

00562

6

2 ej.

"CLONACION DEL GENOMA DEL ROTAVIRUS PORCINO YM
Y SECUENCIACION PARCIAL DEL GENE 4"

Tesis que para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (BIOQUIMICA)
presenta:

MARIA IMELDA LOPEZ VILLASEÑOR

FACULTAD DE QUIMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
1989.

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



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.

RESUMEN

Los rotavirus son el agente etiológico mas comun de gastroenteritis que aqueja a la población infantil y a las crías de distintas especies animales.

En esta Tesis se trabajó con un rotavirus porcino adaptado a crecer in vitro en células de riñón de mono, sin perder su capacidad de infectar lechones. Se describen los procedimientos de clonación del genoma viral (de RNA) en DNA complementario insertado en plásmidos bacterianos. Por hibridación heteróloga se aislaron clones recombinantes con insertos relacionados a los genes de las dos proteínas de superficie VP3 y VP7, que son los antígenos de neutralización mas importantes del virus. Se realizó la secuencia nucleotídica de las clones de VP3, con lo que se obtuvo alrededor del 75% de la región codificadora. Los fragmentos clonados serán utilizados para la producción de vacunas sintéticas mediante su expresión en Escherichia coli.

Se resalta la descripción detallada de las metodologías empleadas, por lo que esta Tesis puede ser un documento útil de consulta para personas interesadas en la Biología Molecular de virus de RNA.

SUMMARY

Rotaviruses are the most common etiologic agents of acute gastroenteritis in children and in the young of many animal species.

The biological system used in this work was the porcine rotavirus YM, which was adapted to grow in vitro on MA 104 cells without affecting its capacity to infect piglets.

This work describes the procedures for cloning the viral genomic RNA as a complementary DNA inserted into bacterial plasmids. Heterologous hybridization rendered the isolation of recombinant clones containing sequences related to VP3 and VP7, the two most important viral neutralization antigens. About 75% of the VP3 gene was sequenced. The cloned fragments will be expressed in Escherichia coli and used for the production of synthetic vaccines.

The description of the methods here employed is detailed enough, so that this work can be used as a reference guide for the Molecular Biology of RNA viruses.

Introducción

Las enfermedades diarreicas constituyen uno de los padecimientos más comunes en los neonatos y niños de todo el mundo; éstos adquieren especial importancia en los países en vías de desarrollo puesto que constituyen una de las causas principales de mortalidad en la población infantil. Estudios epidemiológicos realizados por la Organización Mundial de la Salud arrojan resultados impactantes: en Egipto, Guatemala, El Salvador, México, Nicaragua, República Dominicana, Honduras, Colombia y Paraguay, del 10 al 34% de las muertes ocurridas durante 1 año (1968-1970) se deben a enfermedades diarreicas [17]. Synder y Merson han estimado que en Africa, América Latina y Asia (excluyendo China) ocurren anualmente mil millones de episodios diarreicos y 4.6 millones de muertes causadas por esta enfermedad en niños menores de 5 años de edad [1].

En el año de 1973, en Australia, Bishop y colaboradores describieron la presencia de partículas virales de 70 nm al analizar por microscopía electrónica biopsias duodenales de niños hospitalizados por gastroenteritis aguda [17]. Poco tiempo después, otros investigadores pudieron observar partículas similares en heces analizadas por microscopía electrónica [18,19]. A partir de entonces han aparecido reportes de todo el mundo que en la actualidad acreditan a estos virus, denominados rotavirus, como el agente etiológico individual más importante asociado a episodios diarreicos en niños en todo el mundo [2-8].

Si bien los rotavirus humanos no fueron descubiertos sino hasta 1973, ya en 1963 Adams y Kraft habian descrito la presencia de partículas virales en tejido intestinal de ratones infectados con el virus EDIM (epizootic diarrhea of infant mice) [20]. También en 1963, Malherbe y colaboradores reportaron el aislamiento de un virus de 70 nm al que designaron SA11 (simian agent)-11. Este virus fue aislado de un lavado intestinal obtenido de un mono vervet sano, y fue propagado eficientemente en cultivo de células de riñon de mono [21]. A partir de entonces, diferentes estudios han mostrado la presencia de rotavirus en las heces diarreicas de las crías de un gran número de mamíferos y aves, incluyendo animales de crianza como cerdos, bovinos y equinos, donde las diarreas por rotavirus producen grandes pérdidas económicas tanto por muerte como por retardo en la ganancia de peso [9-11].

Ante la magnitud del problema que representan las enfermedades diarreicas, la Organización Mundial de la Salud ha impulsado el estudio de los agentes causales de la diarrea y el tratamiento de las mismas.

Es claro que una forma de reducir la morbilidad y mortalidad infantil causada por diarrea es a través de un programa dirigido a mejorar las condiciones sanitarias generales, la higiene y la educación de los grupos de mayor riesgo. Otra forma de reducir las diarreas es con el desarrollo de vacunas eficientes. Una vacuna contra rotavirus sería de utilidad aún logrando los objetivos

anteriores ya que la diarrea por este virus parece ser altamente contagiosa y es difícil evitarla aún en buenas condiciones sanitarias.

Al microscopio electrónico, los rotavirus poseen una morfología característica que asemeja una rueda, de donde se deriva su nombre (en latín rota = rueda). Las partículas completas (densidad = 1.36g/cm^3) poseen una doble cápside y miden aproximadamente 70 nm de diámetro; a estas partículas también se les denomina "lisas" pues la capa externa se observa como un círculo bien definido; recientemente se ha descrito la presencia en la superficie del virus de peplómeros de aproximadamente 6 nm de largo [datos no publicados]. Al microscopio electrónico se observan también partículas de apariencia rugosa (densidad = 1.38g/cm^3), las cuales contienen únicamente la capa interna y tienen un diámetro aproximado de 55 nm. [23]. La infectividad viral está asociada a las partículas completas, la cual se pierde al tratar el virus con agentes quelantes como EDTA ó EGTA, tratamiento que provoca la pérdida de la capa externa del virus [24].

El genoma viral, de aproximadamente 20000 pb, consta de 11 segmentos de RNA de doble cadena cuyo tamaño varía entre 660 y 4000 pb [25]. El perfil electroforético de los segmentos de RNA muestra un patrón característico (Fig. 1). En algunas cepas de rotavirus humanos los segmentos 10 y 11 migran menos que lo usual, lo que da lugar al llamado patrón "corto" que es característico de todos los

GENOMA DE
RNA DS

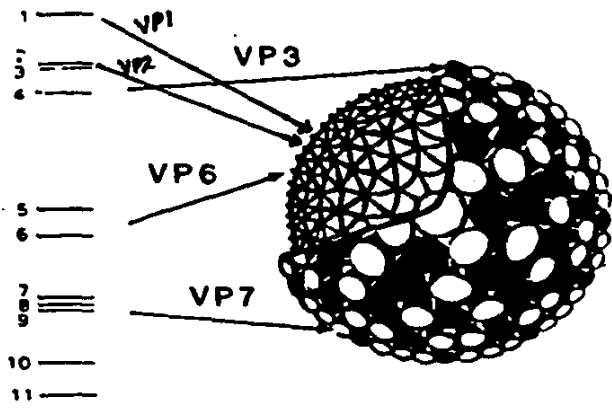


Figura 1.

Representacion esquemática de la estructura de los rotavirus.

rotavirus humanos pertenecientes al serotipo 2 [26,27].

En el contexto de la organización del genoma, resulta interesante que cada uno de los 11 segmentos de RNA codifica aparentemente para una proteína viral. Por lo menos 5 proteínas virales (VP1, VP2, VP3, VP6 y VP7) son incorporadas en la doble cápside del virión [28]; las seis proteínas restantes (NCVP1 a NCVP6), si bien están presentes en extractos de células infectadas, no son recuperables del virus purificado, por lo que se consideran proteínas no estructurales [29].

La asignación de los productos génicos virales se ha llevado a cabo mediante diferentes enfoques experimentales como son: a) La correlación entre genotipo y fenotipo de virus rearreglantes obtenidos por coinfección con 2 cepas diferentes de rotavirus [30]; b) Análisis de los productos protéicos obtenidos por traducción in vitro de los segmentos de dsRNA individuales, previa desnaturalización [29], y c) Traducción in vitro de los mRNA virales fraccionados, producidos por la RNA polimerasa viral, y análisis de los productos protéicos [50]. Con este tipo de datos experimentales se ha demostrado que en el rotavirus de simio SA11, las proteínas de la cápside interna VP1, VP2 y VP6 están codificadas por los segmentos 1,2 y 6 respectivamente, mientras que los segmentos 4 y 9 codifican para las proteínas de la cápside externa VP3 y VP7 [fig. 1]. Recientemente se ha demostrado que el producto del gene 3 de los rotavirus, también es parte de la capa interna del virus.

Los rotavirus representan un género dentro de la familia Reoviridae (22), dentro del cual han sido clasificados en 7 serotipos diferentes. Los rotavirus aislados de humanos pueden pertenecer a los serotipos 1,2,3 y 4, mientras que los rotavirus aislados de animales se han clasificado dentro de los serotipos 3,4,5,6 y 7 (57). Hasta ahora, todos los rotavirus aislados de cerdos han sido asignados a los serotipos 4 y 5, teniendo como cepas de referencia a los rotavirus Gottfried y Osu respectivamente.

En cuanto a la antigenicidad de las proteínas virales, se había considerado a la glicoproteína mas abundante de la capa externa, VP7, como la responsable de inducir la mayoría de anticuerpos neutralizantes y específicos de serotipo (30). Sin embargo, datos obtenidos utilizando anticuerpos monoclonales sugieren que el sistema de neutralización es de una complejidad mayor a la inicialmente considerada: existe la evidencia de que VP3 es un inmunogeno tan potente como VP7 capaz de inducir también anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo y diferentes a los inducidos por VP7 (42); por esto, algunos autores han sugerido la necesidad de un sistema dual para la clasificación de los rotavirus en el que se identifique la especificidad neutralizante de anticuerpos inducidos tanto por VP3 como por VP7.

Resulta interesante el que la infectividad in vitro de los rotavirus se vea aumentada hasta en 1000 veces por efecto del

tratamiento del virus con tripsina [46]. Se ha demostrado que el efecto de esta enzima es directamente sobre el virus, específicamente sobre VP3, y no sobre la célula [47]. El rompimiento proteolítico de VP3 (88000 daltones) genera dos especies de menor peso molecular: VP5 (60000 daltones) y VP8 (28000 daltones) [28,43,44]. Cabe mencionar que VP7, la proteína mayoritaria de la capa externa, y VP6, la proteína mas abundante de la capa interna, no son afectadas por el tratamiento del virus con tripsina [44].

Recientemente se ha deducido la secuencia protéica de VP3 a partir de copias de DNA complementario al RNA genómico [61]. En esta secuencia se identificaron dos argininas muy cercanas entre sí que podrian producir las dos especies de menor peso molecular ya mencionadas (VP5 y VP8). La secuenciación del extremo amino terminal de VP5 obtenida del virus tratado con tripsina mostró que el rompimiento puede ocurrir en cualquiera de las dos argininas, lo que confirmó a esta región como el sitio de corte. Se ha demostrado que estos dos sitios de corte se encuentran altamente conservados entre rotavirus de diferentes serotipos [70].

Se desconoce aún el mecanismo por medio del cual el rompimiento proteolítico conlleva a un aumento en la infectividad del virus. Clark y cols. [43] demostraron que el tratamiento con tripsina no altera la unión del virus a la célula, y sugirieron que la pérdida de la capa externa viral se favorecía mediante el mencionado corte

proteolítico. Recientemente se han presentado evidencias [71] de que el tratamiento del virus con tripsina produce partículas infectivas que entran a la célula mediante penetración directa a la membrana plasmática, mientras que los virus no tratados con tripsina pueden penetrar a la célula utilizando otra vía de entrada (posiblemente endocitosis), pero no son capaces de establecer una infección.

El ya mencionado incremento de la infectividad viral de los rotavirus como resultado del rompimiento proteolítico, específico de una proteína viral, ha sido igualmente descrito en otras familias de virus. Tal es el caso de los Paramixovirus (virus del sarampión, virus Sendai, etc.) y los Mixovirus (virus de la influenza). Al comparar la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal generado por el corte con tripsina en varios miembros de esta familia, se ha encontrado que ésta está altamente conservada [48]. Cabe mencionar que en ambos casos, la proteína cortada por tripsina (F en Paramixovirus y HA en Mixovirus) participa fundamentalmente en la fusión de las membranas viral y celular durante la infección. La secuencia del extremo amino ya mencionada se ha logrado mimetizar en péptidos sintéticos, y al probar su actividad biológica se ha visto que estos péptidos son capaces de atenuar la infectividad del virus en cultivo de células al inhibir la fusión de las membranas viral y celular [49].

Alternativas para el desarrollo de una vacuna contra rotavirus.-

Al establecer a los rotavirus como importantes agentes etiológicos de la gastroenteritis aguda en humanos, mamíferos y aves, se ha reconocido ampliamente la necesidad del desarrollo de métodos inmunoprolifácticos contra la diarrea causada por estos virus [7,51].

