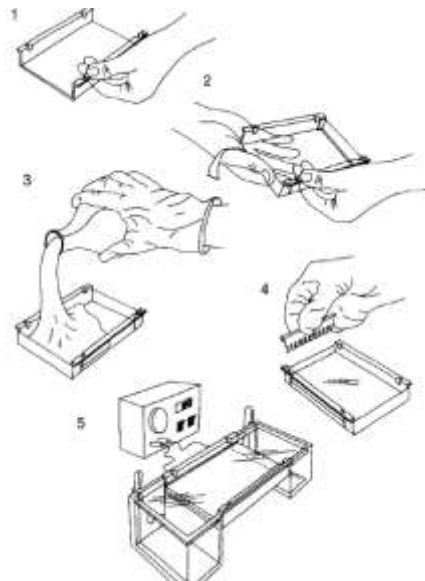


Figura 8. Muestra los pasos realizados en el montaje de la cámara de electroforesis: 1,2. Preparación del porta geles. 3. Colocación de la agarosa. 4. Colocación del peine. 5. Introducción del porta geles a la cámara de electroforesis con buffer TBE y conexión de la fuente de poder a la cámara de electroforesis.

Posteriormente se realizó una segunda electroforesis (bajo las mismas condiciones mencionadas en el punto 8.2) con las 6 muestras por duplicado pero en esta ocasión sólo para verificar la integridad del fragmento 4 correspondiente al que contiene al gen de la hemaglutinina.

La muestra 1 y 2 pertenece al mismo paciente, las muestras 3 y 4 a otro paciente y así sucesivamente.

Tabla 3. Posición de las muestras en el gel para el fragmento 4.

Pozo	Muestra
1	Marcador de peso molecular 1 Kb
2	Marcador de peso molecular 100 pb
3	1
4	2
5	3
6	4
7	5
8	6
9	7
10	8
11	9
12	10
13	11
14	12

8.2.1. Extracción y purificación del cDNA de las bandas.

Una vez corridos los geles se cortaron las bandas que mostraron una mayor integridad. Para este fin se colocó el gel en una lámpara de luz ultravioleta y se cortaron las bandas mediante el uso de un bisturí estéril para no contaminar la muestra, en todos los casos se tomaron las medidas preventivas necesarias de protección personal.

Ya cortadas las bandas se purificaron con el kit comercial “MiniElute Gel Extraction” de la casa comercial QIAGEN. Los pasos realizados se detallan a continuación (nota: todas las centrifugaciones se realizaron a 13,000 rpm):

-Cortar la banda tratando de no llevar más gel del necesario.

- Pesar el gel en un tubo.
- Adicionar 3 volúmenes de buffer QG a un volumen de gel (100 mg de gel equivalen a 100µL aproximadamente)
- Incubar a 50° C 10 minutos (o hasta que el gel se haya disuelto completamente). Para ayudar a disolver el gel se agita en un vortex cada 2-3 minutos durante la incubación.
- Verificar que el color de la mezcla sea amarilla, lo cual es un indicativo de que el pH es el óptimo para la extracción.
- Adicionar 1 volumen de isopropanol a 1 volumen de gel e invertir el tubo varias veces sin centrifugar la muestra.
- Colocar la columna “minielute” en un tubo de 2 mL, en la cual se vierte la mezcla que contiene el cDNA.
- Centrifugar por 1 minuto y descartar la solución colectada en el tubo.
- Adicionar 500 µL de buffer QG a la columna y centrifugar por 1 minuto más, desechando nuevamente la solución del tubo.
- Para lavar, adicionar 750 µL de buffer PE y centrifugar por 1 minuto.
- Desechar el filtrado y centrifugar un minuto adicional.
- Colocar la columna “minielute” en tubos limpios.
- Para eluir el DNA, adicionar 10 µL de buffer EB al centro de la membrana y dejar la columna por un minuto.
- Centrifugar 1 minuto.
- El volumen eluido es de 9 o 10 µL.

8.2.2. Poliadenilación de la muestra.

Antes de proseguir a la clonación se adicionó el nucleótido adenina (A) al producto de PCR, ya que se ha descrito en la literatura que este paso hace más eficiente la inserción del producto de PCR al plásmido. Preparando una solución de adenina 50 mM del kit de la casa comercial “Roche Deoxynucleoside Triphosphate Set”.

A cada muestra se le adiciona taq polimerasa con buffer y solución de adenina. Se incuba por 10 minutos a 72°C en un termobloque Eppendorf.

8.3. Clonación.

Para la clonación del fragmento de hemaglutinina se utilizó el Kit “pcDNA4/HisMax TOPO TA Expression kit” de invitrogen, este plásmido contiene unida covalentemente una topoisomerasa que participa uniendo el producto de PCR o para nuestro caso el cDNA al vector.

A continuación se detallan los pasos realizados hasta la purificación del plásmido.

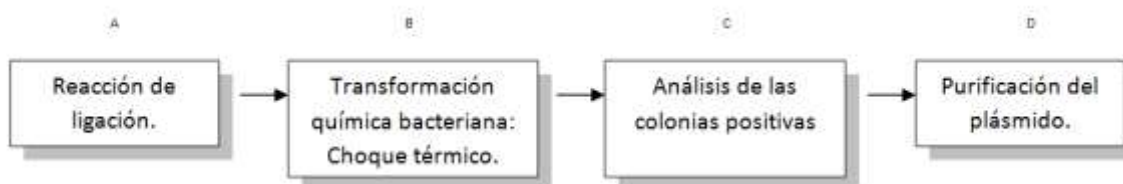


Figura 9. Proceso general de clonación.

A. Reacción de ligación de la muestra al vector.

La ligación del fragmento 4 que contiene el gen de la hemaglutinina al vector, se realizó basado en las recomendaciones del fabricante que consiste en una reacción usando 4 μL del cDNA, 1 μL de solución salina y 1 μL del vector. La reacción se mezcla suavemente y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente.

B. Transformación química bacteriana.

Para realizar la transformación se descongeló, lentamente y en hielo un tubo con 50 μL de bacterias competentes *Escherichia coli TOP 10* del kit comercial “One Shot TOP 10” de invitrogen. Se mezclan los 6 μL de la reacción de ligación con las bacterias competentes y se incuban en hielo durante 30 minutos. Después se sometieron a un choque térmico colocando los tubos en un termomixer a 42°C durante 30 segundos, en donde las células químicamente competentes introducen el cDNA. Inmediatamente se vuelven a introducir en hielo para disminuir la fluidez

de la membrana celular. Tras este paso, se recuperaron las bacterias añadiendo 500 μL de medio SOC al tubo (el cual contiene triptona, extracto de levadura, sales y glucosa) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora en agitación. Transcurrido este tiempo se colocaron 250 μL en placas de medio sólido de agar con ampicilina y se sembraron mediante el uso de un triángulo de vidrio estéril, incubándose a 37 °C una noche. Este paso es el de selección clonal, debido a que sólo las clonas que hayan incorporado el cDNA tendrán resistencia a un antibiótico y crecerán en el medio selectivo, a causa de que el gen de resistencia se encuentra incorporado en la secuencia del plásmido.

Los pasos anteriormente descritos se realizaron para las dos muestras que mostraban mayor integridad.

C. Análisis de las colonias positivas (plásmidos recombinantes).

Las colonias positivas fueron seleccionadas y examinadas después de la incubación para confirmar la presencia del plásmido. Este paso se realizó por “PCR en colonia” utilizando los primers del vector. La técnica consiste en una reacción de PCR de cada colonia bacteriana crecida en el medio sólido de selección, teniendo como ventaja la amplificación de un producto de PCR sin la necesidad de purificar el plásmido previamente. Para tal fin, se “pica” con un palillo estéril cada colonia y se siembra en un tubo que contiene todos los reactivos para una reacción de PCR marcando siempre a que colonia pertenece (Figura 10).

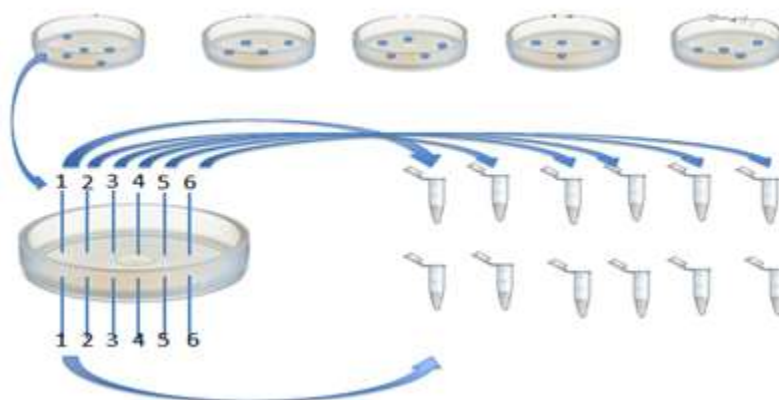


Figura 10. Esquematación del proceso de PCR en colonia.

