

SELECCIÓN E IDENTIFICACION DE MIMOTOPOS DE LA PROTEÍNA N DEL VIRUS DE PRRS

Villa-Mancera, A.¹, Méndez-Mendoza, M.¹, Huerta-Crispín, R.¹, Netzi-Méndez, P.^{1*}, y Córdova-Izquierdo, A.²

¹FMVZ-BUAP. Puebla, México. ²UAM-Xochimilco. México, D.F.

abel.villa@gmail.com

Introducción

El virus del PRRS es uno de los patógenos más importantes que afecta a los cerdos, por ser un agente dinámico que evoluciona por mutación y recombinación.

En virtud de sus propiedades antigénicas y secuencia homologa, la proteína N es usada para la detección de anticuerpos del virus PRRS en sueros de cerdo y al mismo tiempo para la producción de reactivos de diagnóstico (1). Los anticuerpos monoclonales específicos a la proteína N son utilizados para diferenciar los aislados del virus del PRRS de tipo Americano y Europeo (2). El objetivo de este estudio fue seleccionar e identificar fagos filamentosos para el diagnóstico del virus de PRRS utilizando un anticuerpo monoclonal.

Material y métodos

Se adquirió una biblioteca combinatoria con fagos filamentosos (M13) que expone aleatoriamente péptidos de 7 aminoácidos en la región N-terminal fusionado con la proteína III (New England Biolabs, USA). Se realizaron tres rondas de selección utilizando la IgG anti-PRRS (SDOW17, Rural Technologies, USA). Posteriormente, los fagos eluidos fueron amplificados y concentrados utilizando polietilenglicol empleando procedimientos estándares. Un ELISA de fagos fue utilizado para confirmar la especificidad de las clonas positivas.

La secuencia de nucleótidos de los insertos del gen III fueron secuenciados con el cebador de secuenciación -96gIII 5'-HOCCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3' (New England Biolabs, USA) del kit de la biblioteca de exposición en fago utilizando el secuenciador automático Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer.

Resultados

Los fagos eluidos titulados se incrementaron de 3.2×10^6 unidades formadoras de colonias (ufc) en la primera ronda a 4.8×10^8 ufc en la tercera ronda. Después de tres rondas de selección, 10 clonas fueron picadas al azar, cada clona individual fue amplificada, purificada y titulada. La reactividad de la unión de las clonas a los anticuerpos anti-PRRS fue determinado utilizando un ELISA de fagos.

Diez secuencias de aminoácidos fueron alineadas con la secuencias de la proteína N del virus del PRRS obtenida del GenBank (ABU87632.1) Las secuencias de las clonas P01, P02, P03, P04 y P09 se localizaron a la mitad de la proteína N que consta de 123 a.a., principalmente entre los 52-78 a.a. Las clonas de fagos filamentosos P04 y P06 fueron localizadas en el extremo amino terminal y los aminoácidos en la posición 101 y 102; mientras que los péptidos P04 y P05 fueron alineados únicamente a la secuencia del extremo amino terminal de la proteína N. La clona P07 se ubicó en el extremo amino terminal y los aminoácidos en la posición 37 y 38. El anticuerpo monoclonal SDOW17

reconoce un epitopo discontinuo y conservado de la nucleocápside de los genotipos americano y europeo, que corresponden a los aminoácidos 30-52 y 112-113. La secuencia consenso de las diez clonas secuenciadas fue ANYRYQxV (Figura 1).

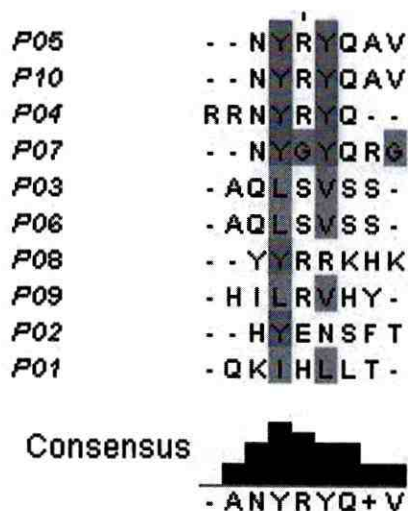


Figura 1. Secuencias de aminoácidos de clonas de fagos filamentosos seleccionados con el anticuerpo monoclonal (SDOW17) y secuencia consenso obtenidas con el software MIMOX.

Discusión

De 300 virus aislados del genotipo americano, el anticuerpo SDOW17 identificó a 99.4% de los virus aislados (3). Cinco dominios de la proteína N fueron obtenidos generando proteínas truncadas, el anticuerpo SDOW17 identificó un epitopo discontinuo que corresponden a los aminoácidos 30-52 y 112-123 de los dominios I y V, del genotipo americano (2). Así mismo, para el genotipo europeo, el epitopo en el dominio D se ubica entre las regiones de aminoácidos 51-67 y 80-90 (4). Plagemann *et al* (2005) demostraron que el anticuerpo monoclonal SDOW17 se une específicamente a proteínas N recombinantes, utilizando una placa de ELISA de un kit comercial (HerdCheck, IDEXX), el epitopo identificado corresponde a los aminoácidos del segmento 31-59, para el genotipo europeo.

Referencias

1. Dea *et al* (2000). *J. Virol. Methods*. 87:109-122.
2. Wootton *et al* (1998). *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 5:773-779.
3. Nelson *et al* (1993). *J. Clin. Microbiol.* 31:3184-3189.
4. Meulenber *et al* (1998). *Virology*. 252:106-114.
5. Plagemann (2005). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104:59-68.