Varios grupos de investigadores han trabajado en la producción de vacunas contra rotavirus, utilizando principalmente el método "Jenneriano" para obtener al inmunógeno, esto es, el empleo de rotavirus aislados de animales, los cuales representan cepas naturales atenuadas para humanos. Una cepa candidato para ser usada como vacuna contra rotavirus en humanos es la aislada de bovinos, llamada RIT 4237, derivada de la cepa NCDV y que ha sido pasada numerosas veces en cultivos in vitro y puede producirse en grandes cantidades en células primarias de riñon de mono [52]. En un ensayo realizado en Finlandia para evaluar la capacidad de la mencionada cepa RIT 4237 para proteger a niños contra infecciones naturales por rotavirus, se encontró que una sola dosis oral es capaz de proteger en un 88% contra la diarrea por rotavirus clínicamente significativa [53]. Sin embargo, en una prueba llevada a cabo en Gambia, se observó que la eficacia de esta misma vacuna fue de 33% y no se observó una disminución significativa en la severidad de las infecciones clínicas [54]. Resultados similares a este último se obtuvieron en una prueba realizada en Rwanda [55].

Otra cepa que ha sido propuesta como vacuna es el rotavirus MMU-18006, el cual fue aislado de mono rhesus. Esta vacuna fue evaluada en Venezuela en niños de 1 a 10 meses de edad, donde se mostró que su eficacia contra cualquier diarrea causada por rotavirus fue de 68%, mientras que la eficacia de la vacuna contra los episodios mas severos de diarrea fue de un 100%. Aún cuando los resultados obtenidos con esta vacuna parecen ser alentadores, es necesario llevar a cabo un mayor número de pruebas en poblaciones formadas por grupos socioeconómicos y raciales diferentes.

Un sistema alternativo prometedor para la producción de vacunas lo ofrece la utilización de técnicas de DNA recombinante para la producción en bacterias, levaduras o células animales de las proteínas antigenicamente relevantes del virus, las cuales podrían ser usadas como inmunógenos para inducir protección contra la infección viral. Este nuevo enfoque en la producción de vacunas es especialmente atractivo para rotavirus, ya que este virus no puede adaptarse fácilmente a crecer in vitro y consecuentemente es difícil la producción de vacunas convencionales en las que se utiliza el virus completo ya sea atenuado o inactivado. En general, la utilización del patógeno completo como inmunógeno presenta algunos problemas como son la posible reactivación de la virulencia o la presencia de sustancias tóxicas contaminantes provenientes del organismo donde se propagó el virus. Existen además requerimientos importantes para las vacunas de agentes vivos, como pueden ser las condiciones de temperatura para el mantenimiento de

la vacuna hasta ser inoculada, lo que puede representar una limitante seria en países subdesarrollados. Por todas estas razones, el interés en la producción de vacunas sintéticas ha aumentado considerablemente en los últimos años.

Respecto al avance en el desarrollo de vacunas sintéticas contra rotavirus, ya se ha logrado sintetizar en Escherichia coli a la glicoproteína de capa externa (VP7) del rotavirus de simio SA11. Esta proteína se sintetizó como un híbrido con la proteína β -galactosidasa. Cuando esta proteína híbrida fue inoculada en ratones, indujo anticuerpos neutralizantes contra el rotavirus SA11 [58]. Por otra parte, se ha llevado a cabo también la síntesis en E. coli de aproximadamente el 45% de la otra proteína de capa externa de SA11, VP3, fusionada a los primeros 98 aminoácidos de la polimerasa del fago MS2. Este fragmento de la proteína incluye al sitio de corte por tripsina y a VP8, el producto de procesamiento de la región amino terminal de VP3. Al inocular este producto en ratones, se obtuvieron, al igual que con VP7- β -galactosidasa, anticuerpos neutralizantes de la infectividad del rotavirus SA11 [59]. Cabe mencionar que tanto VP7 como la región de VP3 expresadas en E. coli son capaces de primoestimular la respuesta inmune contra SA11 al ser inoculados en ratones.

Los resultados anteriores muestran un panorama alentador de los esfuerzos encaminados hacia la producción de una vacuna contra rotavirus por medio de ingeniería genética. Vale la pena mencionar

que el rotavirus de simio SA11 no es el sistema adecuado para realizar experimentos de protección in vivo, ya que no induce diarrea en animales experimentales. Recientemente, se aisló en nuestro laboratorio, a partir del contenido intestinal de un lechón con diarrea, un rotavirus, designado YM. Este rotavirus ha sido adaptado a crecer in vitro sin perder su capacidad de provocar diarrea en lechones. Este sistema de rotavirus porcino se considera adecuado para ser utilizado como modelo de estudio de los rotavirus, ya que permite llevar a cabo ensayos de protección in vivo con los productos obtenidos por manipulación genética.

OBJETIVOS

En nuestro laboratorio se ha emprendido una línea de investigación cuyo interés es el desarrollo de un sistema biológico que permita realizar ensayos de protección in vivo contra la infección por rotavirus, para ensayar la capacidad protectora de inmunógenos obtenidos por manipulación genética. Se ha escogido al rotavirus porcino YM como un sistema modelo.

En este contexto, los objetivos del presente trabajo son:

1. La construcción de un banco de DNA complementario al genoma del rotavirus porcino YM.
2. Identificación y aislamiento de clonas recombinantes que contengan secuencias relacionadas con los dos antígenos de superficie virales: VP3 y VP7.
3. Secuenciación de las clonas de cDNA obtenidas para el gene que codifica para VP3.

Materiales y Métodos.

El rotavirus YM utilizado en este trabajo fue aislado por el Dr. Romilio Espejo a partir del contenido intestinal de un lechón con diarrea. Este virus fue adaptado a crecer in vitro y después de 8 pasajes, mantuvo su capacidad de infección e inducción de diarrea en lechones [69].

1. Propagación y Purificación del virus.

El rotavirus porcino YM se propagó en la línea celular MA104 proveniente de riñón de mono, de acuerdo al procedimiento descrito para la propagación del rotavirus de simio SA-11 [28]. Tanto para la infección como para la propagación del virus se utilizó el medio mínimo de Eagle [73,74] adicionado con 10 µg/ml de tripsina. Después de 1-2 días de infección se observó un 80 a 100% de efecto citopático en la monocapa celular, y en este momento se purificó el virus de la siguiente manera: el lisado celular se congeló y descongeló dos veces y las partículas virales asociadas a material celular se extrajeron mediante la adición de un volumen de trifluorotricloroetano (freón). El material se agitó vigorosamente durante 20 min. a 4°C, y se centrifugó a 10000 g durante 10 min. El virus presente en la fase acuosa se precipitó con 8% PEG (peso/volumen) durante 14 h a 4°C, y se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min. en el rotor SS34 (Sorvall). La pastilla viral se resuspendió en 200 µl de amortiguador TSM (Tris-HCl 0.01M,

NaCl 0.15M, MgCL₂ 0.001M, pH 8.2) y se centrifugó 3h a través de un gradiente lineal preformado de CsCl (densidad de 1.3 a 1.4 g/cm³) en amortiguador TM (Tris-HCl 0.01M, MgCL₂ 0.001M, pH 8.2) a 36000 rpm en el rotor SW55 (Beckman). El material de las dos bandas virales (virus con y sin capa externa) fue colectado por punción lateral, y posteriormente lavado del CsCl mediante su dilución con amortiguador TM y su centrifugación a 40000 rpm durante 30 min. en el rotor SW55. Finalmente, el precipitado viral se resuspendió en amortiguador TSM para su uso posterior.

2. Extracción del RNA viral.

Los virus fueron lisados en SDS 2%, EDTA 0.012M pH 7 y β -mercaptoetanol durante 15 min. a temperatura ambiente. El RNA se extrajo 2 veces con un volumen de fenol (bidestilado y saturado con solución amortiguadora de Tris-HCl 0.1M, EDTA 0.1mM pH 7.5), una vez con dos volúmenes de una mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y por último una vez con un volumen de una mezcla cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). El RNA se precipitó con acetato de amonio 0.2M y 2.5 volúmenes de etanol durante 15 min. a -70°C y se sedimentó por centrifugación durante 10 min. a 12000 g en microcentrífuga (Eppendorf). El RNA se resuspendió en amortiguador TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 0.1mM pH 7.4) y se guardó a -20°C. La concentración de RNA se estimó mediante densidad óptica a 260 nm (42 μ g/ml = 1.0 O.D.) y por electroforesis en geles de acrilamida (ver secc. 4.4).

3. Construcción del Banco de cDNA.

La estrategia para la síntesis y clonación del DNA complementario al RNA del rotavirus porcino YM se ilustra en la figura 2 y a continuación se detallan las condiciones experimentales.

3.1. Desnaturalización del RNA genómico y síntesis de la primera cadena de cDNA.

Para la síntesis de la primera cadena de DNA complementario se utilizaron 3.5 µg de RNA doble cadena (dsRNA) del rotavirus YM como templado. El dsRNA se desnaturalizó en presencia de dimetilsulfóxido al 90%, a 70°C durante 10 min. Inmediatamente después se congeló sobre hielo seco y se precipitó con acetato de sodio y etanol. La pastilla de RNA se lavó con etanol al 70% frío y el etanol restante se evaporó a sequedad en un evaporador rotatorio Savant. La reacción de síntesis de la primera cadena de cDNA se llevó a cabo en un volumen total de 70 µl conteniendo Tris-HCl 50mM pH 8.3, MgCl₂ 8mM, KCl 50mM, DTT 4.4mM, 28 ng de DNA de timo de ternera digerido con DNasa I y utilizado como iniciador al azar, HPRI (inhibidor de ribonucleasas aislado de placenta humana), dATP, dCTP, dGTP y dTTP 1mM cada uno, 10 µCi de α-[³²P]dATP (3000Ci/mMol) y 6 unidades/µg de RNA de la enzima Transcriptasa Reversa del virus de la mieloblastosis de las aves. Después de su incubación a 42.5°C durante 90 minutos, la enzima se inactivó con EDTA 20mM pH 8. La cantidad de cDNA sintetizado se estimó mediante la radiactividad

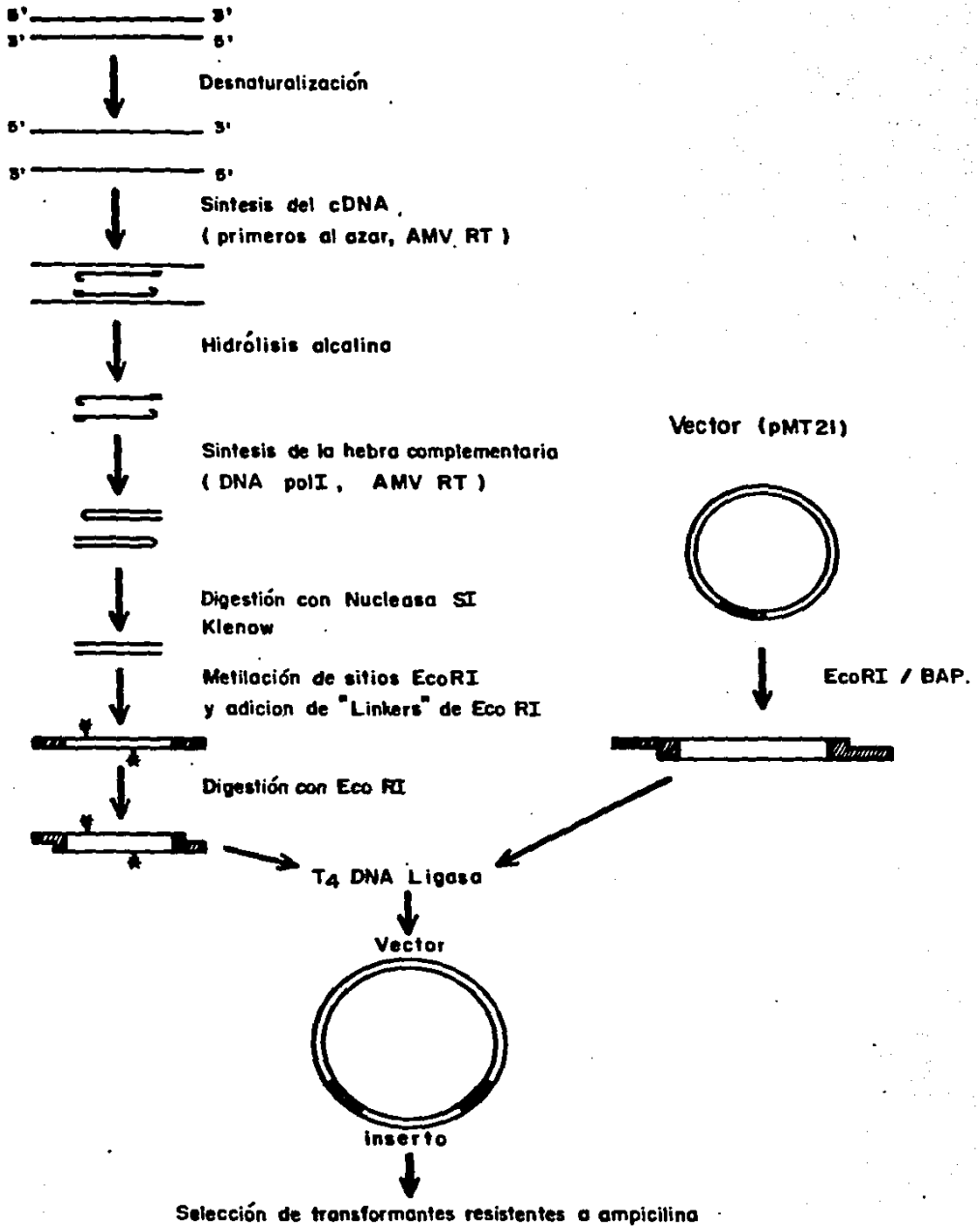


Figura 2.

Figura 2.-

Estrategia utilizada para la síntesis y clonación del DNA complementario al RNA del rotavirus porcino YM.