A continuación se muestra en la siguiente tabla los componentes de la mezcla para la reacción de PCR; así como también las condiciones del termociclador (Applied biosystems 2700).

Tabla 4. Componentes para la PCR en colonia.

Reactivo	Cantidad (µL)
10 X Buffer	2.5
50 mM dNTP's	0.25
Primer Xpress Forward (0.1µg/µL)	0.25
Primer BGH Reverse (0.1µg/µL)	0.25
Agua estéril	16.25
Taq polimerasa	0.5

Tabla 5. Programa del ciclado.

Etapa	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	2 min	94 °C	1 X
Desnaturalización	1 min	94 °C	
Alineamiento	1 min	60 °C	
Extensión	1 min	72 °C	40 X
Extensión final	7 min	72 °C	1 X

Con la finalidad de verificar el tamaño del inserto que se incorporó al plásmido se realizó la preparación de un gel de agarosa al 2%.

Para cargar las muestras en el gel se colocaron 10 µL de muestra + 2 µL de Buffer de carga.

El gel se corrió a 80 V en buffer TBE 1X durante 1 hora en una cámara de electroforesis horizontal Clavent. Utilizando marcadores de peso molecular 100 pb y 1Kb New England Biolabs.

D. Extracción y purificación del plásmido.

La colonia que dio un producto de PCR de un tamaño aproximadamente similar al esperado correspondiente al fragmento 4, se creció en medio líquido con ampicilina a 37° C y 100 rpm por una noche.

Para aislar y purificar el plásmido con el inserto se utilizó el kit “S.N.A.P Midi Prep kit A Simple Nucleic Acid Prep” de invitrogen. El procedimiento consiste básicamente en la lisis de las células, precipitación de proteínas y filtración en un par de columnas, terminando en la elusión del plásmido con un alto grado de pureza.

Estos pasos de la metodología antes descrita se detallan a continuación:

- Crecer el cultivo bacteriano toda una noche hasta una $OD_{600} < 3.0$.
- Centrifugar a 4000 xg por 5 a 10 minutos a 4°C.
- Decantar.
- Adicionar 4 mL de buffer de resuspensión al botón de células (el cual contiene RNAsa A)
- Resuspender con pipeta.
- Añadir 4 mL de solución de lisis y mezclar suavemente por inmersión (5 o 6 veces).
- Posteriormente incubar por 3 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 4 mL de solución de sales de precipitación (3 M de acetato de potasio, pH

5.2) e invertir 6 a 8 veces.

-Incubar 5 minutos en hielo, invertir los tubos dos veces durante la incubación. No centrifugar en este paso.

-El contenido del tubo en el paso anterior se hace pasar por la columna "A" hacia un nuevo tubo. Se centrifuga 5 minutos a 3000 xg y se descarta la columna.

- A lo que queda en el tubo "A" se le agrega 12 mL de "binding buffer". Se mezcla suavemente invirtiendo 2 veces.

-El contenido del tubo "A" se hace pasar por la columna "B" (columna a la cual quedará unido el DNA) a un nuevo tubo falcon "B". Se centrifuga 2 minutos a 1000xg.

-Desechar el tubo "B" y colocar 5 mL de buffer de lavado "Wash buffer" en la columna. Se centrifuga 1 minuto a 2000xg.

-Decantar, descartando el filtrado.

-Colocar 5mL de la solución de "lavado final" 1X. Centrifugar 2 minutos a 2000xg.

-Colocar 10 mL de buffer de lavado final 1x.

-Centrifugar 2 minutos a 2000 xg.

-Desechar el filtrado.

-Centrifugar la columna a 4000 xg durante 5 minutos para que la resina se seque.

-Colocar un nuevo tubo a la columna, agregar 750 µl de agua estéril o TE directo a la columna para eluir.

-Incubar 3 minutos a temperatura ambiente.

-Centrifugar 5 minutos a 4000 xg.

-Retirar la columna, y lo que queda en el tubo es el plásmido puro. Leer con un espectrofotómetro.

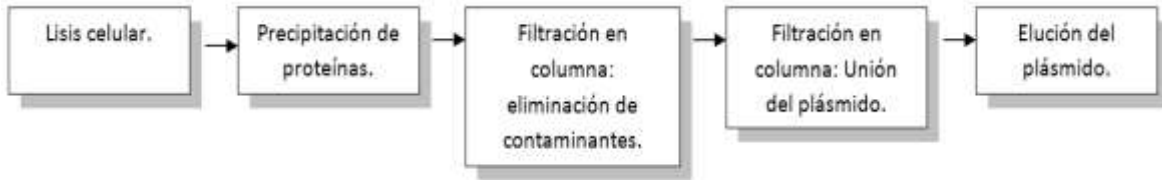


Figura 11. Proceso general de la purificación del plásmido.

Una vez que se obtiene la purificación del plásmido, se leyó la concentración en un equipo espectrofotométrico Nano Drop T009.

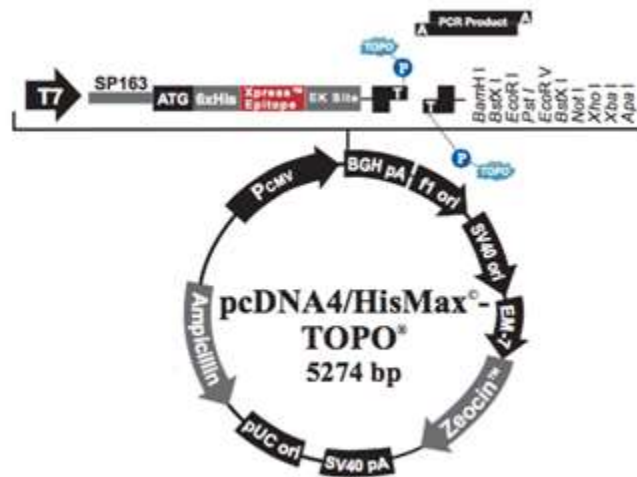


Figura 12. Mapa físico del vector de expresión pcDNA 4His Max TOPO. Se muestra sitios promotores: T7, CMV, EM7,SV40. Un codón de inicio ATG, dominios para su purificación: 6xHis, Xpress Epitope. Dos genes de resistencia a antibióticos: Ampicillin y Zeocin. Sitios de restricción de enzimas: BamH I, EcoR I, Pst I, Xho I, Xba I, Apa I. Sitios de origen: f1 ori y pUC ori. Así como el sitio en donde se inserta el fragmento a clonar, en donde se encuentra la topoisomerasa.

8.4. Secuenciación.

Para verificar la secuencia del inserto clonado en el plásmido, este se mandó a secuenciar a la “Unidad de secuenciación e identificación de polimorfismos” del Instituto Nacional de Medicina Genómica. Los oligonucleótidos usados en la secuenciación corresponden a los denominados Xpress y BGH que se incluyen en el kit de clonación y cuyas secuencias de alineamiento corresponden al vector plasmídico y se muestran a continuación:

Xpress™ Forward 5'-TATGGCTAGCATGACTGGT-3'
 BGH Reverse Primer 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'

