

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE gE DEL
VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY (PSEUDORRABIA)
EN UN SISTEMA DE BACULOVIRUS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARIO ENRIQUE ESPINOSA GONZÁLEZ

TUTOR:

ROGELIO A. ALONSO MORALES

COMITE TUTORAL:

ALVARO AGUILAR SETIÉN

HUMBERTO RAMÍREZ MENDOZA

MÉXICO, D.F.

2004

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

DEDICATORIAS A:

Mis padres. Por las enseñanzas de vida.

Lalito. Porque siempre haz sido mi mejor amigo, a pesar de tu lejana cercanía.

Abue y Tía. Por el apoyo brindado incondicionalmente.

Mis compañeros de laboratorio. Amanda, Refugio, Noé, Feli, Belém, Bety, Simón, Silvia, Toño Figueroa, Espiri, Vero, David, Raúl Ulloa, Mexicanto, Dalila, Tamara, Pepetoño, Luz, Mónica-siglo XXI, Ma. Esther por todos los momentos vividos y por su amistad.

Mis amigos. Por ser y por estar.

Guille. Por tu preocupación y apoyo incondicional.

Nina, Bruno, Carla y Deo. Por siempre estarnos acompañando y ser mis hermanos menores.

Tío Daniel. Por ser un ejemplo a seguir, con gratitud dondequiera que te encuentres †

Graciela. Porque este proyecto no hubiera salido adelante sin tu amor y apoyo. Te amo.

Mario E. Porque nunca te rendiste, creíste que este proyecto podía salir adelante y no te perdiste en el intento.

AGRADECIMIENTOS A:

Universidad Nacional Autónoma de México. Porque únicamente los egresados de esta Universidad sabemos que es tener la sangre azul y la piel dorada. Además, de no tener ninguna duda que ésta, es la Universidad de México.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Por permitirme este nuevo paso en mi formación profesional.

Laboratorio de Genética Molecular de la FMVZ-UNAM. Por el espacio y logística para realizar este proyecto.

Dr. Rogelio A. Alonso Morales. Por la dirección de este proyecto, colaboración, apoyo académico y supervisión tanto de logros como desventuras.

Biol. Amanda Gayosso Vázquez. Por todo el apoyo técnico, enseñanza y paciencia en biología molecular y administrativo con proveedores y reactivos.

Dr. Luis A. Vaca Domínguez.. Por su enseñanza precisa en baculovirus.

M en C. Alicia Sampieri. Por el apoyo técnico en el manejo de baculovirus y células de insecto.

Dra. Ma. Elena Trujillo Ortega. Por permitirme el uso de las unidades de aislamiento y las instalaciones del Departamento de Producción Animal: Cerdos.

M en C. Rosalba Carreón Nápoles. Por su apoyo técnico en la replicación del PrV.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Por el apoyo económico durante este proyecto.

Dr. Javier Flores Covarrubias. Por su apoyo, atención y calidez humana en todos los trámites del posgrado.

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal. Por el apoyo otorgado para la obtención de este grado.

Dr. Juan Antonio Montaña Hirose. Por su enseñanza, guía, apoyo y ser el mejor maestro que haya tenido.

Dr. Juan Antonio Figueroa. Por el apoyo en la pruebas de ELISA.

DECLARACIÓN.

El autor, da consentimiento a la división de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MVZ. Mario Enrique Espinosa González

RESUMEN

PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE gE DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE AUJESZKY (PSEUDORRABIA) EN UN SISTEMA DE BACULOVIRUS

El objetivo de este trabajo, fue desarrollar las metodologías y estrategias de ingeniería genética para producir el antígeno gE del virus de la enfermedad de Aujeszky (EA) en un sistema de expresión genética comercial (Bac-to-Bac) en células de insectos, que emplea como vector baculovirus. La expresión de proteínas recombinantes en sistemas de baculovirus ha sido una medida muy utilizada debido a sus niveles eficientes de expresión y bajo costo. Una de las ventajas, es la eficiencia para producir proteínas recombinantes en cuanto a conformación y modificaciones post-traduccionales, éstas, son semejantes a las células de mamíferos. La EA es un padecimiento altamente contagioso que causa signos respiratorios, nerviosos y reproductivos. La EA causa grandes daños a la porcicultura nacional, empleándose vacunas con delección glicoproteína E (gE) lo que permite diferenciar entre animales vacunados y los expuestos a virus de campo. La diferenciación serológica, se realiza por ELISA con sistemas comerciales, los cuales, son importados y por lo mismo costosos y de lenta adquisición. Estos sistemas, emplean el antígeno gE acoplado a placas de microtitulación. El gen completo del antígeno gE fue amplificado (1,741 pares de bases) por reacción cadena de la polimerasa y clonado en el sitio *Bam*H1 del vector de movilización pFBHTa. Se seleccionaron clonas correctamente orientadas, se obtuvo DNA con el cual se transformaron células competentes DH10BAC, las cuales contienen el genoma de un baculovirus (bácmido). En estas células, se induce la transposición sitio-específica entre el plásmido recombinante y el bácmido, formándose bácmidos recombinantes, que en este caso portan el gen de la gE. El DNA del bácmido recombinante se purificó y se utilizó para transfectar células de insecto *Sf*21. A partir de éstas, se obtuvieron baculovirus recombinantes infectivos que se utilizaron para expresar la proteína recombinante. Finalmente, del antígeno recombinante gER se evaluaron las propiedades antigénicas empleando anticuerpos específicos producidos en conejo y cerdo por ensayos de ELISA, dot Blot, inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa.

Palabras clave. Pseudorrabia, glicoproteína E, baculovirus, bácmido, plásmido, proteínas recombinantes.

CONTENIDO.

I. INTRODUCCIÓN.	6
I.1. ANTECEDENTES.	8
I.2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS.	9
I.3. GENOMA.	9
I.3.1. Glicoproteínas del PrV.	10
I.3.2. Ciclo viral.	11
I.4. EPIDEMIOLOGÍA.	14
I.4.1. Vacunas atenuadas con deleciones.	14
I.4.2. Vacunas “marcadoras.”	16
I.5. GLICOPROTEINA E.	16
I.6. BACULOVIRUS.	17
I.6.1. Infección natural.	17
I.6.2. Replicación in-vitro.	19
I.6.2A. Fase temprana.(Te)	19
I.6.2B. Fase tardía.(Ta)	19
I.6.2C. Fase muy tardía.(MT)	19
I.6.3. Estructura del Baculovirus.	20
I.6.4. Niveles de expresión.	21
I.7. Principios de los vectores de expresión en baculovirus.	22
I.8. Sistema de expresión de baculovirus BAC-TO-BAC®	23
II. JUSTIFICACIÓN.	26
III. HIPOTESIS.	27
IV. OBJETIVO GENERAL.	27
V. OBJETIVOS PARTICULARES	27
VI. METAS	28
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.	29
Virus y células.	29
VII.1. Titulación viral.	29
VII.1.1. Propagación del PrV.	29
VII.1.2. Extracción de DNA del PrV.	29
VII.1.3. Verificación de la identidad del DNA viral del PrV con enzimas de restricción.	30
VII.2. Amplificación del gen que codifica para el antígeno gE	30
VII.2.1. Purificación del gen amplificado que codifica para el antígeno gE.	30
VII.3. Clonación en pUC19/ <i>Sma</i> I/TA.	31
VII.3.1. Transformación de células competentes e identificación por PCR de las clonas recombinantes.	31
VII.3.2. Minipreparación de DNA de plásmido.	31
VII.3.3. Liberación del fragmento del gene gE del pUC19.	32
VII.4. Purificación de DNA y preparación del vector pFTB HTa.	32
VII.4.1. Clonación del gen del antígeno gE en el vector pFB HTa.	32
VII.4.2. Recuperación de plásmidos recombinantes pFBHTa para el gen de gE.	32
VII.5. Esquema de clonación del gen de la gE en el vector pFBHTa.	33

VII.6. Análisis de la orientación de la clonación del gen de la gE en el vector pFBHTa con digestión con enzimas de restricción. -----	35
VII.7. Confirmación del segmento clonado como el gen del antígeno gE. -----	36
VII.7.1 Protocolo de secuenciación. -----	36
VII.7.2. Alineación de identidad. -----	36
VII.8. Obtención del Bámido recombinante. -----	36
VII.8.1. Aislamiento del DNA del bámido recombinante. -----	36
VII.8.2A. Análisis por PCR. -----	37
VII.9. Obtención del Baculovirus recombinante. -----	38
VII.9.1 Transfección en células de insecto. -----	38
VII.10. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO RECOMBINANTE. -----	38
VII.10.1. Inmunodifusión en gel. -----	38
VII.10.2. Ensayo de Inmunofluorescencia. -----	38
VII.10.3. Ensayo de Inmunoperoxidasa. -----	39
VII.10.4. DOT-WESTERN. -----	39
VII.11. Obtención del antígeno recombinante. -----	40
VII.11.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida -----	40
VII.11.1A. Tinción de gel. -----	40
VII.11.2. ELISA doble “sándwich” de anticuerpos o de captura. (DAS) -----	41
VII.11.3. ELISA indirecta. -----	41
VII.12. Preparación del antisuero de conejo contra el PrV -----	42
VII.13. Titulación por ELISA indirecta de los antígenos recombinantes obtenidos. ---	42
VII.14. ELISA indirecta con sueros problema. -----	43
VIII. RESULTADOS. -----	44
1. Verificación de la obtención del DNA del PrV por digestión con enzimas de restricción -----	44
2. Verificación de la obtención del DNA del PrV por amplificación del gen del antígeno gE. -----	44
3. Clonación del gen gE del PrV en pUC19/ <i>Sma</i> I/TA. -----	45
4. Purificación del fragmento del gen gE con extremos cohesivos <i>Bam</i> H1 y preparación del vector pFBHTa. -----	46
5. Identificación de clonas recombinantes del gen gE resultado de la ligación al vector pFBHTa. -----	47
5.1. Identificación de la orientación del gen gE en las clonas recombinantes del vector pFBHTa. -----	49
6. Secuenciación de nucleótidos de la región de clonación en una clona recombinante del gen gE en el vector pFBHTa. -----	50
7. Confirmación del gen como el antígeno gE -----	51
8. Confirmación de la transposición específica del gen gE al Bámido. -----	52
9. Inmunodifusión en gel. -----	53
10. DOT-WESTERN. -----	54
11. Electroforesis de la proteína recombinante gE en gel de poliacrilamida desnaturalizantes. -----	55
12. Obtención y cuantificación de antígenos recombinantes. -----	56
13. Inmunofluorescencia -----	57

14. Inmunoperoxidasa.-----	57
15. ELISA indirecta.-----	58
16. ELISA doble “sándwich” de anticuerpos. (DAS)-----	59
17. Titulación de los antígenos recombinantes obtenidos por ELISA-----	60
18. ELISA indirecta con sueros problema.-----	61
IX. DISCUSIÓN.-----	62
IX.1. Verificación de la obtención de ADN del PrV por digestión con enzimas de restricción.-----	62
IX.2. Amplificación y verificación del gen que codifica para el antígeno gE por PCR.-----	62
IX.3. Purificación del gen amplificado que codifica para el antígeno gE.-----	63
IX.4. Clonación en pUC19/ <i>Sma</i> I/TA.-----	63
IX.5. Subclonación en pFBHTa/ <i>Bam</i> H1/FAC + gE.-----	63
IX.6. Obtención del Bámido recombinante.-----	64
IX.7. Confirmación del gen como el antígeno gE.-----	64
IX.8. Caracterización de la gER.-----	65
Cuantificación de antígeno recombinante gER para ensayos de ELISA-----	65
El antígeno recombinante gER en ensayos de ELISA para diagnóstico.-----	66
CONCLUSIONES.-----	68
La producción de proteínas recombinantes es una herramienta muy útil para generar reactivos biológicos. Esto podría ayudar a producir reactivos a bajo costo con características mas acordes con las exigencias médicas y sanitarias del país.	
X. LITERATURA CITADA.-----	68
X. LITERATURA CITADA.-----	69
XI. ANEXOS-----	76
1. Propagación y titulación del PrV.-----	76
2. Extracción de DNA del PrV-----	76
3. Verificación de la identidad del DNA del PrV por digestión con enzimas de restricción.-----	77
4. Amplificación del gen que codifica para el antígeno gE-----	77
5. Purificación de segmentos de DNA a partir de geles de azarosa por NaI y perlas de sílice.-----	78
6. Clonación en pUC19/ <i>Sma</i> I/TA.-----	78
7. Transformación de células competentes.-----	79
8. Identificación por PCR de clonas recombinantes en pUC19/ <i>Sma</i> I/TA.-----	79
9. Minipreparación de DNA de plásmido.-----	79
10. Liberación del fragmento del del gene gE del pUC19.-----	80
11. Obtención del DNA del vector pFBHTa.-----	80
12. Preparación del vector pFBHTa-----	80
13. Clonación del gen del antígeno gE en el vector pFBHTa / <i>Bam</i> H1/FAC-----	81
14. Transformación en células competentes.-----	81
15. Análisis direccional de las clonas por PCR y digestión con enzimas de restricción.-----	81
16. Confirmación del segmento clonado como el gen del antígeno gE-----	82
16.1 Protocolo de secuenciación.-----	82
16.2 Alineación de identidad.-----	83

17. Obtención del Bámido recombinante-----	83
18. Aislamiento del DNA del bámido recombinante y su verificación. -----	83
19. Obtención del Baculovirus recombinante por transfección de células de insecto del bámido recombinante. -----	84
20. Obtención de antígeno del PrV. -----	84
21. Determinación de la concentración de proteínas por bradford. -----	85
22. Obtención del antígeno recombinante.-----	87
23. Electroforesis en geles de poliacrilamida-----	87
23.1. Tinción de gel.-----	88
23.2 Dot-Western blot. -----	88
24. ELISA sándwich.-----	88
25. ELISA de captura.-----	89
26. Titulación por ELISA indirecta de los antígenos recombinantes obtenidos. ----	90
27. ELISA indirecta con sueros problema. -----	90

I. INTRODUCCIÓN.

En 1953 cuando los científicos James Watson y Francis Crick, descubrieron la doble hélice de DNA, nos dieron las herramientas para avanzar en nuestro conocimiento de las complejas interacciones entre los patógenos infecciosos y sus huéspedes.

La tecnología del DNA recombinante, es la técnica mediante la cual, se aíslan y transfieren secuencias de DNA específicas (genes) de un organismo y se recombinan con el DNA de otro. Ésta ha sido reconocida en todo el mundo como uno de los avances científicos más significativos del último siglo.

En la medicina de animales de compañía, hay tres categorías de vacunas recombinantes reconocidas por el Departamento de Agricultura de E.U.A. (USDA):

Tipo 1, vacuna de sub-unidades. Tipo 2, vacuna con remoción de genes y tipo 3, vacuna con un vector viral.

El ejemplo de vacuna con remoción de genes, es precisamente contra la enfermedad de Aujeszky o pseudorrabia. En pequeñas especies, hay una vacuna recombinante de sub-unidades OspA contra enfermedad de Lyme, aprobada para su uso en perros (Recombitek® Lyme-Merial) en E.U.A. Además, existen vacunas recombinantes vectorizadas en virus de viruela del canario, contra el moquillo canino, moquillo del hurón, y rabia felina.

Tradicionalmente, los virus han sido considerados como agentes patógenos que causan enfermedades en animales y el ser humano. Estas enfermedades, originan grandes pérdidas económicas en las industrias agrícolas y pecuarias. Sin embargo, recientemente se ha desarrollado el conocimiento aplicado a la biología molecular de los virus, los cuales, nos han guiado hacia avances en aplicaciones benéficas. Con base en los avances de ingeniería genética, se han logrado extraer elementos de genomas virales que facilitan la construcción de vectores artificiales, para producir proteínas recombinantes de interés académico y económico. Con éste propósito, se han empleado algunos virus que se replican en mamíferos. *Simian virus 40*, *vaccinia virus*, *adenovirus*, *herpesvirus*, *cytomegalovirus*. Virus, como el del mosaico del tabaco, el virus X de la papa, han sido manipulados para producir proteínas recombinantes en células de plantas. Pero la mayoría de esos sistemas, tienen limitantes en términos de seguridad y cantidad de proteína recombinante producida. Independientemente, de que en la mayoría de las ocasiones, su producto génico, no tiene un

proceso post-traducciona1 adecuado.¹

La expresi3n de prote3nas con el uso de baculovirus, brinda un medio ambiente eucari3tico que generalmente, establece un adecuado plegamiento, y otras modificaciones que normalmente son las mismas en c3lulas de insecto y de mam3fero.² Dos caracter3sticas importantes con los que cuentan los baculovirus, para el 3xito de 3stos virus como vectores de expresi3n son: Primero, el virus contiene un n3mero de genes no esenciales, que pueden ser reemplazados por genes ex3genos. Segundo, muchos de esos genes, particularmente los muy tard3os, est3n bajo el control de promotores muy fuertes, que permiten la abundante expresi3n del gen recombinante. Ejemplos de 3stos promotores, son el de la polihedrina y el p10.¹

En a3os recientes el an3lisis del virus de la pseudorrabia (PrV) o enfermedad de Aujeszky, por t3cnicas de biolog3a molecular, no 3nicamente han incrementado el entendimiento del genoma del PrV, sino tambi3n, de sus productos g3nicos. As3 mismo, se ha alcanzado mayor impacto en el desarrollo de nuevas vacunas y estrategias de erradicaci3n. 3sta enfermedad, es producida por el *Herpesvirus suis* 1, es altamente contagiosa, y se caracteriza por la presencia de signos nerviosos, respiratorios, fiebre y muerte de animales j3venes.

Se han secuenciado cerca de 40 genes, los cuales, constituyen aproximadamente el 60 % del genoma. Las prote3nas virales que determinan la neurovirulencia, patog3nesis de la enfermedad en diferentes especies animales, han sido identificadas por an3lisis detallados de vacunas atenuadas. Estos resultados, permiten el desarrollo de nuevas vacunas con mutaciones dirigidas por ingenier3a gen3tica. Tomando en consideraci3n que distintas glicoprote3nas de la envoltura son dispensables en la replicaci3n viral en cultivo celular. Actualmente, se ha realizado la expresi3n de genes heter3logos del PrV en diversos sistemas. Adem3s, se han desarrollado sistemas que utilizan el PrV como vector. Lo que permite el desarrollo de vacunas marcadas y biol3gicamente seguras contra otros pat3genos porcinos. El reciente conocimiento de la biolog3a del PrV permitir3 el desarrollo de nuevas y poderosas herramientas para combatir y erradicar la pseudorrabia.

La ventaja de utilizar baculovirus como sistema de expresión, es que es una vía económica y sencilla, para obtener, proteínas recombinantes. Distintos investigadores han reportado, la expresión de proteínas del PrV basadas en baculovirus recombinantes y de otros virus.³

I.1.ANTECEDENTES.

La enfermedad de Aujeszky (EA), fue descrita por vez primera en los Estados Unidos de América (EUA) en 1813, en el ganado bovino. El término pseudorrabia se utilizó por vez primera en Suiza en el año de 1849 debido a que los signos clínicos en el ganado eran similares a los de la rabia. En 1902 en Hungría, Aujeszky estableció al agente causal como no bacteriano.⁴ En 1910 Shmiedofer confirmó su origen viral² y en 1931 Shope probó que la "comezón loca" que padecían los bovinos de Iowa, EUA, era en realidad la EA.^{3,6} En 1934 Sabin y Wright identificaron que el virus de la pseudorrabia (PrV) o virus de la enfermedad de Aujeszky (PrV) está relacionado inmunológicamente al virus Herpes Simplex tipo 1^{4,5}

En México, el PrV fue identificado en 1945 por Batchold en bovinos. Posteriormente Ramírez y Téllez observaron algunos casos en la misma especie en Guanajuato.^{7,8} El primer caso informado en cerdos fue en La Piedad, Michoacán en 1969 por Martell y cols., quienes realizaron también el aislamiento y la identificación serológica del PrV.^{7,8} El PrV es un padecimiento altamente contagioso que se caracteriza por presentar signos respiratorios y nerviosos asociados a un aumento de la temperatura corporal y muerte de los animales jóvenes. La infección en animales adultos puede ser inaparente o estar asociada con la presencia de lechones paridos muertos, momificados y abortos.^{4,5,6}

Los signos clínicos dependen de la cepa del virus, la dosis infectante y la edad de los cerdos afectados, así como de su estado inmunitario.^{4,5} Típicamente los primeros signos son fiebre, anorexia, tos, pelo reseco, ataxia y convulsiones.^{4,5,6} La presentación de estos signos es más frecuente mientras menos edad tengan los animales. En lechones de dos semanas de edad la morbilidad y mortalidad son del 100%. Cuando tienen 3-4 semanas la tasa de morbilidad disminuye al 80% y la mortalidad al 40-60%, mientras que en cerdos de crecimiento y engorda disminuyen hasta un 10-20% y 5-10% respectivamente. Los animales del pie de cría son menos propensos a padecer la enfermedad pero pueden quedar como portadores

sanos diseminando el virus.^{4,9} La infección con el PrV, ocurre a través de ingestión o inhalación. El virus se establece en la nasofaringe donde inicia su replicación, invade pulmones y los macrófagos alveolares, lo cual permite el crecimiento de gérmenes secundarios. El PrV puede infectar el sistema nervioso central (SNC) y provocar signos de moderados a severos.⁹

I.2. CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS.

El PrV pertenece a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* de la familia *Herpesviridae*. Se ha encontrado, por comparación de secuencias de amino ácidos de proteínas homólogas, que está estrechamente relacionado con el herpesvirus bovino-1 (BHV-1), el herpesvirus equino-1 (EHV-1), y también al virus varicela-zoster (VZV). Por ello, su asignación dentro del género *Varicellovirus*. Los alfaherpesvirus se caracterizan provocar efecto citopático como formación de sincitios y redondeamiento celular en una gran variedad de cultivos celulares, su neurotropismo, latencia y su amplia gama de hospederos.^{10,11}

Como todos los herpesvirus el PrV esta formado por un centro de nucleoproteína el cual contiene el genoma que es de DNA, una cápside icosaédrica de 162 capsómeros (12 pentámeros y 150 hexámeros).¹² La cápside está rodeada por el tegumento, el cual bajo el microscopio electrónico, se observa como una estructura proteinacea amorfa, que a su vez está envuelta en una bicapa lipídica derivada de las células del huésped, la envoltura. La envoltura, contiene las glicoproteínas virales. Estas glicoproteínas estructurales intervienen en importantes interacciones entre el virus y las células del huésped.

I.3. GENOMA.

El genoma consiste de una doble cadena lineal de DNA de aproximadamente 150 000 pb. La secuencia completa del genoma no ha sido determinada, principalmente por su alto contenido de nucleótidos G-C de 73%, por lo que clarificar y secuenciar es muy laborioso y costoso. Sin embargo, ya se tiene el 90% de la secuencia. El genoma consiste de dos regiones únicas, una larga (U_L) y una corta (U_S) flanqueada por secuencias repetidas invertidas (IRS) las cuales, tienen la misma información pero, de forma opuesta, a manera

de un espejo. Estructuras similares (IRS) se han visto en el virus de la laringotraqueítis aviaria. Figura 1.^{10,11,12,13}

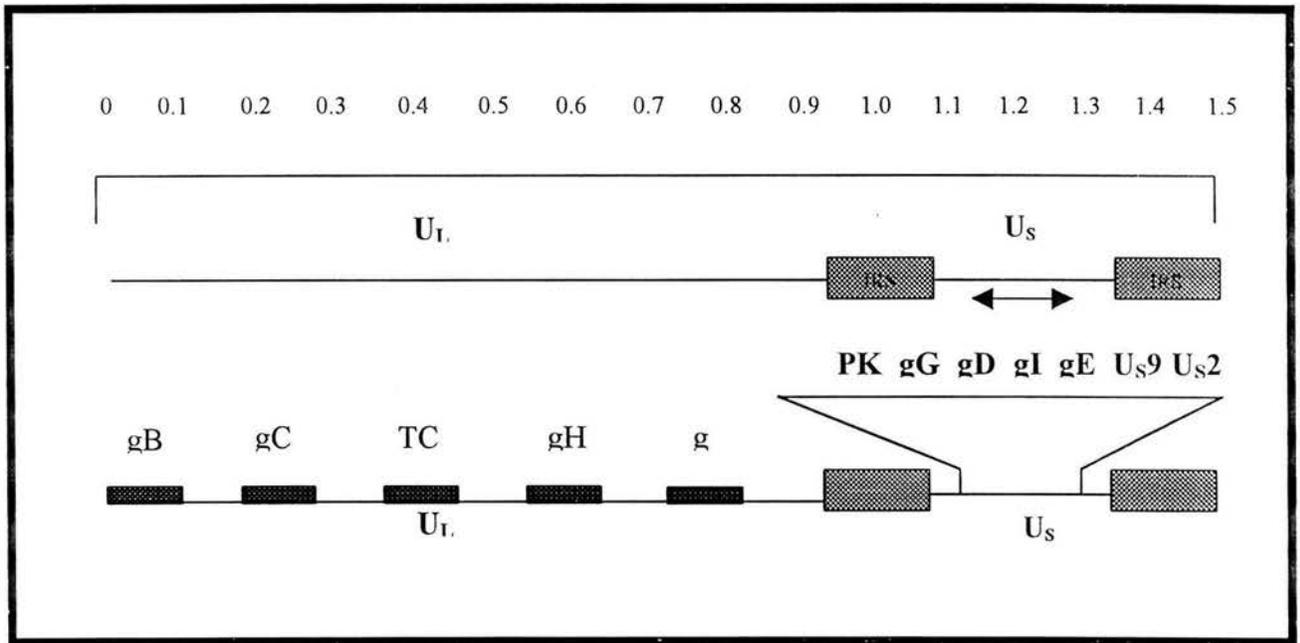


Figura 1. Mapa del genoma del PrV, que consiste de dos regiones únicas una larga (U_L) y una corta (U_S), flanqueada por secuencias repetidas invertidas (IRS) lo que permite isomerización (\leftrightarrow) de la región U_S . Localización de proteínas, en el genoma del PrV.¹

1.3.1 Glicoproteínas del PrV.

En el PrV once glicoproteínas han sido descritas, las cuales son denominadas de acuerdo a la nomenclatura unificada para las glicoproteínas de herpesvirus como gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM, y gN. La glicoproteína gG no está presente en la envoltura, pero es producida abundantemente por células infectadas. De estas glicoproteínas gC, gE, gG, gI y gM son denominadas como no esenciales, por que, la delección de sus genes respectivos no afecta la replicación del PrV en cultivo celular. Por el contrario, la ausencia de gB, gD, gH, gK o gL suprime la replicación viral. Algunas de estas glicoproteínas tienen un papel importante en el inicio de la infección, la unión del virus a las células blanco y la fusión de la envoltura del virus a la membrana citoplásmica celular, en un proceso llamado penetración. También, están involucradas en la infección de células adyacentes no

infectadas, llamado invasión célula-célula, un resumen de esas propiedades se presentan en el (cuadro 1)¹⁴ Otras proteínas membranales no glicosiladas son las producidas por los genes UL3, UL11, UL20, UL34 y UL43. La proteína Us9 del PrV recientemente ha sido presentada como proteína membranal.¹⁰ El tamaño del PrV varía de 150 a 180 nanómetros de diámetro. El PrV es sensible a solventes de los lípidos como los detergentes, cuaternarios de amonio, así como a urea, cloro, formalina y también a enzimas como la tripsina. La heparina impide su adsorción a las células por lo que las muestras sanguíneas no deben contener este producto. El virus es inactivado por los rayos X y por la luz ultravioleta.¹³

Designación ^a	Gen ^b	Esencial	Componente del virus	Unión	Penetración	Invasión célula-célula	Invasión neuronal
gB (gII)	UL27	+	+	-	+ ^c	+	+
gC (gIII)	UL44	-	+	[+] ^d	-	-	-
gD (gp50)	US6	+	+	[+]	+	-	-
gE (gI)	US8	-	+	-	-	[+]	[+]
gG (gX)	US4	-	-	-	-	-	-
gH	UL22	+	+	-	+	+	+
gI (gp63)	US7	-	+	-	-	[+]	[+]
gK	UL53	+	+	-	-	+	? ^e
gL	UL1	+	+	-	+	+	?
gM	UL10	-	+	-	-	[+]	-
gN	UL49.5	-	+	-	[+]	-	-

Cuadro1. Propiedades de las glicoproteínas del PrV

a La nomenclatura anterior se encuentra entre paréntesis.

b Designación del gen de acuerdo a la homología con el HSV-1.

c + indica una función esencial.

d [+] no es esencial o modula la función.

e No hay información disponible.