(cDNA: DNA complementario; AMVRT: transcriptasa reversa aislada del virus de la mieloblastosis de las aves; DNA polI: DNA polimerasa I; Klenow: fragmento mayor de la DNA polimerasa I; BAP: Fosfatasa alcalina bacteriana; linkers de EcoRI: adaptadores de DNA conteniendo la secuencia reconocida por la enzima de restricción Eco RI.)

incorporada en los tiempos 0 y 90 minutos de reacción. Este procedimiento se realizó determinando la radiactividad incorporada en alícuotas de 2 μ l, secadas en filtros DE 81 (Whatman) y lavadas de radiactividad libre (6 veces durante 5 min. cada vez con Na_2HPO_4 0.5M, 2 veces durante 1 min con agua y una vez durante un min. con etanol). Se utilizó Tolueno-PP0 como sistema de centelleo líquido. El cDNA se precipitó con acetato de sodio y etanol de la manera ya descrita. La pastilla se resuspendió en 50 μ l de NaOH 0.1M, se incubó a 60°C durante 1 hora para hidrolizar el RNA y la reacción se neutralizó agregando 10 μ l de HCl 0.5N y 2 μ l de Tris-HCl 1M pH 7.5. El cDNA se purificó por cromatografía de exclusión molecular en Bio Gel ASM (Bio-Rad); la columna se presaturó con 25 μ g de tRNA y se utilizó como eluyente una solución de Tris 20mM pH 7.4, NaCl 10mM y EDTA 0.1mM. Se colectaron fracciones de 225 μ l y se estimó la radiactividad en alícuotas de 5 μ l de cada fracción. El material del pico de cDNA radiactivo se precipitó con acetato de sodio y etanol.

3.2. Síntesis de la segunda cadena de DNA complementario.

La síntesis del DNA complementario de doble cadena (ds-cDNA) se llevó a cabo utilizando la DNA polimerasa I y la Transcriptasa Reversa del virus de la mieloblastosis de las aves (AMVRT). Estas dos enzimas se utilizaron en forma consecutiva para favorecer la síntesis completa de la segunda cadena de cDNA.

La reacción con DNA polimerasa I se llevó a cabo en un volumen de

12 μ l conteniendo Hepes 40mM pH 6.9, MgCl₂ 4mM, β -mercaptoetanol 6mM, KCl 70mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP 0.1 mM cada uno, 33ng/ μ l de DNA complementario de una sola cadena (sscDNA), 60 unidades de DNA polimerasa I por μ g de sscDNA y 15 μ Ci de α -(³²P)dATP (3000 Ci/mMol). La reacción fue incubada durante 15 horas a 14°C. Para determinar el rendimiento en la síntesis de la segunda cadena de cDNA, se tomaron alícuotas de 0.5 μ l en los tiempos 0 y 15 horas y se determinó la incorporación de marca radiactiva de la manera descrita. El dscDNA se extrajo una vez con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, una vez con cloroformo-alcohol isoamílico y se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular en Bio-Gel A5M de la manera descrita. Las fracciones en donde eluyó el pico de cDNA se precipitaron con acetato de sodio y etanol.

La reacción para completar el dscDNA se llevó a cabo en un volumen de 10 μ l conteniendo Tris-HCl 50mM pH 8, MgCl₂ 8mM, KCl 50mM, DTT 2.4mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP 1mM cada uno, 400 ng de dscDNA y 4 unidades de AMVRT. La reacción se incubó a 42.5°C durante 90 minutos y se paró agregando EDTA 20mM. El dscDNA se extrajo una vez con una mezcla de fenol-cloroformo y se precipitó con un volumen de acetato de amonio 4M y 4 volúmenes de etanol.

3.3 Digestión del dscDNA con nucleasa S1.

La cantidad adecuada de la nucleasa S1 (110 u/ μ l, Amersham) para digerir el asa terminal del dscDNA se determinó incubando cantidades variables de enzima (1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16 y 32 unidades de S1)

con 4ng de dscDNA y 5 µg de tRNA como sustrato por reacción en presencia de NaCl 0.2M, acetato de sodio 50mM pH 4.5 y ZnCl₂ 3mM. Las reacciones previamente equilibradas a 37°C se incubaron con la enzima durante 30 min. a esta temperatura. La magnitud de la hidrólisis del DNA fue determinada por análisis electroforético del dscDNA en condiciones desnaturalizantes. Para tal efecto se utilizó un gel de agarosa alcalino (agarosa 1.5% peso/volumen, NaOH 30mM, EDTA 2mM) en el que se corrió el cDNA y un marcador de peso molecular durante 16 h a 50 volts. Las bandas radiactivas fueron visualizadas por autorradiografía (fig. 3).

Una vez titulada la nucleasa S1, el dscDNA restante se digirió con la enzima a una concentración de 0.4 unidades por microgramo de tRNA, extrapolando las condiciones anteriores y en un volumen final de 80 µl. Alícuotas de 10 µl fueron tomadas en los tiempos 0 y 30 min. de reacción y se analizaron electroforéticamente de la forma descrita (Fig. 4). El dscDNA se extrajo con fenol y se precipitó en presencia de etanol y acetato de amonio.

3.4 Metilación del cDNA en los sitios de restricción EcoRI.

Los sitios de restricción reconocidos por la enzima EcoRI, presentes dentro de las secuencias del cDNA, fueron protegidos mediante la metilación con la enzima Metilasa de EcoRI y S-Adenosil Metionina. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25µl en presencia de Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 10 mM, S-Adenosil Metionina 80 mM y 160 unidades de enzima por 100 ng de cDNA. La



Figura 3. Titulación de la Nucleasa S1.

Los productos de digestión con la nucleasa S1 fueron analizados en un gel de agarosa alcalino (ver secc. 3.3):

Carriles #1 y #9: DNA de λ digerido con HindIII, utilizado como marcador de peso molecular.

Carril #2: dscDNA de YM

Carril #3: dscDNA de YM + 0.2 unidades de S1/ug de tRNA

Carril #4: dscDNA de YM + 0.4 unidades de S1/ug de tRNA

Carril #5: dscDNA de YM + 0.8 unidades de S1/ug de tRNA

Carril #6: dscDNA de YM + 1.6 unidades de S1/ug de tRNA

Carril #7: dscDNA de YM + 3.2 unidades de S1/ug de tRNA

Carril #8: dscDNA de YM + 6.4 unidades de S1/ug de tRNA

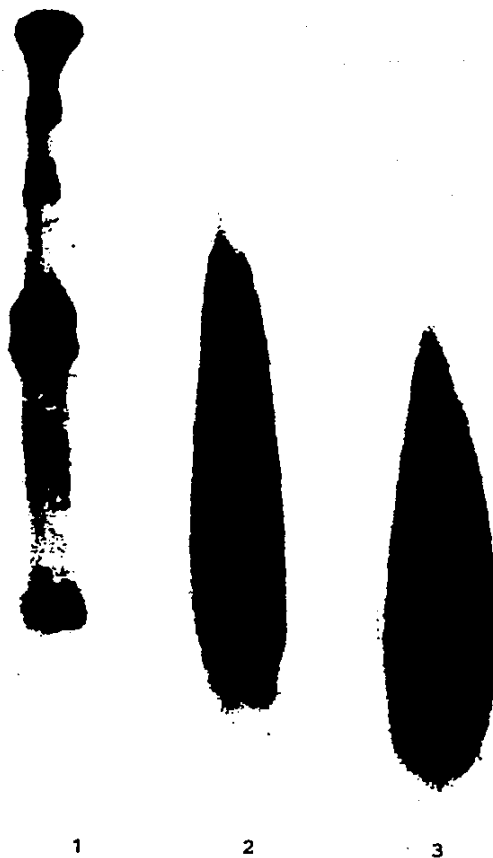


Figura 4. Análisis del dscDNA de YM, digerido con la nucleasa S1, en gel de agarosa alcalino (secc. 3.3)

- Carril #1: DNA de λ digerido con Hind III utilizado como marcador de peso molecular.
- Carril #2: dscDNA de YM antes de ser digerido con la nucleasa S1.
- Carril #3: dscDNA de YM digerido con 0.4 unidades de S1 durante 30 minutos.

reacción se incubó a 37°C por 60 min. y se inactivó por adición de SDS al 0.25%.

3.5 Adición de adaptadores de EcoRI a los extremos del cDNA.

Con el objeto de obtener moléculas de ds-cDNA con extremos rasos y susceptibles de ser ligadas posteriormente a los adaptadores de EcoRI, los extremos del ds-cDNA se polimerizaron con 10 unidades del fragmento mayor (Klenow) de la DNA polimerasa I, en un volumen de 20 µl en presencia de NaCl 50mM, Tris-HCl 10mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP 40 mM cada uno; la reacción se incubó durante 60 min. a temperatura ambiente. Posteriormente el cDNA se extrajo con fenol y se precipitó en presencia de acetato de amonio y etanol.

Los oligonucleótidos conteniendo la secuencia nucleotídica reconocida por la enzima de restricción Eco RI (adaptadores de Bio-Labs) se ligaron a los extremos del ds-cDNA utilizando la enzima DNA ligasa de T₄ (Amersham) en presencia de ATP 2mM, DTT 20mM, MgCl₂ 10mM, Tris-HCl 30mM pH=7.8, y 10 unidades de enzima. La reacción fue incubada a 16°C durante 15 h y a continuación la enzima se inactivó por calentamiento a 55°C durante 15 minutos.

3.6. Digestión del cDNA con la enzima de restricción EcoRI y unión al plásmido vector.

Para obtener moléculas de cDNA susceptibles de ser ligadas al

vector de clonación, se generaron extremos cohesivos en el cDNA mediante su digestión con EcoRI. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 60 μ l con 50 unidades de EcoRI, en presencia de espermidina 4mM y amortiguador de altaconcentración de sal (HS = NaCl 100 mM, Tris-HCl 10mM pH 5, MgCl₂ 10mM, DTT 1mM), a 37°C durante 2 h. Los adaptadores de EcoRI no ligados al cDNA fueron eliminados de la preparación utilizando cromatografía de exclusión molecular (Bio Gel A5M); el cDNA se precipitó en presencia de cloruro de sodio y etanol.

Se utilizó el plásmido pMT21 (ver resultados) como vector para la construcción del banco de cDNA del rotavirus YM. Aproximadamente 10 μ g del plásmido fueron digeridos con 30 unidades de EcoRI durante 2 h a 37°C y los grupos fosfato de los extremos 5' se eliminaron utilizando la enzima fosfatasa alcalina bacteriana (BAP). Esta reacción se llevó a cabo en presencia de Tris-HCl 10mM pH 8.3 y 12 unidades de BAP a 65°C durante 60 minutos. El vector, luego de ser extraído con fenol y precipitado en presencia de acetato de sodio y etanol se separó del vector no digerido, mediante electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión (secc. 4.3.)

Aproximadamente 50 ng del cDNA fueron ligados a 600 ng del vector pMT21 digerido con EcoRI y defosforilado. La reacción se realizó bajo las condiciones descritas en la sección 3.5.

3.7 Transformación de Escherichia coli MC1061 con los plásmidos recombinantes.

La cepa de E. coli MC1061 [72] se hizo competente para su

transformación con los plásmidos recombinantes, bajo las siguientes condiciones:

30 ml de medio líquido de Luria (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.2 con NaOH) fueron inoculados con 0.3 ml de un cultivo bacteriano crecido hasta su fase estacionaria. El cultivo fue crecido a 37°C con agitación hasta una densidad óptica (550 nm) de 0.5 y fue enfriado en hielo durante 10 min. Las células se colectaron por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min. a 4°C en el rotor SS34 (Sorvall) y se resuspendieron suavemente en 15 ml de CaCl₂ frío donde se mantuvieron durante 15 min. en hielo. Posteriormente las células se colectaron por centrifugación de la manera ya descrita y se dejaron en hielo de 30 min. a 24 horas. A 200 µl de células competentes se les agregó el DNA transformante (no más de 50 ng de plásmido por cada 200 µl de células), se incubó 30 min. en hielo, 2 min. a 42°C, y se pasó nuevamente a hielo durante 1 o 2 minutos más. Finalmente, se agregaron 0.8 ml de medio Luria y las bacterias se incubaron a 37°C durante 45 min. para permitir su recuperación. Las células transformantes fueron seleccionadas en cajas Petri conteniendo Luria-agar (Luria + agar 1.5%) adicionado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

4. Búsqueda de clones que contienen secuencias de VP3 y VP7 en el banco de cDNA del rotavirus porcino YM.

La identificación de clones recombinantes se hizo mediante 2

tipos de hibridación: una hibridación heteróloga utilizando clonas de cDNA del rotavirus de simio SA-11, y una hibridación homóloga utilizando clonas de cDNA del rotavirus YM.

4.1. Identificación de clonas de cDNA de los genes 4 y 9 del rotavirus YM por hibridación con cDNA de los segmentos 4 y 9 de RNA del rotavirus SA11.

Para la búsqueda inicial de clonas conteniendo secuencias de VP3 en el banco de cDNA de YM, se utilizaron como sonda los insertos de los plásmidos pSR4-2 y pSR4-4 del rotavirus de simio SA-11 [61] (ver resultados), mientras que para la búsqueda de clonas conteniendo secuencias de VP7 se utilizó como sonda el inserto de la clona pSR9-65 del rotavirus de simio SA-11 [60] (ver resultados).

El material utilizado como sonda se marcó radioactivamente mediante el método conocido como "nick-translation" [65]. Este método consiste en marcar el DNA de la sonda con nucleótidos radiactivos utilizando simultáneamente las enzimas DNasa I y DNA polimerasa I. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 μ l conteniendo 200 ng de DNA, Tris-HCl 50mM pH 7.5, MgCl₂ 10 mM, DTT 1mM, gelatina 0.1 mg/ml, dCTP, dGTP, dTTP 20 μ M cada uno, 5 μ Ci de α [³²P]dATP (3000 Ci/mMol), 4 unidades de DNA polimerasa I y 0.25 μ l de una dilución 1:50000 de DNasaI (1mg/ml); las reacciones se incubaron a 14°C durante 3 h y se pararon agregando EDTA 0.01M y SDS 0.1%. Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados de la preparación mediante cromatografía de

exclusión en Sephadex G-50.