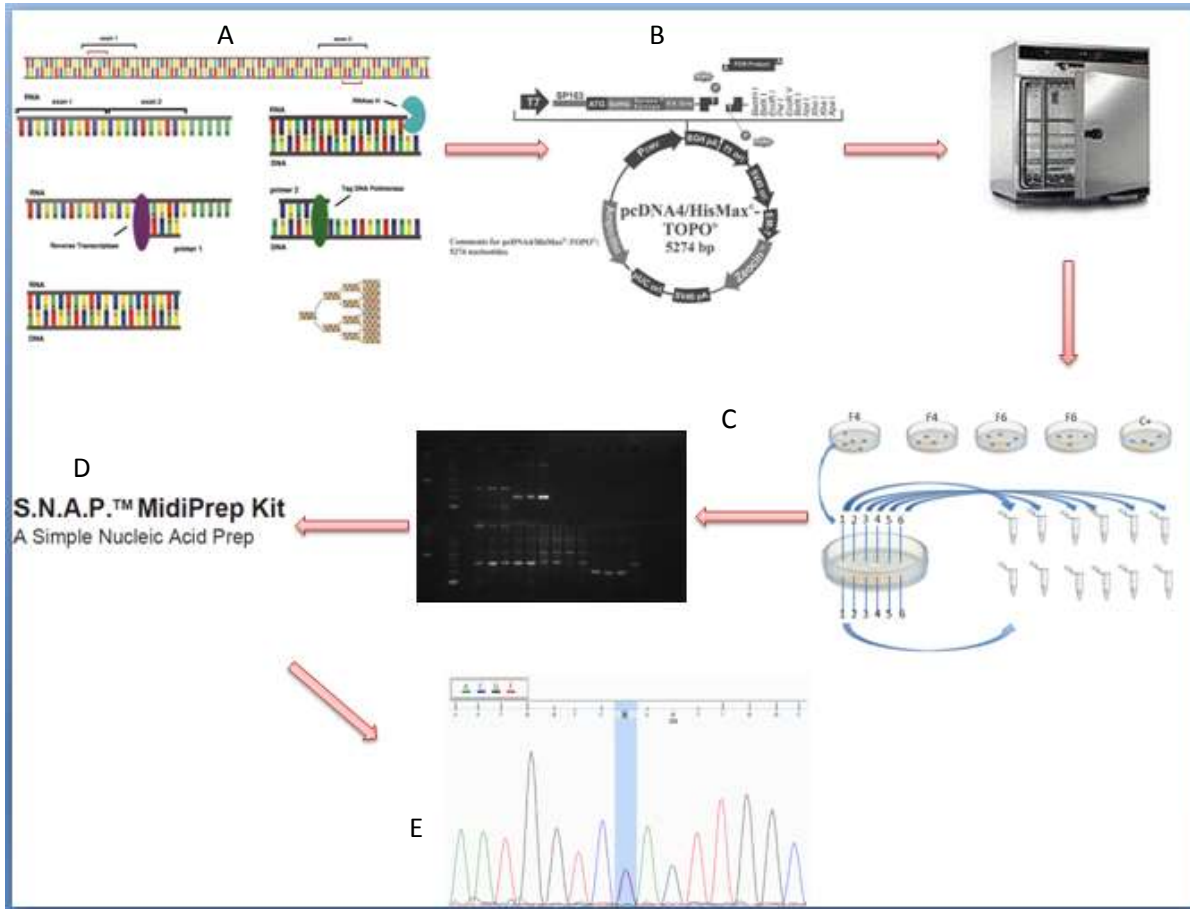


Figura 13. Esquema de la aproximación experimental resumida en sus pasos principales. A. RT-PCR B. Clonación utilizando el vector pcDNA4/His Max TOPO. C. PCR en colonia y electroforesis. D. Purificación del plásmido. E. Secuenciación.

8.5. Análisis de las secuencias clonadas.

Una vez obtenida la secuencia completa, se realizó un alineamiento contra las secuencias nucleotídicas reportadas en base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), con la finalidad de determinar la identidad de la secuencia clonada con la de las reportadas anteriormente.

8.6. Diseño de primers para el dominio globular de la hemaglutinina.

Para lograr la clonación de un fragmento más pequeño, se decidió clonar tan sólo la parte globular de la proteína, la cual está implicada en el proceso de infección y contiene los principales determinantes antigénicos.

Se realizó una búsqueda de la estructura de la proteína en la base de datos PDB (Protein Data Bank). Posteriormente se efectuó el alineamiento de la secuencia clonada y traducida a proteína con la reportada de la estructura experimentalmente resuelta de la base de datos PDB (3AL4).

El diseño de primers para la clonación de la región globular se llevó a cabo con el programa Sequence Analysis 1.6.0.

8.7. PCR de la secuencia globular.

Se prosiguió a realizar amplificación de la secuencia globular usando los primers que se muestran a continuación y que se diseñaron previamente. Estos fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies).

LP 5'- GTAACATTGCTGGCTGGATCC -3'
RP 5'- GGTGTCTGACAAGTTGTATTGC -3'

Las cantidades en la mezcla de reacción y las condiciones en el termociclador se indican a continuación:

Tabla 6. Componentes de la PCR para el dominio globular.

Reactivo	Cantidad (µL)
10 X Buffer	5
GC melt	4
50 mM dNTP's	1
Rigth Primer	2.5
Left Primer	2.5
Agua estéril	32.5
Taq polimerasa	0.5
Templado (cDNA)	2

Tabla 7. Condiciones del termociclador.

Etapa	Tiempo	Temperatura	Ciclos
Desnaturalización inicial	2 min	94 °C	1 X
Desnaturalización	1 min	94 °C	
Alineamiento	1 min	60 °C	
Extensión	1 min	72 °C	40 X
Extensión final	7 min	72 °C	1 X

8.8. Clonación del dominio globular utilizando el vector pcDNA 3.1

Para la clonación del dominio globular de la hemagutina, se empleó el vector pcDNA 3.1/V5-His TOPO, el cual contiene también una topoisomerasa que participa anclando el producto de PCR al vector. Para la transformación se utilizaron células *E. Coli* XL1-B. Todo esto con el fin de tener un mejor rendimiento de colonias.

8.8.1. Reacción de ligación de la muestra al vector.

Para la ligación de la muestra se llevó a cabo tres ensayos en donde se ocupa 3 cantidades diferentes de la muestra; 1µL, 2µL y 3µL del producto de PCR, 1µL de solución salina, 0.5 µL del vector y se ajusta con agua estéril hasta completar 6µL de reacción. La reacción se mezcla suavemente.

8.8.2. Transformación química bacteriana.

Inmediatamente después de la ligación se adiciona a cada tubo de reacción 25 µL de la cepa bacteriana (*E.coli*) XL1-B, las cuales fueron descongeladas previamente. Se mezcla con cuidado y se deja en hielo 30 minutos. Posteriormente se someten a choque térmico colocando los tubos en un termobloque (eppendorf) a 42°C durante 90 segundos. Inmediatamente se colocan en hielo durante 5 minutos. Se coloca a cada tubo 500 µL de medio SOC y se dejan a temperatura ambiente durante una noche. Transcurrido ese tiempo se sembraron 250 µL de cada condición en cajas de agar con ampicilina y se incuban 37°C una noche por duplicado. A continuación se muestra la esquematización del proceso:

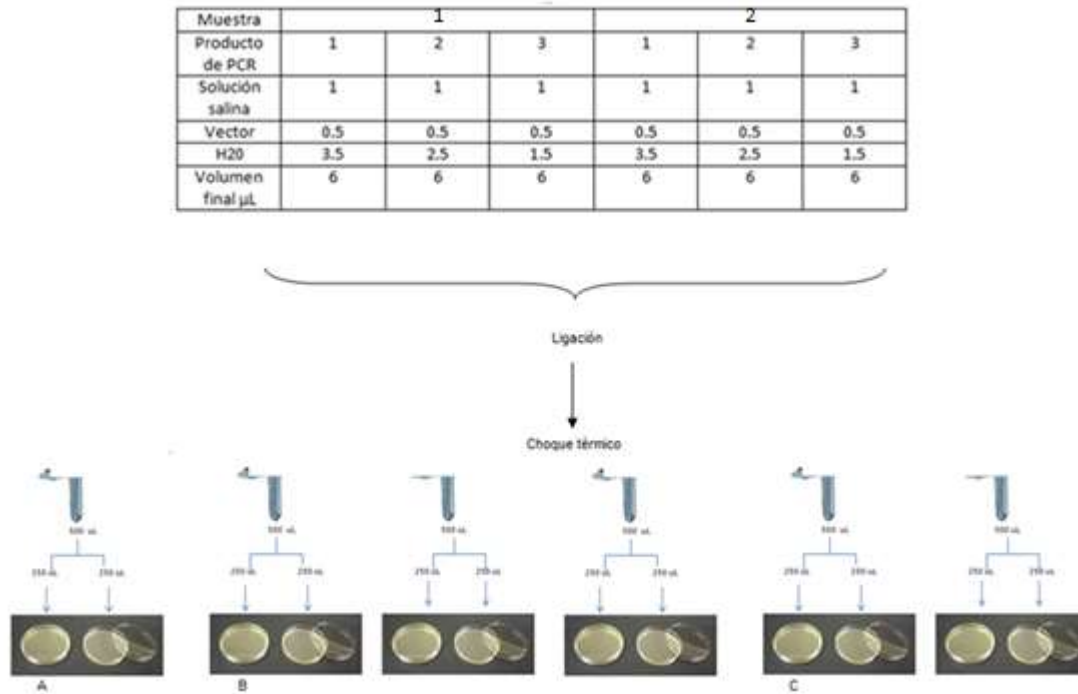


Figura14. Esquema del proceso de clonación de la parte globular (reacción de ligación y transformación química bacteriana)

Transcurrido el tiempo de incubación, se prosigue al análisis de las colonias que crecieron en cada una de las cajas en medio SOC.

