



USO DEL VECTOR pCI-neo PARA LA CLONACIÓN DEL GEN E2 DEL VIRUS DE LA FIEBRE PORCINA CLÁSICA (FPC)

Coba AMA^{1*}, Zapata LE¹, Socci G¹, Flores GHF², Gayosso VA², Alonso MRA², Loza-Rubio E¹, Correa P¹
¹CENID-Microbiología Animal-INIFAP; ²FMVyZ-UNAM-Genética y Bioestadística.
 E-mail: cobaayala@yahoo.com

INTRODUCCIÓN.

El virus de la FPC es altamente contagioso y la enfermedad es de importancia mundial por su impacto económico. La enfermedad es controlada básicamente mediante el uso de vacunas, especialmente vacunas vivas atenuadas que son seguras y eficaces. En programas de control en los países europeos, se han utilizado vacunas marcadas, como apoyo a los programas de erradicación (1). El gen de la glicoproteína E2 (gp55) del virus de la fiebre porcina clásica (FPC), estimula la producción de anticuerpos neutralizantes (1,2). Por esta razón ha sido utilizado para la elaboración de vacunas de ADN (3). Las vacunas de este tipo, consisten en un plásmido que tiene clonado un gen que codifica para una proteína inmunogénica; la expresión de este gen debe estar bajo el control de un promotor fuerte. De esta manera al ser inyectado en el tejido de un animal, el gen se expresa, generando una respuesta inmune que puede ser protectora. El objetivo de este trabajo fue clonar el gen E2 a partir de la cepa Ames del virus de la FPC.

MATERIAL Y MÉTODOS

Como primer paso, se llevó a cabo la amplificación del gen E2 del virus de FPC, mediante la RT-PCR, con el RNA viral, a partir de la cepa Ames; para identificar un fragmento de 1112 pb (que contiene la totalidad del genE2), Para ese fin se diseñaron un par de iniciadores, a los cuales se les adicionó un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción XbaI (E2F Xba ATT CTA GAA TGC AGC TAG CCT GCA AGG AAG ATY AC; E2R Xba ATT CTA GAT CAG GCG AGT TGT TCT GTT AMA ACT ATG). Este fragmento amplificado fue visualizado en un gel de agarosa al 1 %. Una vez corroborado por secuenciación que el fragmento obtenido por PCR correspondió al gen E2 del virus de FPC, fue preparado para llevar a cabo la clonación en el vector comercial T pTZ57R/T (Fermentas. USA) el cual esta linearizado. Con este vector se transformaron células competentes de *E. coli*, las cuales fueron propagadas en un medio sólido de LB con antibiótico (ampicilina) y se seleccionaron las clonas transformantes. Para llevar a cabo la clonación en el vector de expresión pCI-neo, el ADN del plásmido T fue digerido con la enzima XbaI, para liberar el fragmento del gen E2, que contiene los sitios cohesivos para XbaI. Este fragmento fue purificado y ligado al plásmido pCI-neo, también, previamente digerido con XbaI y desfosforilado. Las clonas resultantes fueron evaluadas por PCR para determinar la orientación de la clonación. El fragmento del gen E2 puede ser clonado en dos orientaciones, siendo solo una la correcta para poder ser expresada en forma

adecuada. Para esto se realizó un PCR empleando un iniciador que tiene la secuencia del promotor de la RNA polimerasa de T7 (pT7) y el iniciador E2FXba ó con pT7 y el iniciador E2RXba. La amplificación con este ultimo par de iniciadores identifica a las clonas correctamente orientadas. Con este nuevo vector se transformaron células competentes de *E. Coli*, y las clonas resultantes fueron evaluadas por PCR para determinar la orientación de las clonas.

Una vez seleccionadas las clonas que tienen el gen E2 en la dirección correcta, en el vector pCI-neo, fueron propagadas y posteriormente purificadas en una preparación libre de endotoxinas, para su futura evaluación de expresión del gen E2.

RESULTADOS

Se logró amplificar el producto esperado de 1112 pb del gen E2, del virus FPC a partir de la cepa Ames; y la clonación del mismo en el vector pCI-neo, obteniendo las clonas del gen E2, las cuales se propagaron y el ADN de interés purificado.

DISCUSIÓN

Se tienen trabajos donde se han realizado vacunas de ADN contra el virus de FPC, utilizando el gen E2 clonado en un vector de expresión, las cuales han sido evaluadas (4). El uso de esta tecnología se ha utilizado también para la elaboración de vacunas contra otras enfermedades con gran éxito, como diarrea viral bovina (5) e incluso para la obtención de proteínas recombinantes y su utilización como inmunógeno, como es la enfermedad de Aujeszky (4). La metodología realizada en este trabajo nos dio la pauta para poder obtener una vacuna de ADN a partir de la cepa Ames de FPC, con el gen E2 clonado en el vector pCI-neo, obteniendo clonas del gen E2 a partir de la cepa Ames, para poder ser evaluada como un posible inmunógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.-Moorman Rob JM.,Annemarie Bouma, Johannes A Kramps, Catharinus Terpstra, Hans J. de Smit.200 Vet.Microbiol 73 (2000)209-219.
- 2.- Coba AMA 2000. Tesis Maestría FES-C-UNAM.
- 3.- Markowska-Daniel I; Robert A. Collins, Zygmunt Pejsak. Vaccine 19(2001) 2480-2484.
- 4.- Andrew ME; Cj Moorissy; C Cenghaus; PG Oke; KW Sproat; ALM Hodgson;Ma Johonson; BEH Coupar. Vaccine 18 (2000)1932-1938.
- 5.- Horpin Sergé; David JHurley;Majambu Mbikay;Brian Talbot and Youssef. Journal of General Virology (1999), 80,3137-3144.

Trabajo parcialmente financiado por **SAGARPA-CONACYT (2004-C01-142)**.