Aproximadamente 400 colonias del banco de cDNA de YM se sembraron por triplicado en filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) sobre cajas de Petri conteniendo medio sólido de Luria adicionado con ampicilina (100 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante 12 h. Una copia de cada caja se guardó como copia maestra, y las otras 2 copias se hibridaron con la sonda para el segmento 4 y el segmento 9, respectivamente. Para lisar las colonias y fijar el DNA, los filtros de nitrocelulosa se colocaron una vez durante 5 min. sobre un papel filtro conteniendo NaOH 0.5M y NaCl 1.5M, y dos veces durante 5 min. cada vez sobre un papel filtro conteniendo Tris-HCl 0.5M pH 7.5 y NaCl 1.5M. Los filtros se secaron al aire y se hornearon durante 2 h a 70°C. Los restos celulares se eliminaron mediante el lavado en dos ocasiones con SSPE 2X (SSPE 1X: NaCl 0.18 M, NaH₂PO₄ 10 mM, Na₂EDTA 1mM, pH 7), y una vez con SSPE 5X.

Los filtros se prehibridaron durante 2 h. a temperatura ambiente en 12 ml de mezcla de prehibridación (5X SSPE, 1X solución de Denhardt (0.02% Ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona, 0.02% albúmina sérica bovinal), 0.3% SDS, 175 µg/ml DNA de esperma de salmón [sonicado y desnaturalizado], formamida desionizada 50%) a temperatura ambiente. La sonda radioactiva del segmento 4 ó 9 de SA11, se desnaturalizó por ebullición durante 10 min. y se hibridó con los filtros correspondientes a temperatura ambiente, en 6 ml de mezcla de prehibridación, durante un tiempo equivalente al valor de 2 Cot^{1/2} [66]. A continuación los filtros fueron lavados una vez

con SSPE 2X y 4 veces con SSPE 0.2X durante 15 min cada vez, se envolvieron en plástico y se expusieron a película Kodak (X-Omat) con una pantalla durante 12 horas a -70°C .

4.2 Equivalencia génica entre los segmentos de RNA 4 y 9 del rotavirus de simio SA11 y del rotavirus porcino YM.

La equivalencia génica entre los segmentos 4 y 9 de SA11 y de YM se hizo mediante una hibridación heteróloga entre segmentos de RNA de YM y clonas de cDNA de los segmentos 4 y 9 de SA11 (Secc. 4.1).

Los 11 segmentos de RNA de YM fueron aislados mediante electroforesis en un gel de acrilamida 1 10% (peso/vol) acrilamida, 0.25% (peso/vol) bisacrilamida 1 de 12 cm de largo utilizando amortiguador Tris-glicina como solución de corrida (2.4 g de Tris base, 11.5 g de glicina/ l de solución). Se cargaron en el gel aproximadamente 3 μg de RNA, y la electroforesis se corrió 100 mA totales durante 16 h. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en agua) y las bandas de RNA viral fueron visualizadas con luz ultravioleta de onda larga. Con un bisturí se cortaron las 11 diferentes bandas, se picaron finamente y el RNA fue eluido en 1.5 ml de NaAc 0.6 M, Tris-HCl 0.1 M, EDTA 2mM, tRNA 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pH 7, con agitación durante 2 días a temperatura ambiente. El RNA se precipitó con etanol y se resuspendió en solución amortiguadora TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7.4). La recuperación de los 11 segmentos de RNA se estimó por electroforesis en gel de acrilamida 10% bajo las condiciones mencionadas. (Fig. 5)

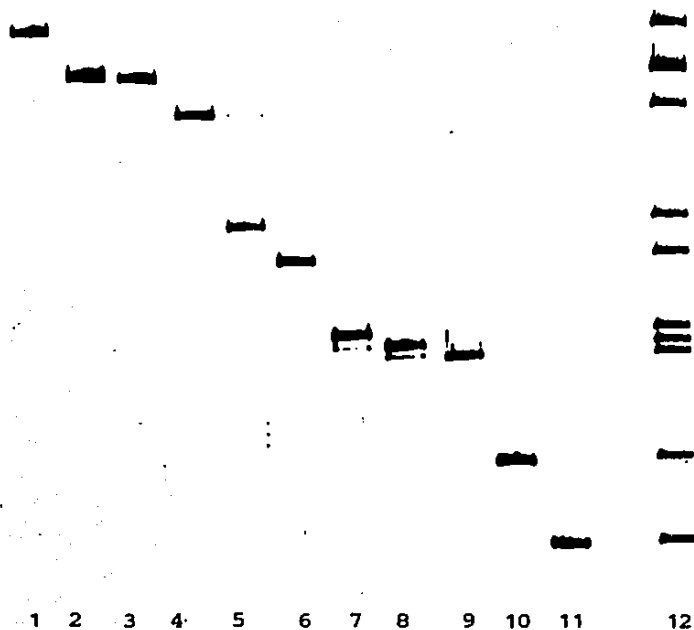


Figura 5. Análisis electroforético de los 11 segmentos de RNA purificados del rotavirus porcino YM.

Carriles 1 al 11: segmentos 1 a 11 de RNA de YM

Carril 12: RNA genómico de YM.

Los segmentos 1, 2, 3 y 4 de RNA de YM fueron desnaturalizados con DMSO (secc. 3.1) y se fijaron en filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) humedecidos en SSPE 20X; los filtros se hornearon, prehibridaron e hibridaron con la sonda del segmento 4 de SA-11 como se describe en la secc. 4.1, pero adicionando a la mezcla de prehibridación bentonita al 0.1% como inhibidor de RNAsas. (fig. 6).

Los segmentos 7, 8 y 9 de RNA de YM se fijaron a filtros de nitrocelulosa de la manera descrita en el párrafo anterior y se hibridaron con la sonda del segmento 9 de SA-11. (Fig. 7).

4.3 Hibridación homóloga de clonas del banco de cDNA del rotavirus YM con secuencias de cDNA de los genes 4 y 9 del rotavirus YM.

La preparación de plásmido de las clonas PYM 4-1, PYM 4-2, PYM 4-3, PYM 9-1 y PYM 9-2 se hizo siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

100 ml de medio líquido de Luria adicionado con ampicilina (100 µg/ml) fueron inoculados con 1 ml de cultivo bacteriano crecido hasta su fase estacionaria. El cultivo se incubó a 37°C con agitación hasta una densidad óptica (550 nm) de 0.5; entonces se le agregó cloranfenicol (100 µg/ml) y se incubó durante 12 h. más con agitación. A continuación el cultivo se enfrió durante 10 min en hielo y las células fueron colectadas por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min a 4°C en el rotor SS34 (Sorvall); la

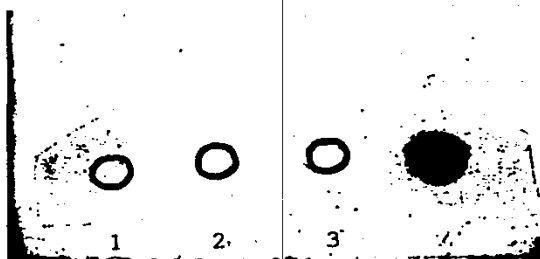


Figura 6 . Equivalencia entre los segmentos 4 de RNA de los rotavirus SAl1 y YM mediante hibridación heteróloga en punto.

Pozo #1: Segmento 1 de RNA de YM

Pozo #2: Segmento 2 de RNA de YM

Pozo #3: Segmento 3 de RNA de YM

Pozo #4: Segmento 4 de RNA de YM

Sonda: cDNA del segmento 4 de SAl1.

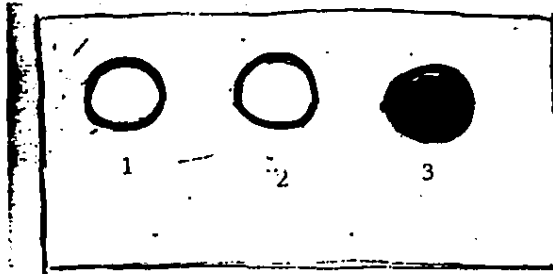


Figura 7 . Equivalencia entre los segmentos 9 de RNA de los rotavirus SA11 y YM mediante hibridación heteróloga en punto.

Pozo #1: Segmento 7 de RNA de YM

Pozo #2: Segmento 8 de RNA de YM

Pozo #3: Segmento 9 de RNA de YM

Sonda: cDNA del segmento 9 de SA11

pastilla celular se resuspendió en 3 ml de amortiguador de sacarosa (sacarosa 10%, Tris-HCl 50 mM pH 8.5, EDTA 80 mM) y se agregaron 400 µl de una solución de lisozima (100 mg/ml en el amortiguador de sacarosa); luego de mezclar suavemente el material se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se congelaron a -70°C y descongelaron a 37°C por dos ocasiones consecutivas y el lisado celular fue centrifugado en el rotor SW55 (Beckman) a 40000 rpm durante 20 min. Al sobrenadante se le agregó 1/2 volumen de cloruro de litio al 20% (peso/vol) y un volumen (total) de isopropanol, se congeló a -70°C y descongeló a temperatura ambiente. El material precipitado fue colectado por centrifugación a 12000 rpm durante 20 min en el rotor SS34 (Sorvall) y la pastilla se lavó con etanol al 70% frío y se resuspendió en 0.5 ml de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.4, EDTA 1mM). El RNA presente en la preparación fue digerido con 30 µg de RNasa A (previamente hervida) durante 1 h a 37°C. El material no disuelto se eliminó por centrifugación durante 5 min en microcentrifuga (Eppendorf). El sobrenadante se extrajo con fenol y cloroformo (secc. 2) y el plásmido fue precipitado con etanol y acetato de sodio.

Los insertos de las clonas anteriores se obtuvieron digiriendo 5 µg de estos plásmidos con 10 unidades de la endonucleasa de restricción EcoRI. Los insertos se separaron del vector mediante electroforesis en mini gel de agarosa de bajo punto de fusión (Sea Plaque) al 2%; el gel se tiñó con bromuro de etidio (1µg/ml en agua), las bandas fueron visualizadas utilizando luz ultravioleta de

onda larga y los insertos se cortaron con bisturí. El DNA de los insertos se recuperó por fusión de la agarosa a 60°C durante 10 min y su extracción con fenol y cloroformo; en esta ocasión el DNA se extrajo además con butanol saturado con NaCl 5M, Tris 10 mM pH 7.4, EDTA 1mM, para eliminar el bromuro de etidio presente y luego se precipitó con etanol y acetato de sodio.

Los insertos anteriores se marcaron radiactivamente por el método de "nick-translation", descrito en la secc. 4.1.

La hibridación con clonas del banco de cDNA se llevó a cabo de manera similar a la descrita en la sección 4.1. En esta ocasión tanto la incubación de los filtros con la sonda radiactiva, como el lavado de los mismos se realizaron a 42°C. (Fig. 8).

4.4 Análisis del tamaño de los insertos en las clonas de cDNA.

Los plásmidos de las clonas que dieron señal positiva en la hibridación con el segmento 4 del rotavirus YM fueron digeridos con la endonucleasa de restricción EcoRI y analizados por electroforesis en gel de acrilamida [5% (peso/vol) acrilamida, 0.125% (peso/volumen) bisacrilamida] y utilizando amortiguador TBE (Tris-boratos 0.089 M, EDTA 0.002 M, pH 8) como solución de corrida. En el gel se incluyó un marcador de peso molecular como referencia.

5. Secuenciación nucleotídica.

La secuenciación de DNA se realizó según el método descrito por

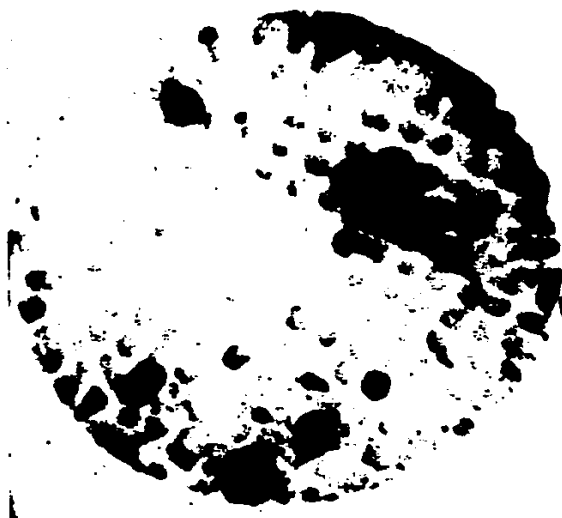


Figura 8 . Hibridación de colonias del banco de cDNA de YM:
con cDNA del segmento 4 de YM.

Maxam y Gilbert (670).

Los fragmentos de DNA a secuenciar se marcaron en el extremo 3' de la siguiente manera:

El DNA del plásmido a secuenciar se digirió con una endonucleasa de restricción conveniente (generalmente se utilizó el sitio de reconocimiento para HindIII localizado en el polilinker). Los extremos generados 5' sobresalientes se rellenaron utilizando 1 unidad del fragmento mayor (Klenow) de la DNA polimerasa I en presencia de 5 μ Ci de α [³²P]-dATP (3000 Ci/mMol) y dCTP, dGTP, dTTP 0,05 mM cada uno; la reacción se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se le agregó dATP 0.1 mM y se incubó por 30 min más; la enzima se inactivó por calentamiento a 70°C durante 10 min. El DNA se sometió a una segunda digestión con la endonucleasa de restricción adecuada que permitiera separar los extremos 3' marcados (generalmente se utilizó el sitio de reconocimiento para SacII localizado en el polilinker). Los fragmentos marcados radiactivamente en uno de sus extremos se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 2% y se detectaron mediante autorradiografía con un tiempo de exposición de 15 min. Las bandas deseadas se cortaron con bisturí; el DNA se extrajo como se menciona en la sección 4.3, y se precipitó una vez en presencia de etanol y acetato de sodio y otra vez en presencia de etanol y acetato de amonio. La pastilla de DNA se resuspendió en 110 μ l de agua desionizada y se dividió en 4 alícuotas que fueron utilizadas para realizar las cuatro reacciones de secuenciación nucleotídica descritas por Maxam y Gilbert (67).