8.9. Análisis de las colonias positivas.

Se verificó el tamaño del inserto en las colonias crecidas en el medio sólido con Ampicilina mediante PCR en colonia utilizando los primers de la secuencia del dominio globular.

Los volúmenes utilizados para el PCR son los mismos que se describen en la tabla 6 y las condiciones del termociclador son las mismas que se utilizaron en la tabla 7.

8.9.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Una vez terminados los ciclos de amplificación de las muestras, el tamaño se verificó en geles de agarosa. Para cargar las muestras en el gel se colocó 10 μL de muestra + 2 μL de buffer de carga y se colocó como se muestra a continuación:

Tabla 8. Posición de las muestras en los pozos del gel.

Pozo	Muestra	Pozo	Muestra
1	PM 1 Kb	21	PM 1 Kb
2	-	22	-
3	PM 100 pb	23	PM 100 pb
4	-	24	-
5	-	25	8
6	-	26	9
7	1	27	-
8	2	28	1
9	3	29	2
10	4	30	3
11	5	31	4
12	6	32	5
13	-	33	6
14	1	34	7
15	2	35	8
16	3	36	9
17	4	37	10
18	5	38	11
19	6	39	12
20	7	40	13

*Nota: La muestra corresponde a la asignación del número de la colonia picada.

8.10. Extracción y purificación del plásmido.

De la misma forma que se procedió anteriormente, las colonias con un fragmento clonado de un tamaño similar al esperado (600 pb) fueron propagadas en 20 mL de medio líquido con ampicilina. Para la extracción del plásmido se realiza con el mismo kit y de la misma manera que en la sección D del apartado 8.3

8.11. Secuenciación.

Estas muestras se mandaron a secuenciar a la “Unidad de secuenciación e identificación de polimorfismos” del instituto.

Los oligonucleótidos usados en la secuenciación corresponden a los denominados LEFTH PRIMER (LP) REVERSE PRIMER (RP) que corresponden a los usados en el PCR y que amplificaron la región globular.

9. RESULTADOS

9.1. Monitoreo de la integridad de las muestras.

En el gel de la figura 15 se puede apreciar en el carril 5 una banda, correspondiente al fragmento F4 (hemaglutinina) con un P.M aproximado a 1.7 Kb (1700 pb).

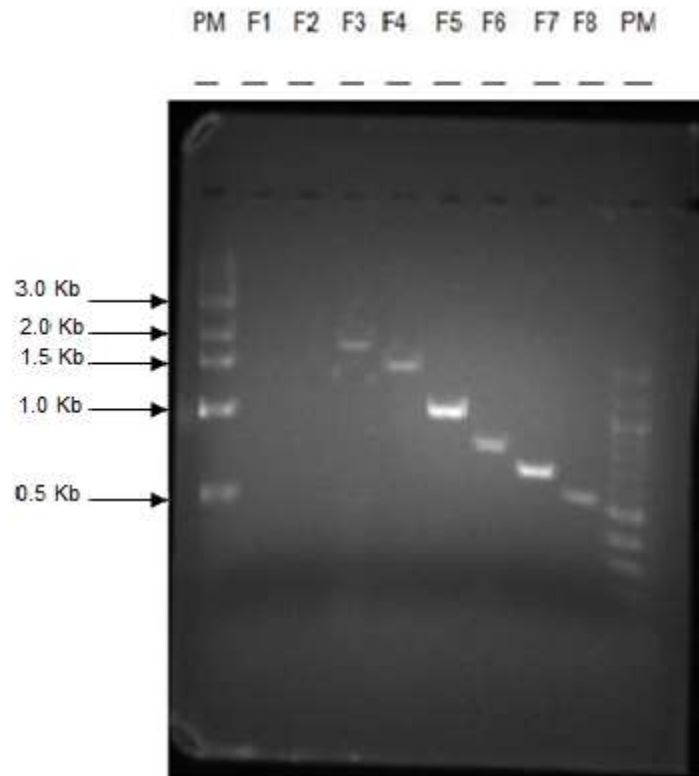


Figura 15. Gel de electroforesis que muestra los 8 fragmentos que contienen el genoma completo del virus. En el carril 5 se puede apreciar el fragmento que contiene la secuencia de la hemaglutinina (F4).

En el gel de la figura 16 se aprecia que las muestras con mayor integridad son la 3-4 y 11-12 correspondiente a los pacientes 2 y 6. Por lo que para la clonación se utilizó la muestra 3 y 11.

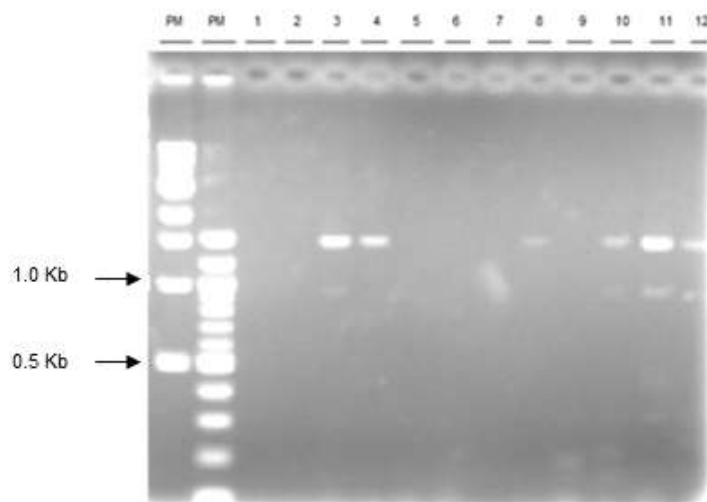


Figura 16. Electroforesis en el de agarosa al 2% de las 12 muestras, con el fragmento 4 (hemaglutinina).

9.2. Clonación.

9.2.1. Transformación química bacteriana.

Posterior a la reacción de ligación del fragmento 4 al plásmido pcDNA4/HisMax TOPO, habiendo realizado el choque térmico para la incorporación de éste a las células TOP 10 y sembrado en placas de selección clonal con Ampicilina, se logró el crecimiento de 36 colonias bacterianas pertenecientes a la muestra 11 del paciente 6.

9.2.2. Análisis de las colonias positivas

La figura 17 muestra el gel de agarosa de la PCR en colonia de las 36 colonias mencionadas anteriormente, en este puede observarse que sólo una de las colonias da un producto de PCR (amplicón) de las 1.7 Kb esperadas (pozo 6, colonia 4).

A primera vista se puede apreciar varias bandas con cierta integridad de las muestras 1 a la 12 y 16; de la 19 a la 31, 33 y 34, todas ellas con un tamaño menor del esperado (aproximadamente 200 pb).

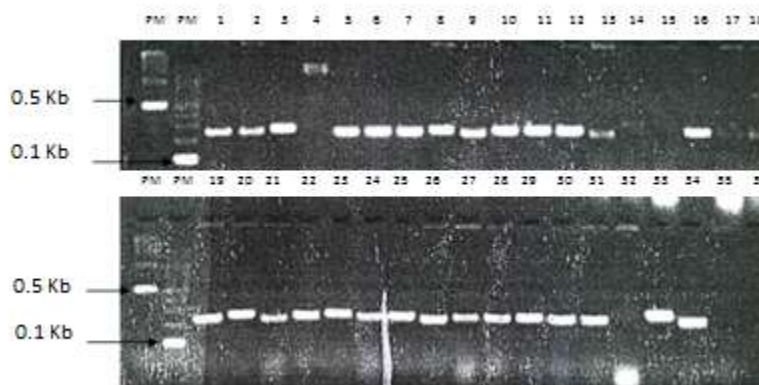


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa del PCR en colonia.

Tabla 9. Posición de las muestras en los pozos del gel de la figura 17.