I.3.2. Ciclo viral.

En el núcleo, entra el DNA, y la transcripción se inicia, como se describe en la figura 2. En

los herpesvirus la transcripción es regulada a manera de cascada. Primero, se transcriben los genes inmediatamente tempranos (IT), que en el PrV sólo es uno, el gen IE180, el cual es homólogo del ICP4 del HSV-1, y está involucrado en la inhibición de la síntesis proteica celular. Después, cesa su síntesis y se presenta la transcripción y traducción de los genes tempranos (T) tales como, EPO (ICPO en HSV-1), RSp40 (ICP22 en HSV-1) y UL54 (ICP27 en HSV-1).

El gen IE180 es un potente transactivador de genes tempranos los cuales incluyen a aquellos que codifican para proteínas requeridas para la replicación del DNA y para otras funciones enzimáticas. Los genes tempranos se caracterizan por ser expresados antes de la replicación del DNA. El PrV codifica varias proteínas con actividad enzimática. La más importante es la timidin cinasa (TC), que no es esencial para el crecimiento del virus en cultivo celular pero, es requerida para la neurovirulencia, así como, la dUTPasa y la ribonucleótido reductasa. La timidin cinasa, codificada por el PrV utiliza como sustrato únicamente timidina, mientras que las de HSV1 y HSV2 utilizan timidina y deoxicitidina, esta TC del PrV presenta mayor homología en su secuencia de aminoácidos con la TC del herpesvirus equino y felino, que con la TC de herpes humanos. El gen de la TC no es esencial para el crecimiento del virus *in vitro*, pero deleciones en dicho gen producen pérdidas en virulencia y en el establecimiento de la latencia.¹⁵ Un virus TC⁻ no es capaz de crear *in vivo* en tejido nervioso y no puede colonizar los ganglios.¹⁶

La replicación del genoma viral necesita de los productos de los genes, UL5 (helicasa), UL8 (helicasa/primasa) UL9 (origen de replicación unido a proteína), UL30 (DNA polimerasa), UL42 (polimerasa asociada a proteína) y UL52 (primasa). Estos genes, son necesarios para reconocer el sitio de inicio de la síntesis de DNA, para desenrollar el DNA, la separación de la doble hélice y la síntesis de las cadenas complementarias. Por último, se expresan los genes tardíos que son componentes de la cápside y de la envoltura.¹⁰ Se ha observado, que mediante el tratamiento con detergentes no iónicos, se solubiliza la envoltura en las que se detectan las glicoproteínas, involucradas en la absorción y penetración del virus en la infección. La gC aunque no es esencial para la multiplicación del virus, si es necesaria para el crecimiento óptimo del virus el cultivo celular, especialmente, porque juega un papel importante en la absorción y liberación del virus.^{16,17} La gB y gD, participan en la

penetración. Además, en la célula infectada se produce otra glicoproteína, la gG (98K) segregada al medio en los cultivos celulares infectados, pero no induce anticuerpos neutralizantes, ni tiene influencia en la virulencia del virus.¹⁵

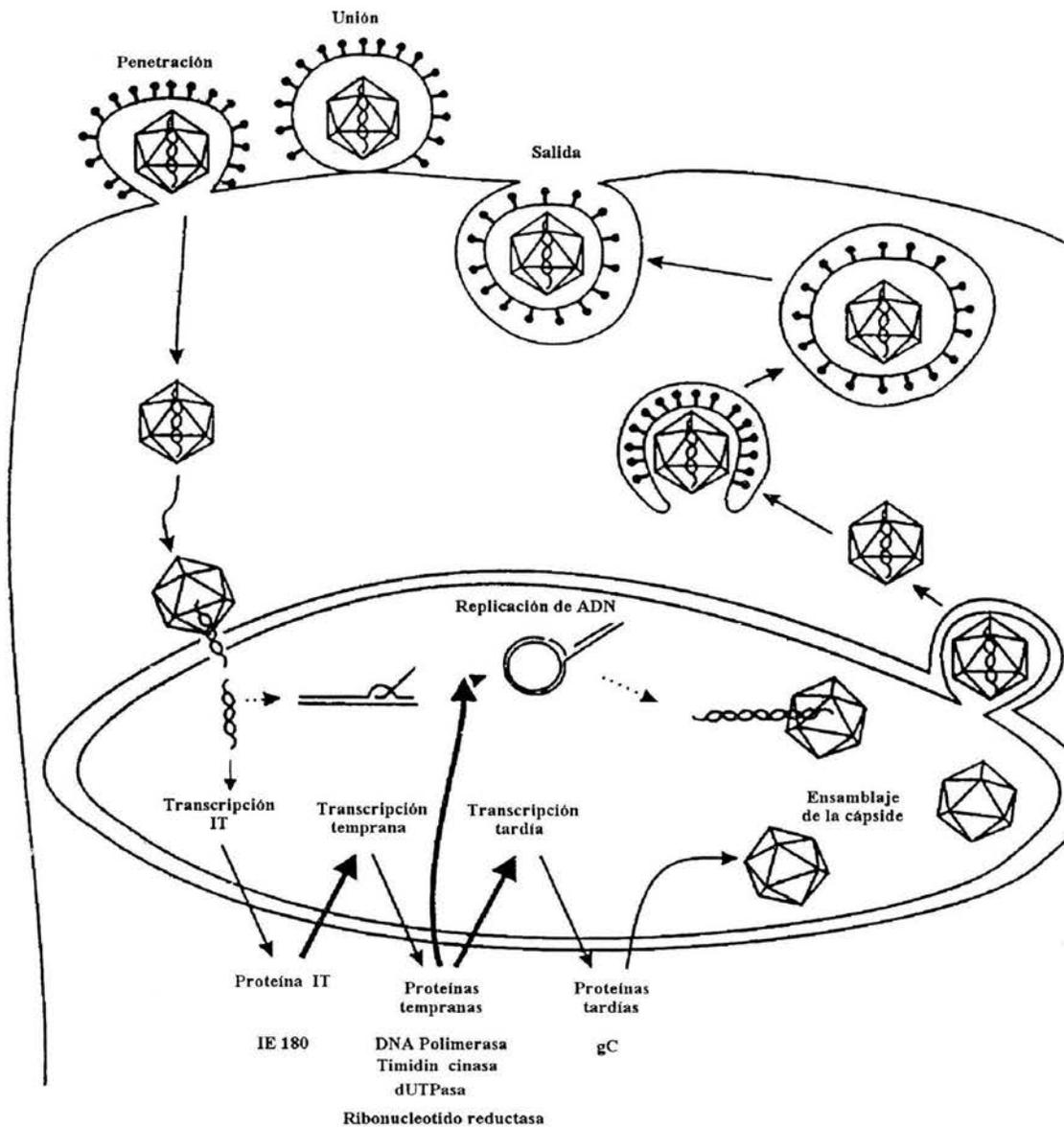


Figura 2. Ciclo viral del PRV¹⁰

I.4. EPIDEMIOLOGÍA.

La EA presenta distribución mundial; se encuentra en la mayoría de los países de Europa, también se ha señalado su presencia en África, Asia y Oceanía. En América está muy difundida, principalmente en Argentina, Brasil, Colombia, Cuba, EUA, Guatemala, Venezuela y México.⁷

El PrV tiene un gran número de hospederos los cuales mueren después de la infección, con la excepción del cerdo adulto, el cual sobrevive, y por lo tanto, es el principal eslabón para mantener la cadena de infección.¹⁸ En la infección natural el PrV puede invadir el SNC y causar una infección letal en bovinos, caprinos, ovinos, caninos, roedores y felinos.⁴ También se presenta en animales silvestres como liebre, conejo salvaje, marta, hurón, venado, ciervo, puerco espín, mofeta, oso polar, chacal, leopardo y camellos. No se ha informado de la infección natural en caballos y aves, sin embargo, experimentalmente la infección en estos animales es posible si se administran grandes cantidades de virus.

El hombre es considerado no susceptible al PrV, así como, el mono Grivet, Rhesus y el macaco, pero no así en el chimpancé. Con respecto a los animales de laboratorio el conejo es uno de los más susceptibles. Las ratas y los ratones de un día de edad son altamente susceptibles, y la resistencia aumenta con la edad.^{6,7,19}

El PrV es uno de los virus mas utilizados por varias razones, técnicamente, es fácil de trabajarlo. El DNA viral purificado, es altamente infeccioso. Varios de los genes son compartidos por alfa herpesvirus y están altamente conservados, aunque, la función de estos varía, por ejemplo: La gD del PrV es necesaria para la infectividad en el virus maduro pero no, para la diseminación de célula-célula en cultivo celular o neurona-neurona en animales. Esto no sucede en el HSV, donde la gD es requerida por el virus para la diseminación de célula-célula. El virus infeccioso es, fácilmente detectado en tejido cerebral.¹⁹

I.4.1 Vacunas atenuadas con deleciones.

El PrV se ha utilizado en vacunas atenuadas y, tiene una variedad de mutaciones que reducen su virulencia, pero al mismo tiempo, mantienen la capacidad de infección y de estimular una respuesta inmunológica.

Tamar Ben-Porat y colegas (Bartha 1961), presentaron estudios de la cepa vacunal Bartha, desarrollada en el Este de Europa. La cepa Bartha, fue seleccionada de entre varios

prototipos que posteriormente ha ofrecido una formidable percepción acerca de los problemas y beneficios de su uso. Distintos aislamientos del PrV de campo atenuados se han utilizado como vacunas. Esta cepa no proviene de un virus modificado por ingeniería genética. Mas bien, fue seleccionada después de sucesivas rondas de replicación en cultivos celulares de origen distinto al cerdo, la mayor parte de ellos, en células de embrión de pollo. Un aislamiento fue seleccionado para inducir inmunidad protectora en cerdos, los cuales, presentaban signos moderados asociados con la infección del PrV. La cepa Bartha tiene numerosas mutaciones en su genoma. Se conocen, mutaciones puntuales en gC, gM y U_L21. También, en la región corta única (U_S) en la que la secuencia de los genes gI, gE, U_S9 y U_S2 están removidos total o parcialmente figura 3.¹⁹

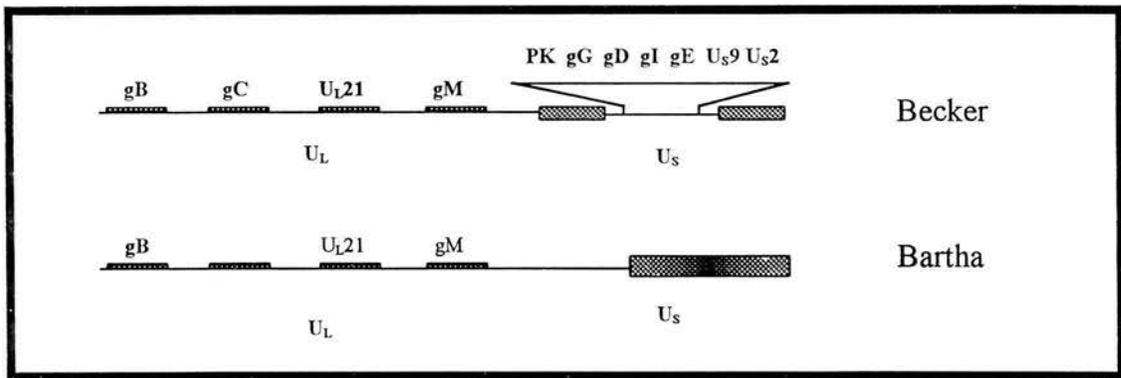


Fig. 3 Mapa de los genomas de las cepas de PRV Becker y Bartha. Genes importantes de la cepa Becker están representados como cajas, con el nombre del gen arriba. Bartha tiene una delección grande en la región U_S y mutaciones puntuales en los genes gC, U_L21 y gM.

En años recientes con los avances en biología molecular e ingeniería genética, se ha llegado a la identificación de varias proteínas del PrV que afectan su virulencia. Aquí se incluyen a las glicoproteínas no esenciales como la gE y la gI, enzimas como timidin cinasa, dUTPasa y la ribonucleótido reductasa o la proteína UL21 involucrada en la morfogénesis de la cápside. La inactivación de uno o mas de estos genes nos conducen a las cepas virales con fenotipo atenuado.^{13,17}

I.4.2 Vacunas “marcadoras.”

Uno de los logros más importantes en años recientes ha sido la creación del concepto de vacunas “marcadoras.” Con base en los hallazgos de que algunas cepas vacunales atenuadas carecían en su superficie de la gE, se establecieron pruebas serológicas para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos anti-gE en los animales.¹⁷ El uso de vacunas que carezcan de una o más proteínas no esenciales pero inmunogénicas, son llamadas vacunas marcadoras, en conjunción con una prueba serológica que detecte anticuerpos contra estas proteínas y permita diferenciar entre cerdos vacunados de los infectados.⁹

En la vacunación contra la enfermedad de Aujeszky se disponen de varias cepas vacunales marcadoras (Bartha, Begonia, Philaxia, Bucarest, Iowa, NIA3) que se utilizan comercialmente.

I.5. GLICOPROTEINA E

Actualmente, sabemos que para el PrV, la gE tiene un papel multifuncional en el ciclo viral y patogénesis. Esta glicoproteína, no es esencial para la replicación del virus en cultivo celular pero, es importante para expresión de la virulencia. Es importante en el tropismo hacia los tejidos y facilita la difusión del PrV neurona a neurona. Sin la gE, la infección primaria es insuficientemente establecida, por ello, es bloqueada por las defensas innatas del huésped (células NK, IFN, complemento). Forma una unión no-covalente con gI, ambas glicoproteínas, son expresadas en la membrana celular de las células infectadas y están presentes en la envoltura viral. Esta unión juega un papel *in vitro* importante en la liberación del virus en ciertas células y muestra también un curioso efecto adverso en el crecimiento del PrV en células aviares. En el cerdo, este complejo es utilizado por el PrV para dirigirse al bulbo olfatorio. En roedores y cerdos también dirige al virus hacia el nervio trigémino en la base del cerebro. La función de la gE, es requerida en los virus de reciente formación, para dirigir la infección y diseminación, después de reactivarse de su estado de latencia.¹⁹ De esta forma, mutantes gE⁻ no se multiplican en tejido cerebral, incluso cuando se inocula intracerebralmente a cerdos.¹⁸ La ausencia de la gE o de dos de sus aminoácidos (val-125 y cis-126) resulta en la reducción de la virulencia del PrV.²² La gE se encuentra dentro de la región U_S del genoma junto a ella se encuentra gI. La gE está formada por 1741 pb.

I.6. BACULOVIRUS.

En los últimos años, la expresión en baculovirus ha sido una medida muy extendida y efectiva para producir proteínas recombinantes en grandes cantidades. Las modificaciones post-traduccionales de los productos génicos de los virus de insectos tienen una glicosilación, acilación de ácidos grasos y fosforilación, semejante a la de las células de los mamíferos. El desarrollo del sistema de expresión en baculovirus se ha facilitado por el establecimiento de líneas celulares de insecto que apoyan o sustentan la replicación de un subgrupo, como el virus de la poliedrosis nuclear (NPV). Este subgrupo tiene la capacidad de propagarse en cultivo celular y también ha permitido diversos estudios en biología molecular. El modelo de esos estudios es el *Autographa californica* NPV (AcNPV) que, fue aislado por primera vez del gusano medidor de la alfalfa. La mayoría de los vectores están basados en la infección de AcNPV en células de *Spodoptera frugiperda*. La expresión en éste sistema está basada en la introducción de un gen extraño dentro de las regiones no esenciales del genoma viral.

La *Baculoviridae* es una familia de virus de DNA de doble cadena que infectan una gran variedad de artrópodos. Se dividen en dos subfamilias, la *Eubaculovirinae* (baculovirus cerrados) y la *Nudibaculovirinae* (baculovirus no-cerrados). La *Eubaculovirinae* infecta larvas de *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, *Neuptera*, *Siphonoptera*, *Thysanura* y *Trichoptera*. También a algunos crustáceos, como el camarón y el cangrejo. Miembros de la *Nudibaculovirinae* incluyen al virus del escarabajo rinoceronte de la palma (*Oryctes rhinoceros*) y al virus del grillo (*Gryllus campestris*). La *Eubaculovirinae* produce estructuras proteínicas cristalinas llamadas cuerpos de oclusión (OB's) los cuales no se presentan en la *Nudibaculovirinae*. Virus embebidos en los OB son protegidos de los factores inactivadores del medio ambiente, como luz ultravioleta, desecación y nucleasas. La generalidad de los baculovirus se han aislado de huéspedes específicos, y la mayoría de la *Eubaculovirinae* se han aislado de la familia *Lepidoptera*.¹

I.6.1. Infección natural.

Se caracteriza por la producción de dos distintos tipos de virus, tanto de forma funcional como estructural, el cerrado o derivado de la polihedrina (OV) y el extracelular o virus de brote (BV). El OV, es responsable de la infección primaria, está embebido en OB's, los

cuales, son requeridos para su propagación en el medioambiente. La larva ingiere OV contenidos en OB's. El ambiente alcalino del intestino origina la liberación de los virus embebidos. El OV liberado, infecta células epiteliales por medio de receptor. Estas células, producen el BV, que son requeridas para la infección secundaria. El BV, es responsable de la diseminación sistémica en insectos y también en cultivo celular. El ingreso del BV a las células es, por endocitosis mediada por receptor. Después, de la penetración, la nucleocápside se dirige hacia el núcleo, por un proceso que necesita de la formación microfilamentos de actina. Fig 4.

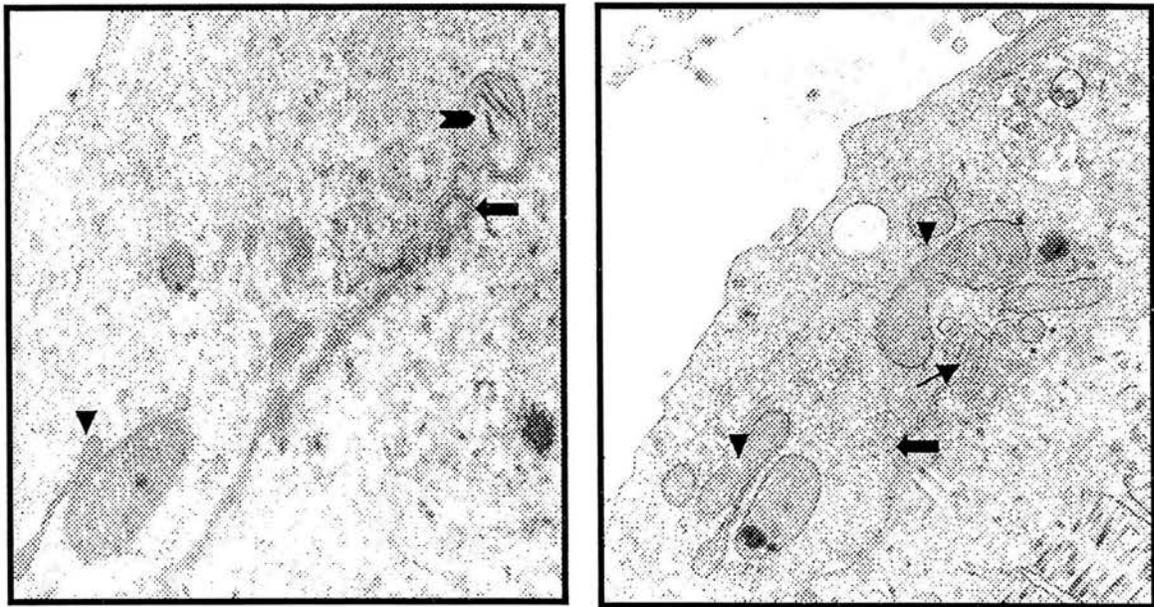


Fig 4. Células SF21 infectadas con baculovirus. Las flechas gruesas, indican invaginaciones en la membrana nuclear; la flecha delgada, señala baculovirus alrededor de la membrana nuclear; las cabezas de flecha, muestran mitocondrias con alteraciones; la flecha con muesca, hace notar baculovirus en la matriz de polihedrina. Fotografías por Dr. Luis Vaca D. Instituto de Fisiología Celular UNAM.

En el núcleo, la nucleocápside es descubierta y el DNA es liberado. El núcleo aumenta de tamaño y a las 12 horas después de la infección, son producidos y liberados BV's al espacio extracelular. La polihedrina es formada y OV's maduros son rodeados y envueltos antes de ser cerrados. La polihedrina, generalmente es esencial en las infecciones a larvas, pero no lo es, en cultivos celulares. La mayoría de los vectores de expresión en baculovirus utilizan este hecho para sustituir el gen que codifica para la polihedrina por el gen de interés.² La designación original fue N-polihedrina para, distinguirla de la matriz proteica C-polihedrina

de los virus de la polihedrosis citoplasmática, los cuales, son miembros de la familia *reoviridae*. Las formas OV y BV se pueden distinguir. Aunque las nucleocápsides son idénticas, la gp64 se encuentra en BV pero no en OV. La gp64, está involucrada en la entrada del virus a las células, en la infección secundaria y la principal forma de infección en cultivo celular. La proteína p74 se encuentra en OV y no en BV.

I.6.2. Replicación in-vitro.

En el ciclo de replicación en cultivo celular, se pueden observar 3 fases: 1.- Temprana, 2.- Tardía y 3.- Muy tardía. Éstas fases corresponden biológicamente a: 1.-Reprogramación de la célula para la replicación viral, 2.-Producción de BV y 3.-Producción de OV. Otros baculovirus como el virus de la polihedrosis nuclear *Bombix mori* (BmNPV) difieren en el proceso de infección o sus características, como el virus de la granulosis viral.

I.6.2A. Fase temprana.(Te)

Las células infectadas tienen cambios significativos durante las primeras 6 horas posteriores a la infección (PI) que es lo que dura esta fase y precede a la replicación de DNA. La cromatina se dispersa en el núcleo, el cual, se agranda durante este periodo.

I.6.2B. Fase tardía.(Ta)

Es un punto de exhaustiva replicación de DNA y producción de BV's. Comprende aproximadamente desde las 6-24 horas PI. Se forman las nucleocápsides y viajan por el citoplasma e interactúan con la membrana, donde, adquieren los peplómeros.

I.6.2C. Fase muy tardía.(MT)

Es la fase específica de oclusión. Se producen OV's. Inicia aproximadamente desde las 20 horas PI. La envoltura de la nucleocápside, parece ser un preámbulo esencial en el recubrimiento de la matriz de polihedrina. La naturaleza cristalina de la polihedra, ofrece, una apariencia altamente refractante al grupo de células infectadas.

Los pases sucesivos en cultivo celular, pueden disminuir la infectividad de los OV's. Esto se debe a que no hay presión de selección de virus que los produzcan. También, prolongadas series de pases de BV's incluyendo pases a bajas multiplicidades de infección (MOI's) de la semilla de baculovirus eventualmente degenerará en virus defectuosos. El gen *polh* está relacionado con la oclusión (occ) y por lo tanto, en la formación de OV's.

I.6.3. Estructura del Baculovirus.

El DNA está fuertemente asociado con una proteína, es una proteamina llamada p6.9. El resultado de este complejo forma el *core* o VP 12 de la nucleocápside. Además, de p6.9 se han identificado genes que codifican para otras proteínas de la cápside. La principal proteína de la cápside es la p39.

La cápside mas el *core* se llama nucleocápside. La nucleocápside, del AcNPV es de forma baciliforme, mide de 35-40 por 200-400 nm. Contiene un genoma circular de DNA de doble cadena, de aproximadamente 135 Kb del cual, ya se tiene la secuencia completa.²¹ El genoma de AcNPV contiene varias regiones llamadas repeticiones homólogas (*hrs*), las cuales, contienen en el centro de cada región un sitio de reconocimiento para la enzima *EcoR1*. Las regiones *hrs* parecen tener dos funciones, actúan como “enhancers” para numerosos genes *Te* y *Ta*. Y recientemente, se ha visto que actúan como orígenes de replicación para plásmidos, cuando son co-transfectados con fragmentos del genoma de baculovirus al ser introducidos a las células de insecto. Algunos genes presentes en esas regiones, incluyen la DNA polimerasa codificada por el baculovirus, p143 (helicasa) y el antígeno nuclear de proliferación celular.