La técnica de secuenciación de DNA descrita por Maxam y Gilbert se basa en la modificación parcial y selectiva de bases mediante ciertos reactivos químicos, para luego romper el enlace fosfo-diéster del nucleótido modificado utilizando piperidina. Los fragmentos del DNA obtenidos en el paso anterior se separan en dos geles (80 cm de largo y 0.75 cm de espesor) al 6% de acrilamida - bisacrilamida (19:1) y Urea 7M; el xilén cianol presente en la muestra se permite que migre 50 y 90 cm en cada gel. Los geles se someten a autorradiografía con película Kodak X-Omat a -70°C con pantalla durante 12 h o más si es necesario.

Para secuenciar tanto el extremo 5' como el 3' de algunas clonas, fue necesario subclonar los insertos de tal manera que existieran sitios susceptibles de ser marcados radiactivamente en ambos extremos. Con tal fin se escindieron los insertos del vector utilizando la endonucleasa de restricción EcoRI, se purificaron a través de agarosa de bajo punto de fusión y se generaron extremos rasos utilizando la fracción Klenow de la DNA polimerasa I. Los insertos fueron ligados al vector pMT21 digerido con la endonucleasa de restricción SmaI y tratado con fosfatasa alcalina.

RESULTADOS

1.- Asignación génica de las proteínas de superficie VP3 y VP7 en el rotavirus YM.

Como se mencionó ya en los antecedentes, en el rotavirus de simio SA11 (utilizado como sistema modelo por varios grupos de investigación), la proteína de superficie VP3 es codificada por el segmento 4, mientras que la glicoproteína VP7 está codificada en el segmento 9 del genoma viral. Sin embargo, en otros rotavirus se ha encontrado que la glicoproteína VP7 puede estar codificada por los segmentos 8 ó 9. Con objeto de conocer cual es la situación a este respecto en el rotavirus porcino YM, se realizó una hibridación heteróloga (en condiciones que permitieran hibridizar secuencias con un 70% de homología) entre los segmentos aislados de RNA de YM y el cDNA de SA11, tal como se describe en la sección 4.2 de Materiales y Métodos. Se encontró que el segmento 4 de SA11 es equivalente al segmento 4 de YM, y que el segmento 9 de SA11 es equivalente al segmento 9 de YM, ya que, como se muestra en las figuras 6 y 7, la hibridación heteróloga resulta positiva entre los segmentos mencionados.

2.- Construcción del banco de cDNA.-

En la figura 2 se muestra la estrategia utilizada para la síntesis del banco de cDNA del rotavirus porcino YM.

Para la síntesis de la primera cadena de DNA complementario se utilizaron 3.5 µg de RNA del rotavirus YM y la enzima Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis de las aves (AMVRT). El rendimiento de síntesis en esta reacción fue del 49.7%, esto es, se sintetizaron 1.74 µg de cDNA, determinados por la incorporación de $[^{32}\text{-P}]\text{dATP}$.

Para hidrolizar el RNA del heteroduplex RNA-cDNA, se trató la muestra con NaOH y el cDNA se separó del RNA degradado utilizando cromatografía de exclusión molecular en una columna de Bio Gel ASM (Bio Rad). De la columna se recuperó el 60% de la muestra, 1.045 µg de cDNA.

El cDNA de cadena sencilla (sscDNA) fue convertido en cDNA de cadena doble (dscDNA) utilizando la estructura de horquilla que deja la transcriptasa reversa en el extremo 3' del sscDNA, y que puede ser utilizada por la DNA polimerasa I como primero para la síntesis de la segunda cadena. Esta reacción se llevó a cabo con 400 ng de sscDNA y se obtuvo un rendimiento del 72%, o sea, 686 ng de dscDNA determinados por la incorporación de $\alpha\text{-}[^{32}\text{-P}]\text{dATP}$. El dscDNA se separó de los nucleótidos no incorporados por medio de cromatografía de exclusión molecular en Bio Gel ASM. De esta columna se recuperó el 60% de la muestra, o sea, 411 ng de dscDNA.

Para aumentar la síntesis de la segunda cadena de DNA, se hizo una segunda reacción de polimerización utilizando la enzima Transcriptasa Reversa (AMVRT). Ya que la actividad específica del dscDNA sintetizado era muy alta (3.89 µCi/mg), en esta segunda reacción se utilizaron únicamente deoxinucleótidos no radiactivos,

por lo que la cantidad de DNA sintetizado no pudo ser monitoreada.

Para obtener moléculas de cDNA doble cadena unidas no covalentemente es necesario eliminar el asa de la horquilla formada durante la síntesis de la primera cadena de cDNA, lo que se logra utilizando la nucleasa S1. Para determinar la cantidad adecuada de enzima necesaria para hidrolizar el DNA del asa, se tituló la nucleasa S1 (Amersham) a concentraciones variables de la enzima y una cantidad constante de cDNA (4 ng) y tRNA (5 µg) como sustrato. Los resultados se muestran en la figura 3. Se encontró que utilizando 0.4 unidades de S1 por µg de tRNA el tamaño promedio de las moléculas de cDNA, analizado en un gel desnaturante, disminuye a la mitad, lo que sugiere que el asa de la horquilla se digirió y por lo tanto se rompió la unión covalente entre las dos cadenas de cDNA. Una vez titulada la enzima, el ds-cDNA restante se digirió extrapolando las condiciones anteriores. El análisis electroforético del cDNA (en condiciones desnaturantes), indica que el peso molecular promedio del material antes de ser tratado con nucleasa S1 era de aproximadamente 1100 bases, y después de la digestión su tamaño promedio se redujo a aproximadamente 600 bases (fig. 4).

La clonación de 50 ng de cDNA del rotavirus de cerdo YM se hizo en el vector pMT21, plásmido derivado de pBR322 (68) que carece de los primeros 2520 pares de bases de este último y tiene insertada una región de enlazador múltiple (polilinker) con 10 sitios únicos de reconocimiento para las siguientes endonucleasas de restricción: SacII, EcoRI, AvaI, SmaI, BamHI, SalI, PstI, BglII,

XbaI y Hind III. El sitio de FstI presente en el gene de la β -lactamasa en pBR322 no se encuentra en PMT21. Para la ligación del vector con el inserto, se utilizó un exceso de vector con respecto al inserto en una proporción molar aproximada de 4:1.

La cepa de *Escherichia coli* MC1061 se transformó con los plásmidos híbridos y las bacterias transformantes se seleccionaron en presencia de ampicilina. De esta manera se obtuvo un banco de cDNA del rotavirus porcino YM, con aproximadamente 10000 colonias.

3.- Identificación de clonas conteniendo secuencias de los genes de VP3 y VP7 del rotavirus YM.-

Uno de los objetivos de la construcción del banco de cDNA del rotavirus porcino YM fue el de tener clonas de los genes que codifican para las dos proteínas de superficie del virus: VP3 y VP7.

a) Hibridación heteróloga con sondas de SA11.-

La primera búsqueda de recombinantes en el banco de cDNA se hizo en 400 colonias, utilizando sondas heterólogas del rotavirus de simio SA-11. Para la identificación de clonas conteniendo secuencias de VP7 se utilizó el inserto de la clona pSR9-65, construida por el Dr. Carlos Arias, y que contiene el cDNA completo del gene 9, que en el rotavirus SA-11 codifica por la glicoproteína de superficie VP7 (60). La selección de clonas conteniendo

secuencias de VP3 se hizo utilizando como sonda los insertos de las clonas pSR4-2 y pSR4-4, construidas también por el Dr. Carlos Arias y caracterizadas por la Dra. Susana López (61); entre estas dos clonas se encuentra representado casi en su totalidad el gene 4 de SA-11, que codifica para la proteína de superficie VP3. La hibridación heteróloga entre YM y SA11 se efectuó en condiciones que permitieran un 70% de homología, esto es, un 30% de bases erróneas durante la reasociación de la doble cadena. La señal radiactiva en los filtros hibridados tanto con el segmento 4 como con el segmento 9 no fue muy buena ya que las clonas positivas no pudieron distinguirse bien de la señal dada por el fondo.

b) Hibridación homóloga con secuencias de YM.-

Dados los resultados ambiguos obtenidos de la hibridación heteróloga entre el banco de cDNA de YM y las secuencias de cDNA de SA11, se tomaron 12 clonas que parecían dar señal positiva con el segmento 9 y 14 clonas que parecían dar señal positiva con el segmento 4 de SA11, se agruparon e hibridaron con RNA de YM para identificar los segmentos representados en los plásmidos recombinantes. Se identificaron así 3 clonas conteniendo secuencias del segmento 4 del rotavirus YM (pYM 4-1, pYM 4-2 y pYM 4-3) y 2 clonas conteniendo insertos del segmento 9 de YM (pYM 9-1 y pYM 9-2).

La segunda búsqueda de recombinantes en el banco de cDNA se hizo también en 400 colonias utilizando como sonda los insertos de las clonas pYM4-1, pYM4-2 y pYM4-3 por una parte, y por otra los

insertos de las clonas PYM 9-1 y PYM 9-2. Esto permitió identificar 12 clonas positivas para el segmento 4 y 12 clonas positivas para el segmento 9.

En ocasiones hubo que hacer una segunda e incluso una tercera hibridización en el banco de cDNA, para identificar clonas que representaran secuencias de los extremos 5' y 3' del gene 4.

El tamaño de los insertos de cDNA contenidos en las clonas del segmento 4 de YM fue determinado por el análisis electroforético de los productos de la digestión de los plásmidos de estas clonas con la endonucleasa de restricción EcoRI. Se observó que el tamaño de los insertos variaba entre 850 y 200 pb.

Las clonas del segmento 9 de YM fueron analizadas y secuenciadas por el Q.F.B. Alberto Ruiz, como un proyecto independiente [69].

4.- Secuencia nucleotídica de diferentes regiones del gene 4 del rotavirus de cerdo YM.

En la figura 9 se ilustran los insertos de las clonas de cDNA seleccionadas para obtener la secuencia parcial del gene 4 de YM.

La ubicación de las regiones secuenciadas respecto al gene completo de VP3 se facilitó al compararla con la secuencia reportada para el gene 4 del rotavirus de simio SA-11 [61].

La figura 10 muestra la secuencia nucleotídica parcial del gene 4 del rotavirus porcino YM obtenida en el presente trabajo. Estos

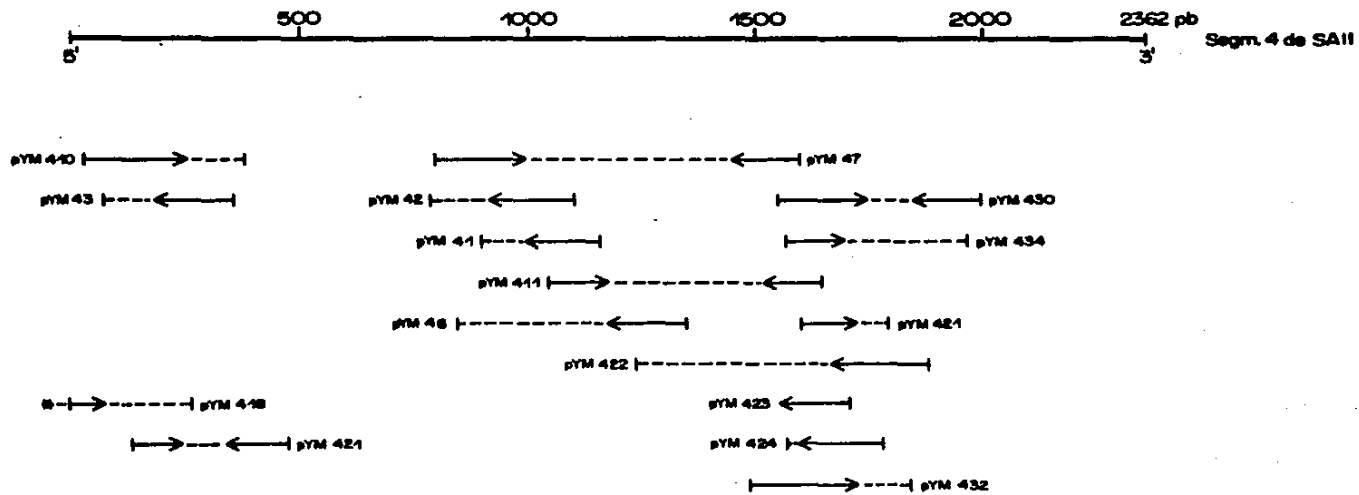


Figura 9. Clonas de cDNA del gene 4 de YM.
La línea continua muestra la región secuenciada de cada clona.

Fig. 10

Secuencia nucleotidica del segmento 4 de YM comparada con otras secuencias ya reportadas. La linea punteada indica region de homologia con la secuencia de SA11, mientras que la linea discontinua indica la region no secuenciada de YM.