Pozo	Muestra	Pozo	Muestra
1	PM 1 Kb	21	PM 1 Kb
2	PM 100 pb	22	PM 100 pb
3	1	23	19
4	2	24	20
5	3	25	21
6	4	26	22
7	5	27	23
8	6	28	24
9	7	29	25
10	8	30	26
11	9	31	27
12	10	32	28
13	11	33	29
14	12	34	30
15	13	35	31
16	14	36	32
17	15	37	33
18	16	38	34
19	17	39	35
20	18	40	36

9.3. Extracción y purificación del plásmido.

Basados en el protocolo descrito de purificación mediante el uso del S.N.A.P Midi Prep kit de Invitrogen, se obtuvieron 750 µl de plásmido en buffer TE, los cuales fueron cuantificados y cuyos resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Se muestra la concentración, relación 260/280 y relación 260/230 del plásmido purificado.

Concentración ng/µL	260/280	260/230
Colonia 4: 58.5	1.87	2.35

*Nota: Se utilizó como blanco buffer TE.

Los resultados muestran que a una longitud de onda de 260/280, la muestra se encuentra en un alto grado de pureza [19], por lo que podemos utilizarlo para el proceso de secuenciación.

9.4. Secuenciación.

9.4.1. Secuenciación de la muestra del fragmento 4, colonia 4 con el primer XPRESS.

A continuación se muestra el formato gráfico perteneciente a los electroferogramas obtenidos en el equipo de secuenciación.





Figura 19. Electroferograma de la muestra del fragmento 4 con el primer BGH. Imagen tomada del programa BioEdit.

Ambas secuencias se utilizaron para obtener la secuencia completa clonada. Para ello se utilizó el programa CLC Sequence Viewer 6.

CGGCCGNNACTNNGCTGGNTATCTGCAGAATTCCACCACACTGGATCCTAGGTACAGGCCCTTGACAAGCA
TAACGGGAAACTATGCNAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAATGTAACATTGCTGGCTGGA
TCCTGGGAAATCCAGAGTGGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCCTACATTGTGGAAACATCTAGTT
CAGACAATGGAACGTGTTACCCANGAGATTTTCATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTG
TCATCATTGAAAGGTTTGAGATATTCCTCCAAACAAGTTCATAGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGTGTAA
CGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAAGGAAAT
TCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCTATGGGGCATTAC
CATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTGTGGGGTCATCA
AGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAGTAGCAATAAGACCCAAAGNGAGGGATCAAGAAGGGAGAATG
AACTATTACTGGACGCTAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACC
GAGATATGCATTCGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTTCAGATACACCAGTCCACGATTG
CAATACAACCTGTGACACACCCNANGGTTGCTATAAACACCCAGCCTCCCATTTTCAGAATATACATCCGATCA
CNNNTGGAAAATGTCCAAAATATGTA AAAAGCACAAAATTGAGACTGGCCACAGGATTGAGGAATGTCCC
GTCTATTCAATCTAGAGGCCTATTTGGGGCCATTGCCGGTTTCATTGAAGGGGGGGTGGACAGGGATGGTA
GATGGATGGTACGGTTGTCACCATCAAAAAGAGCAGGGGTCNGGATATGCAGCCGACCTGAAGAGCACAC
AGAATNCCATTGACGAGATTAACA AAAGTAAATTTCTGTTATTGAAAAGATGAATACACAGTTCACAGCA
GTAGGNAAAGAGTTCAACCACCTGAAAAAAGAATAGAGAA TTTAAATAAAAAAGTTGATGATGGTTTCT
GGACATTTGGACTTACAATGNCGAACTGTTGTTCTATTGAAAATGAAAGANCTTTGGACTACCACGATT
AAATGTGAAGAACTTANATGAAAAGGTAAGAAGCCAGCTAAAAACAATGCCAAGGAAATGGAAACGGC
TGCTTTGAATTTTACCACAAATGCGATAACACGTGCATGGAAAGTGTCA NAAATGGGACTTATGACTACCCN
AAATACTCAGAGGAAGCAAAATTAACAGAGAAGAAATAGATGGGGTAAAGCTGGAATCAACAAGGATTT
ACCANAAGGGCCTGTANNNNNNC

Figura 20. Secuencia completa clonada.

9.5. Análisis de las secuencias clonadas.

Después de realizar el alineamiento (BLAST) en la base de datos de NCBI, la secuencia clonada mostraba un 98% de homología con la secuencia de la hemaglutinina : Influenza A virus (A/Mexico/24053/2009(H1N1)).

Download ▾ GenBank Graphics

Influenza A virus (A/Mexico/24053/2009(H1N1)) hemagglutinin (HA) gene, complete cds
 Sequence ID: [gb|CY147891.1](#) Length: 1732 Number of Matches: 1

Range 1: 154 to 1586 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2553 bits(1382)	0.0	1413/1435(98%)	3/1435(0%)	Plus/Plus
Query 64	GACAAGCATAACGGGAAACTATGCNAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAAA	123		
Sbjct 154	GACAAGCATAACGGGAAACTATGCAAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAAA	213		
Query 124	TGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGC	183		
Sbjct 214	TGTAACATTGCTGGCTGGATCCTGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGC	273		
Query 184	TCATGGTCCTACATTGTGGAAACATCTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACCCANGAGAT	243		
Sbjct 274	TCATGGTCCTACATTGTGGAAACATCTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACCCAGGAGAT	333		
Query 244	TTCATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTGCATCATTTGAAAGGTTT	303		
Sbjct 334	TTCATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTGCATCATTTGAAAGGTTT	393		
Query 304	GAGATATTCCCAA-ACAAGTTCATAGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGTGTAACGGCA	362		
Sbjct 394	GAGATATTCCCAAAGACAAGTTCATGGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGTGTAACGGCA	453		
Query 363	GCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAA	422		
Sbjct 454	GCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAA	513		
Query 423	GGAAATTCATAACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTC	482		
Sbjct 514	GGAAATTCATAACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTC	573		
Query 483	GTGCTATGGGGCATTACCATCCATCTACTAGTGTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAAT	542		
Sbjct 574	GTGCTATGGGGCATTACCATCCATCTACTAGTGTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAAT	633		
Query 543	GCAGATGCATATGTTTTTGTGGGGTCATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAGTA	602		

Figura 21. Alineamiento de la secuencia clonada, realizado en la base de datos de NCBI.

9.6. Diseño de primers para el dominio globular de hemaglutinina.

De la secuencia clonada (DNA que codifica para la hemaglutinina) se diseñaron los primers capaces de amplificar la región globular, la cual está involucrada en el proceso de infección. Este diseño se realizó basándose en parte en la estructura resuelta experimentalmente y depositada en el Protein Data Bank con el número de acceso 3AL4 y que muestra a continuación.

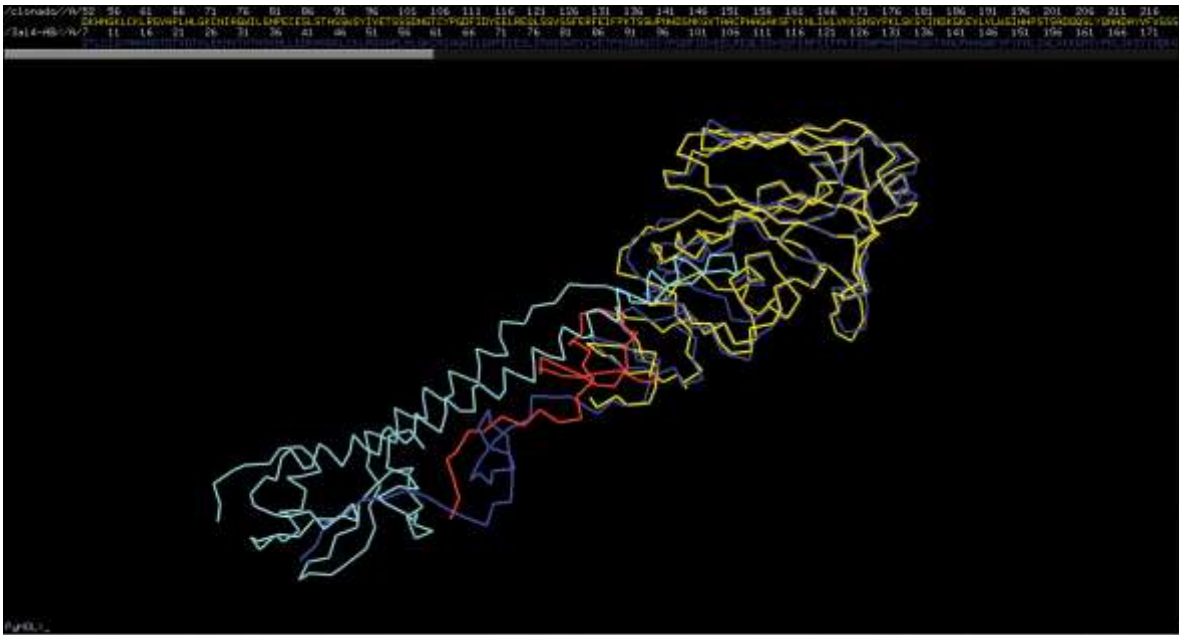


Figura 22. Estructura de la proteína HA (Hemaglutinina) del virus de influenza AH1N1 (Influenza tipo A Hemaglutinina 1 Neuraminidasa1). Cadena H1 (azul), H2(magenta) y amino terminal (rojo), dominio globular (amarillo).