Los genes *Te*, son transcritos por la RNA polimerasa II del huésped. La especificidad de la polimerasa inducida por el virus, quizás, es indicada únicamente por los promotores *Ta* y *MT* del baculovirus, los cuales, se diferencian de los primeros, por ser muy compactos y no contener elementos de DNA, como cajas TATA, presentes en la mayoría de los promotores eucarióticos. El único elemento parecido y que está presente en todos los promotores *Ta* y *MT*, es la secuencia consenso TAAG. La cual, contiene el sitio de inicio de la transcripción. Este elemento, está presente y es hiper-expresado, por los genes *MT*, como parte de una secuencia muy conservada TAATAAGT/AATT. Esta secuencia, es responsable de los altos niveles de expresión observados en lo promotores *MT*.¹

Las nucleocápsides, se forman en el núcleo y posteriormente, obtienen su envoltura de la membrana citoplasmáticas de células de insecto infectadas y se nombran como partículas

virales o viriones. En un extremo de la envoltura se encuentran los peplómeros. Estos, contienen la principal glicoproteína gp64. Fig 5.

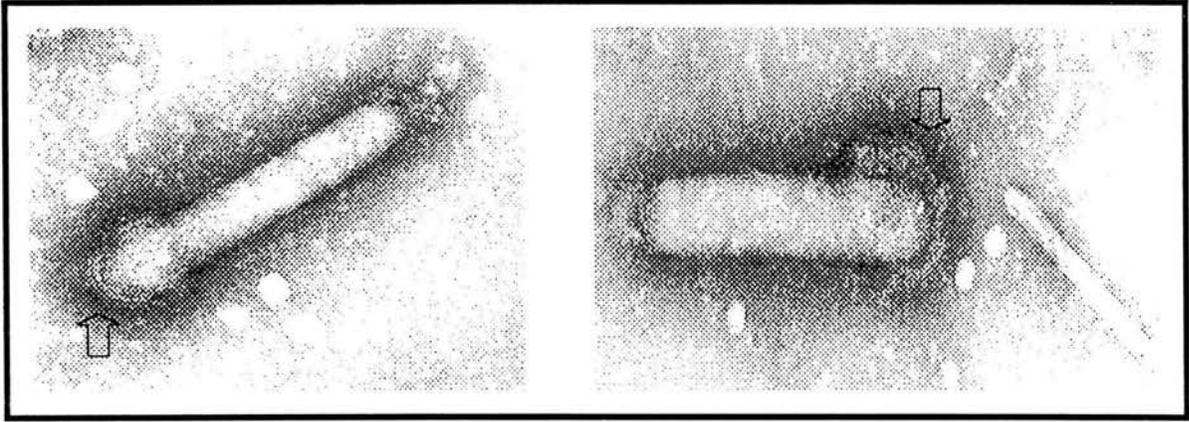


Fig 5. Fotografía con tinción negativa de baculovirus. Las flechas muestran el extremo donde se encuentran los peplómeros. Fotografías por Dr. Luis Vaca D. Instituto de Fisiología Celular UNAM.

I.6.4. Niveles de expresión.

La característica mas notable de los vectores de expresión en baculovirus es, la potente expresión de genes heterólogos. La expresión es de 25-50 % del total de la proteína celular. Estos niveles, equivalen a la expresión de la polihedrina y corresponden aproximadamente a 1 gramo de producto proteico por litro de cultivo con 10^9 células. Sin embargo, no todas las proteínas heterólogas se producen al mismo nivel. Rendimientos cercanos al 25 % se han logrado en pocos casos. La mayoría de ellos pertenecen a genes estructurales de otras familias de virus, en las que se han alcanzado rendimientos de aproximadamente 10-100 mg con 10^9 células por litro de cultivo.

Al utilizar un sistema de expresión eucariótico, es importante obtener proteínas heterólogas biológicamente activas. Este sistema ofrece un medio ambiente eucariótico que generalmente conduce a un adecuado plegamiento, formación de puentes disulfuro y otras modificaciones post-traduccionales. Los sitios de tales modificaciones, normalmente son las mismas en células de insecto y de mamífero.¹

I.7 Principios de los vectores de expresión en baculovirus.

Baculovirus recombinantes se han empleado ampliamente como vectores para expresar genes heterólogos en cultivos de células de insectos y en larvas de insectos. Genes heterólogos situados bajo el control transcripcional del promotor de la polihedrina del AcNPV es abundantemente expresado durante estados de infección. En la mayoría de los casos, las proteínas recombinantes son procesadas, modificadas, y colocadas en el sitio celular apropiado, y son funcionalmente similares a su contraparte original.

Algunas características que distinguen a éste sistema de expresión de otros:

- Altos niveles de expresión de genes heterólogos, muchas veces son mejores al compararlos con sistemas de expresión eucarióticos, particularmente para proteínas intracelulares.
- Los baculovirus tienen un rango de huéspedes restringido, se limita a especies de invertebrados. Estos virus son seguros para trabajar, mas aun, que con virus de mamíferos. La mayoría de las células de insecto susceptibles no son transformadas por virus patógenos o infecciosos.
- Utiliza una transposición sitio-específica para insertar genes extraños dentro de un báculo propagado en *E. coli*. Este sistema tiene numerosas ventajas sobre la generación de baculovirus recombinantes en células de insecto por recombinación homóloga. Elimina la necesidad de pruebas de purificación de placas, para seleccionar los virus recombinantes de los no recombinantes. Como resultado, se reduce el tiempo para identificar y purificar virus recombinantes de 4 a 6 semanas (por métodos convencionales) a 7 o 10 días.

1.8. Sistema de expresión de baculovirus BAC-TO-BAC[®]

Recientemente, se ha desarrollado un rápido y eficiente método para generar baculovirus recombinantes. Este sistema, está basado en la transposición sitio específico, de una caja de expresión dentro de un bacmido (baculovirus transformado), propagado en *E. coli*. El bacmido contiene un número bajo de copias de un replicón mini-F, un marcador resistente a kanamicina, un segmento de DNA que codifica para lacZ, péptido del vector de clonación pUC, insertado en el extremo amino terminal de lacZ, un segmento corto que contiene el sitio de unión para el transposon bacteriano Tn7 (mini-attTn7), que no rompe el marco de lectura de lacZ. El bacmido se propaga en *Escherichia coli* DH10BAC[®] como un plásmido grande que confiere resistencia a la kanamicina y puede complementar la delección de lacZ, presente en el cromosoma para formar colonias azules (Lac⁺) en presencia de un sustrato cromógeno como el Bluo-gal o X-gal y el inductor IPTG. Cuando se inserta un gen de interés se rompe lacZ y el fenotipo de las colonias bacterianas en blanco. El bacmido recombinante se construye por transposición de un elemento mini-Tn7 de un plásmido donador para que se una al sitio mini-attTn7 sobre el bacmido, las funciones de transposición de Tn7 están dadas por un plásmido cooperador. El plásmido cooperador confiere resistencia a la tetraciclina, y codifica para la transposasa. El plásmido pFASTBAC HT tiene una caja con el gen de gentamicina, otra con el gen de ampicilina, un promotor específico de baculovirus, un sitio múltiple de clonación y una señal de poliadenilación de SV40. Figura 6.

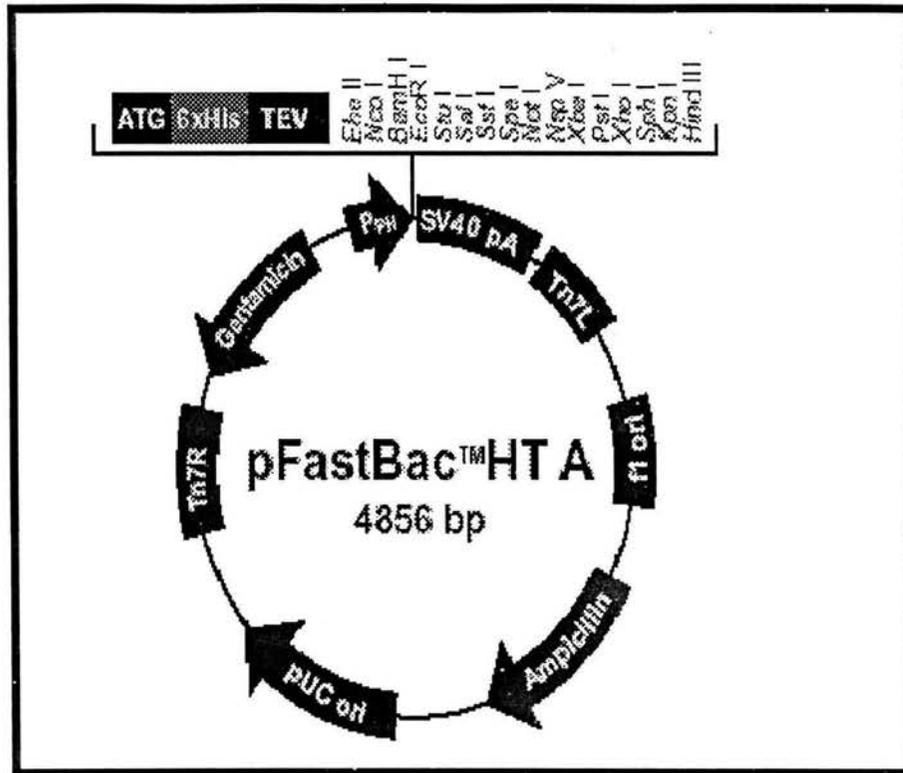


Figura 6. Esquema y características del vector pFASTBAC HTa.¹⁸ Sitio de origen f1: bases 2-457. Gen de resistencia a ampicilina: bases 589-1449. Origen de replicación pUC: bases 1594-2267. Tn7R: bases 2511-2735. Gen de resistencia a gentamicina: bases 2802-335. Promotor de la polihedrina: bases 3904-4032. Codón de inicio ATG: bases 4050-4052. Cola de 6 histidinas: bases 4062-4079. Sitio de reconocimientoTEV: bases 4101-4121. Sitio múltiple de clonación: bases 4119-4222. Señal de poliadenilación de SV40: bases 4240-4480. Tn7L: bases 4509-4674. Frameshift ocurre en el sitio *BamH1* del vector.

El sistema de expresión de baculovirus BAC-TO-BAC[®] para generar baculovirus recombinantes. Basado en la transposición sitio-específica. La semilla de virus ($> 10^7$ ufp/ml) es cosechada de las células de insecto y utilizada para infectar células de insecto frescas para la expresión, y análisis de la proteína. Figura 7. Para facilitar la purificación de proteínas expresadas con éste sistema, se han desarrollado una serie de plásmidos donadores (pFASTBAC[®] HT vectores de expresión). Estos vectores incorporan una cola de 6-histidinas y un sitio de unión de la proteasa TEV arriba del sitio múltiple de clonación (MCS). El sistema BAC-TO-BAC en conjunto con los vectores pFASTBAC HT brinda una vía simple para clonar, expresar y purificar proteínas de células de insecto.²²

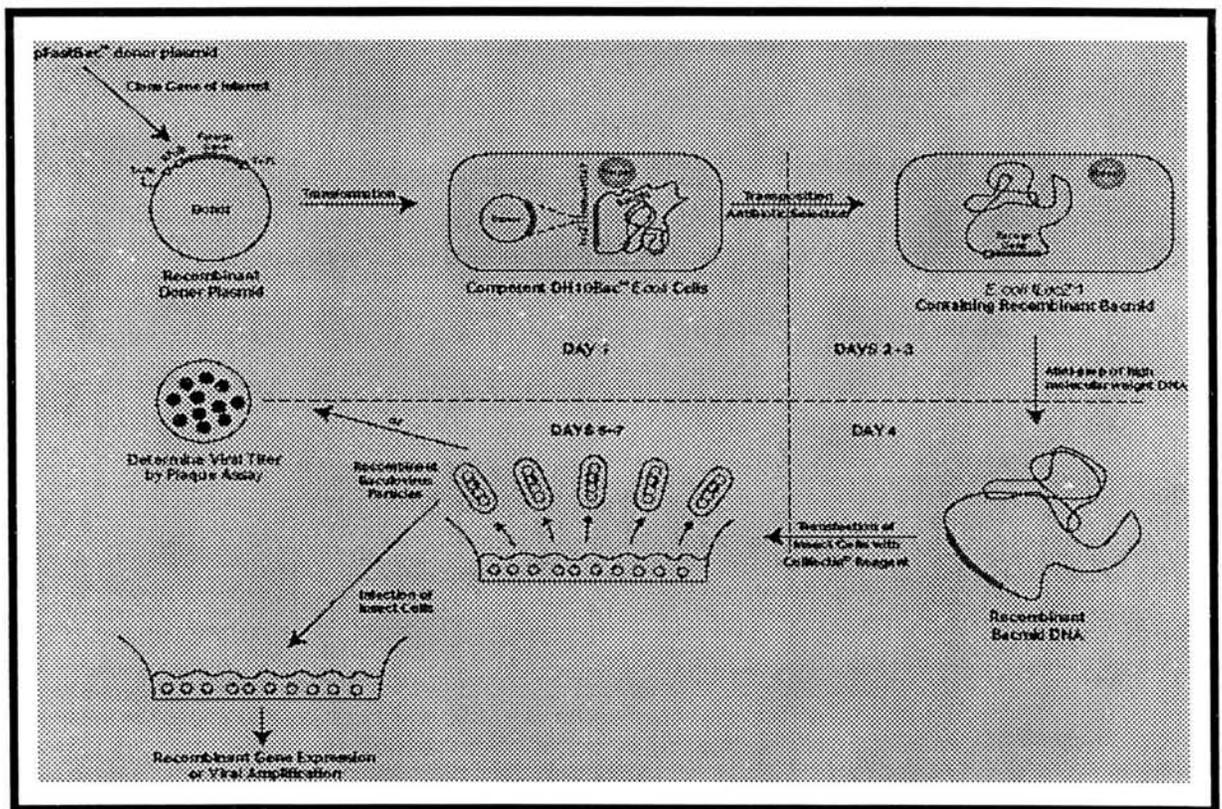


Fig 7. Generación del baculovirus recombinante y la expresión del gen con el sistema BAC-TO-BAC. El gen de interés es clonado el plásmido donador FAST BAC, el plásmido recombinante es transformado en células competentes DH10BAC, las cuales, contienen el bacmido con el sitio mini-att7 y el plásmido cooperador. El elemento mini-att7 del plásmido donador FAST BAC puede transponerse sobre el bacmido en presencia de las proteínas de transposición proveídas por el plásmido cooperador. Las colonias que contienen bacmidos recombinantes se identifican al interrumpir el gen de *lacZα*.

II. JUSTIFICACIÓN.

La enfermedad de Aujeszky o pseudorrabia es uno de los padecimientos que más daño causa a la porcicultura nacional. En la actualidad existe la Campaña Nacional para el Control y la Erradicación de la EA (NOM-007-ZOO-1994), en la que se establecen diferentes estrategias de control, de la que forma parte la vacunación. En México sólo está autorizado el uso de vacunas con delección del antígeno gE, lo que permite distinguir entre individuos vacunados de los infectados. Las pruebas diagnósticas para la EA y otras enfermedades están basadas en sistemas comerciales ELISA que detectan anticuerpos circulantes, los cuales son importados de distintos países, lo que encarece la prueba, tanto para productores como laboratorios de diagnóstico. Por tal motivo, éste trabajo buscó desarrollar las metodologías para producir antígenos recombinantes en un sistema de baculovirus comercial que es eficiente y de bajo costo.

Para que sea utilizada en la elaboración de un futuro paquete de diagnóstico.

III. HIPOTESIS.

La gE del PrV se puede producir en un sistema de baculovirus como proteína recombinante. Si la proteína recombinante gER obtenida en el sistema de baculovirus, entonces, tiene las mismas propiedades antigénicas que la gE original.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Clonar y expresar el antígeno gE del PrV en el sistema comercial de baculovirus BAC TO BAC® y obtener su análogo recombinante.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- A) Propagación del virus de la pseudorrabia y purificación del DNA viral.
- B) Amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa y clonación del gen que codifica para el antígeno gE.
- C) Emplear el sistema comercial BAC TO BAC® para obtener un baculovirus recombinante
- D) Expresar y caracterizar el antígeno gE recombinante.

VI. METAS

- Propagar el virus de la Pseudorrabia en un título mayor a 10^5 DICC₅₀/ml, y en cantidad suficiente para, obtener el virión mediante precipitación y purificar el DNA viral.
- Comprobar la integridad del DNA viral por electroforesis y verificar su identidad por medio de restricción con las enzimas *Bam* H1 y *Kpn* 1.
- Utilizar el DNA como molde para amplificar el gen de la gE por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- Clonar el fragmento amplificado del gen de la gE inicialmente en el vector pUC 19/T, verificar su clonación por PCR y purificación del DNA plasmídico recombinante.
- Liberar con enzimas de restricción el fragmento del gen de la gE del pUC recombinante, purificarlo a partir de un gel de agarosa y subclonarlo en el vector pFASTBAC HTa. Aislamiento de una clona que se encuentre correctamente orientada. Esto será verificado por digestión con enzimas de restricción y por PCR.
- Verificar por secuenciación de nucleótidos las clonas que presentan la orientación correcta, confirmando que el gen se encuentra en el marco abierto de lectura correcta.
- Transformación de células DH10 BAC con las clonas pFASTBAC HTa recombinantes para el gen del antígeno gE para la obtención de un báculo recombinante. Obtención de DNA del báculo recombinante y confirmación de que es recombinante por PCR.
- Obtención y adiestramiento del manejo las células de insecto *Sf21* de *Spodoptera frugiperda*, (crecerlas en medio de cultivo, propagarlas, congelarlas, descongelarlas, infectarlas, contarlas y evaluar su viabilidad).
- Transfección de las células de insecto Sf21 con el DNA del báculo recombinante para obtener baculovirus recombinantes infecciosos.
- Expresar en células de insecto Sf21 el antígeno gER recombinante y caracterizarlo por ELISA, Western dot blot e inmunofluorescencia.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS.

Virus y células.

La cepa Shope del PrV se propagó en células de riñón de bovino MDBK como se describe en el Anexo 1. El inóculo original fue amablemente donado por el Dr. Humberto Ramírez del departamento de producción animal cerdos de la FMVZ-UNAM. A este se le realizaron tres pases en cultivos celulares de 30 ml (1×10^6 células/ml) para obtener un mayor efecto citopático en 48 hrs. El lisado se clarificó por centrifugación, se tituló, se fraccionó y se almacenó a -70°C , hasta su uso.

Las células de insecto Sf21 de *Spodoptera frugiperda* crecen y propagan en medio Sf900 II (Gibco, No. catalogo 10902-096) adicionado con 10% de suero fetal bovino, glutamina $2\mu\text{M}/\text{ml}$, piruvato de sodio 1%, y antibiótico IX (Invitrogen Co.15240-062). Esta línea celular se deriva de ovario de pupa de *S. frugiperda*. Las células se duplican aproximadamente cada 22 horas.

VII.1. Titulación viral.

El PrV fue titulado por diluciones a punto final de efecto citopático. El título se considera como el logaritmo inverso de la dilución más alta del lisado viral que no presenta efecto citopático.²³ Ver anexo 1.

VII.1.1. Propagación del PrV.

Se infectó un monoestrato de células MDBK en botella de 175 cm^2 con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 por 48 horas en el que se observó efecto citopático mayor al 50%.

El MOI se calculó de esta forma:

$$\text{MOI} = \frac{\text{mililitros de inóculo a utilizar} * \text{Título del virus}}{\text{No. de células}}$$

$$\text{MOI} = \frac{1 \text{ mililitro de inóculo} * 1 \times 10^{5.6} \text{DICC}_{50}}{1 \times 10^6 \text{ células / mililitro}} = 1$$

VII.1.2. Extracción de DNA del PrV.

El DNA del PrV se obtuvo como lo menciona Silhavy y cols 1984²⁴ con ligeras modificaciones, como se menciona en el Anexo 2. La pastilla de DNA obtenida fue

resuspendida con agua destilada estéril, se cuantificó por fluorometría, se observó su integridad por electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz ultravioleta. La obtención de antígeno viral se describe en el anexo 20 y la cuantificación de proteínas en el anexo 21.

VII.1.3. Verificación de la identidad del DNA viral del PrV con enzimas de restricción.

Debido a que la purificación del DNA viral puede venir contaminado con DNA genómico celular, el DNA de PrV se evaluó el grado de contaminación por digestión con las enzimas *Bam* HI y *Kpn* I. El protocolo de la digestión se describe en el anexo 3.

VII.2. Amplificación del gen que codifica para el antígeno gE

El gene que codifica para el antígeno gE fué amplificado utilizando iniciadores específicos diseñados a partir de la secuencia reportada en el GeneBank (Numero de acceso M14336). Iniciador delantero **BFgE** (G GAT CCG ATG CGG CCC TTT CTG CTG CGC) Iniciador reversa **BRgE** (Cg G GAT CCG ATT AGC GGG GCG GGA CAT CAA). Se realizó una PCR de gradientes para verificar la temperatura óptima a la que se alinean los iniciadores. En el anexo 4 se indican las condiciones de PCR que se empelaron para amplificar el segmento del gene gE.

La amplificación del gene del antígeno gE con un tamaño de 1741 pb, así como el patrón de restricción obtenido del DNA del PrV fue verificada por electroforesis en gels de agarosa al 1%. Se aplicaron 70 volts durante 45 minutos. El gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5 µg/ml por 5 minutos y se observó con luz ultravioleta.

VII.2.1. Purificación del gen amplificado que codifica para el antígeno gE.

El producto amplificado del gene del antígeno gE se fue purificado a partir de un gel de agarosa al 1% siguiendo la metodología descrita por Boyle and Leww en 1995 ²⁵ Este procedimiento se describe en el anexo 5. La recuperación del DNA del fragmento fue confirmada por electroforesis en agarosa al 1%.

VII.3 Clonación en pUC19/SmaI/TA.

El segmento amplificado y purificado del gene del antígeno gE se ligó al vector pUC19 al cual había sido cortado con SmaI y se le habían adicionado colas de timidinas (proporcinado amablemente por la Biol. Amanda Gayosso del Lab. de Genética Molecular de la FMVZ-UNAM). Este protocolo se describe en el Anexo 6.

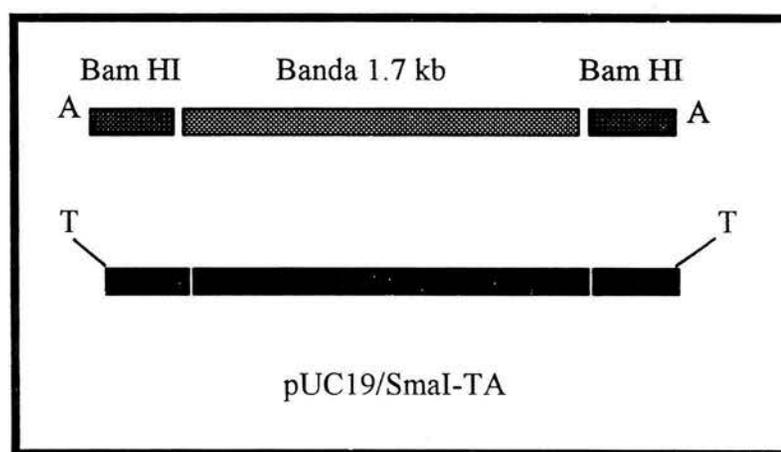


Figura 8. Esquema de ligación con T4 DNA ligasa entre el vector T y el fragmento amplificado con extensión de 15 minutos para facilitar la adenilación de sus extremos.

VII.3.1. Transformación de células competentes e identificación por PCR de las clonas recombinantes.

Con el producto de ligación en pUC19 se transformaron células competentes DH10b (ver Anexo 7). Las células transformadas fueron espatuladas en placas de agar LB ampicilina, IPTG y X-Gal obteniéndose colonias blancas y azules. Las colonias blancas fueron elegidas y lisadas por ebullición en 50 μ l de H₂O bidestilada. Para identificar las clonas recombinantes se tomaron 5 μ l del lisado para efectuar una PCR utilizando los iniciadores específicos para el gen de la gE (ver Anexo 8).

VII.3.2 Minipreparación de DNA de plásmido.

Las clonas recombinantes para el gen gE positivas se amplificaron para obtener DNA plasmídico. Para esto una colonia positiva se inoculó en 3 ml de LB/ampicilina en agitación

durante 12 horas. Se obtuvo el DNA por el método de ebullición (ver anexo 9). La obtención del DNA y su integridad fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1% como ha sido descrito.

VII.3.3. Liberación del fragmento del gene gE del pUC19.

Del DNA de las clonas pUC19 recombinantes para el gen gE se liberó el fragmento que contiene el gen para gE al digerirlo con la enzima *Bam*H1. El fragmento, fue purificado de un gel de agarosa al 1% por el método de perlas de sílica (Ver Anexos 5 y 10).

VII.4. Purificación de DNA y preparación del vector pFTB HTa.

El DNA del vector pFBHTa fue purificado obtenido por un método de lisis alcalina comercial que emplea una columna de afinidad (ver Anexo 11). El DNA del plásmido pFBHTa fue preparado como vector de clonación digiriéndolo con la endonucleasa *Bam*H1 para exponer los sitios cohesivos y desfosforilado con fosfatasa alcalina de camarón como se menciona en el Anexo 12.

VII.4.1 Clonación del gen del antígeno gE en el vector pFB HTa.

El fragmento de DNA purificado conteniendo al gen del antígeno gE, con extremos cohesivos *Bam* HI, se ligó al DNA del vector pFBHTa digerido con *Bam* HI y desfosforilado. Las condiciones de ligación se muestran en el Anexo 13.

VII.4.2. Recuperación de plásmidos recombinantes pFBHTa para el gen de gE.

Los productos de ligación anterior se emplearon para transformar células competentes DH10b. 100 µl de las células transformadas se espatularon en placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina y 7 µg/ml de gentamicina. Las placas fueron incubadas a 37C por 24-48 horas. A partir de varias de las clonas seleccionadas se obtuvo DNA plasmídico (Ver anexo 14).

VII.5. Esquema de clonación del gen de la gE en el vector pFBHTa.

ACG ACC GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC GCC ATG **GAT CCG** ATG CGG CCC TTT
Thr Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Met Asp Pro Met Arg Pro Phe
Secuencia del sitio de clonación del vector pFBHTa en donde se señala el sitio *Bam*HI (en negritas)

Secuencia del iniciador delantero para amplificar el gen gE. El sitio *Bam*HI se indica en negritas.

GAT CCG ATG CGG CCC TTT CTG CTG CGC
ATG CGG CCC TTT CTG CTG CGC
Met Arg Pro Phe Leu Leu Arg
Inicio de la secuencia del gen de la gE.