SA11	GGCTATAAAATGGCTGCACTCATTATAGACAGTTGCTTACTAATTCATACACAGTAGAA	60
RV-5T.G.....AC.T..C.....TT.G.....C	
RRVT.G.....A.....CA.....C..T..C	
C4B6T.....	
YMT.GNNNNA.....AC.A.....T.....CA.T	
	CTTTCAGATGAAATACAAGAAATTGGATCGACTAGACTCAAACGTTACC6TTAATCCA	120
	T.GCAT.....G..C.G.....GAG..A.....GT..A..A..A.....	
	..A..T.....T.....G....T..C..TA.....T.	
C.....	
T..C.....T.....AG.....G.A..G..T.....A.A...NT	
	GGACCATTGCGCAACAACAATTACGCTCCAGTTAATTGGGGACCTG6TGAACGATGAC	180
	..T.....T..A.....C.GA.....A...G..G.TT.....T	
C.....GG..T.....C.....T.....T.....T	
G.....T.....	
	..T.....GGG..T..A.....GG.A.....G..T..C...	
	TCAACTACAGTTGAACCAAGTGCCTTGATGGACCATATCAACCAACGACTTTTAAATCCACCT	240
G.....TT.A....T..T.....C..T..A..C..A.....C	
	..T.....T..A.....G..A.....T..T.....TT.G..C.....A	
A..T..C..G...T.A..A.....T.....C.....C.....	
	GTAAGTTATTGGATGTTGCTAGCACCAACGAACGCGGGGGTGGTASTTGAAGGTACGAAC	300
	AATGA.....T.CC.TA.TAGTT...AT.CA.AT..A..A..CTAC...A...A..T	
	..GA.....C.AT.....T..AGCA..T..A..A.....A.....A..T..T	
T.....A.C.....	
	ACG..C.....G.A..A..T..G.....TGTA.A..T..A.TA.CC...A..A...	
	AATACAAACAGATGGTTAGCGACAATATTAATTGAACCAAATGTACASCAAGTTGAGCGA	360
	...ATG.TTTT...AC...AGTT..CGC.G.....C...TAGT...ACAA.TA.G	
G..C.....C...T.....T..G....G..T..C...ACATC..AAACCA..	
A.....	
CG.....T..T.....G.....C..G..AACGAC.A.CA..	
	ACATATACATTATTTGGACAACAAGTTCAAGTAACGGTATCAAATGACTCGCAGACAAAG	420
	CA.....TT.....TG..A.TAAA...TTAAC-G.AG..AACCAAT...T....	
	.GT.....GC.....ACG...AG...A.T.CAA..G.TT...CT..C..A...C.A	
G.....A.....T.....A.....	
C.ATC.T.....T.....AACTC.GT....GAT..CACA..A..A..C.A	
	TGGAAGTTTGTGGATCTAAGTAAGCAACACAAGATGGTAATTATTCACAGCATG6TTCT	480
A..T..C..AA.GTT...AGGT.GTAGTC.G...G...T...TA.TAGAC.GA..	
A..A..T...G.CGT...AACT.....A...A.GC.....AT.C..AC.A	
G.....A.....C.....	
CA.T...G.G.....AACT..G.TGACA..A..C..CA.G..A.-----	

RV-5 CTACTGTCGACACCCAAAACCTGATGGAGTGGATGAAGCATGGTGGTAAGATTTACACTTAT 540
 RV ACC..T.ACAAT.G...TGTA..GA..C.A..AT.....A.GAG.A.GG..A.T.
 2486 T...AA..T..T.....C....CC.....A...AA.....A.....T..A...
 MA.....G.....A.....A.....A.....A.....

 AATGGAGAGACACCCGAACGCAAAACACTGGTTACTACTCTACAACCTAACTTTGACACTGTA 600
 C....T..A.....A.GA..T.CT....A.AGT.CAAA...TG.GG.T..AA.T.A.A..
A..T.....T.TG.C...AAG.....A..T..A..T.A..TT.A..
CT.....

 AATATGACAGCATATTGCGATTTTTATATAATTCCATTAGCACAAGAGGGCAAATGCACT 660
 TCA..T.TGATTC...CA..G.....T.....AG.T.C.....AT.T.....T.AC
 ..C.....T...T..C.....T..A..TAG..A.G...AT...C...T..C
 ..C.....T.....T.....A.....

 GAATACATAAATAATGGATTACCACCAATACAAAATACGAGAAATATCGTACCAGTTTCG 720
 ..G..T..C..G.....T.....T..G....T....CG.A..T..T.A..T
 ..G.....T.....C..G.....T..G..T..G....AC...C..T..T..T.GG..
 N....T..C.....C..T.....T....G...G.A..N.....N...

 ATAGTATCAAGGAATATTGTATATACAAGAGCACAACCCCAATCAAGACATCGTGGTATCA 780
 T..TC..C..ATC...CAG...GG.....GTT..G...T..TACAA.T...
 C.TTC.G.T..A....AA...CACAT...T...G..G...T...T..G...
T.....A.....
 C.....T..AG.A..A..GC.....C...GTG...G...T..A..T..T...

 AAAACTTCATTATGGAAAGAGATGCAATATAATAGAGATATAGTGATAAGATTTAAATTT 840
G..A.....TA.A.....
 ..G..A..C.T.....C.....C..CACA..TC.....C
C.....A.....C.....AC.....G...

 GCTAACTCAATCATAAAATCAGGGGGATTGGGATATAAATGGTCAGAGGTGTCATTTAAA 900
 .G...TAGTG.T.....CT...A.....T...A.A...A...
 ..A.GT....TG.T....C..T..GC.A..T.....GA.T.....
A.....A.....A.....C.....A.A..T.....
 ..A..GGA.G..T..T..GG.T..A....A.....C.....A.A..T.....

 CCACGCTTTTATCAGTACACATATACCAGAGATGGTBAAGAAAGTTACTGCACATACTACG 960
 G....AA.....T.GT..T.AC.T.....C.....C..T
AAC....A..T..G....AC.....A..G..T....A..T..C..G...
TAA.....
 ...ATTAC.....T....C..T.....A...C.GA...A..G..C....A

 TGTTCACTAAATGGGGTAAATGATTTTAAATTATAATGGTGGATCATTACCBACTGATTT 1020
A.....A.....GC.....A..T..C...T.....
 ..C.....C..AA.G..C.....TC...G...G...A..B...T
AA.....
 ..C.....T....A..T..CA.....G.....C..T.....G..C..T

SA11
 IV-5
 486
 M

GTAATATCAAATATGAGGTAATTAAGGAAAATTCTTTTGTGTACATAGACTACTGGGAC 1080
 AGT..T..G.G.....A..T.G...A.....A.....T.....T
 A.....G.....A.....A..G.....A..T..TG.T..T.....T
A..G.....T.....T.....T.....T.....T.....T
 .CT.....G.....A..G.....A.....A.....T..T..T.....T

GATTCACAAGCATTAGAAACATGGTATATGTACGCTCGTTGGCAGCTGATTTAATTCA 1140
A.....T.....G.....TA.A...C.A.....AA.....C
C..C..G.....T.....A.G..A..A..T..A.....C..T
G.....C.....G.....T..G..ACT.T..T..A...G...A..

GTAATGTGTACAGGAGGTGACTATAGTTTGGCGCTTCCAGTTGGTAATTATCCAGTTATG 1200
 ..G.AA.....T..GAGT...GA...AGAT.G..C..A...GGA.GG..TA....
 ..T..A.....T..G.....T.....C.....AT.A..G.....C.A.GG.....A..
A.....T.....T.....A.....C.....C.....C.....
C...C..T..T...AGT.....C..C..CT.G..TT.A....C.....

ACTGGGGGTGCTGTGTCATTGCATTACAGCAGGTGTAACCTTTATCAACGCAGTTTACAGAT 1260
 .A...T.....A.....A...TT..T..A..T..A.....T..A.....C..T...
C..A..A.....T.....T..G.....C..A.....C.....
T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....T.....
T..A.A..TA..C.A..CC...T..A..T..G.....T..C..A.....T..

TTCGATCATTAAATTCAGTATGATTTAGATTATCAGTAGAAGAACCGCCGTTTC 1320
 ..T.....C.....C..T...A.....T.....AT.T...
 ..T.....T.....TT.A..G..C..G.....C..A..T..T...G..AT.A...
 ..T.....TC.T.....T..C.C.....G..C.....A..T..G.G.....TT.A..T

TCAATTCTACGGACCAGAGTTAGTGGATTGTATGGACTTCCAGCGGCAAAACCGAATAAT 1380
AA....A..AC.TACA.TAAAC.....C...T.A.....A..T..T.....C...
 ..G..CACCA.A..T.....G.....GT.A..T..A..TT.C..C.....
 ..T..AACGA.A..T..G..A...A...A..C.....A..T..T..A..C...

TCACAAGAATATTATGAGATAGCTGGGAGATTTTCATTAATATCACTTGTACCGTTAAT 1440
 GG.A.T..G..C.....A..GT.A..A..G.....C.T..T..TT.A..T.TAACC...
 GG.A.....AG.G.....C..C.C..C.....T.G.....A.CT...
C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
 CABAGG...C.....A..AG...C..C...G.....T.A..G..A.C...

GATGATTATCAGACACCAATCATBAATTCAGTTACTGTACGACAAGATTTAGAACGACAA 1500
A..T...T.....A..A...A.G..G.....C..G
 ..C.....C.....A..CT.....A..CA.....G
A..A.....C.....C.....C.....C.....C.....
A..G...T...C.....C..GA.....C...GA...

TTAGGAGAACTAAGAGATGAATTTACAATTTATCACAACAAATCGCTATGTCACAATTG 1560
 C.TAAT..TT.GC....A.....TTCA..G.....G...A.....A
 ..G..T...T.....A.....C..GC.C.C.....G.G..A..C.....G..GC.T
C.....C.....C.....C.....C.....C.....C.....
 ..G.....G...C.G.....G..C..TTCA..G.....G.....A..G.....C..

SA11 ATAGATCTTGC GTTACTACCGTTAGATATGTTCTCAATGTTTTTCAGGAATTAAGAGTACA 1620
 RV-5 ..T..T.A..A.....T.....T.....T.....G.....A..A.....
 RV ..TT..T.G..A.....T..A..G.....T..G.....T..T.....C..C
 2486 ..G.....C.....G.....
 /M ..T..T.G..AC..T.G..A.....T.....C.....A.....

ATTBACGCAGCGAAGTCTATGBCGACGGAACGTAATGAAGAGATTTAAAAAGTCAAGTCTC 1680
 ..TCT.A.C..A..A.....A..T.GT.....A.A.....G...A..G.AAT.A
 ..A..T.....T..A..A.....T..T.GT.....A.....G..A..G..T.A
 ..T.....T.....
 ..A..T..T.....A.....A..A..T.....A.....CG.....AC..A

GCTAACTCAGTGTCAACGCTCACTGATTCATTGTCTGATGCASCATCATCAATTTCTAGA 1740
CA...A.T...GAAA.G...A.....A.....G..T.....GCA..A...
T..A..T..AT.A..A..C...C...C..C...T..T.....A...
A.GT.....T..T...T.A.....G..A.....C.....G..T.....A...

AGTGCATCGGTTAGATCAGTTAGTTCAACTGCATCAGCTTGGACGGAGATCTAACATT 1800
T..TA.....AA.TTA..T..GATT...AA.....TA.TACT..A..A.G.
 G.A.....TA..C.T.....G.A...T.A.....A.....T..C..A.CACAA
T.....AA.AC.....A.AG.A...T.A.....C.....G..A.CTTCA

GCATCAGATATTAATGTGACAACGAGCTCAATTTCTACACAGACATCAACAATAAGCAGA 1860
 .TG...A..G.A.C..ACT..GTA.ATGATG...A.....A.....T.....T..T.AG
 ATCA.T...G..TC.TCAT.TGTC..T..G..C..G.....T.....T..T..T...
 A.....G..C.....A.N.....
 ATCA...C...TC.ACT...GTTGATA..G.A..A..G..A..TG.T..T..TGCT.A.

AGGTTAAGACTAAAAGAGATGBCGACTCAAACAGACGGTATGAATTTTGATGATATATCA 1920
 .AAC.T...T...G.....ATT.....T..A..A...G.....T.....
 C..C..C.....A.....T..G.....A..G.....C.....T
A.....G.....
 C.....C..T.G.....A..A.....C..T.....C.....T

GCGGCAGTACTTAAGACTAAAATTGATAAATCAACCCAGTTAATACAATACATTGCCA 1980
 ..A..T.....G..A..G.....A...TG..C..A..AA.TGGA.A..C..T..A..T
 ..T.....T.G.....CG...C..T..AA..TC.C...C.....A...
 ..A.....C.....G
 ..A..G...T.A..A..G.....G.G..AA...CAC...G..G..A..G

GAAATAGTACTGAGGCTTCAGAAAAGTTTATACCAAATAGAGCGTACCGTGTAATTAAG 2040
 ..T.....T.....A..G..T.....A.....T.....AC..T.A..T..A..T.A..A
 ..T.....C.....A.....G.....T..T.....A.A.....T
A.....A

GATGATGAAGTCTGAGGCTAGTATTGATGGTAAATATTTGCTTACAAAGTTGAAACA 2100
 ..A.....AA...AAT..AC.CA...A..A..G.T...T..A..T...G..T...
 A.....CT.T..A..GG.A.CA...A.G.....T..G..TCGT.....G
A.....C.....C

A11
V-5
RV
486
M

TTTGAAGAGATTCCATTTCGATGTCCAGAAATTCGCCGACTTAGTGACTGACTCACCAGT 2160
 C.CA.T.....A.....T..A.AA.T.....AC.T..C..G..T..T.....
 ..C..T..A.....T.....G..A..G..T..A..TC.....A.....T..G..C
 A..TTGA.GAGATTCCATTTCGA.GT.C.....T.....