Así, de nuestra secuencia obtenida del fragmento 4 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos de amplificación:

GACAAGCATAACGGGAAACTATGCNAACTAAGAGGGGTAGCCCCATTGCATTTGGGTAAT**GTAACATTGCTGGCTGGATCC**TGGGAAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCTCATGGTCCCTACATTGTGGAACATCTAGTTCAGACAATGGAACGTGTTACCCANGAGATTTTCATCGATTATGAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTATCATTTGAAAGGTTTGGATATTCCCAANACAAGTTCATAGCCCAATCATGACTCGAACAAAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTACAAAAATTTAATATGGCTAGTAAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCTACATTAATGATAAAGGGAAAGAAGTCCTCGTGCATATGGGGCATTACCCATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAGTCTCTATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTTGTGGGGTCATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAGTAGCAATAAGACCCAAAGNGAGGGATCAAGAAGGGGAGAATGAACTATTACTGGACGCTAGTAGAGCCGGGAGACAAAATAACATTCGAAGCAACTGAAATCTAGTGGTACCAGATATGCATTCGCAATGGAAAGAAATGCTGGATCTGGTATTATCATTTCAGATACACCAGTCCACGATT**GCAATACAAC TTGTCAGACACC**CNANGGGTGTATAAACACCAGCCTCCCATTCAGAATATACATCCGATCACNNNTGGAAAATGNCCAAAATATGNNNAAAGCACAAANTTGAGACNNGCNCNNNGNTTGAGGAATGTCCCGTCTATTCAATCTAGAGGCCATTTGGGGCCATTG

Primer	Secuencia	%GC	Tm
Left primers:	GTAACATTGCTGGCTGGATCC	52.3	61.7
Rigth primers:	GGTGTCTGACAAGTTGTATTGC original	45.4	57.2

Figura 23. Primers para la región globular.

Usando como templado los plásmidos con la secuencia de la hemaglutinina completa clonada, los PCR para la amplificación de la región globular mostraron los siguientes resultados.

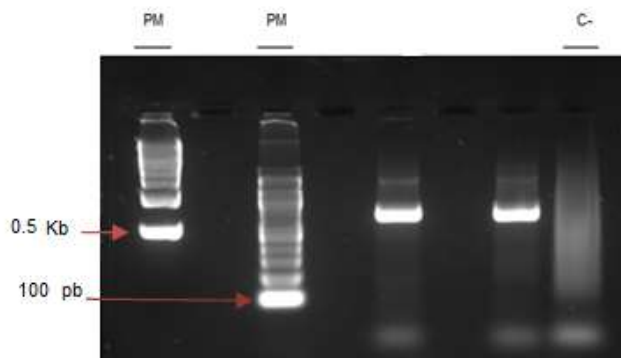


Figura 24. Amplificación de la secuencia globular (utilizando los oligonucleótidos diseñados sólo para éste dominio)

En la figura 24 se puede observar dos bandas con un peso aproximado de 600 pb, con buena integridad, de tal manera que pueden ser utilizadas para ligar en un nuevo plásmido teniendo así sólo la región globular clonada.

Para tal fin, ambas bandas fueron cortadas y purificadas con el kit comercial de QIAGEN “MiniElute Gel Extraction”.

9.7. Clonación del dominio globular.

El producto de PCR obtenido de aproximadamente 600 pb fue ligado al vector pcDNA 3.1/V5-His TOPO de la misma forma como se describe en el apartado 8.8.1

9.7.1. Transformación química bacteriana.

Una vez realizada la inserción del producto de PCR en el plásmido y realizada la selección clonal por duplicado se obtuvieron los siguientes resultados.

De las 12 cajas usadas para la selección clonal, cuyo diseño se muestra en la figura 14, se obtuvo el crecimiento bacteriano en tres de ellas denominándolas como A, B y C.

De la caja “A” se picaron 6 colonias, las cuales pertenecen a la muestra 1 con 1 μ L de muestra en la ligación. Mientras que de la caja “B” se picaron 9 colonias, también pertenecientes a la muestra 1 pero con 2 μ L de muestra en la ligación. Y para la caja “C” se picaron 13 colonias, las cuales pertenecen a la muestra 2 con 2 μ L de volumen de muestra usado en la ligación.

9.7.2. Análisis de las colonias positivas.

La figura 25 muestra tres colonias de las cuales se obtuvo un producto de PCR aproximado de 600 pb que es el peso molecular que se esperaba, por lo que las colonias se colocaron en 20 mL de medio líquido con ampicilina y se incuban 37° C a 100 rpm una noche. De esas tres muestras sólo hubo crecimiento en dos.

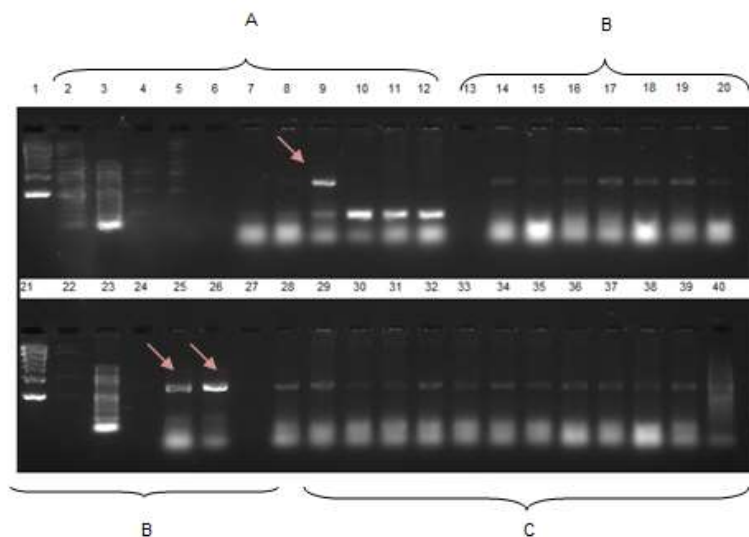


Figura 25. Colonias positivas en la clonación del dominio globular.

9.7.3. Extracción y purificación del plásmido.

De las dos colonias en las que hubo crecimiento en medio líquido, se realizó la extracción y purificación del plásmido, denominándolas A1 y A2 respectivamente.

Tabla 11. Concentración, relación 260/280 y relación 260/230 del plásmido de cada una de las colonias.

	Concentración ng/μL	260/280	260/230
Colonia A1:	13.4	2.15	4.30
Colonia A2:	38.9	1.91	2.52

*Nota: Se utilizó como blanco buffer TE.

9.8. Secuenciación.

Finalmente estos dos plásmidos que contienen la secuencia del dominio globular se verificaron por secuenciación. A continuación se muestra el electroferograma, secuencias y alineamiento obtenido.

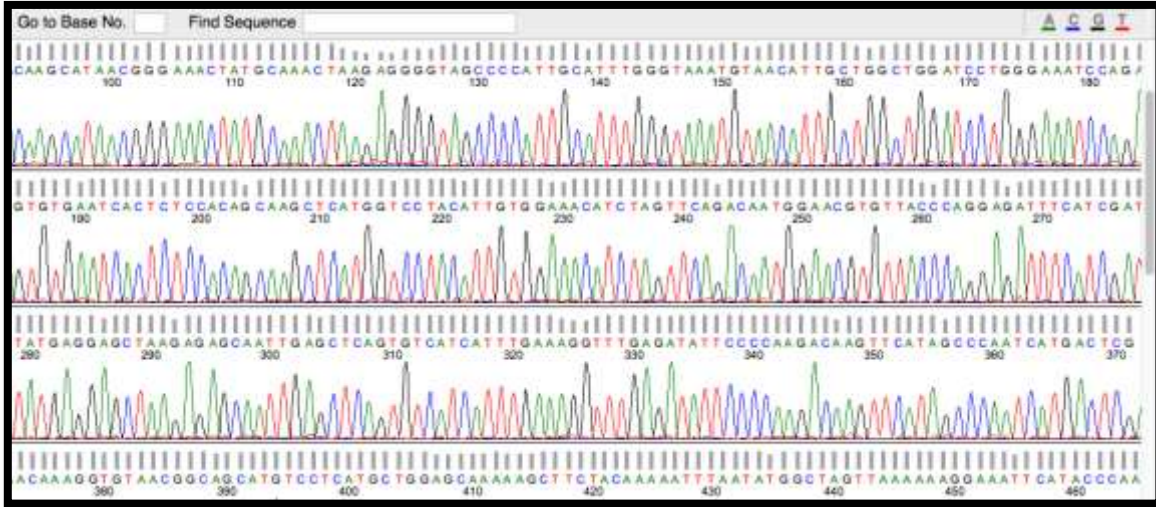


Figura 26. Electroferograma del dominio globular

TCTCTTTTCGGGGCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAA TTCACCACACTGG
 ATCCTAGGTACAGGCCCTTGACAAGCATAACGGGAAACTATGCAAAC TAAGAGGGGTAGCCCCATTGCAT
 TTGGGTAATGTAACATTGCTGGCTGGATCCTG GGAATCCAGAGTGTGAATCACTCTCCACAGCAAGCT
 CATGGTCTACATTGTGGAACATCTAGTTCAGACAATGGAACGTGTACCCAGGAGATTTCATCGATTAT
 GAGGAGCTAAGAGAGCAATTGAGCTCAGTGTTCATCATTTGAAAGGTTTGAAGATA TCCCAAGACAAGTTC
 ATAGCCCAATCATGACTCGAACAAGGTGTAACGGCAGCATGTCCTCATGCTGGAGCAAAAAGCTTCTAC
 AAAAATTTAATATGGCTAGTTAAAAAGGAAATTCATACCCAAAGCTCAGCAAATCCTACATTAATGATAAA
 GGGAAAGAAGTCTCGTGCTATGGGGCATTACCATCCATCTACTAGTGCTGACCAACAAAAGTCTCTATC
 AGAATGCAGATGCATATGTTTTGTGGGGTCATCAAGATACAGCAAGAAGTTCAAGCCGGAAGTAGCAATA
 AGACCCAAAGTGAGGGATCAAGAAGGGAGAATGAACTATTACTGGACGCTAGTAGAGCCGGGAGACAAA
 ATAACATTCGAAGCAACTGGAAATCTAGTGGTACCGAGATATGCATTCGCAATGGAAGAATGCTGGGATCT
 GGTATTATCATTTAGATACACCAGTCCACGATTGCCATAACAACCTTTGTCAGAACACCCCAATGGGGTGC
 CTA

Figura 27. Secuencia globular utilizando el primer LP

GCCTGGATCGGGGACTGTACGACTATGACGATAAGGTACAGGCCCTTCTGGTAAATCCTTGTTGATTCCA
 GCTTACCCCATCTATTTCTCTGTTTAATTTGCTTCCCTCGAGTATTTGGGTAGTCATAAGTCCCATT
 TTTGACACTTCCATGCACGTGTTATCTCATTGTGGTAAATTCAAAGCACCCGTTTCCAATTTCTTTGGC
 ATTGTTTTTAGCTGGCTTCTTACCTTTTCATAAAGTCTTACATTTGAATCATGGTACTCCAAAGTTCTT
 TCATTTTCCAATATAACCAACAGTTCGGCATTGTAAGTCCAAATGTCCAGCAAACCATCATCAACTTTTTTA
 TTTAAATCTCTATTCTTTTTCCAGGTGGTGAAGTCTTTACCTACTGCTGTGAAGTGTGATTCATCTTTT
 CAATAACAGAATTTACTTTGTAGTAATCTCGTCAATGGCATTCTGTGTGCTCTTCCAGGTCGGCTGCATATC
 CTGACCCCTGCTCATTTTGATGGTGATAACCGTACCATCCATCTACCATCCCTGTCCACCCCTTCAAT
 GAAACGGCAATGGCCCCAAATAAGCCTCTAGATTGAATAGACGGGACATTCTCAATCCTGTGGCCAGT
 CTCAATTTTGTGCTTTTTACATATTTGGACATTTCCAATTGTGATCGGATGTATATTCTGAAATGGGAGG
 CTGGTGTATAGCACCCCTGGGTGCTGACAAGTTGTATTGCATCGTGAAGTGGTGATCTGATATGATA
 ATACCAGATCCAGCATTCTTTCCATTGCCGAATGCATATCTCGGGTACCACTAG

Figura 28. Secuencia globular utilizando el primer RP

9.9 Análisis de las secuencias clonadas

Se realizó un alineamiento (BLAST) en la base de datos de NCBI, con las secuencias anteriores, las cuales mostraron un 98% de homología con hemaglutinina del virus de influenza A de Korea.

hemagglutinin [Influenza A virus (A/swine/Korea/VD02/2009(H1N1))]

Sequence ID: [gb|ADC53523.2](#) Length: 276 Number of Matches: 1

Range 1: 48 to 272 [GenPept](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
466 bits(1198)	8e-163	Compositional matrix adjust.	221/225(98%)	223/225(99%)	0/225(0%)	+3
Query 90		DKHNGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSSSDNGTCYPGD			269	
Sbjct 48		DKHNGKLCCKLRGVAPLHLGKCNIAAGWILGNPECESLSTASSWSYIVETSSSDNGTCYPGD			107	
Query 270		FIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSS*PNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKK			449	
Sbjct 108		FIDYEELREQLSSVSSFERFEIFPKTSSPNHDSNKGVTAAACPHAGAKSFYKNLIWLVKK			167	
Query 450		GNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFGSSRYSKFKKPEV			629	
Sbjct 168		GNSYPKLSKSYINDKGKEVLVLWGIHHPSTSADQQSLYQNADAYVFG+SRYSKFKKPE+			227	
Query 630		AIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMEE		764		
Sbjct 228		AIRPKVRDQEGRMNYYWTLVEPGDKITFEATGNLVVPRYAFAMER		272		

Figura 29 Alineamiento de la secuencia globular clonada, realizado en la base de datos de NCBI

10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Al realizar el análisis de las colonias positivas, se pudo observar crecimiento de 36 colonias en las placas de agar. Ya en los geles se puede apreciar que de esas 36 colonias sólo una da un amplicón del tamaño esperado de aproximadamente 1.7 Kb que es tamaño del fragmento 4 completo que contiene la secuencia de la hemaglutinina. Con esto podemos inferir que no es un bajo rendimiento del proceso de transformación, ya que hubo crecimiento de varias colonias y el hecho de que el plásmido presenta el gen de resistencia a antibiótico (Ampicilina) como marcador de selección, nos indicaría que la presencia de crecimiento es de bacterias que fueron capaces de aceptar el plásmido. Por lo que se podría hablar de un bajo rendimiento en la ligación del inserto al vector. Esto puede suceder debido a que uno de los inconvenientes al utilizar sales durante tiempos de incubación largos es que la topoisomerasa se disocia del vector. Como segunda instancia se pensó que el tamaño del inserto era grande para el vector, pero el fabricante asegura el funcionamiento para fragmentos menores de 3Kb. Una posibilidad más es que los oligonucleótidos se unan inespecíficamente a secuencias del genoma bacteriano ya que al ser un PCR en colonia existe esta posibilidad.

De la colonia que dio positivo con un amplicón de 1.7 Kb, se aisló y purificó el plásmido con un alto grado de pureza ya que tuvo una relación 260/280 de 1.87, por lo que fue posible utilizarla para su secuenciación, obteniéndose 1514 pares de bases (1.5 Kb), la cual al alinearse con secuencias reportadas en la base de datos de NCBI, se mostró que de 1435 nucleótidos, 1413 cubren el alineamiento, esto es el 98% de homología con la secuencia de la hemaglutinina de la cepa A/México/24053/2009(H1N1).

El resultado en el montaje del PCR para el plásmido con la secuencia clonada previamente y los primers diseñados para la región globular, mostró bandas con un peso molecular aproximado entre 500 y 600 pares de bases. Dichas bandas fueron purificadas y utilizadas para clonar en un nuevo vector. Con el antecedente de la baja eficiencia en el anclaje del inserto, se decidió cambiar de vector y la

cantidad de muestra (inserto), para ver el efecto en la ligación. Los resultados muestran crecimiento en tres de las seis cajas con las diferentes condiciones (cantidad de muestra), en la primera caja 6 colonias, en la segunda 9 y en la tercera 13. Posteriormente, se realizó el análisis de las colonias positivas mediante PCR. En la figura 25, se puede apreciar tres bandas bien definidas con un peso aproximado en 600 pb, en el pozo 10 a 12 se puede observar muy nítidamente una banda con peso moleculares de 100 pb, estos podrían ser residuos de oligonucleótidos. En los pozos 14 a 20 y 28 a 39 se puede ver una banda en 600 pb, sin embargo se decide monitorear las primeras tres, ya que estas últimas no se observa tan nítidamente.

Se puede observar que al cambiar el vector la eficiencia mejoró, pues se observa crecimiento de 28 colonias de las cuales 22 presentan una banda con el peso molecular esperado; 3 de ellas monitoreadas para la secuenciación. También podemos observar que la cantidad de muestra es determinante para la eficiencia, ya que con 1 μ L de muestra se observó crecimiento de 6 colonias de las cuales tan sólo una tenía el inserto con el peso molecular esperado. Con 2 μ L de muestra se observa un aumento tanto en el crecimiento así como en las colonias que se observa la banda esperada, lo mismo para cuando se utilizaron 3 μ L.

La muestra que se decidió utilizar para secuenciación es la que presenta menor contaminación (colonia A2) con una relación 260/280 de 1.91.

Finalmente el plásmido que contiene la secuencia globular se secuenció con los primers diseñados para la parte globular. Para ambas muestras con cada uno de los primers (LP y RP), los electroferogramas mostraron señal. Una vez traducida esta secuencia, se realizó un alineamiento con proteínas en la base de datos de NCBI. Se puede observar que de 225 aminoácidos 221 cubren el alineamiento, esto es el 98% de identidad lo que nos estaría indicando la homología de nuestra secuencia clonada con la de la cepa (A/swinw/Korea/VD02/2009(H1N1)) reportada en la base de datos.

Así entonces, se puede inferir que para el proceso de ligación entre los factores que hay que supervisar, es la cantidad de muestra; ya que pudimos observar que es una variable determinante en el rendimiento de la reacción de ligación.

11. CONCLUSIÓN

Se logró clonar la secuencia nucleotídica para el fragmento F4 (Hemaglutinina) del virus de influenza AH1N1, mediante un vector de clonación. Así como también el diseño de primers de la región globular involucrada en el proceso de infección, logrando clonar la secuencia perteneciente a la región globular.

Se pudo observar que la variación en la eficiencia de la reacción de ligación pudo deberse a la cantidad de muestra utilizada, en este ensayo mostró una mejor eficiencia utilizando 2 μL de muestra (inserto) para la reacción de ligación. Así como también el tiempo de incubación se monitoreo para mejores resultados.

Se logra obtener ambas secuencias (fragmento entero y la parte globular) con homología a Hemaglutinina de cepas reportadas en la base de datos de NCBI con un alto porcentaje de identidad.

12. PERSPECTIVAS

*Llevar a cabo la sobreexpresión de la proteína en un sistema de expresión eucariote.

*Mutagénesis dirigida para propuestas de probables mutaciones que sirva de indicio para el diseño de futuros fármacos.

13. REFERENCIAS

1. Luan-Yin Chang,† Shin-Ru Shih,† Pei-Lan Shao, Daniel Tsung-Ning Huang, Li-Min Huang. Novel Swine-origin Influenza Virus A (H1N1): The First Pandemic of the 21st Century. *J Formos Med Assoc.* 2009 Jul; 108(7):526-32.
2. Sami Al Hajjar, Kenneth McIntosh. The first influenza pandemic of the 21st century. *Ann Saud Med* 2010; 30 (1):1-10
3. Karl G. Nicholson, John M. Wood, María Zambom. Influenza. *The lancet* 2003; 362: 1733-45.
4. Derek Gatherer. The 2009 H1N1 Influenza outbreak in its historical context. *Journal of Clinical Virology* 45 (2009) 174-175.
5. Nicole M. Bouvier^{a,b}, Peter Palese. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. *Vaccine* 26S (2008) D49–D53
6. Per A. Bullough, Frederick M. Hughson, John J. Skehel and Don C. Wiley. Structure of Influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *NATURE* 1994 Vol. 371 p. 37-43
7. María Eugenia Flores Munguía, Luz Vazquez Moreno, Gabriela Ramos-Clamont Montfort. Glicobiología del virus de la influenza A. *Revista Latinoamericana* 2007 Vol 49, Nos 3-4 pp.74-87
8. Don C. Wiley, John J. Skehel. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann Rev Biochem* 1987 56: 365-94.
9. Chavela M. Carr, Charu Chaudhry and Peter S. Kim. The National Academy of Science Influenza hemagglutinin is spring-loaded by a metastable native conformation. [http:// www.pnas.org](http://www.pnas.org) This contribution is part of the special series of Inaugural Articles by members of the National Academy of Science elected on april 29, 1997. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) pp 14306- 14313
10. Jue Chen, Kon Ho Lee, David A; Steinhauer, David J Stevens, John J. Skehel and Don C. Wiley. Structure of the Hemmaggutin in Precursor Cleavage site, a Determinant of Influenza Pathogenicity and the Origin of the Labile Conformation. *Cell* 1998, Vol 95. 409-417.
11. Rui Xu, Damian C. Ekiert, Jens C. Krause, Rong Hai, James E. Crowe Jr; Ian A. Wilson. Structural Basis of Preexisting Immunity to the 2009 H1N1 Pandemic Influenza Virus. *Science* 2010. Vol. 328: 357-360.
12. W. Weis; J. Brown; S. Cusack, J. C. Paulson, J. J. Skehel & D. C. Wiley. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 1988. Vol 333. 426-431.
13. Nancy D. Denslow, Paul T. Wingfield and Keith Rose. Overview of the Characterization of Recombinat Proteins. *Current Protocols in Protein Science* (1995) Chapter 7.

14. Guerrero Olazarán Martha, Cab-Barrera Eddy L, Galán-Wong Luis y Viader-Salvadó. Biotecnología de Proteínas recombinantes para la aplicación en Acuicultura. Avances en nutrición agrícola VII. Memorias del VII simposium Internacional de Nutrición Acuícola 2004, Hermosillo, Sonora, México.
15. Drago Serrano María Elisa, Sainz Espuñes. Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 2006.Volumen 37 N°1 p. 38-44
16. Jonasson Per, Liljeqvist Sissela, Nygren Per-Ake, and Stahl Stefan. Review Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in Escherichia coli. Biotechnol. Appl. Biochem 2002. 35, 91-105.
17. Goulding Celia W. and Perry L. Jeanne. Protein production in Escherichia coli for structural studies by X-ray crystallography. Journal of Structural Biology 2003 142, 133-143.
18. Anne Moscona, M.D. Oseltamivir Resistance-Disabling Our Influenza Defenses. The New England Journal of medicine 2005. 353, 2633-2636.
19. Technical support bulletin. 260/280 and 260/230 ratios. NanoDrop ND-1000 and ND-800 8-Sample Spectrophotometers.
20. Kind Thomas J; Goldsby Richard A and Osborne Barbara A. "Kuby Immunology" 6 edición. Editorial Mc Graw Hill. México 2007.
21. Sambrook, J. and D. Russell. 2001. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. pp 8.4-8.9
22. Klug William S; Cummings Michael R. y Spencer Charlotte A. "Conceptos de Genética" 8º edición. Editorial Pearson Prentice Hall. España 2006. Pp.538, 540, 541, 542

Páginas WEB consultadas:

Plan Nacional de preparación y respuesta ante una pandemia de influenza.(03/10)

URL1:www.cenavece.salud.gob.mx/indre

Boletín epidemiológico Influenza AH1N1 (10/10)

URL2:<http://www.envigado.gov.co/Secretarias/SecretariadeSalud/documentos/Vigilancia%20epidemiologica/Boletin%20N%2026%20Influenza%20AH1N1.pdf> . URL

URL3:<http://www.flu.gov/individualfamily/vaccination/index.html> (10/10)

URL4:<http://www.cdc.gov/flu/professionals/acip/background.htm> (10/10)

URL5:http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb76_1.html (10/10)

URL6:<http://cbm.msoe.edu/teachRes/palm/influenza.html> (10/10)

URL7:http://www.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/omm/jmol/ha/ha.html (10/10)

URL8:<http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespcr.htm> Eva Mas, Julio Poza, Jesús Ciriza, Pilar Zaragoza, Rosario Osta y Clementina Rodellar. Laboratorio de Genética, Bioquímica y Grupos Sanguíneos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza (España)(11/10)

URL9:<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMp058291> (09/11)