ACC GAA AAC CTG TAT TTT CAG GGC GCC ATG **GAT CCG** ATG CGG CCC TTT CTG
Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ala Met Asp Pro Met Arg Pro Phe Leu
Reconstrucción del sitio 5' de clonación después de insertar el gen del antígeno gE en el vector de clonación pFBHTa en el sitio *Bam*HI (en negritas). Se muestra que los marcos de lectura del sitio de clonación del vector y del gen de la gE quedan en la fase de lectura apropiada.

Iniciador reverso para amplificar el gen gE. El sitio *Bam*HI se indica en negritas

Cg **G GAT CCG** ATT AGC GGG GCG GGA CAT CAA
TAA TCG CCC CGC CCT GTA GTT
Complementario reverso del extremo 5' terminal del gen de la gE

ACC GCC AAC CGC CTG TTG ATG TCC CGC CCC GCT TAA **G GAT CCG** ATG CGG CCC TTT
Thr Ala Asn Arg Leu Leu Met Ser Arg Pro Ala --- Asp Pro Met Arg Pro Phe
Reconstrucción del sitio 3' de clonación entre el extremo terminal del gene de la gE y el vector pFBHTa en el sitio *Bam*HI (en negritas).

En la figura 9, se observa la secuencia completa de la gE en el pFBHTa. En mayúsculas, parte de la secuencia del pFBHTa, en rojo esta el codón de inicio de la transcripción y el codón de término con la secuencia de *Bam* HI, en azul la secuencia de los iniciadores para amplificar el gen completo. Con el fondo amarillo las 6 histidinas que se encuentran antes del sitio múltiple de clonación (SMC) del pFBHTa.. El SMC inicia con ACG del treonina.

CCATCACCATCACCATCAC GATTACGATATCCCAACGACCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGCCATGGATCCG
atgCGGCCctttctgctgCGcgcCGcgcagctcctggcgtgctggccctggcgtctctccaccgag
gccccgagcctctccgCCgagacgacccccgggccccgtcaccgaggtcccgagtcctcggccgag
gtctgggacgacctctccaccgaggccggcgacgatgacctcaacggcgacctcgacggcgacgac
cgccgCGcgggttcggctcggccctcgcctccctgagggaggcgccccggcccatctggtgaacg
tgtccgagggcgccaacttcaccctcgacgCGcgcggcgacggcgccgtgctggcgggatctgga
cgttcctgcccgtccgCGgctgCGacgCCgtgtcggtgaccacgggtgtgcttcgagaccgCGtgcc
accCGacctggtgctgggCGcgcctcgtccccgaggccccggagatgggcatcggcgactacc
tgccgccccgaggtgCCgCGgctccggCGcgcgagccgccccatcgtcaccCCggagCGgtggtcgcCGc
acctgagCGctcctgCGggccacgCCcaacgacacgggCctctacacgctgCACgacgcctcggggc
CGcgggCCgtgttctttgtggCGgtgggCGaccggcCGccccgCGcCGggaccCGgtgggccccg
CGcGCCacgagccccgcttccacgCGctcggcttccactCGcagctcttctCGccccgggacacgt
tcgacctgatgCCgCGcgtggtctcggacatgggCGactCGcCGgagaactttaccgCCacgctgg
actggtactacgCGcgcgCGccccCGggtgCctgctgtaactacgtgtacgagccctgcatctacc
accCGcGCgCGcccagtgCctgCGccccggtggaccCGgctgCagcttcaacctCGcCGgCGcCGc
CGcggctggtggCGcGCcCGcgtacgcctcgtgCagcccgtgctCGgggaccGGtggtgaccg
cctgcccccttcgacgccttcggCGagggaggtGCacacgaacGCCaccCGgacgagtcggggctgt
acgtgctcgtgatgaccacaacggCCacgctCGccacctgggactacacgctcgtCGccaccCGcgg
CCgagtacgtcacggtcatcaaggagctgacggccccCGccccgggccccCGgacccccgtggggcc
CCggCGgCGgCGacgaccCGatctacgtggacggCGtcacgacCGcCGcCGccccCGcCGccccgt
ggaaCCCGtacgGCCggaCGacgccccgggCGgctgtttgtgctggcgtgggctccttcgtgatga
cgtgCGtcgtCGggggggcCGctctggctctgCGtgctgtgctccccggccccgggCGgctcCGcggcc
gttccGGgtgCCgacCGggCGcGGacgcacatgctctctccGGtgtaCCagcctGCCacgca
CGaggactactCGacggCGacgacgacgacgagggagggCGgctcatccCGcGGcGGccccgCctcc
ccccGGgagacagCGgctacgaggggtcgtacCGcagcctggaccCGaggacgagttcagcagCG
acgaggacgacCGgctgtacgtgCGccccgaggagggCGccccgctccGGcttcgacgtctggttcc
gCGatccGGgagaaCCggaagtGacgaatggacccaactatggCGtgaccGCCaaccgCctgTtga
TgtccccgccccgcttaaCGGATCCCGGAATTCAAAGGCCTACGTCGACGAGCTCAACTAGTGCGGC
CGCTTTCGAATCTAGAGCCTGCAGTCT

Fig 9. Secuencia completa del gen gE clonado en el plásmido pFBHTa. En mayúsculas la secuencia del plásmido pFBHTa, en verde el codón de inicio y en rojo el término de la transcripción. En azul el sitio *Bam* HI. Los iniciadores para amplificar el gen completo están subrayados. Con el fondo amarillo las 6 histidinas que se encuentran antes del sitio múltiple de clonación del pFBHTa.

VII.6. Análisis de la orientación de la clonación del gen de la gE en el vector pFBHTa con digestión con enzimas de restricción.

Para verificar la inserción correcta del gen de la gE en el vector pFBHTa/*Bam*HI/FAC, se utilizó un análisis por PCR y digestión con enzimas que cortan dentro del inserto y en el vector. La PCR se realizó con los iniciadores específicos que amplifican el de la gE, con el protocolo descrito anteriormente. La digestión se realizó con las enzimas *Bst*EII (5' G/GTNACC 3') que corta en la posición 411 de la secuencia del gen de la gE y la enzima *Hpa* I (5' GTT/AAC 3') corta en la posición 43242 en la secuencia del pFBHTa. En la figura 10 se observa en el esquema la clonación con la orientación correcta. Los fragmentos obtenidos después de la doble digestión, son de 5050 pb y otro de 1547 pb. En el esquema de orientación incorrecta (figura 11) se observa que se generan dos fragmentos uno de 5970 pb y otro de 627 pb.

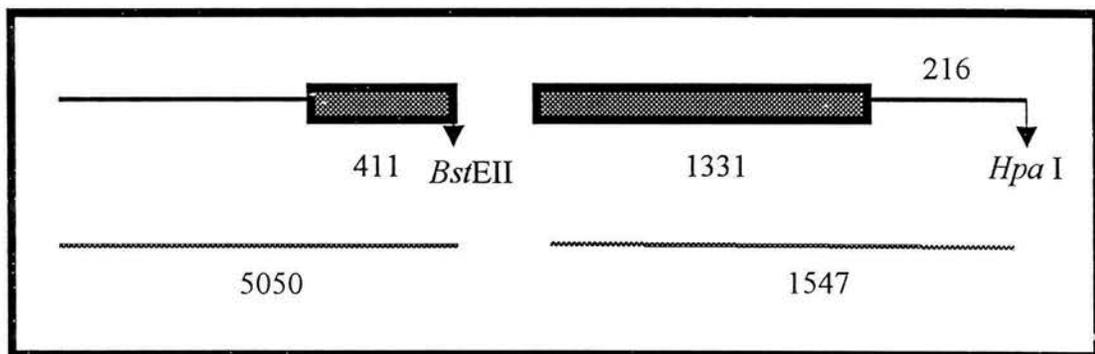


Fig 10. Orientación correcta. Esquema de digestión con las enzimas *Hpa*I y *Bst*EII de las clonas que tienen la orientación correcta. Se muestra el corte *Hpa* I en el vector y *Bst*EII en el fragmento del gen para la gE. Se obtienen dos fragmentos, uno de 1547 pb y otro de 5050 pb.

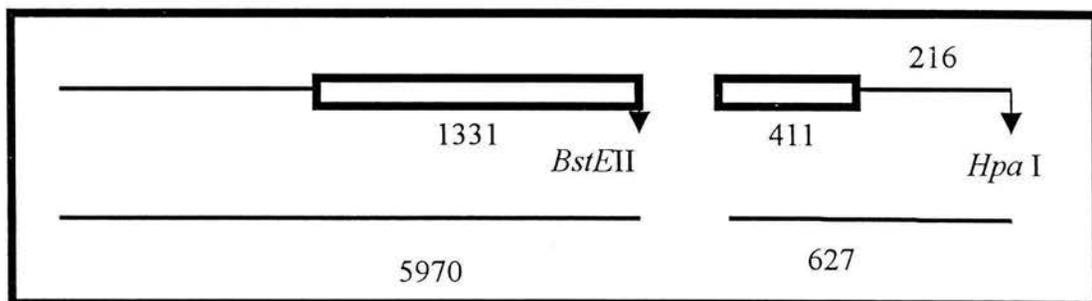


Fig 11. Orientación incorrecta. En las clonas con la orientación incorrecta se espera que los tamaños que se obtienen sean diferentes. Uno de 627 pb y otro de 5970 pb.

Los productos de digestión se observaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.(ver Anexo 15)

VII.7. Confirmación del segmento clonado como el gen del antígeno gE.

VII.7.1 Protocolo de secuenciación.

Para verificar que el gen del antígeno gE fue clonado en el marco abierto de lectura correcto, se realizó un análisis de secuencia de nucleótidos. Se diseñó un iniciador de secuenciación denominado SEQPFBHT con la secuencia 5' CTC TAG CTA TAG TTC TAG TGG 3'. Este iniciador se asienta en la posición 3962 del vector, arriba del sitio múltiple de clonación. Las condiciones de la reacción de secuencia se encuentran en el anexo 16.1.

Los productos de la reacción de secuencia, se filtraron, y se secaron por centrifugación al vacío durante 45 minutos. Las muestras se cubrieron para protegerlas de la luz y se congelaron para su envío a secuenciación.

VII.7.2. Alineación de identidad.

Se realizó una búsqueda de identidad con la opción Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) en el banco de genes (GeneBank), para saber si el gen clonado correspondía a la gE (ver anexo 16.2).

VII.8. Obtención del Bámido recombinante.

Se obtuvo DNA de los plásmidos pFBHTa recombinantes para el gen gE DNA mediante una minipreparación. Este DNA fue empleado para transformar células competentes DH10 BAC. En condiciones selectivas, en éstas células se lleva a cabo la recombinación sitio específica para movilizar el segmento recombinante del plásmido recombinante al genoma del baculovirus. Los detalles de este procedimiento se encuentran en el anexo 17.

VII.8.1. Aislamiento del DNA del bámido recombinante.

Las colonias blancas obtenidas al transformar las células DH10BAC contienen el bámido recombinante. A partir de ellas se obtuvo DNA mediante una mini-preparación creciendo las células en medio selectivo. Este DNA se empleó para transfectar células de insecto.

Previamente, se confirmó por medio de PCR que en el Bámcido efectivamente se había llevado a cabo la transposición. Para esto, se utilizó una combinación de iniciadores, los iniciadores universales M13, se pueden emplear ya que estos flanquean el sitio de transposición. Sin embargo se espera que este segmento sea muy grande y sería difícil de amplificar. Por lo tanto, se empleó el iniciador Bfw que se asienta en el inicio del gen para gE y el iniciador reverso de M13. En la figura 12 se indica las regiones que se amplificarían empleando estos iniciadores. En las clonas que tienen la orientación correcta se espera un amplificado de 2344 pb. (ver Anexo 18)

VII.8.2A. Análisis por PCR.

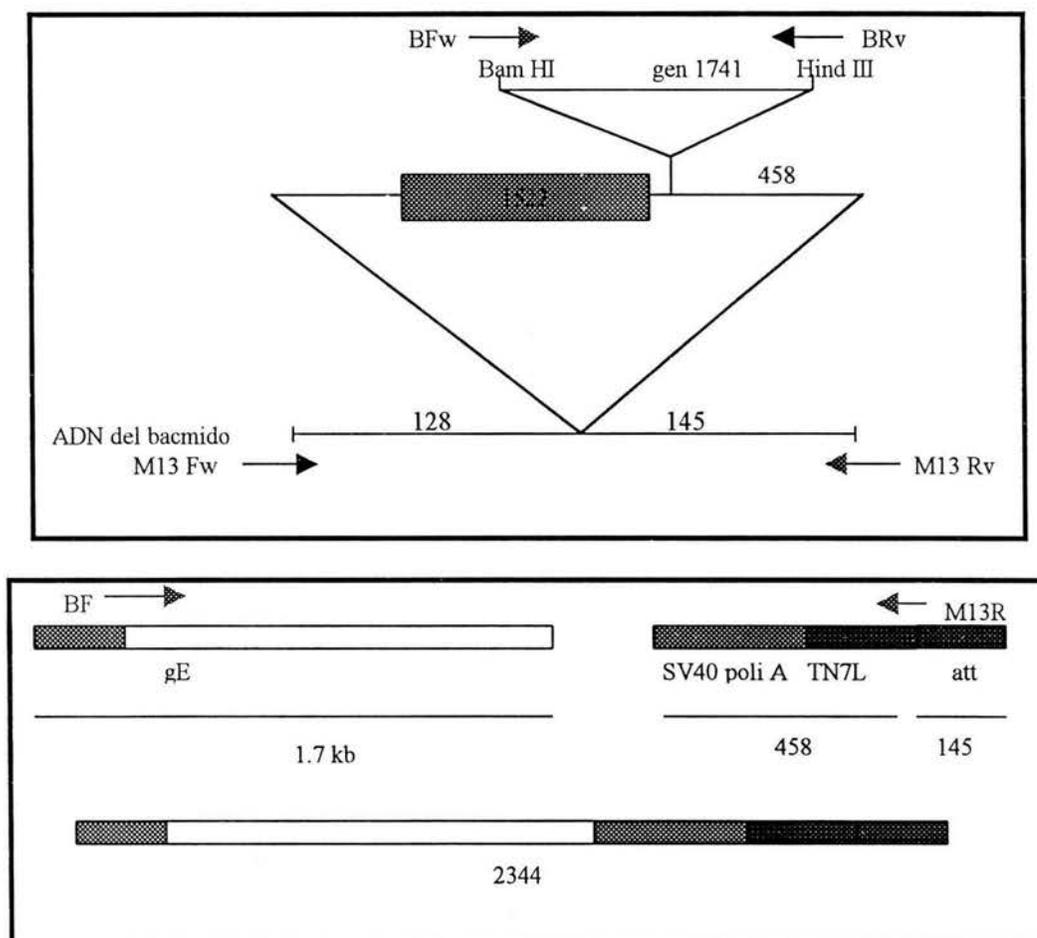


Figura 12 Esquema de la estrategia de identificación de clonas del báculo recombinante por PCR con el uso del iniciador frontal específico de la gE y el iniciador posterior de M13 (flechas rojas). En el la figura A se indican las posiciones de los iniciadores M13 frontal y reverso (M13fw M13Rv) y los específicos para el gen gE (Bfw y BRv). En la figura inferior se indican los segmentos que se amplifican cuando se usan los iniciadores Bfw y M13Rv

VII.9. Obtención del Baculovirus recombinante.

VII.9.1 Transfección en células de insecto.

El DNA purificado del Bámido recombinante se empleó en transfectar células de insecto *Sf21*. Para esto el DNA se combino con liposomas (Cellfectin Gibco BRL - 10365-010) y se agregó a las células de insecto. El protocolo detallado se encuentra en el anexo 19.1.

De aquí se obtuvo una suspensión celular nombrada P1, que es el baculovirus recombinante que se genera después de la transfección. Con este P1 se infectaron 0.7×10^6 células *Sf21*/ml durante 48 horas para obtener una segunda suspensión P2. Con P2 se hacen las pruebas de caracterización del antígeno y titulación del baculovirus recombinante.

VII.10. CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO RECOMBINANTE.

La obtención de antígeno del PrV que nos sirve como control positivo y la cuantificación de proteínas están detalladas en los anexos 20 y 21 respectivamente.

VII.10.1. Inmunodifusión en gel.

Se preparó agarosa al 1% en agua destilada, se vertió en una caja de petri y se dejó solidificar. Se realizaron perforaciones con el uso de un sacabocado. En cada perforación se colocaron 70 μ l de cada reactivo. En el centro, se colocó la proteína gE recombinante (gER) y en los pozos periféricos se colocó antisuero positivo comercial a la enfermedad de Aujeszky, antisuero de cerdo a la enfermedad de Aujeszky, antisuero positivo a la enfermedad de Aujeszky de conejo, suero negativo comercial, suero negativo de cerdo y suero negativo de conejo.

VII.10.2. Ensayo de Inmunofluorescencia.

En cajas de 6 pozos para cultivo celular, se colocaron cubreobjetos. Sobre ellos se cultivaron células *Sf21* a una concentración de 1.8×10^6 células en 2 ml de medio. Se incubaron 24 horas a 27° C. Posteriormente, células se infectaron por duplicado con el baculovirus recombinante para gE, otras células se infectaron con un baculovirus recombinante que expresa la proteína verde fluorescente (AcNPV+EGFP), adicionalmente

se dejaron células sin infectar como control negativo. Se incubaron 120 horas a 27C. Se tomaron los cubreobjetos y se fijaron con acetona al 80%.

Se tomaron tres cubreobjetos, uno de cada muestra. Se agregó a cada uno antisuero de conejo positivo a la enfermedad de Aujeszky diluido 1:20 con TBS (125mM NaCl, 25mM Tris-HCl pH 7.9) fueron incubados a 37C durante 40 minutos. Se lavaron con agua bidestilada en tres ocasiones. Posteriormente, se agregó anticuerpo anti-conejo acoplado a FITC (SIGMA F 0382) diluido 1:20 con TBS, nuevamente se incubaron a 37C durante 40 minutos. Se lavaron con agua en tres ocasiones. Posteriormente, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos para visualizarlos en microscopio de fluorescencia y tomar fotografías de cada muestra.

VII.10.3. Ensayo de Inmunoperoxidasa.

Se tomaron tres cubreobjetos. A cada uno se le agregó el anticuerpo monoclonal contra la gE acoplado a peroxidasa (Bomeli BGAF-B 075) diluido 1:10 en TBS. Se incubaron a 37C durante 40 minutos. Se lavaron con agua en tres ocasiones. Se agregó sustrato para peroxidasa triamino benzidina (TMB Bomeli BGAF-K 002) y se incubó durante 15 minutos a 37C. Se lavaron con agua en tres ocasiones. Posteriormente, los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos para visualizarlos en microscopio para tomar fotografías de cada muestra.

VII.10.4. DOT-WESTERN.

En dos tiras de nitrocelulosa, previamente tratadas con etanol al 70% se colocaron 4 µl de cada una de las siguientes muestras: antígeno de PrV obtenido de infección en cultivo celular, baculovirus recombinantes que expresan la gER (gER1 y gER2), baculovirus recombinante que expresan la proteína verde fluorescente (AcNPV+EGFP) y un lisado de células Sf21. Las membranas se bloquearon con leche descremada Sveltys al 5% en TBS por 45 minutos a 37C. A la primera, se incubó con un anticuerpo monoclonal específico contra la gE acoplado a peroxidasa (Bomeli BGAF-B 075), en una dilución 1:10 con leche al 1% en TBS a 37C durante 45 minutos. La membrana fue lavada con TBS (125mM NaCl, 25mM Tris-HCl pH 7.9 y 0.1% de Tween 20). Fue revelada con TMB (TMB Bomeli

BGAF-K 002). La segunda, se incubo con un antisuero policlonal de conejo contra el PrV diluido 1:100 en leche al 1% a 37C por 45 minutos. La membrana fue lavada con TBS. Posteriormente se agregó un anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa en dilución 1:5000 en leche al 1% por 45 minutos a 37C. La membrana fue lavada nuevamente con TBS. Fue revelada también con TMB.

VII.11. Obtención del antígeno recombinante.

Se cosecharon células Sf21 con 48 horas de infección con el baculovirus recombinante P2 a una MOI de 1. Las células, fueron centrifugadas se decantó el sobrenadante y las pastillas celulares fueron lisadas con el amortiguador de lisis para células de insecto (0.1 M Tris pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100), como se describe en el anexo 22. El antígeno fue cuantificado con una concentración de 1.2 microgramos/ μ l. Fue utilizado como antígeno y observado en geles de poliacrilamida.

VII.11.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La preparación de geles de poliacrilamida SDS se muestra en el anexo 23. El gel, fue teñido con azul de Coomasie. La muestra fue desnaturalizada a 95C con el amortiguador para proteínas (SDS 2%, Glicerol 10%, Tris HCl pH 6.8 0.8M, azul de bromofenol 0.01% y 2-mercaptoetanol 5%) Se colocaron 40 μ g de muestra por pozo.

La electroforesis se llevo al cabo en una cámara Mini-PROTEAN[®] 3 Cell de BIORAD No de catálogo 170-4018. Se aplicaron 100 volts por 45 minutos.

VII.11.1A. Tinción de gel.

El gel fue teñido con azul de Coomasie (0.4% de azul de Coomasie, 12% de ácido acético glacial y etanol 20%). Se incubó a 56C durante 15 minutos. Se decantó la solución y se agregaron 10 ml de solución para desteñir (ácido acético glacial 20% y alcohol metílico al 4%) se incubó a 56C durante 15 minutos para, observar las bandas.

VII.11.2. ELISA doble “sándwich” de anticuerpos o de captura. (DAS)

En una placa de 96 pozos se colocan 100µl a cada pozo de anticuerpo policlonal de conejo diluido 1:20 en solución amortiguadora carbonatos 0.1M (carbonato de sodio y bicarbonato de sodio) pH 9.6. Se incubó durante toda la noche a 4C. Posteriormente se bloqueó con leche descremada Sveltys al 5% en TBS durante 1 hora a 4C. Se realizaron 4 lavados de 5 minutos con TBS adicionado con tween 20 al 0.1%. Se agregan las muestras y se realizan diluciones dobles seriadas (de 1:2 a 1:2048) de los antígenos PrV, gER1, gER2 (baculovirus recombinantes que expresan la gER), AcNPV+EGFP (baculovirus recombinante que expresan la proteína verde fluorescente) y lisado de células de insecto *Sf21*. Se incubó durante 2 horas a 37C. Se repitió el paso de lavado. Se agregó el anticuerpo monoclonal contra la gE acoplado a peroxidasa en una dilución 1:10 en TBS. Se incubaron a 37C durante 2 horas. Se repitió el paso de lavado. Se agregó el sustrato para peroxidasa (dicloro orto-phenylendiamina OPD SIGMA P-6913) fueron disueltos, 4 mg en 10 ml de la solución de citratos (5ml de ácido cítrico 0.1M + 5ml de citrato de sodio 0.1M pH 4.5 + 4 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción de este sustrato con la enzima fue detenida a los 15 minutos con una solución 2N de ácido sulfúrico.

La placa fue leída a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 de Labsystems.

VII.11.3. ELISA indirecta.

Los lisados de PrV, gER, *Sf21* y EGFP se utilizaron como antígenos. Los antígenos se diluyeron en una solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6. Se colocaron en una placa de 96 pozos se incubó toda la noche a 4C. La placa se lavó 3 veces con TBS+ 0.1% Tween 20 (TTBS) en agitación lenta por 5 minutos. Posteriormente se bloqueó a 37C durante 1 hora con leche descremada Sveltys al 5% en TBS. Se diluyó el primer anticuerpo 1:200 anti PrV en conejo en TTBS y se adicionaron 100 µl en cada pozo. Se incubó a 37C durante 1 hora. Se repitió el paso de lavado. El conjugado anti IgG de conejo marcado con peroxidasa (SIGMA A-0545) se diluyó 1:5000 en TTBS. Se incubó a 37C durante 1 hora. Se repitió el paso de lavado. Se adicionó el sustrato para peroxidasa OPD como se describió anteriormente. La reacción fue detenida con una solución 2N de ácido sulfúrico.

La placa fue leída a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 de Labsystems.

VII.12. Preparación del antisuero de conejo contra el PrV

Se utilizaron cuatro conejos Nueva Zelanda a los que se les dio un periodo de adaptación de 3 días. A un conejo no se le inmunizará ni se desafiará con el PrV solo se le inyectó agua estéril. Se siguió el siguiente protocolo de inmunización:

Día 0. Vacuna inactivada Boehringer Ingelheim. Ingelvac Aujeszky KV cepa Bartha K61 gI(-) 2ml vía intramuscular. (IM)

Día 7. Se repitió la vacunación.

Día 15. Toma de sangría e inmunización con PrV completo inactivado + adyuvante incompleto de Freund.

Día 20. Toma de sangría e inmunización con PrV completo inactivado + adyuvante incompleto de Freund.

Día 30. Desafío con PrV activo 2ml IM.

Los días posteriores se realizaron, observación de signos clínicos y toma de sangrías. El día 7 posterior al desafío se realizó el sangrado a blanco de los 4 conejos. Se obtuvo el suero y se congeló a -20°C hasta su uso.

VII.13. Titulación por ELISA indirecta de los antígenos recombinantes obtenidos.

Los lisados de PrV, gER, Sf21 y AcNPV+EGFP se colocaron en una placa de 96 pozos y se les realizaron diluciones quintuples seriadas de 1:5 hasta 1:62500 en una solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6. Posteriormente se bloqueó con leche descremada Sveltys al 5%. La placa se lavó con TTBS. Se agregó un antisuero anti PrV en conejo diluido 1:200. Se incubó a 37°C durante 1 hora. Fue revelada con un conjugado anti IgG de conejo marcado con peroxidasa (SIGMA A-0545) diluido 1:5000 en TTBS. Se incubó a 37°C durante 1 hora. Se repitió el paso de lavado. Se adicionó el sustrato para peroxidasa OPD como se describió anteriormente. La reacción fue detenida con una solución 2N de ácido sulfúrico. (ver anexo 26)

La placa fue leída a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 de Labsystems.

VII.14. ELISA indirecta con sueros problema.