ATATCGGCAATAATTGATTTTAAACTCTCAAGAATCTAAATGATAATTACGGAATAAGC 2220
A..G.....A..C.....G..GT.A..A..T....C..C.....T.....T..CT
 ..C..A..C..T..A..C.....G..A.....C..C.....T..T..T..T
C.....T.....

AGACAACAAGCACTAAATCTTCTAAGATCTGACCCGCGAGTATTGCBTGAATTTATTAAT 2280
 C.TATTG....GT.T...T.AA.T.A...GA.T..AAAT..GC.A...A.T..C.....
 ..G.....T.T....G.....C..T..AA.....A.....C...
T.....A.....

CAGGATAATCCAATAATACGAAATAGAATAGAAAGTTTGATAATGCAATGTCGCTTATAA 2340
 ..AA.....T..A.....T..GCAG..AA.TC.AC.....AAG..G.G.
 ..A..C.....T..T..C.....T..CAG..A.....G..A.AC.G...
G...

GCAACTGACAGAGGATGTGACC 2362
 .A.TG.C.TCC.....
T.TCT.....
ACA..AGGA..TGACC

	YM	C486	RRV	RV5	SA11
YM	100	75.13	74.08	70.07	74.92
C486		100	74.97	68.92	95.63
RRV			100	67.61	75.71
RV-5				100	69.47
SA11					100

Tabla 1. Porcentaje de homología entre las secuencias nucleotídicas de los genes 4 de las cepas de rotavirus YM, C486, RRV, RV-5 y SA11. Los valores reportados para el segmento 4 de YM se obtuvieron comparando únicamente la región secuenciada en este trabajo.

resultados fueron comparados con secuencias reportadas de genes que codifican para VP3 en otros rotavirus como son el rotavirus de simio SA11 [61], el rotavirus humano RV-5 [62], el rotavirus de mono rhesus RRV [63] y el rotavirus bovino C486 [64]. Es importante señalar que aproximadamente el 10% de la secuencia presentada del gene 4 del rotavirus porcino YM fue obtenida por el Biol. Pedro Romero, en el laboratorio del Dr. Carlos Arias.

El tamaño reportado para los genes 4 en rotavirus es de 2362 pb; si se asume que este gene es de igual tamaño en el rotavirus porcino YM, entonces puede decirse que en este trabajo se logró secuenciar el 76.12% del gene 4 de YM, o sea, 1798 de 2362 pares de bases.

Al comparar la secuencia nucleotídica conocida del gene 4 del rotavirus YM con las otras secuencias ya mencionadas, se encontró la homología mas alta (75.13%) entre el rotavirus YM y el rotavirus C486; en orden decreciente de homología le siguen el rotavirus SA11 (74.92%), el rotavirus RRV (74.08%) y por último el rotavirus RV-5 (70.07%) (Ver Tabla 1).

En la figura 11 se presenta la secuencia de aminoácidos de VP3 deducida de la secuencia nucleotídica de las regiones conocidas del segmento 4 de YM, y comparada con la secuencia de aminoácidos de VP3 de los rotavirus SA11, RV-5, RRV y C486.

Dado que la mayor parte de los cambios en la secuencia,

Fig. 11

Secuencia de aminoácidos de la proteína VP3 del rotavirus YM comparada con otras secuencias ya reportadas. La línea punteada indica región de homología con la secuencia de SA11, mientras que la línea discontinua indica la región no secuenciada de YM.

SA11	M A A L I Y R Q L L T N S Y T V E L S D E I Q E I G S T K T	30
RV-5	. . S S . D . H E Q E . .	
RRV	. . S D	
C486	. . S .	
YM	. . S ? ? N A . A	
	Q N V T V N P G P F A Q T N Y A P V N W G P G E T N D S T T	60
	. . S R H . . I	
 I . L G	
 I . ? G	
	V E P V L D G P Y Q P T T F N P P V S Y W M L L A P T N A G	90
	. S . K . . N D . . F . I S S N T D .	
	. .	
 L T V V E .	
	V V V E G T N N T N R W L A T I L I E P N V Q Q V E R T Y T	120
	. . Y . S N D F . T . V . A V . . H . S . T N . Q . I	
 D V T S S T . S . .	
	. . D D . K T T N N	
	. I I Q D .	
	L F G Q Q V Q V T V S N D S Q T K W K F V D L S K Q T Q D G	150
 E N K . F N . E . N . D F E M F . G S S R .	
 T . S . I . I A Y A Q I . V V . T . . H .	
 T L S . D . T Q I . V . T . L T .	
	N Y S Q H G S L L S T P K L Y G V M K H G G K I Y T Y N G E	180
	D F . . N R R T . T . N N R . V . M L . Y . . R V W . F H . .	
	S Y . P . Q A N	
 P .	
	. . T .	
	T P N A N T G Y Y S T T N F D T V N M T A Y C D F Y I I P L	210
	. . R . T . D S S N . A D L N N I S I M I H S E R	
 V T . K Y . S F R	
 T .	
	A Q E A K C T E Y I N N G L P P I Q N T R N I V P V S I V S	240
	S . . S . . N K .	
	E E . S T .	
	. .	
 C ? S . . V L . . .	

3A11
 RV-5
 2486
 M

O I A M S O L I D L A L L P L D M F S M F S G I K S T I D A 540
 E Y L

A K S M A T N V M K R F K K S S L A N S V S T L T D S L S D 570
 T S K . R K . T . I . E M . N
 S K G
 R . N S A M . .

A A S S I S R S A S V R S V S S T A S A W T E V S N I A S D 600
 A I N L I . N N T . K S V . N
 G I G . S D T Q I T .
 S . I I G . S T S I T .

I N V T T S S I S T Q T S T I S R R L R L K E M A T Q T D G 630
 V T D S V N D V K K R I E .
 V S S S V K ?
 . S T . V D T V A . A K I

M N F D D I S A A V L K T K I D K S T Q L N T N T L P E I V 660
 S M I G K D
 R I S P D
 A . I T P S

T E A S E K F I P N R A Y R V I K D D E V L E A S I D G K Y 690
 K . S L . N M . I N T E . . F
 N N F . G T . . R .
 T

F A Y K V E T F E E I P F D V Q K F A D L V T D S P V I S A 720
 D . L N I N E
 R D
 I L K R F H S M Y

I I D F K T L K N L N D N Y G I S R Q Q A L N L L R S D P R 750
 T . I E . F I K . N . N
 F

V L R E F I N Q D N P I I R N R I E S L I M Q C R L 776
 N N Q L K .
 Q

	YM	C486	RRV	RV-5	SA11
YM	100	82.32	80.80	72.05	82.65
C486		100	83.50	69.84	96.90
RRV			100	71.00	84.53
RV-5				100	70.87
SA11					100

Tabla 2. Porcentaje de homología entre las secuencias de aminoácidos de VP3 deducidas de las secuencias nucleotídicas de los genes 4 de las cepas de rotavirus YM, C486, RRV, RV-5 y SA11.

nucleotídica se ubican en la tercera posición de los tripletes codificadores, la homología en secuencia de aminoácidos es mayor que la encontrada para la secuencia nucleotídica. Al comparar la secuencia de aminoácidos de YM con las otras secuencias reportadas para segmentos 4, se encontró que la homología mas alta es entre YM y SA11 (82.65), y le siguen en orden decreciente, el rotavirus C486 (82.32%), el rotavirus RRV (80.80%) y por último el rotavirus RV-5 (72.05%). Ver Tabla 2).

DISCUSION

Asignación génica de las proteínas de superficie en el rotavirus porcino YM.

Como se mencionó en la introducción, las dos proteínas de la capa externa de los rotavirus, VP3 y VP7, están codificadas por los fragmentos de RNA virales 4 y 8 ó 9, respectivamente. En este trabajo se presenta evidencia experimental (mediante hibridaciones heterólogas) que indica que el segmento 4 de RNA del rotavirus YM codifica para la proteína de superficie VP3, mientras que la glicoproteína de superficie VP7 está codificada por el segmento 9 del RNA viral. Esta situación es análoga a la observada en la mayoría de los rotavirus descritos incluyendo al de simio SA11, lo que sugiere una conservación entre los tamaños relativos de las moléculas de RNA y los productos protéicos virales.

Tamaño del Banco de cDNA.

Como parte del presente trabajo se construyó un banco de cDNA del rotavirus porcino YM, conteniendo aproximadamente 10000 colonias, con insertos promedio de 500 pb.

La probabilidad de obtener una secuencia de DNA específica representada en una biblioteca genómica puede calcularse por la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)}$$

Donde: P = probabilidad deseada

f = proporción fraccional del genoma en una recombinante Única.

N = número de recombinantes necesarias.

Considerando que el genoma de rotavirus tiene un tamaño aproximado de 20000 pb, y que el tamaño promedio de los insertos en el banco de cDNA es de 500 pb, tenemos que:

$$N = \frac{\ln(1 - 0.99)}{\ln\left(1 - \frac{5 \times 10^2}{2 \times 10^4}\right)} = 182 \text{ recombinantes}$$

Sin embargo, es importante considerar que la biblioteca es de cDNA y de un genoma fraccionado, por lo que se antoja que la probabilidad de clonar los extremos de los segmentos génicos es menor que la de clonar regiones centrales. De hecho, de acuerdo al método de clonación empleado, es prácticamente imposible obtener clonas que contengan los extremos de los genes, ya que el tratamiento con la nucleasa S1 elimina el DNA de una sola cadena presente en ambos extremos de el ds-cDNA.

Análisis de la región clonada del segmento 4 viral.

La identificación inicial de clonas con secuencias relacionadas al segmento 4 se realizó por hibridación con clonas de cDNA del segmento 4 del rotavirus de simio SA11 [61]. Las colonias que dieron señal positiva fueron corroboradas como tales por hibridación homóloga con el segmento 4 del RNA del rotavirus YM.

La secuencia nucleotídica de las clonas caracterizadas, y el aislamiento reciente de clonas no mostradas en la fig. 9, reveló que se tiene clonado el 84% del segmento 4 de YM (nucleótidos 1 - 2000). Actualmente se están realizando nuevas hibridaciones con el banco de cDNA que permitan identificar clonas conteniendo el extremo 3' del gene. Una alternativa para obtener la secuencia faltante del extremo 3', es mediante la secuenciación directa del RNA viral utilizando el método de terminación en la síntesis de la cadena de cDNA mediante dideoxinucleótidos, la enzima transcriptasa reversa, y uno o varios oligonucleótidos sintéticos.

Al alinear la secuencia nucleotídica obtenida, y la deducida para aminoácidos, con otras secuencias reportadas para el gene 4 en los rotavirus SA11, RV-5, RRV y C486, se encontró que la homología va del 70 al 75% para nucleótidos, y de 72 a 83% para aminoácidos, como se muestra en las tablas 1 y 2. La mayor homología encontrada en la secuencia deducida de aminoácidos se debe a que la mayor parte de los cambios de nucleótidos ocurren como sustituciones silenciosas en la tercera posición de los codones.

Un análisis apreciativo de las regiones comparadas, indican que las variaciones en la secuencia esperada de aminoácidos aparentemente no se encuentran distribuidas uniformemente a lo largo de la proteína, sino que existen ciertos dominios de mayor variabilidad (v. gr. la región del a.a. 556 al 608) y otros con una variabilidad menor (a.a. 511 al 539). Se desconoce si esta situación tiene implicaciones funcionales, pero las regiones hipervariables pudieran representar epitopes específicos de serotipo, mientras que las regiones conservadas podrían estar comprometidas con dominios funcionalmente restringidos a cambios.

Vale la pena mencionar que el rotavirus porcino YM parece ser per se un sistema muy interesante: estudios recientes de neutralización cruzada muestran que antisueros hiperinmunes contra rotavirus YM fueron incapaces de neutralizar a rotavirus pertenecientes a los serotips 1 a 6, mientras que se observó una mínima neutralización cruzada del virus YM por antisueros contra rotavirus heterotípicos [69]. Estos datos sugieren fuertemente que el virus YM representa a un nuevo serotipo entre los rotavirus.

Perspectivas para el desarrollo de una vacuna contra rotavirus elaborada por ingeniería genética.

Tradicionalmente, el desarrollo de vacunas antivirales se ha realizado con preparaciones de virus vivos atenuados o virus inactivados, lo que, como se mencionó en la introducción, puede acarrear situaciones colaterales no deseadas.

Las clonas de VP3 aisladas y caracterizadas en el presente trabajo podrán ser utilizadas para su expresión en *Escherichia coli* o en sistemas de levadura, de manera análoga a lo realizado con SA11 (58,59). El utilizar el sistema de YM como modelo de infección de rotavirus es útil pues YM es capaz de producir diarrea en lechones, por lo que se pueden probar las vacunas desarrolladas en el sistema homólogo.