En una placa de 96 pozos se coloca una dilución 1:250 del sobrenadante de los cultivos de células Sf21 que expresan la gER, en una solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6 que se incubó toda la noche a 4C. Se lavó con TTBS, posteriormente se bloqueó a 37C durante 1 hora con leche descremada Sveltys al 5% en TTBS. La placa se lavó en 3 ocasiones con TTBS. Fueron colocados sueros de cerdos positivos y negativos en una dilución 1:2 con leche descremada Sveltys al 1% en TTBS La placa fue incubada durante 1 hora a 37C. Se repitió el paso de lavado. Se adicionó el conjugado anti IgG de cerdo marcado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch-114-035-003) diluido 1:5000 en TTBS. Se repitió el paso de lavado. Se incubo a 37C durante 1 hora. Se repitió el paso de lavado. Se adicionó el sustrato para peroxidasa OPD y la reacción se detuvo con una solución 2N de ácido sulfúrico. (ver anexo27)

La placa fue leída a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 de Labsystems.

VIII. RESULTADOS.

1. Verificación de la obtención del DNA del PrV por digestión con enzimas de restricción

En la figura 13 se observaron las bandas del patrón de digestión del DNA purificado del PrV obtenido con las enzimas *KpnI* y *Bam* HI.

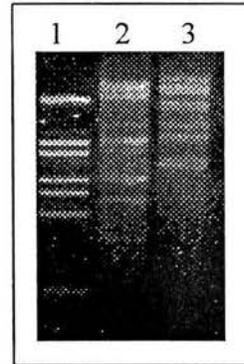


Fig.13. Patrón de restricción del DNA del PrV, con las enzimas *KpnI* y *Bam* HI. Carril 1 marcador de peso molecular λ *BstEII*. Carril 2 DNA del PRV digerido con *KpnI*. Carril 3 DNA del PrV digerido con *Bam*HI.

2. Verificación de la obtención del DNA del PrV por amplificación del gen del antígeno gE.

En la figura 14 se muestra el resultado de la PCR de gradientes efectuada para encontrar la temperatura óptima a la que se alinean los iniciadores para amplificar el gen de la gE, así como para verificar de que el DNA obtenido era el del PrV utilizando éste DNA como molde. Figura 14. Se observó que la temperatura óptima de alineación es a 70.2 C.

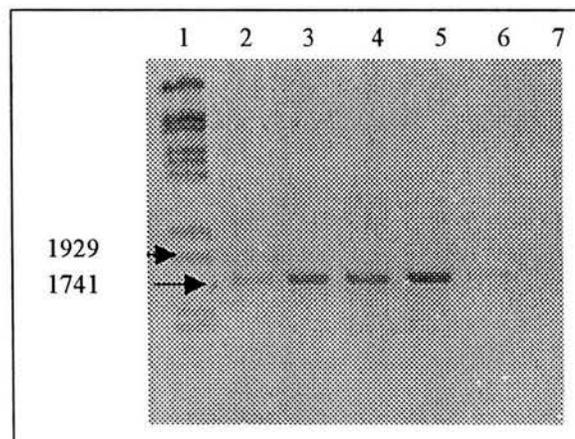


Fig 14. Gradientes de amplificación del gen del antígeno gE. Se observa un fragmento de 1741 pb que es lo se espera. En el carril 1 se tiene el marcador de peso molecular λ *BstEII*. En los carriles siguientes se tienen los amplificadas obtenidos a diferentes temperaturas en el gradiente. 59.4 C, 63.3 C, 65.3C, 67.6 C, 70.2 C. En el último carril se tiene el control negativo sin DNA a 70.2 C.

3. Clonación del gen gE del PrV en pUC19/*Sma*I/TA.

Clonación del gen gE en pUC19/*Sma*I/TA. En la figura 15 se muestra la electroforesis en un gel de agarosa al 1% en donde se separan los productos de digestión con *Bam*HI de dos clonas recombinantes del gen gE del PrV en pUC19. Se observaron bandas de 4431 pb que es la suma del fragmento de 1741 pb mas el vector pUC19. De las clonas obtenidas, se purificó DNA y fue liberado el fragmento con la enzima *Bam*HI. En la figura 15 se observan clonas digeridas (líneas 3 y 5) y sin digerir (líneas 2 y 4).

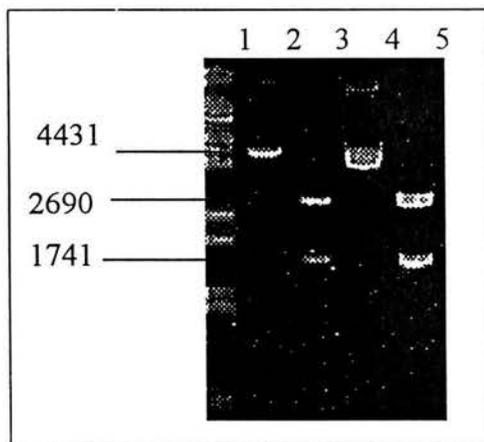


Fig 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en donde se muestra en el carril 1 marcador de peso molecular λ BstEII. En el carril 2 y 4 la clona 1 y 2 sin digerir. En los carriles 3 y 5 se muestran los productos de digestión con *Bam*HI de las clonas 1 y 2. Se señalan los pesos moleculares del DNA de plásmido linearizado (2690 pb) y del segmento del gen de la gE (1741 pb).

4. Purificación del fragmento del gen gE con extremos cohesivos *Bam*HI y preparación del vector pFBHTa.

En la figura 16 se observan la electroforesis en gel de agarosa al 1% en donde se muestra el fragmento purificado del gen gE que fue liberado por digestión con la endonucleasa *Bam*HI de la clona en pUC19 (carril 2). Este fragmento que contiene sitios *Bam*HI se ligó a así mismo (carril 3). Esto asegura que los sitios de clonación son cohesivos. El gel también muestra el DNA purificado del vector pFBHTa (carril 4 y 5).

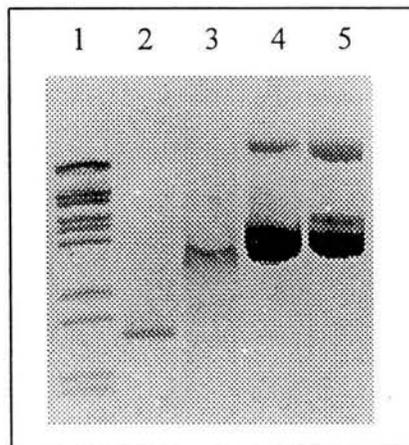


Fig 16. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en donde se muestra en el carril 1 marcador de peso molecular (λ BstEII). En el carril 2 se observa el fragmento purificado del gen gE que fue liberado por digestión con la endonucleasa *Bam*HI de la clona en pUC19. En el carril 3 se observa el fragmento purificado después de haber sido ligado a sí mismo. En el carril 4 y 5 se muestra el DNA purificado del vector pFBHTa.

El DNA del plásmido pFBHTa fue digerido con *Bam*H1 y desfosforilado para, emplearlo como vector de clonación. En la figura 17 se observa una electroforesis en agarosa al 1% en donde se muestra el DNA del plásmido pFBHTa intacto (carril 5) y digerido con la endonucleasa *Bam*H1 y desfosforilado (carril 4). En este gel se muestra también el DNA purificado y digerido del PrV y su digestión con *Bam*H1 (líneas 2 y 3). Estas figuras nos muestra todos los elementos necesarios para clonar el gen gE en el vector pFBHTa.

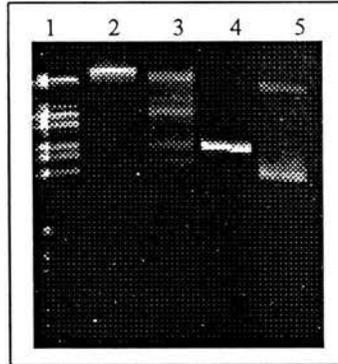


Fig 17. Electroforesis en gel de agarosa al 1% en donde se muestra en el carril 1 marcador de peso molecular (λ BstEII). En el carril 2 Se observa el DNA purificado de PrV y en el carril 3 el DNA de PrV digerido con *Bam*H1. En el carril 4 se muestra el DNA del vector pFBHTa digerido con *Bam*H1 y desfosforilado. En el carril 5 tenemos el DNA intacto del plásmido pFBHTa.

5. Identificación de clonas recombinantes del gen gE resultado de la ligación al vector pFBHTa.

En el DNA obtenido de minipreparaciones de colonias blancas, en las que se llevó a cabo la ligación del pFBHTa /*Bam*H1/FAC de 5855 pb, mas el gen de la gE de 1741 pb, se observaron bandas con un peso de 7596 pb figura 18.

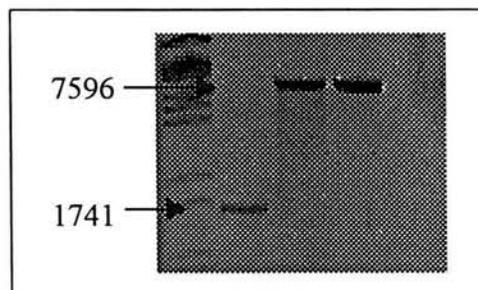


Fig 18. Electroforesis en gel de agarosa de la ligación del pFBHTa /*Bam*H1/FAC de 5855 pb, mas el gen de la gE de 1741 pb, lo cual, suma 7596 pb.

A partir de varias colonias transformantes obtenidas en medio selectivo se obtuvo DNA y se realizaron ampliificaciones del gen gE utilizando los iniciadores específicos. Las colonias positivas produjeron un fragmento de 1741pb figura 19. Este DNA utilizará para realizar RFLP's y la reacción de secuencia

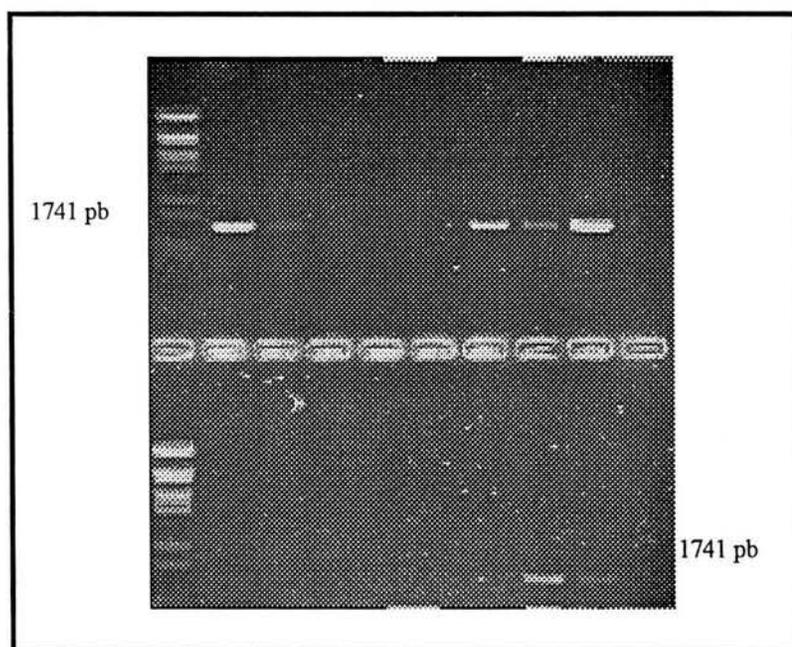


Fig 19. Electroforesis en gel de agarosa para la identificación de clonas recombinantes por PCR del gen de la gE en el pFBHTa /*Bam*H1/FAC. Las colonias positivas produjeron un fragmento de 1741pb de la gE.

5.1. Identificación de la orientación del gen gE en las clonas recombinantes del vector pFBHTa.

La figura 20 muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1% de la doble digestión con *BstEII* y *HpaI* del DNA de tres clonas recombinantes en vector pFBHTa. Se observan en los fragmentos obtenidos, uno de 5050 pb y otro de 1547 pb con la orientación correcta (carriles 2 y 3). Con orientación incorrecta se observan fragmentos de 5970 pb y otro de 627 pb (carril 4).

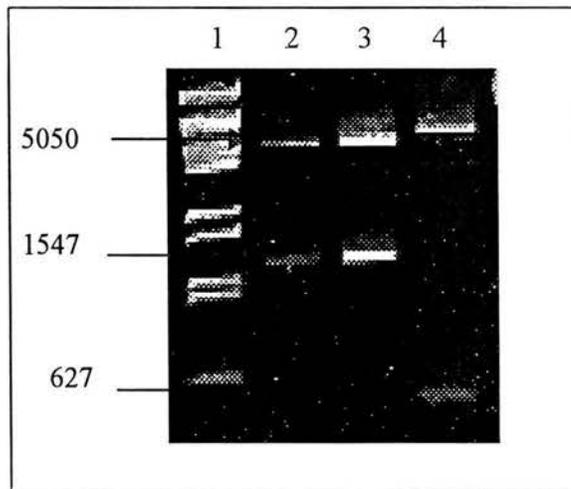


Fig 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. En el carril 1 está el marcador de peso molecular λ *BstEII*. En los carriles 2-4 se tiene la doble digestión con las endonucleasas *BstEII* y *HpaI* del DNA de clonas recombinantes del gen gE en vector pFBHTa. Las clonas con orientación correcta carriles 2 y 4 presentan fragmentos de 5050 pb y 1547 pb. La clona con orientación incorrecta presenta fragmentos de 5970 pb y 627 pb (carril 4).

6. Secuenciación de nucleótidos de la región de clonación en una clona recombinante del gen gE en el vector pFBHTa.

En la figura 21 se muestra el electroferograma de la secuenciación de nucleótidos de una clona recombinante del gen gE en el vector pFBHTa. La secuencia inicia arriba del sitio de clonación, lo cual, permite analizar el sitio de clonación y verificar si el gen de la gE se encuentra en el marco abierto de lectura correcto.

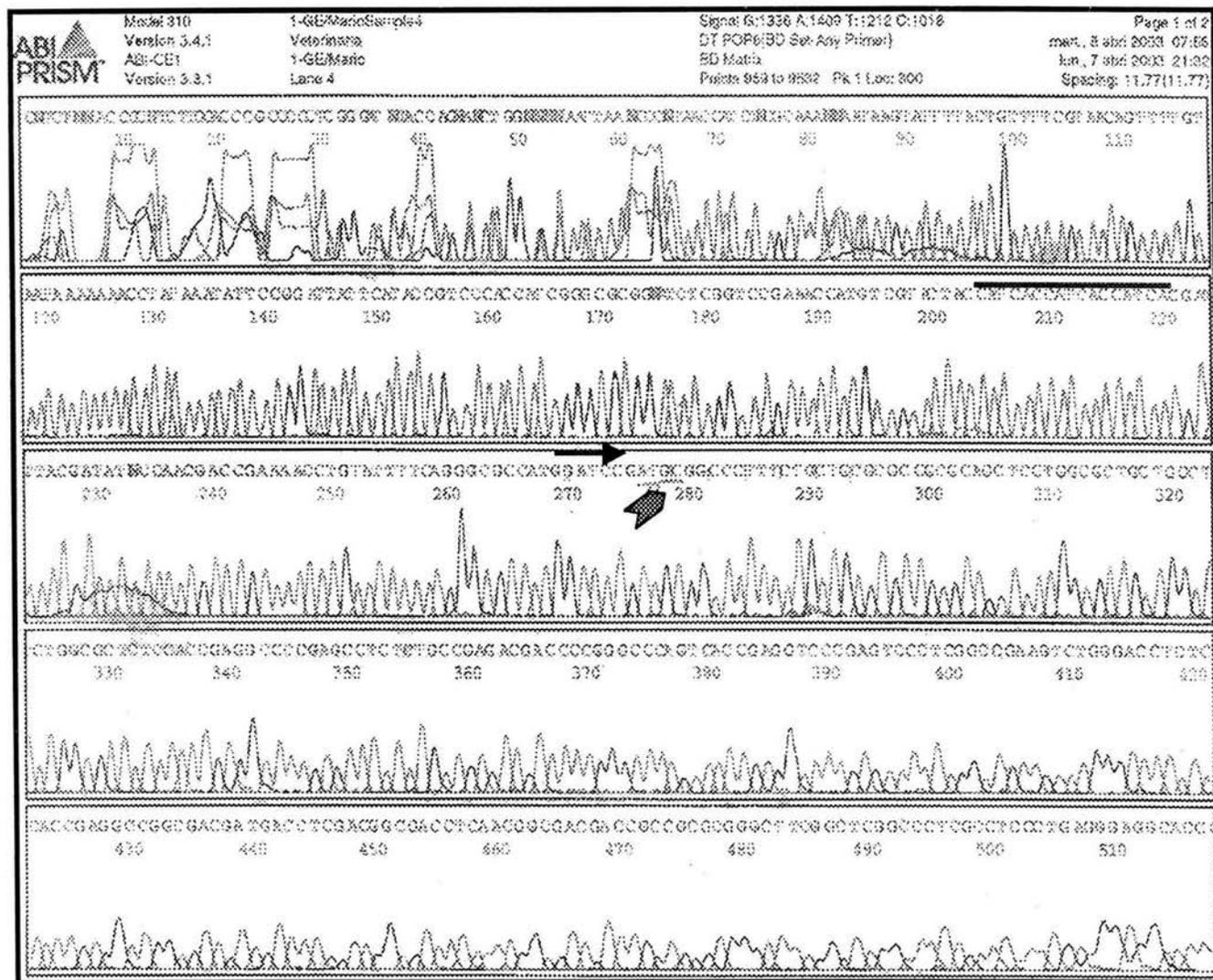


Fig 21. Reporte de la secuencia de nucleótidos para verificar que el gen clonado se encuentre en el marco abierto de lectura (sin señal de paro) adecuado. Se hacen evidentes las seis histidinas (línea roja sobre ellas), el sitio *Bam* HI en la que se insertó el gen de la gE (flecha negra sobre ellas) y el inicio de la secuencia del gen de la gE (cabeza de flecha roja).

7. Confirmación del gen como el antígeno gE

Para verificar la identidad del segmento clonado en el vector pFBHTa como el gen del antígeno gE, la secuencia de nucleótidos obtenida, fue tamizada en el banco de genes (GenBank) utilizando la opción Blast. Se observa en la figura 22 el resultado del tamizaje y demuestra que la secuencia obtenida coincide con la gE del PrV (líneas rojas y rosas). En la parte inferior de la figura, están los accesos a las referencias de las 7 primeras líneas de la alineación que se encuentran en este banco de información GenBank.

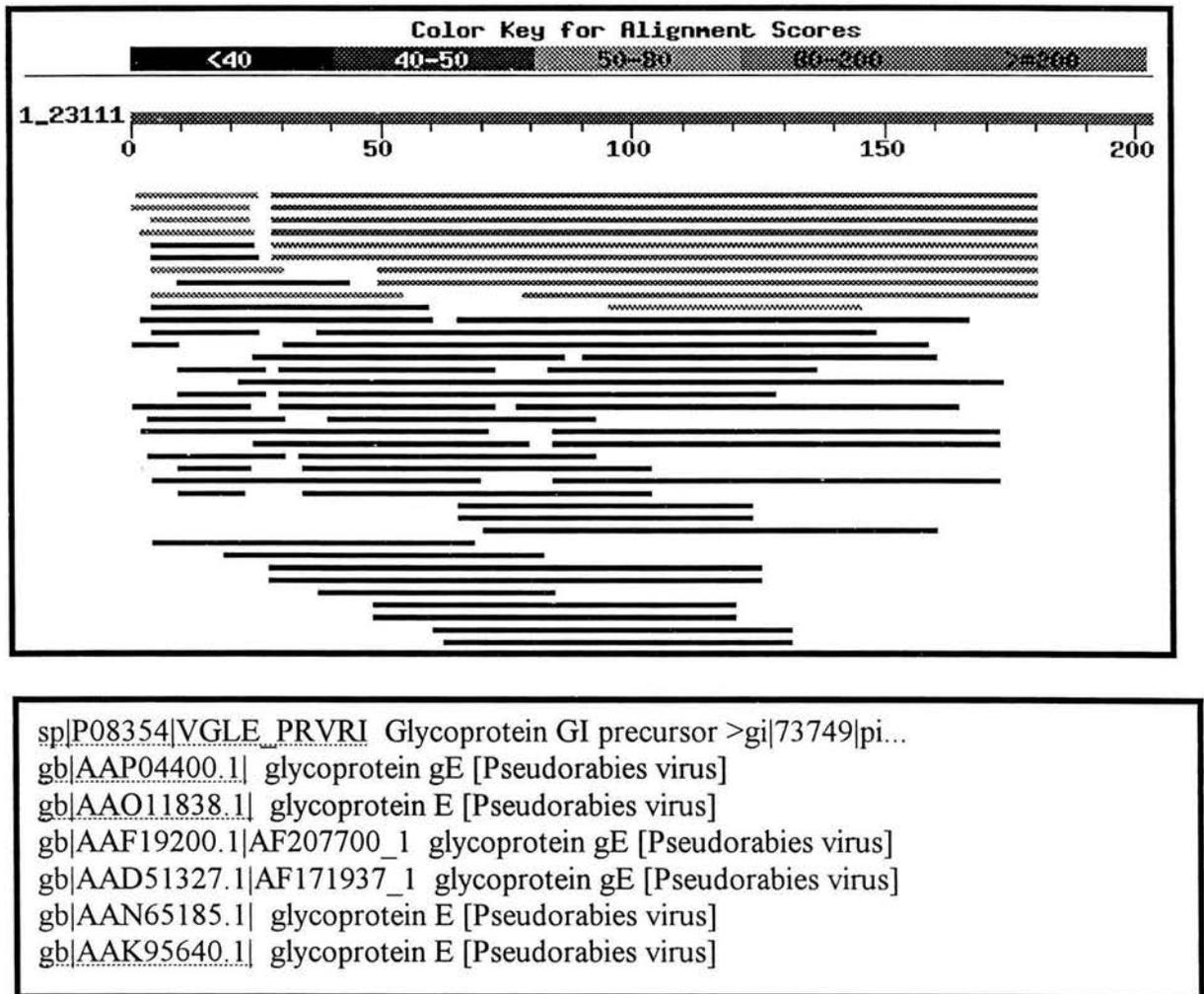


Fig 22. resultado del tamizaje del GeneBank utilizando la opción Blast y la secuencia de nucleótidos obtenida de la clona gE en el vector pFBHTa. En la figura superior se muestra gráficamente, las secuencias que presentaron mayor grado de identidad. Estas correspondieron a secuencias de la gE del PrV (líneas rojas y rosas). En el recuadro inferior de la figura, están los números de accesos a las referencias de las 7 primeras identidades.

8. Confirmación de la transposición específica del gen gE al Bámido.

Después de realizar la transposición en células DH10 BAC con el plásmido recombinante las colonias blancas recuperadas contienen el bámido recombinante. A partir de ellas se obtuvo el DNA del bámido y para confirmar que se efectuó la transposición del gen gE al bámido se hizo una amplificación por PCR utilizando como iniciadores el BFW y M13Rv. En la figura 23 se observa como producto de la amplificación una banda de 2 344 pb del tamaño esperado con esta combinación de iniciadores (carriles 2, 3 y 4). Con este DNA fueron transfectadas células de insecto para, obtener baculovirus recombinantes. Posteriormente, se realizaron las pruebas de caracterización del antígeno recombinante gER.

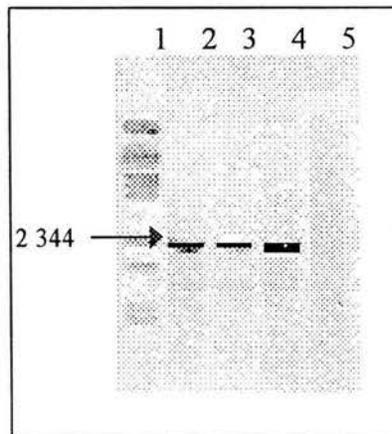


Fig 22. Electroforesis en agarosa al 1% en donde se muestran los productos de amplificación de tres clones de bámidos recombinantes. En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular λ BstEII. En los carriles 2 al 3 se observa una banda de 2,344 pb amplificada a partir del ADN de tres clones de bámidos recombinantes.

9. Inmunodifusión en gel.

En la figura 24 se observa el resultado de un ensayo de inmunodifusión en gel de agarosa al 1%. En el centro, se encuentra la proteína recombinante gER y los pozos periféricos se colocaron sueros positivos y negativos. Se aprecian bandas de precipitación solo en la cercanía de los sueros positivos.

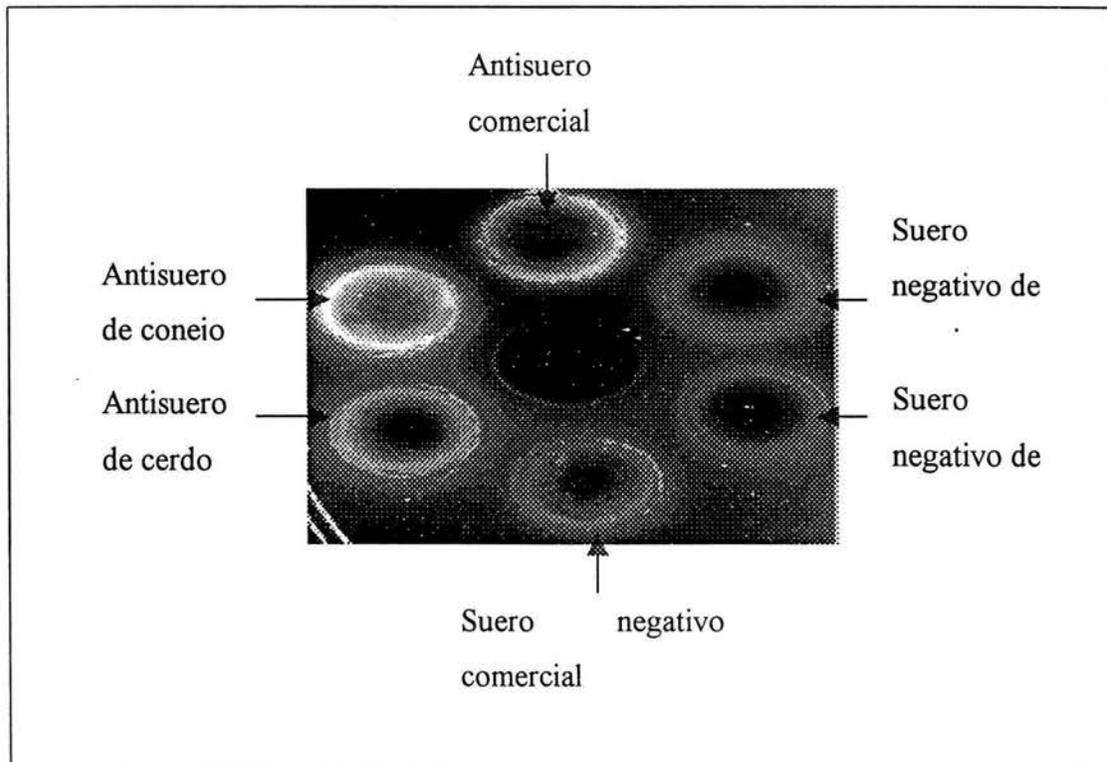


Fig 24. Inmunodifusión en gel de agarosa al 1%. En el centro, se encuentra la proteína gER y en los pozos circundantes sueros y antisueros, en estos últimos se observan bandas de precipitación.

10. DOT-WESTERN.

En la figura 24 se muestra un dot-western en donde se colocaron gotas de lisados celulares obtenidos a partir de la infección con tres baculovirus recombinantes (P-1, gER1 y gER2), también se colocó como antígeno control positivo el virus del PRV purificado. En las Tiras también se colocaron gotas de controles negativos: células de insecto sin infectar (SF21) y un baculovirus que expresa la proteína verde fluorescente (EGFP). En la primera tira se utilizó como primer anticuerpo suero de conejo anti-PrV. En la segunda tira se utilizó como primer anticuerpo suero de cerdo anti-PrV. En la tercera tira se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial anti-gE acoplado a peroxidasa (Bomelli CHEKIT-Anti-PRV-gI-PO-Conjugate) En los tres ensayos se aprecia que los anticuerpos reconocen el antígeno recombinante expresado por las células de insecto *Sf21*.

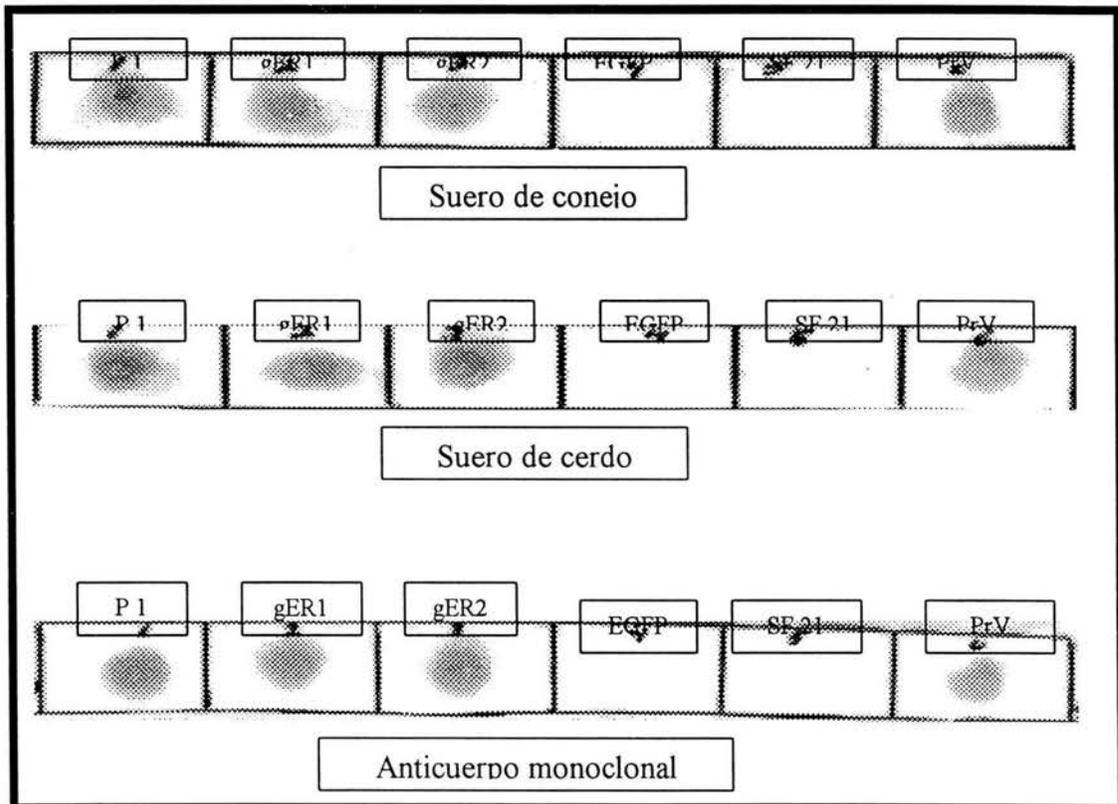


Fig 24. Dot western en tiras de nitrocelulosa se colocaron gotas de lisados celulares de tres baculovirus recombinantes (P-1, gER1 y gER2), como control positivo antígeno purificado del PRV y como controles negativos un extracto de células de insecto *Sf21* y un baculovirus que expresa la proteína verde fluorescente (EGFP). En la primera tira se utilizó como primer anticuerpo, suero de conejo anti-PrV. En la segunda tira se utilizó como suero de cerdo anti-PrV. En la tercera tira se utilizó un anticuerpo monoclonal comercial anti-gE acoplado a peroxidasa (Bomeli).

11. Electroforesis de la proteína recombinante gE en gel de poliacrilamida desnaturalizantes.

En la figura 25 se muestra un gel de poliacrilamida al 10% donde se separaron las proteínas provenientes del antígeno PrV, la pastilla y el sobrenadante del cultivo en donde se expresó la proteína recombinante gE, así como controles negativos: lisados de células de insecto *Sf21*, el baculovirus recombinante que expresa la proteína verde (AcNPV+EGFP). En el carril del sobrenadante de la gER se hace evidente una banda aproximadamente 80 Kilodaltones que podría ser el antígeno recombinante.

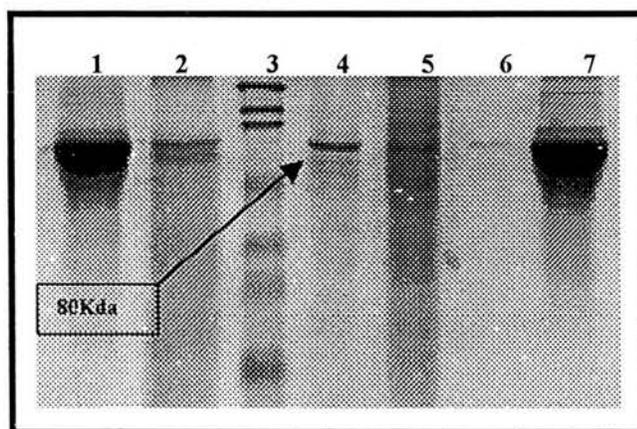


Fig.25 Electroforesis en gel de poliacrilamida del antígeno recombinante gE. En el carril 1 se tienen células *Sf21*, carril 2: AcNPV+EGFP, carril 3: Marcador de peso molecular, carril 4: sobrenadante de cultivo infectado con el baculovirus recombinante para la gE, carril 5 y 6 pastilla 1 y 2 del cultivo anterior, carril 7: antígeno PrV. La flecha muestra una banda de un peso aproximado a 80 kilodaltones, probablemente el antígeno recombinante gE.

12. Obtención y cuantificación de antígenos recombinantes.

Se cosecharon 2 botellas de 175 cm² donde se crecieron células Sf21 MOI1 con 48 horas de infección con el baculovirus recombinante para la gE. Las células, fueron centrifugadas se decantó el sobrenadante y las pastillas celulares fueron lisadas con el amortiguador de lisis para células de insecto (0.1 M Tris pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100), como se describe en el anexo 22. Se obtuvo 200 ml de sobrenadante y 2 plisados de pstillas (P1 y P2). El antígeno fue cuantificado y utilizado como antígeno. La cuantificación se realizó con la hoja de cálculo quantprotein como se describe en el anexo21. En el cuadro 2 se observan los resultados de la cuantificación de proteínas.

Muestra	EGFP	Muestra	Sf 21
A1 =	0.323	A1 =	0.36
A2 =	0.361	A2 =	0.361
Conc. del pozo =	22.8003	Conc. del pozo =	26.31806
# de pozo (dil.) =	4	# de pozo (dil.) =	5
µL de muestra =	40	µL de muestra =	40
Coc. De la muestra (mg/ml)		Coc. De la muestra (mg/ml)	
0.364		0.842178	

Muestra	gER-Pastilla	Muestra	gER-Sobre.
A1 =	0.359	A1 =	0.344
A2 =	0.354	A2 =	0.55
Conc. del pozo =	25.55747	Conc. del pozo =	24.226447
# de pozo (dil.) =	4	# de pozo (dil.) =	4
µL de muestra =	40	µL de muestra =	40
Coc. De la muestra (mg/ml)		Coc. De la muestra (mg/ml)	
0.842178		0.21195	

Cuadro 2. Cuantificación de antígenos. En el cuadro se observan las lecturas y los resultados de la cuantificación de proteínas de los antígenos en el formato de la hoja de cálculo quantprotein.

13. Inmunofluorescencia

En la figura 26 se muestran fotos de células de insecto SF21 infectadas con un baculovirus recombinante para gE. Las células infectadas se incubaron con antisuero de conejo vs. PRV y se revelaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a Fitocromo C. En la superficie de las células de insecto se observa la detección positiva de la gER al reaccionar la luz UV con el fitocromo.

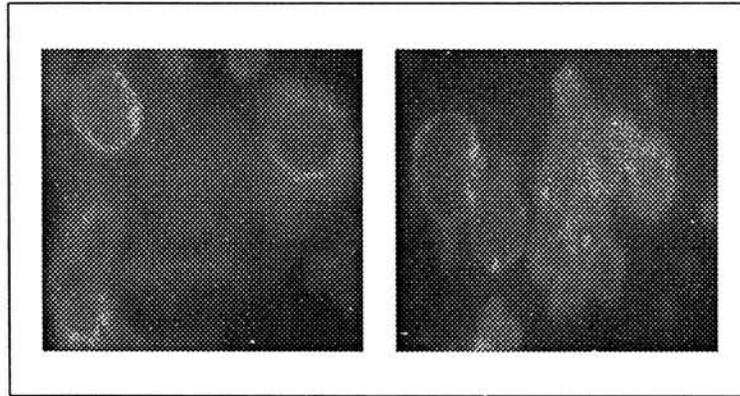


Fig 26. Inmunofluorescencia de células de insecto infectadas con un baculovirus recombinante. Las células se incubaron primeramente con un anticuerpo de conejo anti-PRV y se revelaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a fitocromo C. Se observa la presencia de la proteína gER recombinante al reaccionar la luz UV con el fitocromo.

14. Inmunoperoxidasa.

En la figura 27 se muestran células de insecto infectadas (panel de la derecha) y no infectadas (panel de la izquierda) con el baculovirus recombinante e incubadas con un anticuerpo monoclonal comercial dirigido contra la gE acoplado a peroxidasa. La reacción positiva de la enzima con el sustrato produce una apariencia rojiza en aquellas células que expresan el antígeno gER.

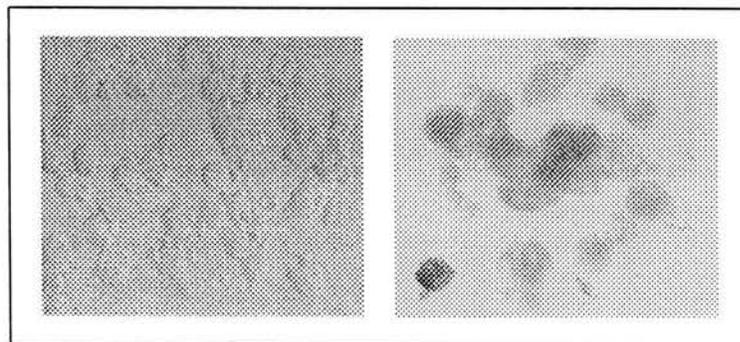
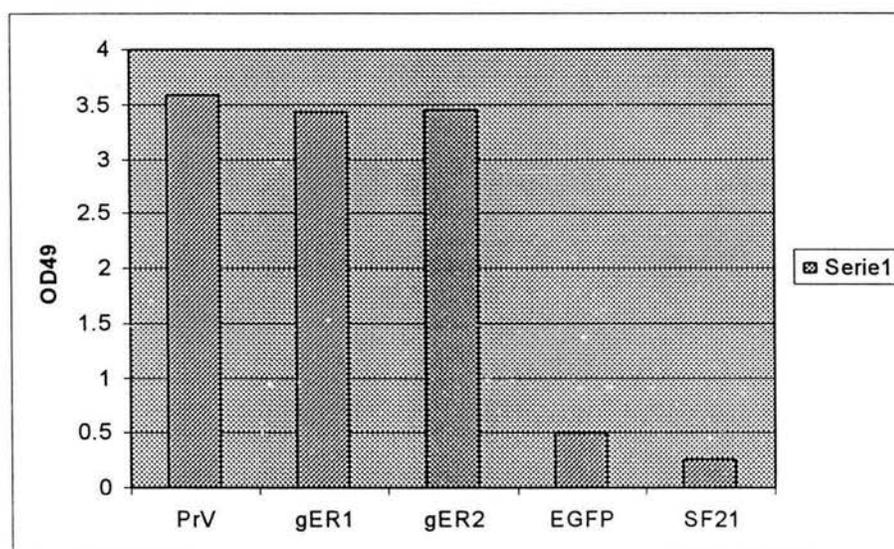


Fig 27. Macrofotografía de células de insecto infectadas (panel de la derecha) con el baculovirus recombinante e incubadas con un anticuerpo monoclonal comercial dirigido contra la gE acoplado a peroxidasa. En el panel izquierdo se tienen células no infectadas como control negativo.

15. ELISA indirecta.

La figura 28 muestra los valores de densidad óptica obtenidos en un ensayo de ELISA al revelar con un antisuero de conejo anti-PrV y un conjugado anti IgG de conejo marcado con peroxidasa (SIGMA A-0545) En el cuadro se muestran los valores de DO obtenidos en cada pozo en donde se acoplaron al fondo: el antígeno PrV, el lisado de células infectadas obtenidos con dos baculovirus recombinantes (gER1 y gER2) y como controles negativos, lisados de células de insecto infectado con un baculovirus que expresa la proteína verde fluorescente (EGFP) y células sin infectar (*Sf21*). El cuadro muestra también los promedios para cada antígeno. La grafica muestra los valores promedios obtenidos de DO.

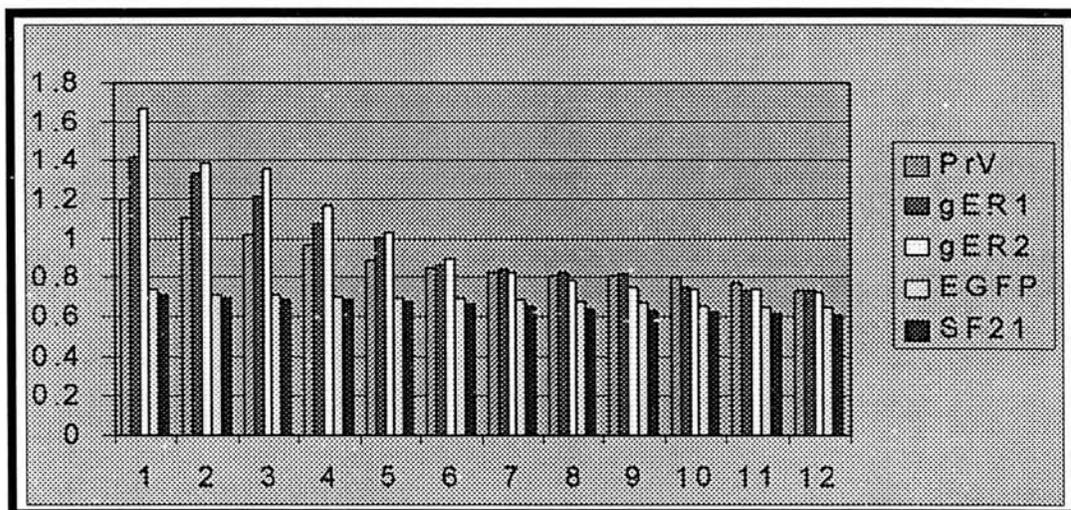


Muestra	PrV	gER1	gER2	EGFP	SF21
Pozo1	4.002	3.408	3.406	0.5	0.369
Pozo2	3.548	3.353	3.492	0.89	0.393
Pozo3	3.369	3.37	3.408	0.48	0.202
Pozo4	3.709	3.558	3.446	0.509	0.197
Pozo5	3.429	3.43	3.607	0.433	0.247
Pozo6	3.677	3.474	3.533	0.34	0.256
Pozo7	3.488	3.389	3.406	0.479	0.198
Pozo8	3.497	3.556	3.285	0.411	0.2
Promedio	3.589875	3.44225	3.447875	0.50525	0.25775

Fig 28. Ensayo de ELISA indirecta. Valores de densidad óptica obtenidos utilizando como primer anticuerpo un suero hiperinmune de conejo contra el PrV diluido 1/20. Como segundo anticuerpo se utilizó un conjugado anti IgG de conejo marcado con peroxidasa. Ver texto.

16. ELISA doble “sándwich” de anticuerpos. (DAS)

La figura 29 muestra los valores de densidad óptica obtenidos en una ELISA de captura en donde se pegó antisuero anti PrV de conejo a la dilucion 1:20. Este sirvió para atrapar el antígeno contenido en el extracto de PrV y en las clonas recombinantes gER1 y gER2. Como controles negativos se emplearon lisados de células de insecto sin infectar *Sf21* y un baculovirus Ac NPV+EGFP. Se empleó para revelar un anticuerpo monoclonal anti-gE comercial. Se puede observar que los valores de DO son mayores en los pozos los antígenos de PrV, gER1 y gER2. Los antígenos y controles negativos se efectuaron diluciones dobles seriadas desde 1:2 hasta 1:2048. En estas condiciones podemos detectar que se captura antígeno recombinante hasta la dilución 1:64.

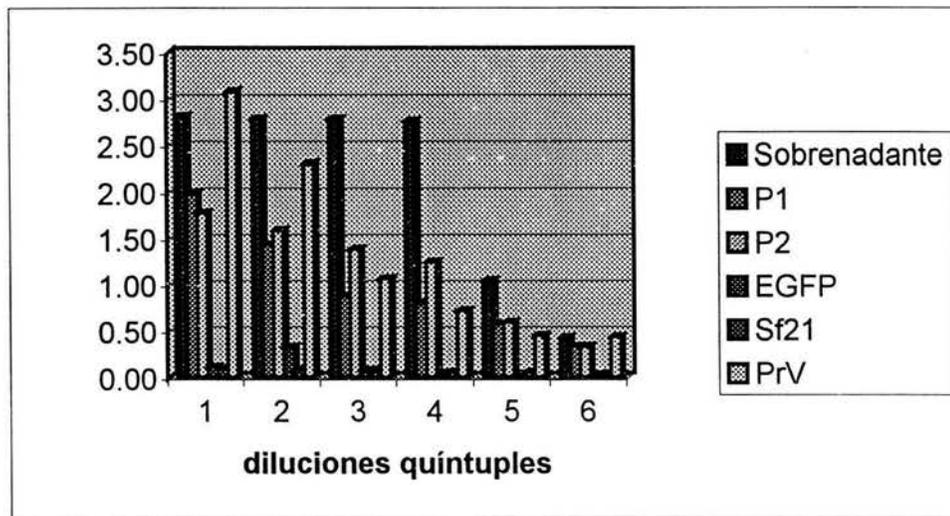


PrV	gER1	gER2	EGFP	SF21
1.2	1.417	1.67	0.739	0.707
1.106	1.332	1.384	0.71	0.693
1.024	1.214	1.354	0.708	0.688
0.967	1.072	1.168	0.703	0.684
0.885	1.008	1.029	0.693	0.679
0.847	0.862	0.893	0.691	0.666
0.825	0.842	0.825	0.684	0.654
0.811	0.827	0.789	0.681	0.641
0.808	0.818	0.747	0.67	0.633
0.802	0.747	0.742	0.654	0.62
0.77	0.733	0.742	0.65	0.616
0.735	0.73	0.721	0.643	0.609

Fig 29. ELISA de Captura. El cuadro y la figura muestran los valores de densidad óptica obtenidos al revelar con un anticuerpo monoclonal vs gE acoplado a peroxidasa un ensayo de ELISA de captura. Se pegó en el fondo de la placa anticuerpo hiperinmune de conejo diluido 1:20 y se hicieron diluciones seriadas del antígeno PrV, gER1 y gER2, así como controles negativos: lisados de células de insecto sin infectar SF21 y un baculovirus que expresa la proteína verde fluorescente EGFP.

17. Titulación de los antígenos recombinantes obtenidos por ELISA

En la figura 30 se observan los valores de densidad óptica obtenidos en un ensayo de titulación de antígeno recombinante gE mediante la técnica de ELISA donde se acoplaron al fondo de la placa: las pastillas obtenidas de un infección con baculovirus recombinantes (MOI 1, 48 hrs de infección) P1 y P2, así como el sobrenadante de uno de ellos (P2), así como controles negativos: lisados de células de insecto infectado con AcNPV+EGFP y células sin infectar (Sf21). Se realizaron diluciones quintuples seriadas de 1:5 hasta 1:62500. Para revelar se utilizo un antisuero de conejo anti-PrV diluido 1:200 y un conjugado anti IgG de conejo marcado con peroxidasa (SIGMA A-0545). Se observa en el cuadro y en la gráfica una diferencia notable hasta la dilución 1:625. En el cuadro inferior están las densidades ópticas y las diluciones. Se hace evidente que la mayor cantidad de antígeno recombinante gER se encuentra en el sobrenadante. De igual modo, pudimos notar que en el sobrenadante se encontraron valores de DO por arriba de uno en la dilución 1:5.

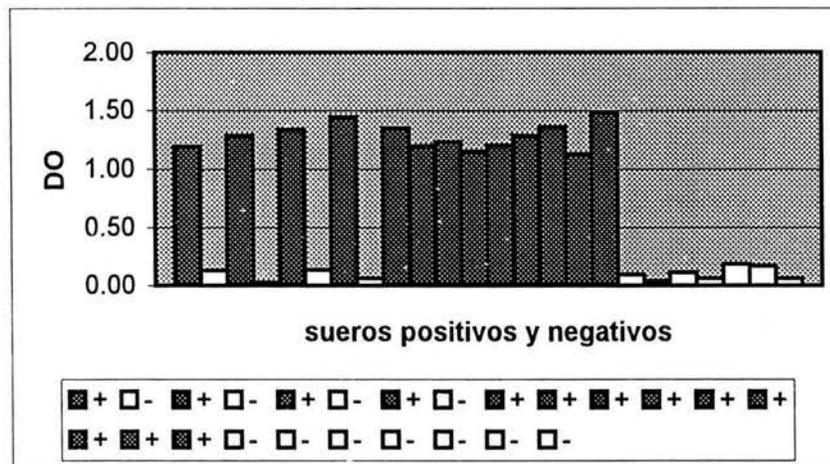


Dilución	Sobrenadante	Pastilla 1	Pastilla 2	EGFP	SF21	PrV
5	2.81	1.99	1.78	0.11	0.09	3.08
25	2.79	1.44	1.59	0.33	0.08	2.30
125	2.78	0.88	1.39	0.08	0.08	1.07
625	2.76	0.80	1.25	0.05	0.06	0.72
3125	1.05	0.58	0.60	0.04	0.06	0.46
15625	0.43	0.33	0.34	0.03	0.01	0.44

Fig. 30 Titulación por ELISA. En el cuadro y la gráfica se observan las densidades ópticas utilizando un antisuero de conejo anti-PrV y el conjugado anti IgG de conejo marcado con peroxidasa. Se realizaron diluciones quintuples seriadas de los antígenos y de los controles negativos. Se hace evidente que en el sobrenadante se encuentra la mayor cantidad de la gER.

18. ELISA indirecta con sueros problema.

Se forró la placa con una dilución 1:625 del sobrenadante de los cultivos de células de insecto Sf21 que expresan la gER. Se probaron sueros (previamente evaluados en un sistema comercial de diagnóstico de la enfermedad de Aujeszky) de cerdos positivos y negativos a la enfermedad en una dilución 1:2. La placa se reveló con el conjugado anti IgG de cerdo marcado con peroxidasa. En la figura 31, se observa tanto en el cuadro como en la gráfica notorias diferencias de los valores de las DO entre sueros positivos y negativos. Con este resultado se corrobora que el antígeno recombinante gE funciona eficientemente en un sistema de ELISA para efectuar diagnóstico diferencial entre animales enfermos y vacunados.



Suero	Lectura 1	Lectura 2	Promedio	Suero	Lectura 1	Lectura 2	Promedio
+	1.32	1.06	1.19	+	1.16	1.24	1.20
-	0.17	0.09	0.13	+	1.25	1.32	1.29
+	1.38	1.19	1.29	+	1.37	1.35	1.36
-	0.03	0.03	0.03	+	1.11	1.15	1.13
+	1.31	1.36	1.34	+	1.46	1.51	1.48
-	0.18	0.09	0.13	-	0.10	0.09	0.10
+	1.49	1.41	1.45	-	0.05	0.03	0.04
-	0.07	0.06	0.06	-	0.10	0.13	0.12
+	1.34	1.36	1.35	-	0.06	0.07	0.06
+	1.19	1.20	1.20	-	0.19	0.19	0.19
+	1.24	1.23	1.23	-	0.17	0.16	0.17
+	1.15	1.15	1.15	-	0.07	0.06	0.06

Fig. 31. ELISA con sueros problema. Se probaron sueros de cerdos positivos y negativos en una placa que tenía una dilución 1:250 de la gER y revelada con un conjugado anti IgG de cerdo marcado con peroxidasa.

IX. DISCUSIÓN.

IX.1. Verificación de la obtención de ADN del PrV por digestión con enzimas de restricción.

El polimorfismo en el tamaño de los fragmentos obtenidos después de digestión del DNA con enzimas de restricción (RFLP's) se ha empleado para la identificación del PrV y de sus cepas, mediante la presencia o ausencia de bandas características. Las enzimas que han utilizado distintos investigadores con este propósito son: *Bam* HI, *Kpn* I, *Hind* III y *Sal* I las cuales identifican los subfragmentos tanto de la región U_L como de la región U_S. Es el caso de los subfragmentos 7A y 7B del genoma del PrV digerido con *Bam* HI en la que se encuentra la gE y gI. Mediante este procedimiento, algunos autores observan variación genética (Mettenleiter TC y cols., 1987)²⁶ o corroboran el patrón de restricción de las cepas de referencia (Pritchett y cols., 1984)²⁷. Este procedimiento, también es utilizado para diferenciar aislamientos (Mettenleiter TC y cols., 1988)²⁸ y (Nishimori T y cols., 1987)²⁹. De igual manera, en este trabajo se utilizó la digestión con las endonucleasas *Bam* HI y *Kpn* I para, identificar el genoma del PrV. Nosotros encontramos un patrón de bandas característico del PrV, confirmando así que nuestro proceso de purificación del DNA viral fue exitoso, descartando que se tratara de DNA celular.

IX.2. Amplificación y verificación del gen que codifica para el antígeno gE por PCR.

La exigencia de la erradicación del PrV por medio de una extensa vacunación ha permitido el desarrollo de nuevas cepas atenuadas que tienen delección de ciertos genes como TC y gE obtenidos ya sea por selección *in-vitro* o por ingeniería genética. La aplicación de cepas de virus activos modificados ha complicado el diagnóstico de infecciones por PrV. Se desconoce cual es el porcentaje de los aislamientos de cepas vacunales de PrV. Entonces, una prueba diferencial que podría auxiliar para hacer la diferenciación y al mismo tiempo una identificación inequívoca de un virus vacunal o de campo es la técnica de PCR como la utilizan (Hasebe H y cols., 1993)³⁰. En nuestro, trabajo se utilizó la PCR con dos fines: Uno, para confirmar que el DNA obtenido y digerido con *Bam* HI y *Kpn* I era realmente el PrV y segundo, para amplificar el gen de la con la finalidad de clonarlo y expresarlo en un sistema de baculovirus.

IX.3. Purificación del gen amplificado que codifica para el antígeno gE.

El producto amplificado por PCR fue purificado a partir de un gel de agarosa por perlas de sílica y NaI. Éste método se utilizó debido a que, es una alternativa económica para la purificación de DNA. Distintas matrices, entre ellas incluida el vidrio, tierra de diatomeas y resinas de intercambio iónico son utilizadas para la purificación de DNA. La matriz, de perlas de sílica está disponible comercialmente y es ampliamente utilizada para la purificación de DNA a partir de geles de agarosa. Es 1000 veces más económica. Se ha observado que es muy eficaz, tanto cuantitativamente como cualitativamente, en la purificación de DNA. La capacidad de unión es de 3 µg de DNA por 1mg de sílica. (Boyle y Lew 1995)²⁵.

IX.4. Clonación en pUC19/*Sma*I/TA.

En este trabajo se utilizó el DNA del PrV como molde, para obtener el gen de la gE con iniciadores específicos y clonar en un vector pUC19/*Sma*I/TA. Este procedimiento, también, lo utilizaron Xuan X y cols³⁴. (1995) para clonar y expresar el gen de la gB del PrV. De igual forma, Gut M y cols³⁵.(1999) clonaron y expresaron el complejo gE y gI también del PrV. Ambos autores al igual que en este trabajo, utilizan la proteína expresada con el objeto de realizar el diagnóstico del PrV. El gen obtenido, se ligó con un vector T, en este caso en pUC19/*Sma*I/TA, permite después obtener por digestión con la endonucleasa *Bam*H1 el fragmento del gen gE garantizando que va a exhibir extremos cohesivos *Bam*H1 y posteriormente subclonarlo al vector pFBHTa/*Bam*HI/FAC, el cual, tiene los sitios *Bam*H1 complementarios. De las clonas obtenidas, se obtuvo DNA y fue liberado el fragmento con la misma enzima *Bam*HI.

IX.5. Subclonación en pFBHTa/*Bam*H1/FAC + gE.

El segmento de DNA con el gen de la gE obtenido de 1741 pb y liberado de pUC19, fue ligado al pFASTBAC/*Bam*H1/FAC de 5855 pb, con el que se obtuvo un plásmido de 7596 pb. Este DNA fue utilizado para realizar digestión con enzimas de restricción para identificar la dirección de la clonación y reacciones de secuenciación para estudiar si efectivamente el gen gE había sido clonado en el marco correcto de lectura. Además, la

secuencia de nucleótidos nos aseguro totalmente que el gen clonado es la gE del PrV. Al igual que el trabajo de Xuan X y cols³⁴, (1995) y en el de Bing Li y cols³⁶,(2003) que realizan RFLP's para comprobar la expresión de los genes de la gII (gB) y HCA587 antígeno asociado al carcinoma hepatocelular respectivamente. En este trabajo, además de RFLP's como en los trabajos citados, se realizó secuenciación para asegurarnos que el gen clonado es la gE del PrV. Con este DNA se construyó el báculo recombinante.

IX.6. Obtención del Báculo recombinante.

Como se mencionó en la introducción, el genoma del baculovirus se propaga en *E. coli* DH10BAC[®] como un plásmido grande (Báculo). Este genoma tiene el gen reportero Lac Z, de forma que en presencia de IPTG y X-gal las colonias bacterianas dan color azul (Lac⁺). Cuando ocurre la transposición de un elemento mini-Tn7 de un plásmido donador pFBHTa al sitio mini-attTn7 sobre el báculo, se interrumpe el gen de Lac Z, produciendo colonias blancas. Las funciones de transposición de Tn7 están dadas por un plásmido cooperador que esta dentro de las células DH10BAC[®]. A partir de células transformantes DH10BAC blancas se obtuvo DNA y para confirmar que el báculo recombinante poseía efectivamente el gen de la gE, se utilizó la combinación de iniciadores frontal de la gE y el iniciador reversa M13, observando una banda diagnóstica de 2,344pb. Por igual en el trabajo de Bing Li y cols³⁶,(2003) utilizaron los iniciadores de M13 para verificar la presencia del inserto en el báculo del sistema BAC TO BAC[®]. Al igual que Effio PC y cols.³⁷(2003) que expresaron una amilasa funcional de *Anopheles merus* en éste sistema.

IX.7. Confirmación del gen como el antígeno gE.

Con la secuencia obtenida, se realizó un alineamiento de identidad (BLAST) en la página del NCBI. De igual forma, en ésta página se realizó la búsqueda de marcos abiertos de lectura ORF's en la secuencia de la gE para verificar que no tuviera alguna alteración o una señal de alto. Por medio de estos dos análisis, se observó que el gen de la gE clonado en este sistema estaba completo y que realmente la secuencia correspondía al gen de la gE del virus de la enfermedad de Aujeszky.

IX.8. Caracterización de la gER .

En este trabajo se logró expresar la glicoproteína E del PrV como proteína recombinante en células de insecto, utilizando un sistema comercial de baculovirus. El empleo del sistema comercial BAC TO BAC[®] ya había sido reportado para expresar igualmente el antígeno gE del PrV (Fang et al. 2001).³³ Estos autores, así como nosotros, hemos encontrado que la antigenicidad de la gER es específica con los métodos convencionales de identificación (anticuerpos policlonales y monoclonales). Así mismo, corroboramos que este sistema es un método eficiente para producir esta y otras proteínas de importancia veterinaria y que puede utilizarse para la elaboración de futuros sistemas de diagnóstico y vacunas en México. Las propiedades antigénicas de la proteína recombinante de la gE pudieron ser evaluadas positivamente por inmunodifusión en gel de agarosa, inmunofluorescencia indirecta, histoquímica y por ELISA.

En el caso de inmunodifusión en gel de agarosa y en la inmunofluorescencia se empleó suero hiperinmune contra el PrV elaborado de conejo. En el ensayo de inmunoperoxidasa se utilizó un anticuerpo monoclonal dirigido, contra la gE del PrV. En ambos casos se encontraron reacciones específicas contra el antígeno gER.

En el trabajo de Gut-Winiarska M y cols.³⁸, (2000) utilizaron un anticuerpo monoclonal contra la gB del PrV para realizar inmunoperoxidasa y una prueba de ELISA muy similar a las que realizamos en éste trabajo. En el presente trabajo, se efectuó una ELISA de captura fijando a la placa el antisuero para el PrV de conejo y revelando con un anticuerpo monoclonal dirigido al antígeno gE acoplado con peroxidasa. Pudimos encontrar que efectivamente este antisuero atrapó al antígeno gER recombinante. Con estos resultados confirmamos que la gER obtenida en este trabajo, tiene propiedades antigénicas muy cercanas a la glicoproteína original y que puede emplearse con fines diagnósticos.

Cuantificación de antígeno recombinante gER para ensayos de ELISA

Con la intención de determinar que cantidad de antígeno se requiere colocar por pozo en un ensayo de ELISA para detectar niveles adecuados de densidad óptica en los sueros positivos se efectuó una titulación por dilución seriada (1:5) en ensayos de ELISA. Pudimos determinar que 0.4µl del sobrenadante crudo de la proteína recombinante gER en

100µl por pozo son eficientes para diferenciar entre sueros positivos y negativos. Por lo que se requieren solo 40µl del sobrenadante crudo para preparar una placa de ELISA con 96 pozos. En nuestro experimento de expresión del antígeno recombinante gE en botellas de cultivo de 175cm² con una MOI de 1 y 48 horas de infección, se obtuvieron 200ml de sobrenadante. Entonces, el rendimiento de esta producción de antígeno es de 4,000 placas de ELISA. Al cuantificar la cantidad de proteína utilizada se registro que el sobrenadante contiene 211.95 µg /µl, esto quiere decir que por pozo depositamos 84.78 ug y para una placa de ELISA se utilizan 8.478mg de proteína. La cantidad de proteína en el la producción del antígeno recombinante fue de 169.56mg.

El antígeno recombinante gER en ensayos de ELISA para diagnóstico.

El ensayo de ELISA con placas sensibilizadas con el antígeno recombinante y empleando sueros controles negativos y positivos nos mostró que se generan notorias diferencias entre los valores de las DO entre sueros positivos y negativos. Por lo anterior, podemos asegurar que el antígeno recombinante gER funciona eficientemente en un sistema de ELISA para efectuar diagnóstico diferencial entre animales expuestos al virus de campo y vacunados.

En este trabajo mostramos que en nuestro medio es posible desarrollar un sistema de expresión en baculovirus. Así mismo, tuvimos la experiencia que es un proceso relativamente sencilla para obtener proteínas recombinantes con actividad biológica y con aplicaciones prácticas.

Además, después de la erradicación de la pseudorrabia en algunos estados y países, el manejo del virus completo debe ser restringido. En estos casos, las antígenos recombinantes expresados en baculovirus que protejan adecuadamente contra la enfermedad, ofrecen una solución conveniente. Varios investigadores han informado el desarrollo de pruebas diagnósticas basadas en proteínas recombinantes del PrV expresadas en baculovirus Fang LR y cols³³, 2001, Prud'homme I y cols³⁹, 1997, Gut-Winiarska M y cols.³⁸, 2000, Xuan X y cols.,³⁴ 1995 y Gut-Winiarska M y cols.,³⁵ 1999.

Kimman y cols.⁴⁰, (1996). Expresaron la gE del PrV en un sistema de baculovirus en la que encontraron toxicidad en células de insecto cuando la gE estaba completa. En este artículo

se sugiere que la expresión de la proteína completa es inestable, debido a la acumulación de la gE en membranas del retículo endoplásmico, lo cual, puede inhibir la síntesis de proteínas, lo que se traduce en bajos niveles de expresión de la proteína recombinante.

Ro LH y cols⁴¹.(1995) Informan de la expresión de la gE del PrV en *E. coli* y mencionan que puede utilizarse en el diagnóstico, aunque, no posee una conformación adecuada. Porque, *E. coli* no tiene una glicosilación adecuada, debido a que este proceso no se encuentra en células procariontes. El correcto plegamiento de la gER expresada es importante porque, los principales sitios inmunogénicos son dependientes de su conformación Kimman y cols⁴⁰., (1996).

Igualmente, se ha reportado la expresión de otras proteínas en baculovirus como la proteína gp64 del virus respiratorio sincitial en el humano (Oomens AG y Wertz GW 2004)⁴², la gp50 de *Taenia solium* para el diagnóstico de cisticercosis (Hancock K y cols⁴³., 2004), la lactoferrina bovina como antimicrobiano contra *Prototheca zopfii* (Tanaka T y cols⁴⁴., 2003) la gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana (Joshua MN y cols⁴⁵., 2000), y la gp51 del virus de la leucemia bovina (De Giuseppe y cols.⁴⁶, 2004) entre otras.

CONCLUSIONES.

- Con el sistema comercial BAC TO BAC[®] se pueden obtener baculovirus recombinantes que expresen la glicoproteína gE de PRV.
- La proteína recombinante gE obtenida en el sistema de baculovirus, tiene las mismas propiedades antigénicas que la gE original.
- Con la proteína recombinante gE se puede desarrollar un paquete de diagnóstico local para el control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky.
- El sistema comercial BAC TO BAC[®] se puede utilizar para la expresión de proteínas recombinantes tanto de importancia académica como con aplicaciones en diversos áreas de la biotecnología veterinaria, como sería el diagnóstico y la producción de vacunas.

La producción de proteínas recombinantes es una herramienta muy útil para generar reactivos biológicos. Esto podría ayudar a producir reactivos a bajo costo con características mas acordes con las exigencias médicas y sanitarias del país.

X. LITERATURA CITADA.

1. Vialard JE, Arif BM and Richardson CD. Introduction to the Molecular Biology of Baculoviruses. In: Richardson CD, editor. Baculovirus Expression Protocols. New Jersey (USA): New Jersey Humana Press, 1995: 1-24.
2. O'Reilly DR, Miller LK and Luckow VA. Baculovirus expression vectors. A laboratory manual. W H Freeman and Company, 1992.
3. Gut-Winiarska M, Jacobs L, Kerstens H, Bienkowska SK. A highly specific and sensitive sandwich blocking ELISA based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein B. *Virological Meth.* 2000; 88; 63-71.
4. Klugge JP, Beran GW, Hill HI, Platt KB. Pseudorabies (Aujeszky's Disease). In: Leman AD, editor. Diseases of Swine. 8th ed. Iowa (USA): Iowa State University Press. 1999:233-340.
5. Taylor DJ. Pig Diseases. 6th ed. Great Britain: St. Edmundsbury Press, 1995.
6. Mettenleiter TC. Pseudorabies (Aujeszky's Disease) Virus. Aujeszky's Disease Symposium OIE Intervet. Bangkok, Thailand 1994: 1-9.
7. Vargas AM. Control y erradicación de la enfermedad de Aujeszky en un sistema múltiple de tres sitios (tesis de maestría). México (DF) México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, 1996.
8. Alzina A, Gómez M, Rodríguez J, Villegas S y Álvarez M: Control de la Enfermedad de Aujeszky mediante el uso de vacunación gI- en una granja infectada. Memorias del XXVII Congreso Nacional De AMVEC; 1992 Acapulco (Guerrero) México. Acapulco (Guerrero): Asociación Mexicana de Veterinarios

- Especialistas en Cerdos, 1992: 224-225.
9. Morilla GA. Enfermedad de Aujeszky. INIFAP-SAGAR y PAIEPEME, AC, editores. Manual para el control de las Enfermedades Infecciosas de los Cerdos. México 1997: 75-90.
 10. Mettenleiter TC. Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis-State of the art, June 1999. *Vet Res.* 2000; 31: 99-115.
 11. Walter F, Ehrlich C, Klupp BG and Mettenleiter TC. Characterization of the replication origin (Oris) and adjoining parts of the inverted repeat sequences of the pseudorabies virus genome. *J of Gen Virol.* 2000; 81: 1539-1543.
 12. Kimman TG, Pol JMA, de Wind N, Oie-Lie N, Berns AJM and Gielkens ALJ. Role of different genes in the virulence and pathogenesis of Aujeszky's disease virus. *Vet Microbiol.* 1992; 33: 45-52.
 13. Mengelgin WL, Brockermeier SL, Lager KM, Vorwald AC. The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies (Aujeszky's disease) eradication strategies. *Vet Microbiol.* 1997; 55: 49-60.
 14. Mettenleiter TC. Immunobiology of pseudorabies (Aujeszky's Disease). *Vet Immunol and Immunopath.* 1996; 54: 221-229.
 15. Tabares LE. Biología Molecular del virus herpes porcino tipo 1. Mesa redonda sobre las nuevas perspectivas de lucha contra la Enfermedad de Aujeszky. *Anaporc.* 1990; 90: 10-12.
 16. Lomniczi B. Estudio molecular de las vacunas de la Enfermedad de Aujeszky. *Anaporc.* 1991; 99: 6-17.
 17. Pensaert M, Gielkens AL, Lomniczi B, Kimman TG, Vannier P and Eloit M. Round

- table on control of Aujeszky's disease and vaccine development based on molecular biology. *Vet Microbiol.* 1992; 33: 53-67.
18. Nawynck HJ. Functional aspects of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity. *Vet Microbiol.* 1997; 55: 3-11.
 19. Calisher CH, Horzinek MC. 100 Years of Virology: The birth and Growth of a Discipline. *Archives of Virology Supplement* 15 1999.
 20. Bouma A, Zwart RJ, De Bruin MGM, De Jong MCM, Kimman TG, Bianchi ATJ. Immunohistological characterization of the local cellular response directed against pseudorabies virus in pigs. *Vet Microbiol.* 1997; 58:15-45-154.
 21. Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, López-Ferber M and Posee RD. The complete DNA sequence of AcNPV. *Virology* 1994 202: 586-876
 22. Gibco BRL. Manual. BAC-TO-BAC[®] Baculovirus expression Systems. Gibco BRL Products. 1996; 18:1-37.
 23. Gerdt V, Jons A, Mettenleiter TC. Potency of an experimental DNA vaccine against Aujeszky's disease in pigs. *Vet Microbiol.* 1999; 66: 1-13.
 24. Silhavy TJ, Berman ML, and Enquist LW. Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, 1984.
 25. Boyle JS and Leww AM. An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends in genetics.* 1995; 11 (1):8.
 26. Mettenleiter TC, Zsak L, Kaplan A, Ben-Porat T and Lomniczi B. Role of a Structural Glycoprotein of Pseudorabies in Virus Virulence. *J. of Virol.* 1987; 61 (12): 4030-4032.

27. Pritchett RF, Bush CE, Chang TJ, Wang JT and Zee YC. Comparison of the genomes of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus strains by restriction endonuclease analysis. *Am J Vet Res.* 1984;45: 2486-2489.
28. Mettenleiter TC, Lomniczi B, Sugg N, Schreurs C and Ben-Porat T. Host Cell-Specific Growth Advantage of Pseudorabies Virus with a Deletion in the Genome Sequences Encoding a Structural Glycoprotein. *J. of Virol.* 1988;62 (1): 12-19.
29. Nishimori T, Imada T, Sakurai M, Kitabayashi T, Kawamura H and Nakalima H. Restriction endonuclease analysis of Aujeszky's disease viruses isolated in Japan. *Jpn. J. Vet. Sci.* 1987;49:365-367.
30. Hasebe H, Wheeler JG and Osorio F. Gene specific assay to difernciate strains of pseudorabies virus. *Vet. Microbiol.* 1993;34: 221-231.
31. Ausubel F.M.. 1999 Short protocols in molecular biology. 4th edition. Wiley.
32. Harlow E., Lane D. *Antibodies a laboratory manual.* 1988.Cold Spring Harbor laboratory.
33. Fang LR, Chen HC, Xiao SB, He QG and Wang GF. Expression of the gE gene of pseudorabies virus in insect cells. *Sheng Wu Gong Xue Bao.* 2001; 17 (4): 449-451.
34. Xuan X, Nakamura T, Ihara T, Sato I, Tuchiya K, Nosetto E, Ishihama A and Ueda Susumu. Characterization of pseudorabies virus glycoprotein gII expressed by recombinant baculovirus. *Virus Research.* 1995; 36: 151-161.
35. Gut-Winiarska M, Jacobs L, Tyborowska J, Szewczyk B, Bienkowska SK. A highly specific and sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein gE and gI complex

36. Bing Li, Hong-Yan W, Xiao-Ping Q, Yan L and Wei-Feng Ch. Expression, purification and serological analysis of hepatocellular carcinoma associated antigen HCA587 in insect cells. *World Journal Gastroenterology*. 2003; 9(4): 678-682.
37. Effio PC, Flojeras-Flatschart AV, Montor WR, Pernasetti FM, Pueyo MT and Sogayar MC. Expression of functional *Anopheles merus* alpha-amylase in the baculovirus/*Spodoptera frugiperda* system. *Insect Molecular Biology*. 2003; 12 (5): 415-425.
38. Gut-Winiarska M, Jacobs L, Kerstens H and Bienkowska-Szewczyk K. A highly specific and sensitive sandwich blocking ELISA based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein B. *J. of Virological Methods*. 2000;88: 63-71.
39. Prud'homme I, Zhou EM, Traykova M, Trotter H, Chan M, Afsar A and Harding MJ. Production of a baculovirus-derived gp50 protein and utilization in a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pseudorabies virus. *Canadian Journal Veterinary Research*. 1997; 61 (4): 286-291.
40. Kimman TG, De-Leeuw O, Kochan G, Szewczyk B, Van Rooij E, Jacobs L, Kramps JA and Peeters B. An indirect double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) using baculovirus-expressed antigen for the detection of antibodies to glycoprotein E of pseudorabies virus and comparison of the method with blocking ELISAs. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1996; 3 (2): 167-174.
41. Ro LH, Lai SS, Hwang WL, Chou HH, Huang JN, Chang EL and Yang HL. Cloning and expression of an antigenic domain of glycoprotein gE of pseudorabies virus in *Escherichia coli* and its use as antigen in diagnostic assays. *American*

- Journal Veterinary Research. 1995; 56 (5): 555-562.
42. Oomens AG y Wertz GW. The baculovirus gp64 protein mediates highly stable infectivity of a human respiratory syncytial virus lacking its homologous transmembrane glycoproteins. *Journal of Virology*. 2004; 78 (1): 124-135.
 43. Hancock K, Pattabhi S, Greene RM, Yushak ML, William F, Khan A, Priest JW, Levine MZ and Tsang VC. Characterization and cloning of gp50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Molecular Biochemical Parasitology* 2004; 133 (1): 115-124.
 44. Tanaka T, Nakamura I, Lee N-Y, Kumura H and Shimazaki K-I. Expression of bovine lactoferrin and lactoferrin N-lobe by recombinant baculovirus and its antimicrobial activity against *Prototheca zopfii*. *Biochemical Cellular Biology/ Biochemical Biology Cellular*. 2003; 81 (5): 349-354.
 45. Joshua MN, Qi Y, Fu-Hua Y and Yong-Xiu H. Comparison of the biological activities of human immunodeficiency virus 1 P24 and gp41 expressed in *Spodoptera frugiperda* cells by use of bac-to-bac system. *Acta Virol*. 2000; 44 (3): 125-130.
 46. De Giuseppe, Feliziani F, Rutili D and De Mia GM. Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51 by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. 2004; 11(1): 147-151.
 47. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 2nd edition *Molecular cloning a laboratory manual*, 1989.

Falta página

N° 75

XI. ANEXOS

1. Propagación y titulación del PrV.

La cepa Shope del PrV se propagó en células de riñón de bovino MDBK. Estas células crecen a 37C con medio esencial mínimo Eagle (HyQ MEM EBSS Hy-Clone SH 30008.03) adicionado con suero fetal bovino 10% (Gibco BRL 16140-063) y antibiótico-antimicótico (Invitrogen Co.-15240-062). Con estas condiciones las células se duplican cada 20 horas. Al PrV se le realizaron tres pases en cultivos celulares de 30 ml (1×10^6 células/ml) para obtener un mayor efecto citopático en 48 hrs.

El virus fue titulado por el método de Kärber. Éste método estima directamente el 50% del punto final (DICC₅₀). El título se considera como el logaritmo inverso de la dilución más alta del lisado viral que no presenta efecto citopático.²³

2. Extracción de DNA del PrV

Cultivos de células MDBK infectadas con PrV (MOI 1) después de 48 hrs. fueron cosechados y conservados a -20C por 12 horas. El cultivo se descongeló y centrifugó a 3000 x g por 15 minutos para eliminar las células. La purificación del DNA fue siguiendo las recomendaciones de Shilhavy y cols 1984²⁴. Al sobrenadante se le agregó polietilenglicol 6000 (PEG Sigma P 2139) al 10%. Este se colocó en agitación por 4°C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 3000 x g por 20 minutos y la pastilla se resuspendió en el buffer SM (5.8g NaCl, 2g MgSO₄.7H₂O, 1M Tris-HCl, 2% de gelatina para un litro de amortiguador). En este paso se recomienda extraer con un volumen de cloroformo para eliminar el PEG. Nosotros pudimos apreciar que el uso de cloroformo conduce a que no se recupere el DNA, por eso omitimos este paso. Al precipitado viral suspendido en 3 ml de SM, se le adicionó RNAasa (Sigma R 5125) a una concentración de 10µg/ml y se incubó durante 30 minutos a 37C. Posteriormente se agregaron 0.2 volúmenes de solución de lisis STEP (0.5% SDS, 50mM Tris-HCl pH 7.5 y 0.4M de EDTA) conteniendo proteinasa K (Research Organics LS 004222) a una concentración de 100 µg/ml y se incubó durante 15 minutos a 50C. Posteriormente se realizaron dos extracciones con volúmenes iguales de fenol, cloroformo, alcohol isoamílico (25:24:1) centrifugando a 5000g/5minutos y dos extracciones con cloroformo, alcohol isoamílico (24:1) por centrifugación a 5000g/5minutos. Posteriormente se agregó un volumen de isopropanol

absoluto frío y se incubó durante 1 hora a -70C. Se centrifugó a 8000 g/10 minutos para obtener la pastilla de DNA la cual se lavó con 200µl de etanol al 70% frío por centrifugación a 8000 g/5minutos. El etanol se decantó y la pastilla se secó por centrifugación al vacío 5 minutos.

3. Verificación de la identidad del DNA del PrV por digestión con enzimas de restricción.

La digestión del DNA viral se realizó con las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I con los siguientes protocolos:

Protocolo de restricción con *Bam* HI.

Se digirió 300 ng de DNA de PrV en un volumen de 20 ul, incluyendo 5 unidades de la enzima *Bam*HI (10U/ µl, New England, BIOLABS, Beverly, Mass), 1X del amortiguador recomendado por el proveedor (New England BIOLABS) , 1 mM Espermidina (Merck 7902-.0001), y 1X BSA (New England, BIOLABS B-9001S). Se incubo por 24 horas a 37C.

Protocolo de restricción con *Kpn*I.

Se digirió 300 ng de DNA de PrV en un volumen de 20 ul, incluyendo 5 unidades de la enzima *Kpn*I (10U/ µl, New England, BIOLABS), 1X del amortiguador recomendado por el proveedor (New England BIOLABS) , 1 mM Espermidina (Merck 7902-.0001), y 1X BSA (New England, BIOLABS B-9001S). Se incubo por 24 horas a 37C.

4. Amplificación del gen que codifica para el antígeno gE

La amplificación del gen que codifica para el antígeno gE se realizó por PCR empleando como molde el DNA del PrV con el siguiente protocolo:

En un volumen de 50 µl conteniendo 50 ng de DNA del PrV, 0.2 mM, de los iniciadores delantero **BFgE (G GAT CCG ATG CGG CCC TTT CTG CTG CGC)** e iniciador reversa **BRgE (Cg G GAT CCG ATT AGC GGG GCG GGA CAT CAA)**, Buffer D 1X (10mM Tris HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 10µg/ml de gelatina, 150µg/ml BSA, 0.1% Triton X-100, 2mM MgCl₂), 5% DMSO (MERCK), 0.2 Mm dNTP's (BIOGENICA), 4U Taq DNA polimerasa (BIOGENICA).

Se emplearon las siguientes condiciones de amplificación: un paso inicial a 94C por 3min., seguido por 30 ciclos de 94C por 30seg, 68C por 1 min y 72C por 90 seg. Un paso final a 72C por 15minutos.

5. Purificación de segmentos de DNA a partir de geles de agarosa por NaI y perlas de sílice.

A partir de geles de agarosa al 1% se cortaron las bandas de DNA correspondientes, se colocaron en un tubo eppendorf y se pesaron. Se agregaron 3 volúmenes de NaI 6M, se incubó durante 10minutos a 55C, hasta fundir la agarosa. Posteriormente se adicionaron 20µl de perlas de sílica, se mezclaron por inversión y se incubó en hielo durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 8000g/4 minutos/4C y se decantó el sobrenadante. La pastilla con las perlas fue lavada en dos ocasiones con la solución new wash (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5 y 50% etanol) se centrifugó a 8000g/4 minutos/4C. La pastilla se suspendió con 30µl de agua destilada estéril y se incubó a 55C durante 5 minutos, se centrifugó a 8000g/4 minutos a temperatura ambiente. El DNA se recuperó en el sobrenadante.

6. Clonación en pUC19/*Sma* I/TA.

El vector de clonación pUC19 fue digerido con *Sma*I y modificado por la adición de timinas en los extremos 3'. El producto de amplificación por ser clonado necesita una extensión final de 15 minutos a 72C en la PCR para adicionar adenina en el extremo 3' y de esa forma hacerlo complementario al vector. El gen de la gE amplificado se purificó de un gel de agarosa al 1% con NaI 6M y perlas de sílica.

En un volumen de 20 µl conteniendo 60 ng del segmento purificado de gene gE, 100 ng del vector pUC19/*Sma* I/TA, amortiguador de ligación (10mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.4mM ATP, 50 µg/ml, 25mM Tris-HCl pH 7.8 en H₂O) y 1 unidad de T4 DNA ligasa (1U/ µl ROCHE). La mezcla de ligación se incubó a 16C por 16 horas.

7. Transformación de células competentes.

Para recuperar los plásmidos recombinantes se transformaron células competentes *E. coli* DH10b. Las células competentes fueron proporcionadas amablemente por la Biol. Amanda Gayosso. Las células competentes fueron preparadas con métodos previamente descritos. De la mezcla de ligación se adicionaron 40 ng de DNA a 100ul de células competentes DH10b. Se colocaron por 30 minutos en hielo, posteriormente 1 minuto a 42C y después por 2 minutos en hielo. Se adicionó 1 ml de medio LB y se incubó durante 60 minutos a 37C. Se espatularon 100-200 µl de las células transformadas placas de agar LB con ampicilina (100 µg/ml), IPTG (266 µg/ml) y X-gal (266 µg/ml) y se incubaron por 16 horas a 37° C. De las células que crecieron se seleccionaron las colonias blancas como probables clonas recombinantes.

8. Identificación por PCR de clonas recombinantes en pUC19/*Sma* I/TA.

Se seleccionaron colonias blancas, que son probablemente recombinantes, se estriaron en agar LB ampicilina. Simultáneamente, las colonias se colocaron en tubos de 200 µl de PCR conteniendo 60 µl de agua destilada estéril. Para ser lisadas las colonias en los tubos de PCR se calentaron a 90C por 10min. Esta suspensión cruda de DNA fue utilizada en reacciones de PCR con los iniciadores específicos que amplifican un fragmento de 1.7 Kb de gen de la gE.

9. Minipreparación de DNA de plásmido.

Se colocaron las colonias seleccionadas en 3 ml de LB ampicilina líquido en agitación durante 12 horas. El cultivo fue centrifugado a 8000g/ 7minutos, el sobrenadante fue decantado. La pastilla se resuspendió con 200 µl de solución de lisis (8 % de sacarosa, 5 % de tritón X-100, 50 mM de EDTA y 50 mM de Tris pH 8) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó lisozima a 1.25 µg/µl, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. La muestra se llevó a 95C en baño húmedo por 1 minuto y se centrifugó 8000g/10minutos. Se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 2

volúmenes igual de etanol absoluto frío, se incubó a $-70^{\circ}\text{C}/30$ minutos y se centrifugó a $8000\text{g}/10$ minutos. Se lavó en dos ocasiones con etanol al 70% a $8000\text{g}/5$ minutos y se desechó el sobrenadante. La pastilla se secó por centrifugación al vacío durante 5 minutos y fue resuspendida en agua destilada estéril. Se verificó la purificación del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

10. Liberación del fragmento del del gene gE del pUC19.

Del DNA de las clonas pUC19 recombinantes para el gen gE se libero el fragmento que contiene el gen para gE al digerirlo con la enzima *Bam*H1 siguiendo el siguiente protocolo. En un volumen de 100 μl se colocaron 5 μg del DNA de las colonias recombinantes, unidad de la enzima *Bam* H1 (10U/ μl Roche) y 1 mM Espermidina. La mezcla de digestión se incubó a 37°C por 8 horas.

11. Obtención del DNA del vector pFBHTa.

El vector, fue purificado con el paquete comercial de Quiagen (EndoFree plasmid Mega Kit No. Cat. 12381) Este sistema se basa en la lisis alcalina de la masa bacteriana y centrifugación ó filtración para la remoción del DNA cromosomal bacteriano. Este sistema emplea una columna con una resina de intercambio aniónico (DEAE acoplado a partículas de sílica de 100 μM) para concentrar y purificar el DNA del plásmido. En la columna se lavan todos los contaminantes y el DNA del plásmido se eluye al aumentar la fuerza iónica. Al final de la purificación se obtuvo una pastilla que se cuantificó y corrió por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

12. Preparación del vector pFBHTa

El DNA del vector pFBHTa se preparó, primeramente para exponer los sitios cohesivos, digiriéndolo con la endonucleasa *Bam*H1, y posteriormente para evitar la recircularización del vector se trató con fosfatasa alcalina de camarón FAC.

Digestión con *Bam*H1

En un volumen de 200 μl de agua se incluyeron 200 μg de DNA pFBHTa, 1 unidad de la endonucleasa *Bam* H1 (10U/ μl , Roche), y 1 mM Espermidina. Se incubó a 37°C por 16 horas.

Posteriormente el vector fue desfosforilado con fosfatasa alcalina de camarón (FAC) se utilizó 1 unidad de FAC por 1 pmol de DNA del pFBHTa. Para esto en un volumen de 1 ml conteniendo 100 µg del DNA del plásmido pFBHTa/*Bam* HI µg, 5.6 unidades de FAC (Roche-1758-250) y 1X del amortiguador comercial proporcionado por el proveedor. Se incubó a 37C durante 1 hora y después a 65C durante 15 minutos.

13. Clonación del gen del antígeno gE en el vector pFBHTa /*Bam*HI/FAC

En un volumen de 20 µl se agregaron 70 ng del segmento de DNA con extremos *Bam*HI, conteniendo el gen de la gE, en 200 ng del vector pFBHTa/*Bam* HI/FAC, amortiguador de ligación (10mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.4mM ATP, 50 µg/ml, 25mM Tris-HCl pH 7.8 en H₂O) y 1 Unidad de T4 DNA ligasa (ROCHE). La mezcla de ligación se incubó a 16C por 16 horas.

14. Transformación en células competentes.

La transformación se realizó en placas de agar LB con 100 µg/ml de ampicilina (Merck-278), con el siguiente protocolo: Se colocaron 100 µl de células competentes DH10b en hielo. Se agregaron 40 ng del plásmido recombinante y se mezclaron. Incubación en hielo 30 minutos. La mezcla se expuso a un choque térmico de 42C por 1 minuto. Se enfrió en hielo durante 2 minutos. A cada tubo se agregaron 900 µl de medio LB. Los tubos fueron incubados en agitación (225 rpm) a 37C por 1 hora. Se espatularon 200 µl de cada mezcla en placa. Las placas fueron incubadas a 37C por 24-48 horas.

Se realizaron minipreparaciones de DNA de las clonas resultantes. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% y se observó una banda del plásmido recombinante de 7,596 pb.

15. Análisis direccional de las clonas por PCR y digestión con enzimas de restricción.

Se realizó un análisis direccional de las clonas. Para verificar la inserción correcta del gen de la gE en el pFBHTa/*Bam*HI/FAC, se utilizó un análisis por PCR y una digestión con enzimas que cortan el inserto y otra que corta el vector. La PCR se realizó con los iniciadores específicos que amplifican la gE con el protocolo descrito anteriormente.

Protocolo de digestión con *Bst*EII.

En un volumen de 50 µl se puso 1 µg del DNA del plásmido de la clona estudiada. 1 unidad de la enzima *BstE* II (10U/µl, New England BIOLABS), 1X del amortiguador recomendado por el proveedor (Buffer 3, New England BIOLABS), 1 Mm Espermidina. Se incubó a 60C por 12 horas.

Protocolo de digestión con *Hpa* I.

En un volumen de 50 µl se puso 1 µg del DNA del plásmido de la clona estudiada. 1 unidad de la enzima *Hpa* I (10U/µl, New England BIOLABS), 1X del amortiguador recomendado por el proveedor (Buffer 3, New England BIOLABS), 1 Mm Espermidina. Se incubó a 60C por 12 horas. Se incubó a 37C por 12 horas.

16. Confirmación del segmento clonado como el gen del antígeno gE

16.1 Protocolo de secuenciación.

Se realizó un análisis de secuencia para verificar que la proteína se encuentre en el marco correcto de lectura. Se diseñó un iniciador de secuenciación denominado SEQPFBHT con la secuencia 5' CTC TAG CTA TAG TTC TAG TGG 3' Este iniciador se asienta en la posición 3962 del vector, arriba del sitio múltiple de clonación.

Reacción de secuencia:

En 20 µl se agregaron 150 ng del DNA de la clona estudiada, 3.2 picomoles del iniciador SEQPFBHT y 4 µl del amortiguador de secuenciación (Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit Applied Biosystems-401150)

Las condiciones de la reacción de secuenciación en un termociclador fueron: 90C/10'' 50C/5'' 60C/4' 25 ciclos.

El producto de secuenciación obtenido se filtró en columnas de Sephadex G50 centrifugando a 2700 rpm /3 min. Posteriormente, las muestras se secaron por centrifugación al vacío durante 45 minutos. Las muestras se cubrieron para protegerlas de la luz y se congelaron para su envío al secuenciador automático para ser leídos.

A partir de la secuencia de DNA obtenida se pudo determinar la orientación correcta de la clona por medio de la alineación de esta con una secuencia de referencia y por la búsqueda

de marcos abiertos de lectura. Esto se determina con el programa Clone Manager V7.3 (Scientific & educational software)

16.2 Alineación de identidad.

Para saber si el gen clonado correspondía en realidad al gen de la gE, a partir de la secuencia de DNA obtenida de la clona de gE en pFBHTa, se realizó una búsqueda de identidad (Blast) en el banco de genes (GeneBank), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

17. Obtención del Búcmido recombinante

Transposición sitio específica entre un segmento del plásmido pFBHTa recombinante para el gen gE y el genoma del baculovirus contenido en E. Coli (búcmido) se lleva a cabo al transformar células competentes DH10BAC y rescatar colonias en un medio selectivo. Para esto se efectuó el protocolo siguiente :

Se agregaron 40 ng del plásmido recombinante a 100 µl de células competentes DH10BAC y se incubaron en hielo por 30 minutos. Posteriormente, a las células se les dio un choque térmico de 42C por 1 minuto. Enseguida se enfriaron en hielo durante 2 minutos y se agregaron 900 µl de medio SOC (20g bacto triptona, 5g bacto extracto de levadura, 0.5g NaCl, 250mM KCl, 10mM MgCl, 20mM de glucosa). Los tubos se incubaron en agitación (225 rpm) a 37C por 4 horas. Se realizaron diluciones de las células con el medio SOC 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y se espatularon 100 µl de cada dilución en placas de agar LB con 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de tetraciclina, 200µg/ml de bluo-gal, 200 µg/ml de IPTG. Las placas fueron incubadas a 37C por 48 horas.

18. Aislamiento del DNA del búcmido recombinante y su verificación.

Las colonias blancas seleccionadas del proceso de arriba contienen el búcmido recombinante. De ellas se obtuvo el DNA mediante una minipreparación y a partir de este se hizo una amplificación por PCR de un segmento diagnóstico para determinar que efectivamente se llevo a cabo la transposición. Se utilizó, una combinación de iniciadores. Los iniciadores M13 se utilizan para la amplificación por PCR, y facilitar la rápida detección y caracterización por tamaño de los insertos clonados en la región que codifica

para el gen de *LacZ*, sin embargo los segmentos amplificados resultan muy largos. Por esta razón, se combinó el iniciador frontal específico del gen para la gE y el iniciador posterior de M13 (BFW y M13Rv). Para esto se empleó el siguiente protocolo: En un volumen de 20 μ l se incluyó 100 μ g de DNA del Bámido recombinante, 0.4 mM de cada uno de los iniciadores BFW y M13Rv, 0.4 mM de cada uno de dNTP's (BIOGENICA), 1 unidad de Taq DNA polimerasa (5U / μ l BIOGENICA), 10 mM Tris-HCL pH 8.4; 50 mM KCl; 10 μ g/ml gelatina, 1.5mM MgCl₂. Como los iniciadores se alinean a distintas temperaturas, se realizó una PCR de gradientes, encontrando que la temperatura ideal fue de 65 C.

19. Obtención del Baculovirus recombinante por transfección de células de insecto del bámido recombinante.

Se sembraron 1.6×10^6 células *Sf21* en 2 ml de medio SF-900 II con suero fetal bovino (SFB) al 10 % y 1X antibiótico (Antibiotic 100X Gibco BRL 15070-063) en una placa de 6 pozos y se incubaron a 27C /30'.

Fueron preparadas las siguientes soluciones: Solución A) Para cada transfección se diluyeron 250 ng de DNA del bámido recombinante en 100 μ l de medio SF-900 II sin antibióticos. Solución B) Para cada transfección se colocaron 6 μ l de Cellfectin (Gibco BRL No cat. 10362-010) 100 μ l de medio SF-900 II sin antibióticos. Las dos soluciones fueron mezcladas, e incubadas de 15-45 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas con 2ml de medio SF-900 II sin antibióticos. Para cada transfección se agregaron 800 μ l de medio SF-900 II sin antibióticos, mezclados y colocados sobre las células. Se incubaron a 27C durante 5 horas. Se agregó un ml de medio SF-900 II con SFB y antibiótico. Incubando a 27C durante 72-120 horas.

20. Obtención de antígeno del PrV.

Se realizó la precipitación de PrV con el siguiente protocolo. El PrV se propagó en células de riñón de bovino MDBK en medio MEM con SFB al 10 % con una MOI de 1 por 48 horas hasta observar efecto citopático mayor al 50%. Se congeló a -20C por 12 horas. Se descongeló y se centrifugó a 3000 x g por 15 minutos para eliminar las células. Todos los pasos se realizaron a 4C o en hielo.¹⁹ Se tomó el sobrenadante y se la agregó PEG 6000 al

10%. Se colocó en agitación a 4°C durante toda la noche. Se centrifugó a 3000 x g por 20 minutos y resuspendió en buffer SM.

21. Determinación de la concentración de proteínas por Bradford.

Se determinó la concentración de proteínas con el siguiente protocolo:

A) Preparación de la curva patrón de albúmina sérica bovina (ASB).

1. Se prepararon 100 ml de una solución de ASB en PBS (solución amortiguadora de fosfatos) a una concentración de 1 mg/ml.
2. Se enumeraron 10 viales del No. 10 al 100, éste número representa la cantidad de microlitros de ASB que se colocaron en cada uno.
3. Cada vial se preparó conforme al cuadro siguiente:

No. de vial	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
µl de ASB	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
µl de PBS	990	980	970	960	950	940	930	920	910	900
Volumen total en µl	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Cantidad en mg de ASB	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.1

B) Formato de llenado de la placa.

En un formato de ELISA se designaron las líneas de pozos para la curva patrón y para la determinación de proteínas por duplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	PBS
B	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	PBS
C	MUESTRA A											
D	MUESTRA B											
E	MUESTRA C											
F	MUESTRA C											
G	MUESTRA C											
H	MUESTRA C											

1. Se colocan 40 µl de cada estándar en el pozo correspondiente,
2. En la línea 1 se colocan 40 µl de PBS.

3. En la línea 12 se colocan 200 μl de PBS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40 μl de PBS	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	200 μl de PBS
B	40 μl de PBS	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	200 μl de PBS
	Se colocan 40 μl de cada estándar											

C) Ubicación de la muestra a determinar.

1. A los pozos de la línea 1 se le agregan 78 μl de PBS.
2. A los pozos de la línea 2 a la 12 se les agregan 40 μl de PBS.
3. Se colocan 2 μl de la muestra a determinar en los pozos en los que se agregaron 78 μl de PBS.
4. Se realizan diluciones dobles seriadas con 40 μl .
5. Los últimos 40 μl se desechan.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C	78 μl de PBS mas 2 μl de muestra en diluciones dobles seriadas											
D	78 μl de PBS mas 2 μl de muestra en diluciones dobles seriadas											
	Diluciones con 40 μl de cada muestra											

D) Revelado de la placa.

1. Se emplea una solución comercial de Bradford Protein-Assay (BIO-RAD 500-0006) agua bidestilada 1:5.
2. Se colocan 160 μl de ésta solución a los pozos de la curva y a los de la muestra. Teniendo cuidado de no colocar esta solución a los pozos blanco.
3. Se incuba 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
4. Se ajustó el lector de ELISA a 595 nm y con los pozos blancos.
5. Se hace la determinación de proteínas con el programa cuant-protein. El cual, obtiene el promedio de los pozos que se hicieron por duplicado, tanto de la curva patrón como de las muestras a determinar.
6. Los resultados obtenidos son en miligramos/mililitros.

22. Obtención del antígeno recombinante.

Se tomaron células Sf21 con 48 horas de infección a un MOI de 1 con el baculovirus recombinante. Las células se cosecharon y fueron centrifugadas, el sobrenadante se conservó y las pastillas de células fueron lisadas con el amortiguador de lisis para células de insecto (0.1 M Tris pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1% Triton X-100), se incubaron 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 4000 rpm/ 10 minutos, se tomó el sobrenadante. Tanto el sobrenadante como el lisado celular fueron cuantificados para posteriormente caracterizarlos.

23. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Preparación de geles de acrilamida con el sistema discontinuo SDS:

Reactivo	Gel separador 10%(10ml)	Gel concentrador (3ml)
Agua	4ml	2.1ml
SDS 10%	100 microlitros	30 microlitros
Tris pH 8.8 1.5M	2.5ml	
Tris pH 6.8 1M		380 microlitros
Acilamida 30%	3.3ml	500 microlitros
Persulfato de amonio 10%	30 microlitros	30 microlitros
TEMED	4 microlitros	3 microlitros

Se prepararon soluciones amortiguadoras para corrida y transferencia:

Reactivo	Amortiguador de corrimiento	Amortiguador de transferencia
Amortiguador de corrida ¹	25 ml	25 ml
SDS 10%	2.5 ml	
Agua	222.5 ml	175 ml
Metanol absoluto		50 ml
Volumen final	250 ml	250 ml

¹Tris 0.25M, 1.92M de glicina pH 8.3 (30.3 g de Tris, 144 g de glicina se disuelve en un litro de agua destilada, se mide pH y se almacena a 4C.

Se preparan dos geles de acrilamida. Uno se utilizó para transferirlo a la membrana de nitrocelulosa y el otro, fue teñido con azul de Coomassie (0.4% de azul de Coomassie, 12% de ácido acético glacial y etanol 20%).

La muestra fue desnaturalizada a 95C por 10 minutos con el amortiguador para proteínas (SDS 2%, Glicerol 10%, Tris HCl pH 6.8 0.8M, azul de bromofenol 0.01% y 2-mercaptoetanol 5%) Se colocaron 40 µg de muestra por pozo.

La electroforesis se llevo al cabo en una cámara Mini-PROTEAN[®] 3 Cell de BIORAD. Se aplicaron 100 volts por 45 minutos.

23.1. Tinción de gel.

Los geles de poliacrilamida son teñidos con azul de Coomasie (0.4% de azul de Coomasie, 12% de ácido acético glacial y etanol 20%). Se incubó a 56C durante 15 minutos. Se decantó la solución y se agregaron 10 ml de solución para desteñir (ácido acético glacial 20% y alcohol metílico al 4%) se incubó a 56C durante 15 minutos hasta observar las bandas.

23.2 Dot-Western blot.

Se realiza a una membrana de nitrocelulosa o PVDF.

1. Se bloquea con leche sveltys al 5% en TBS por 2 horas a temperatura ambiente.
2. Se agrega el primer anticuerpo en una dilución 1:200 en leche al 1% y TBS+0.1% de Tween 20(TTBS), se incuba por 2 horas a temperatura ambiente.
3. Se lava con TTBS cuatro veces.
4. Se agrega el segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa en una dilución 1:5000 en leche al 1% y TTBS.
5. Se lava con TTBS cuatro veces.
6. La membrana se reveló con sustrato para peroxidasa Opti4-CN (BIO-RAD 170-8235).

24. ELISA sándwich.

En una placa de 96 pozos se colocan 100µl a cada pozo de anticuerpo policlonal de conejo diluido 1:20 en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6.

1. Se incubó durante la noche a 4C.
2. Posteriormente se bloqueó con leche al 5% en TTBS durante 1 horas a 37C.
3. Se realizaron 4 lavados de 5 minutos con TTBS.
4. Se agregan las muestras en las líneas correspondientes.
5. Se incubó durante 1 hora a 37C.
6. Se repitió el paso de lavado.
7. Se agregó el anticuerpo monoclonal contra la gE acoplado a peroxidasa.
8. Se incubaron a 37C durante 1 horas.
9. Se repitió el paso de lavado.
10. Se agregó el sustrato para la peroxidasa (dicloro orto-phenylendiamina OPD) se diluyó en solución de citratos pH 4.5, 5 mg de OPD (Sigma P 6912) en 10 ml de solución de citratos + 4 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción fue detenida con 50 µl/pozo de una solución 2N de ácido sulfúrico.
11. La placa fue leída a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 de Labsystems.

25. ELISA de captura.

Los lisados de la gER, PrV, *Sf21* y EGFP fueron cuantificados. Los antígenos se diluyeron en una solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 En una placa de 96 pozos se colocaron 100 µl en cada pozo. Se incubó durante toda la noche a 4C.

1. La placa se lavó 3 veces con 200 µl/pozo de TTBS en agitación lenta por 5 minutos. Posteriormente se bloqueó con leche al 5% diluida con de TTBS a 37C durante 1 hora.
2. Se diluyó el primer anticuerpo 1:200 en TTBS y se adicionaron 100 µl en cada pozo. Se incubo a 37C durante 1 hora.
3. Se repitió el paso de lavado.
4. El conjugado (anti IgG de conejo marcado con peroxidasa) se diluyó 1:2000 en TTBS y se adicionaron 100 µl en cada pozo. Se incubo a 37C durante 1 hora.
5. Se repitió el paso de lavado.

6. El sustrato para peroxidasa (dicloro orto-phenyldiamina OPD) se diluyó en solución de citratos pH 4.5, 5 mg de OPD (Sigma P 6912) en 10 ml de solución de citratos + 4 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción fue detenida con 50 µl/pozo de una solución 2N de ácido sulfúrico.

La placa fue leída a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 de Labsystems.

26. Titulación por ELISA indirecta de los antígenos recombinantes obtenidos.

Los lisados de PrV, gER, Sf21 y AcNPV+EGFP se colocaron en una placa de 96 pozos y se les realizaron diluciones quintuples seriadas de 1:5 hasta 1:62500 en una solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6. se incubo toda la noche a 4C. Posteriormente se bloqueó a 37C durante 1 hora con leche descremada Sveltys al 5% en TTBS. La placa se lavó 3 veces con TTBS Se diluyó el primer antisuero 1:200 anti PrV en conejo en TTBS y se adicionaron 100 µl en cada pozo. Se incubo a 37C durante 1 hora. Se repitió el paso de lavado. Fueron agregados 100µl de conjugado anti IgG de conejo marcado con peroxidasa (SIGMA A-0545) que se diluyó 1:5000 en TTBS. Se incubo a 37C durante 1 hora. Se repitió el paso de lavado. Se adicionó el sustrato para peroxidasa OPD como se describió anteriormente. La reacción fue detenida con una solución 2N de ácido sulfúrico.

La placa fue leída a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 de Labsystems.

27. ELISA indirecta con sueros problema.

En una placa de 96 pozos se colocan 100µl a cada pozo de una dilución 1:250 del sobrenadante de los cultivos de células de insecto Sf21 que expresan la gER con una MOI de 1 y 48 horas de infección, en una solución amortiguadora de carbonatos 0.1M pH 9.6 se incubó toda la noche a 4C. Se lavó 3 veces con TTBS, posteriormente se bloqueó a 37C durante 1 hora con leche descremada Sveltys al 5% en TTBS. La placa se lavó en 3 ocasiones con TTBS. Fueron colocados 100µl de sueros de cerdos positivos y negativos en una dilución 1:2 con leche descremada Sveltys al 1% en TTBS fue incubada durante 1 hora

a 37C. Se repitió el paso de lavado. Se agregaron 100µl del conjugado anti IgG de cerdo marcado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch-114-035-003) que se diluyó 1:5000 en TTBS. Se repitió el paso de lavado. Se incubó a 37C durante 1 hora. Se repitió el paso de lavado. Se adicionó el sustrato para peroxidasa OPD como se ha descrito anteriormente. La reacción fue detenida con una solución 2N de ácido sulfúrico.

La placa fue leída a 492 nm en un espectrofotómetro Multiskan MCC/340 de Labsystems.