Bibliografía

- 1.- Snyder, J.D., and Merson, M.H. (1982): The magnitude of the global problem of acute diarrhoeal disease: a review of active surveillance data. *Bull. WHO*, 60:605-613.
- 2.- Barnett, B. (1983): Viral gastroenteritis. *Med. Clin. North Am.*, 67:1031-1058.
- 3.- Cukor, G., and Blacklow, N.R. (1984): Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.*, 48:157-179.
- 4.- Estes, M.K., Palmer, E.L., and Obijeski, J.F. (1983): Rotaviruses: a review. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 105:123-184.
- 5.- Holmes, I.H. (1983): Rotaviruses. In: *The Reoviridae*, edited by W.H. Joklik, pp359-423. Plenum, New York.
- 6.- Kapikian, A.Z., Greenberg, H.B., Wyatt R.G., Kalica, A.R., Kim, H.W., Brandt, C.D., Rodriguez, W.J., Parrott, R.H., and Chanock, R.M. (1982): Viral gastroenteritis. In: *Viral infections of Humans*, edited by A.S. Evans, pp.282-362. Plenum, New York.
- 7.- Kapikian, A.Z., Wyatt, R.G., Greenberg, H.B., Kalica, A.R., Kim, H.W., Brandt, C.D., Rodriguez, W.J., Parrott, R.H., and Chanock, R.M. (1980): Approaches to immunization of infants and young children against gastroenteritis due to rotaviruses. *Rev. Infect. Dis.* 2:459-469.
- 8.- Wolf, J.L. (1982): Viral gastroenteritis. *Med. Clin. North Am.* 66:575-595.
- 9.- Rodger, S.M., Craven, J.A., and Williams, I. (1975): Demonstration of reovirus-like particles in intestinal contents of piglets with diarrhoea. *Aust. Vet. J.*, 51:536.
- 10.- Murakami, Y., Nishioka, N., Hashiguchi, Y., and Kuniyasu, C. (1983): Serotypes of bovine rotaviruses distinguished by serum neutralization. *Infect. Immun.*, 40:851-855.
- 11.- Hoshino, Y., Wyatt, R.G., Greenberg, H.B., Kalica, A.R., Flores, J., and Kapikian, A.Z. (1983): Isolation and characterization of an equine rotavirus. *J. Clin. Microbiol.*, 18:585-591.
- 12.- Malherbe, H.H., and Strickland-Cholmay, M. (1967): Simian virus SA-11 and the related "O" agent. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 22:235-245.

- 13.- Adams, W.R., and Kraft, L.M. (1963): Epizootic diarrhoea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, 141:359-360.
- 14.- McNulty, M.S., Allan, G.M., Todd, D., and McFerran, J.B. (1979): Isolation and cell culture propagation of rotaviruses from turkeys and chickens. *Arch. Virol.*, 61:13-21.
- 15.- Roseto, A., Lema, F., Cavaliere, F., Dianoux, L., Sitbon, M., Ferchal, F., Lasneret, J., and Peries, J. (1980): Electron microscopy detection and characterization of viral particles in dog stools. *Arch. Virol.*, 66:89-93.
- 16.- Snodgrass, D.F., Angus, K.W., and Gray, E.W. (1979): A rotavirus from kittens. *Vet. Rec.*, 104:222-223.
- 17.- Bishop, R.F., Davidson, G.F., Holmes, I.H., and Ruck, B.J. (1973): Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet*, 2:1281-1283.
- 18.- Bishop, R.F., Davidson, G.F., Holmes, I.H., and Ruck, B.J. (1974): Detection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*, 1:149-151.
- 19.- Flewett, T.H., Bryden, A.S., and Davies, H. (1973): Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 2:1497.
- 20.- Adams, W.R., and Kraft, L.M. (1963): Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*, 141:359-360.
- 21.- Malherbe, H.H., Harwin, R., and Ulrich, M. (1963): The cytopathic effect of vervet monkey viruses. *S. Afr. Med. J.*, 37:407-411.
- 22.- Matthews, R.E.F. (1979): The classification and nomenclature of viruses: summary of results of meetings of the international committee on taxonomy of viruses in The Hague, September 1978. *Intervirology*, 11:133-135.
- 23.- Holmes, I.H., Ruck B.J., Bishop R.F., and Davidson G.P. (1975): Infantile enteritis viruses: morphogenesis and morphology. *J. Virol.* 16:937-943.
- 24.- Estes, M.K., Graham, D.Y., Smith, E.M., and Garba, C.F. (1979): Rotavirus stability and inactivation. *J. Gen. Virol.* 43:403-409.
- 25.- Both, G.W., Bellamy, A.R., Street, J.E. and Siegman, L.J. (1982): A general strategy for cloning double-stranded RNA: nucleotide sequence of the simian-11 rotavirus gene 8. *Nucleic Acids Res.*, 10:7075-7088.

26. - Kalica, A.R., Greenberg, H.B., Espejo, R.T., Flores, J., Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z., and Chanock, R.M. (1981): Distinctive ribonucleic acid patterns of human rotavirus subgroups 1 and 2. *Infect. Immun.*, 33:958-961.
27. - Kutsuzawa, T., Konno, T., Suzuki, H., Ebina, T., and Ishida, N. (1982): Two distinct electrophoretic migration patterns of RNA segments of human rotaviruses prevalent in Japan in relation to their serotypes. *Microbiol. Immunol.*, 26:271-273.
28. - Espejo, R.T., López, S., and Arias, C. (1981): Structural polypeptides of simian rotavirus SA11 and the effect of trypsin. *J. Virol.* 37:156-160.
29. - Arias, C.F., López, S., and Espejo, R.T. (1982): Gene protein products of SA11 simian rotavirus genome. *J. Virol.*, 41:42-?
30. - Kalica, A.R., Greenberg, H.B., Wyatt, R.G., Flores, J., Sereno, M.M., Kapikian, A.Z., and Chanock, R.M. (1981): Genes of human (strain Wa) and bovine (strain UK) rotaviruses that code for neutralization and subgroup antigens. *Virology*, 112:385-390.
31. - Matsuno, S., Inouye, S., and Kono, R. (1977): Antigenic relationship between human and bovine rotaviruses as determined by neutralization, immune adherence hemagglutination, and complement fixation tests. *Infect. Immun.*, 17:661-662.
32. - Coulson, B.S., Fowler, K.J., Bishop, R.F., Cotton, R.G.H. (1985): Neutralizing monoclonal antibodies to human rotavirus and indications of antigenic drift among strains from neonates. *J. Virol.* 54:14-20.
33. - Greenberg, H.B., Flores, J., Kalica, A.R., Wyatt, R.G., Jones, S. (1983): Gene coding assignments for growth restriction, neutralization and subgroup specificities of the Wa and DS-1 strains of human rotavirus. *J. Gen. Virol.* 64:313-320.
34. - Greenberg, H.B., Valdesuso, J., van Wyke, K., Midthun, K., Walsh, M., McAuliffe, V., Wyatt, R.G., Kalica, A.T., Flores, J., and Hoshino, Y. (1983): Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.*, 42:267-275.
35. - Sonza, S., Breschkin, A.M., and Holmes, I.H. (1983): Derivation of neutralizing monoclonal antibodies against rotavirus. *J. Virol.* 45: 1143-1146.
36. - Taniguchi, K., Urasawa, S., and Urasawa, T. (1985): Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 66:1045-1053.

- 37.- Dyall-Smith, M.L., Lazdins, I., Tregear, G.W., and Holmes, I.H. (1986): Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:3465-3468.
- 38.- Greenberg, H.B., Wyatt, R.G., Kapikian, A.Z., Kalica, A.R., Flores, J., and Jones, R. (1982): Rescue and serotypic characterization of noncultivable human rotavirus by gene reassortment. *Infect. Immun.* 37:104-109.
- 39.- Lazdins, I., Sonza, S., Dyall-Smith, M.L., Coulson, B.S., and Holmes, I.H. (1985): Demonstration of an immunodominant neutralization site by analysis of antigenic variants of SA11 rotavirus. *J. Virol.* 56:317-319.
- 40.- Dyall-Smith, M.L., and Holmes, I.H. (1984): Sequence homology between human and animal rotavirus serotype specific glycoproteins. *Nucleic Acids Res.* 12:3973-3982.
- 41.- Gunn, R.R., Sato, F., Powell, K.F.H., Bellamy, A.R., Napier, J.R., Harding, D.R., Hancock, L.J., Siegman, L.J., and Both, G.W. (1985): Rotavirus neutralizing protein VP7: antigenic determinants investigated by sequence analysis and peptide synthesis. *J. Virol.* 54:751-797.
- 42.- Hoshino, Y., Sereno, W.W., Midthun, K., Flores, J., Kapikian, A.Z., and Chanock, R.M. (1985): Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6701-6704.
- 43.- Clark, S.M., Roth, J.R., Clark, M.L., Barnett, B.B., and Spendlove, R.S. (1981): Trypsin enhancement of rotavirus infectivity: mechanism of enhancement. *J. Virol.* 39:316-322.
- 44.- Estes, M.K., Graham, D.Y., and Mason, E.B. (1981): Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: molecular mechanisms. *J. Virol.* 39:875-888.
- 45.- Cohen, J. (1977): Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 36:395-402.
- 46.- Matsuno, S., Inoue, S., and Kono, R. (1977): Plaque assay of neonatal calf diarrhea virus and the neutralizing antibody in human sera. *J. Clin. Microbiol.* 5:1-5.
- 47.- Barnett, B.B., Spendlove, R.S., and Clark, M.L. (1979): Effect of enzymes on rotavirus infectivity. *J. Clin. Microbiol.* 10:111-119.

48. - Richardson, C.D., Scheid, A., and Choppin, P.W. (1980): Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with aminoacid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology* 105:205-
49. - Richardson, C.D., and Choppin, P.W. (1983): Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: Studies on the site of action. *Virology* 131:528-
50. - Mason, B.B., Graham, D.Y. and Estes, M.K. (1983). Biochemical mapping of the simian rotavirus SA11 genome. *J. Virol.* 46:413-
51. - Chanock, R.M. (1981). Strategy for development of respiratory and gastrointestinal tract viral vaccines in the 1980s. *J. Infect. Dis.* 143:364-374.
52. - Vesikari, T., Isolauri, E., Delem, A., D'Hondt, E., André, F.E. and Zissis, G. (1983). Immunogenicity and safety of live oral attenuated bovine rotavirus vaccine strain RIT 4237 in adults and young children. *The Lancet* 1983, 807-811.
53. - Vesikari, T., Isolauri, E., D'Hondt, E., Delem, A., André, F.E. and Zissis, G. (1984). Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *The Lancet* 1987, 1342-1345.
54. - Hanlon, P., Marsh, V., Shenton, F., Jobe, O., Hayes, R., Whittle, H.C., Hanlon, L., Byass, P., Hassan-King, M., Sillah H., M'Bope, B.H., and Greenwood, B.M. (1987). Trial of an attenuated bovine rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. *The Lancet* 1987, 1342-1345.
55. - De Moy, P., Zissis, G., Butzler, J.P., Mutwewingabo, A., and André, F.E. (1986). Failure of live, attenuated oral rotavirus vaccine. *The Lancet* 1986, 109.
56. - Flores, J., Gonzalez, M., Perez M., Cunto, W., Peraz-Schaal, I., Garcia, D., Daoud, N., Chanock, R.M. and Kapikian, A.Z. (1987). Protection against severe rotavirus diarrhoea by rhesus rotavirus vaccine in Venezuelan infants. *The Lancet* 1987, 882-884.
57. - Hoshino, Y., Wyatt, R.G., Greenberg, H.B., Flores, J., and Kapikian, A.Z. (1984). Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization. *J. Infect. Dis.* 149:694-702.
58. - Arias, C.F., Ballado, T., and Flebański, M. (1986). Synthesis of the outer-capsid glycoprotein of the simian rotavirus SA11 in *Escherichia coli*. *Gene* 47:211-219.

59. - Arias, C.F., Lizano, M., and López S. (1987). Synthesis in *Escherichia coli* and immunological characterization of a polypeptide containing the cleavage sites associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *J. Gen. Virol.* 68:633-642.
60. - Arias, C.F., López, S., Bell, J.R. and Strauss, J.H. (1984). Primary structure of the neutralization antigen of simian rotavirus SA11 as deduced from cDNA sequence. *J. Virol.* 50:657-661.
61. - López, S., Arias, C.F., Bell, J.R., Strauss, J.H. and Espejo, R.T. (1985). Primary structure of the cleavage site associated with trypsin enhancement of rotavirus SA11 infectivity. *Virology* 144:11-19
62. - Kantharidis, P., Dyal-Smith, M.L., and Holmes, I.H. (1987). Marked sequence variation between segment 4 genes of human RV-5 and simian SA11 rotaviruses. *Arch. Virol.* 93:111-121.
63. - Mackow, E.R., Shaw, R.D., Matsui, S.M., Vo, F.T., Dang, M.N., and Greenberg, H.B. (1988). Characterization of the rhesus rotavirus VP3 gene: location of aminoacids involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusion region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85:
64. - Potter, A.A., Cox, G., Parker, M. and Babiuk, L.A. (1987). The complete nucleotide sequence of bovine rotavirus C486 gene 4 cDNA. *Nuc. Ac. Res.* 15:4361.
65. - Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* 113:237
66. - Molecular Cloning: A Laboratory Manual. T. Maniatis, E.F. Fritsch, and J. Sambrook, eds. Cold Spring Harbor Laboratory. (1982)
67. - Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1980). Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods in Enzymol.* 65:499-560.
68. - Bolívar, F., Rodríguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heynecker, H.L., Boyer, H.W., Crossa, J.H. and Falkow, S. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95.
69. - Ruiz, A.M., López, I.V., López S., Espejo, R.T. and Arias, C.F. (1988). Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. *J. Virol.* 62:4331-4336.

- 70.- López, S., Arias, C.F., Méndez, E., and Espejo, R.T. (1986). Conservation in rotaviruses of the protein region containing the two sites associated with trypsin enhancement of infectivity. *Virology* 154:224-227.
- 71.- Kaljot, K.T., Shaw, R.D., Rubin, D.H., and Greengard, H.B. (1988). Infectious rotavirus enters cells by direct cell membrane penetration, not by endocytosis. *J. Virol.* 62:1136-1144.
- 72.- Casadaban, M.J., and Cohen, S.N. (1980). Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in Escherichia coli. *J. Mol. Biol.* 138:179-207.
- 73.- Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* 122:501.
- 74.- Eagle, H. (1959). Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130: 432.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA