

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA**  
**“ALBERTO CAZORLA TALLERI”**



**“EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VP1 DE SAPOVIRUS GI MEDIANTE EL  
SISTEMA DE BACULOVIRUS”**

**Jorge Manuel Fernández Torres**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**Lima-Perú**

**2017**

**ASESOR:**

**Dr. Holger Mayta Malpartida**

**Jurado Calificador:**

Presidente: Dra. Cristina Guerra Giraldez

Secretario: M.Sc. Jorge Rodríguez Bailón

Vocal: Dra. Patricia Herrera Velit

## DEDICATORIA

*A mis padres y hermana, por su ayuda constante en mi vida  
profesional y personal.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y hermana, por el apoyo brindado durante el periodo de estudios y profesional.

Al doctor Holger Mayta que, además de su amistad, me permitió y confió labores en el laboratorio de virología molecular, impulsándome a continuar y nunca desistir.

A los laboratorios de Biología molecular e Inmunología Parasitaria, a cargo de las doctoras Maritza Calderón y Manuela Verástegui, quienes me abrieron las puertas, compartiendo conmigo conocimiento y uso de material y equipo.

Finalmente, agradecer a mis amigos y colegas, Manuel Burga, Noelia Coronado, María Claudia Villegas, Alexandra Prado, Alejandra Pando y Claudina Sancho, por su amistad y apoyo incondicional.

### **Financiamiento**

Financiado por CIENCIACTIVA contrato N° 110-2015- FONDECYT

## ÍNDICE

CAPITULO I.....	1
Introducción.....	1
Antecedentes.....	1
1.1 Historia, Clasificación y Datos Epidemiológicos. ....	1
1.2 Organización Genética y Estructura.....	3
1.3 Sistema de expresión de Baculovirus para la generación de Proteínas Recombinantes.....	6
CAPITULO II.....	9
Hipótesis y Objetivos.....	9
2.1 Hipótesis.....	9
2.2 Objetivos.....	9
CAPITULO III.....	10
Materiales y métodos.....	10
3.1 Extracción de RNA Viral.....	10
3.2 Diseño de cebadores para la amplificación del Gen VP1, elección de enzimas de restricción y análisis in silico.....	10
3.3 Amplificación del Gen VP1 mediante RT-PCR.....	15
3.4 Digestión enzimática por enzimas de restricción. ....	15
3.5 Ligamiento del gen VP1 dentro del vector donador PFastBac-HTa.....	16
3.6 Transformación bacteriana y extracción de ADN plasmídico para la obtención del vector PFastBac-HTa recombinante.....	16
3.7 Análisis y confirmación de la inserción del gen VP1 en el vector donador PFastBac-HTa.....	18
3.8 Transformación en Bacterias DH10Bac y Generación de b́acmidos recombinantes.....	18

3.9 Aislamiento de bácmidos recombinantes y Análisis de la transposición del gen VP1 en el genoma de baculovirus. ....	19
3.10 Transfección en células de Insecto Sf9 con el bácmido recombinante.....	20
3.11 Obtención de la primera Generación de Baculovirus recombinantes.....	20
3.12 Aislamiento de DNA viral para la detección del gen VP1 en genoma de Baculovirus recombinantes.....	20
3.13 Detección de la proteína mayor de cápside VP1 mediante Western Blot.....	21
CAPITULO IV.....	22
Resultados.....	22
4.1 Diseño de Cebadores y Selección de enzimas de Restricción. ....	22
4.2 Obtención y Amplificación del Gen VP1 mediante RT-PCR. ....	22
4.3 Digestión enzimática mediada por enzimas de restricción. ....	22
4.4 Análisis del clonamiento del gen VP1 en el vector PFastBac-HTa.....	26
4.5 Aislamiento del bácmido recombinante y análisis por PCR.....	29
4.6 Mantenimiento y Transfección de células Sf9.....	31
4.7 Confirmación de la presencia del gen VP1 en genoma de baculovirus recombinantes post-transfección. ....	33
4.8. Análisis de la presencia de la proteína VP1 mediante Western Blot.....	34
CAPITULO V.....	35
Discusión.....	35
Conclusiones.....	40
Recomendaciones.....	41
Anexos.....	42
Referencias.....	44

## Índice de Tablas

1. Tabla 1. Secuencias del gen VP1 de Sapovirus GI.1 reportadas en el Centro Nacional de información en Biotecnología (NCBI, Estados Unidos).....	11
2. Tabla 2. Nombre y secuencia de cebadores utilizados en el sistema de expresión por Baculovirus.....	12
3. Tabla 3. Concentración de plásmidos PFastBac-HTa Recombinantes (PFBR).....	29
4. Tabla 4. Concentración de Búcmidos recombinantes (BR).....	30

## Índice de Figuras

1. Figura 1, Organización del Genoma de Sapovirus GI.1. ....	4
2. Figura 2, Estructura Molecular de la Capside de Sapovirus.....	5
3. Figura 3, Generación de Antígenos de Norovirus mediante sistemas de expresión de proteínas. ....	8
4. Figura 4, Mapa del Vector Donador PFastBac-HTa.....	13
5. Figura 5, Metodología en el sistema de expresión de Baculovirus. ....	14
6. Figura 6, Ligamiento In silico del Gen VP1 de Sapovirus GI.1 en el vector PFastBac-HTa.....	17
7. Figura 7, Amplificación del gen VP1 de Sapovirus GI.1 mediante PCR. ....	24
8. Figura 8, Purificación del producto de PCR del gen VP1.....	25
9. Figura 9, Digestión enzimática del gen VP1 y vector PFastBac-HTa.....	26
10. Figura 10, Ligamiento del gen VP1 en el vector PFastBac-HTa. ....	27
11. Figura 11, Análisis por Secuenciación de la inserción del Gen VP1 en el vector PFastBac-HTa. ....	28
12. Figura 12, Análisis de bacmidos recombinantes mediante PCR. ....	30
13. Figura 13, Células Sf9. ....	31
14. Figura 14, Células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes. ....	32
15. Figura 15, Células Sf9 como control negativo en el proceso de transfección.....	32
16. Figura 16, Presencia del Gen VP1 de Sapovirus GI.1 en el genoma de baculovirus recombinantes post-transfección. ....	33
17. Figura 17, Análisis por western Blot de la presencia de la proteína VP1.....	34
18. Figura 18, Análisis in silico del proceso de traducción en el vector PFastBac-HTa.....	38

## **Lista de abreviaciones**

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

Ab: Anticuerpo

PBS: Buffer Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

IgA: inmunoglobulina A

IgM: inmunoglobulina M

IgG: inmunoglobulina G

pb: pares de bases

Kb: Kilo Bases

kDa: Kilo Daltons

ORF: marco de lectura abierto (Open Reading Frame)

RdRp: RNA polimerasa dependiente de RNA (RNA-Dependent RNA Polymerase)

Rpm: Revoluciones por minuto

Ufp: Unidades formadoras de placa

ng: Nanogramos

ml: Mililitros

$\mu$ l: Microlitros

$\mu$ M: micromolar

mA: Mili Amperios

PFBR: PFastBac Recombinante

BR: Bácido Recombinante

## Glosario

**Pseudo-partículas Virales:** Partículas virales conformadas por las proteínas estructurales de un virus sin material genético en su interior, por lo que son consideradas no infecciosas. Se emplean como antígenos inocuos en el desarrollo de vacunas o para la detección de anticuerpos.

**Baculovirus:** Virus envuelto de DNA de aproximadamente 123 000 pares de bases, capaz de infectar insectos del orden lepidóptera, hymenoptera y díptera.

***E. coli* DH10Bac:** Estas bacterias resistentes a kanamicina y tetraciclina, presentan un b́acmido que contiene el genoma de baculovirus modificado, además de un plásmido auxiliar que codifica una transposasa, permitiendo la transposición del gen de interés (contenido en el vector PFastBac) dentro del genoma de baculovirus sin alterar el marco de lectura abierto, confiriendo resistencia a gentamicina.

**Transposición:** Método de recombinación del DNA en el cual una secuencia es transportada hacia otra sección del genoma por acción de una transposasa.

**Vector PFastBac-HTa:** Vector donador de genes que presenta secuencias transponibles reconocidas en el b́acmido presente en bacterias DH10Bac. Además, presenta un sitio de inserción múltiple para el ligamiento de un gen de interés en el vector.

**B́acmido:** Vector de DNA capaz de ser propagado células bacterianas y de insecto, el cual contiene el genoma de baculovirus modificado, con secuencias transponibles para la inserción de genes codificantes de proteínas presentes en el vector PFastBac. Además, tiene el gen LacZ en la secuencia de transposición para la selección fenotípica de colonias recombinantes.

**Células Sf9:** Línea celular primaria aislada a partir de tejido ovárico de polilla *Spodoptera frugiperda* que es capaz de crecer en medio libre de suero, adaptándose a cultivo en suspensión. Son utilizadas como sistema de expresión de proteínas mediante la infección por baculovirus recombinantes que expresan un gen de interés.

**Medio S.O.C:** Medio de cultivo utilizado en procesos de transformación bacteriana que aumenta la eficiencia en *Escherichia coli*. Entre sus componentes destacados se encuentran glucosa, cloruro de magnesio y sulfato de magnesio.

## ABSTRACT

**Background:** Sapovirus is a causative agent of acute gastroenteritis worldwide. Human Sapovirus are classified into four genogroups (GI, GII, GIV, GV) based on the sequence encoding the major capsid protein VP1. Although genogroups of Sapovirus show different levels of prevalence, most outbreaks and sporadic cases of acute gastroenteritis are caused by Sapovirus GI. Due the lack of a cell culture, the expression of virus-like particles based on the major capsid protein VP1, has been established as an effective method for analyzing seroprevalence and immunogenicity tests. This study aims to express the VP1 from Sapovirus GI.1 using the baculovirus system, to further development immunological methods of diagnosis and conduct seroprevalence studies in Peru.

**Methods:** The VP1-encoding gene of Sapovirus GI.1 was amplified by PCR, cut by enzymatic restriction and ligated into donor vector PFastBac-Hta. DH10Bac *E. coli* cells were transformed with the recombinant PFastBac-Hta donor vector for gene transposition into the baculovirus genome (Bacmid). Recombinant bacmid was purified and used to transfect Sf9 insect cells. Detection of VP1 protein expression was performed by western blot with Anti-His antibody.

**Results:** Sapovirus GI.1 VP1 gene was amplified and inserted into FastBac-HTa donor vector, maintaining the correct reading frame for VP1 expression. Transformation of DH10Bac *E. coli* cells with recombinant PFastBac-Hta vector, led to site-specific transposition of the VP1 gene into the baculovirus genome assembling a recombinant bacmid. Transfection of Sf9 cells produced recombinant particles of baculovirus. Western blot expected analysis showed a single protein band corresponding with the size of the recombinant VP1 protein.

## KEY WORDS

Sapovirus, Gastroenteritis, Capsid Protein, Baculovirus, Virus-like particles.

## RESUMEN

**Antecedentes:** Sapovirus es un agente causante de gastroenteritis aguda a nivel mundial. Los Sapovirus humanos se clasifican en cuatro genogrupos (GI, GII, GIV, GV) según la secuencia que codifica la proteína mayor de cápside VP1, siendo el genogrupo GI el causante de la mayoría de brotes o casos esporádicos de gastroenteritis. Debido a la falta de un cultivo celular, la expresión de pseudo-partículas virales en base a la proteína mayor de cápside VP1 ha sido establecida como un método eficaz para el análisis de seroprevalencia y ensayos de inmunogenicidad. El presente estudio tiene como objetivo expresar la proteína VP1 de Sapovirus GI.1 mediante el sistema de baculovirus, por su potencial para desarrollar métodos de diagnóstico inmunológicos y estudios de seroprevalencia en el Perú.

**Métodos:** El gen codificante de la proteína VP1 de Sapovirus GI.1 fue amplificado mediante PCR, sometido a restricción enzimática y ligado en el vector donador PFastBac-HTa. Luego, se transformaron bacterias de *Escherichia coli* DH10Bac para la transposición del gen VP1 en el genoma de baculovirus (bácmido). El bácmido recombinante purificado fue empleado para la transfección de células Sf9. La expresión de la proteína VP1 se corroboró mediante Western Blot empleando anticuerpos Anti-His.

**Resultados:** Se obtuvo la amplificación del gen VP1, que se clonó en el vector PfastBa-HTa manteniendo el marco de lectura para la expresión de VP1. La transformación en bacterias DH10Bac con el plásmido PfastBa-Hta recombinante condujo a la transposición sitio-específica del gen VP1 en el genoma de baculovirus. La transfección de células de insecto Sf9 generó partículas recombinantes de baculovirus. El análisis por western blot de recombinantes seleccionadas mostró la presencia de una sola banda proteica compatible con el tamaño de la proteína recombinante VP1.

## PALABRAS CLAVE

Sapovirus, Gastroenteritis, Proteína de Cápside, Baculovirus, Pseudo-partículas virales.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Sapovirus es un agente infeccioso perteneciente a la familia *Caliciviridae* causante de gastroenteritis aguda a nivel mundial que afecta principalmente a pacientes pediátricos y adultos mayores<sup>1,2</sup>. En general, Sapovirus es causante de brotes en lugares cerrados o semi-cerrados, como hospitales, centros militares, guarderías y cruceros, además de casos esporádicos de gastroenteritis, donde la principal causa de contagio es la ruta fecal-oral o la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas<sup>3</sup>. Por otro lado, Sapovirus es también un patógeno que afecta animales, como cerdos, perros y leones marinos, por lo que estaría involucrado un mecanismo de infección por zoonosis<sup>4</sup>.

### 1.1 Historia, clasificación y datos epidemiológicos.

Sapovirus fue aislado por primera vez en 1976 en Reino Unido, a partir de una muestra de heces de un paciente con diarrea aguda<sup>5</sup>. Posteriormente, fueron reportados más casos de diarrea siendo Sapovirus el agente etiológico, por lo que fue considerado como un agente causante de gastroenteritis aguda<sup>6</sup>. Pese a ello, su diagnóstico es poco común debido a la alta prevalencia de otros virus entéricos, como Norovirus y Rotavirus, además de la falta de un buen sistema de diagnóstico rutinario que permita la fácil identificación de Sapovirus en muestras de heces, el cual pueda ser implementado fácilmente en hospitales y centros de salud<sup>7</sup>.

Actualmente Sapovirus es clasificado en cinco Genogrupos (GI, GII, GIII, GIV y GV) en base a la secuencia de nucleótidos que codifican la proteína mayor de cápside VP1, de los cuales, GI, GII, GIV y GV infectan al humano, mientras que GIII es patógeno del cerdo<sup>8</sup>. Sin embargo, debido a la presencia de Sapovirus en diversos animales y a la alta variabilidad genética, otros autores proponen una clasificación más diversa que incluyen catorce Genogrupos<sup>9-10</sup>

Por otro lado, los genogrupos GI y GII han sido subclasificados en siete genotipos (GI.1-7 y GII.1-7) los cuales desarrollan una respuesta inmunológica diferente<sup>11</sup>, generando la posibilidad de una reinfección por Sapovirus<sup>12</sup>.

La detección de Sapovirus se da principalmente mediante técnicas en biología molecular. Entre ellas, la más destacada es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), además de la reacción en cadena de la polimerasa de tipo convencional (PCR)<sup>13</sup> y técnicas de Inmunoensayo<sup>14</sup>.

Estos métodos permitieron identificar contaminación con Sapovirus en diversas fuentes, desde aguas residuales y tratadas, hasta alimentos de origen marino, como ostras y mariscos destinados al consumo humano<sup>15</sup>; además han permitido estudios de prevalencia de Sapovirus a nivel mundial. La prevalencia varía en función de los países que han reportado casos de gastroenteritis, variando significativamente según genogrupo y genotipo<sup>15</sup>. Sapovirus GI.1 y GI.2 son diagnosticados en la mayoría de casos de gastroenteritis aguda e identificados en diversos estudios epidemiológicos, sin embargo, no existe información consistente acerca del genotipo dominante<sup>16</sup>.

Se ha sido estudiado en diversos países la prevalencia de Sapovirus en pacientes con gastroenteritis aguda. En Tehran, Irán, se analizaron muestras de heces de pacientes con gastroenteritis asistidos al hospital del niño Shohadaye Tajrish y Mofid, donde se reportó una prevalencia del 11.9%, siendo el genotipo GI.2 el de mayor incidencia<sup>17</sup>. En Estados Unidos, el departamento de salud pública de Oregon y Minnesota, realizó un estudio sobre brotes de gastroenteritis aguda en ambos estados reportándose una prevalencia del 23% de Sapovirus como agente causante del cual, el 71% fue causado por Sapovirus GIV<sup>18</sup>, mientras que en Suecia, la prevalencia de Sapovirus fue del 1.3% en base a muestras recolectadas de distintos centros de salud en todo el país<sup>19</sup>. De igual forma en Yokohama, Japón, se reportó un brote epidémico en una escuela primaria causado por Sapovirus GV<sup>20</sup>.

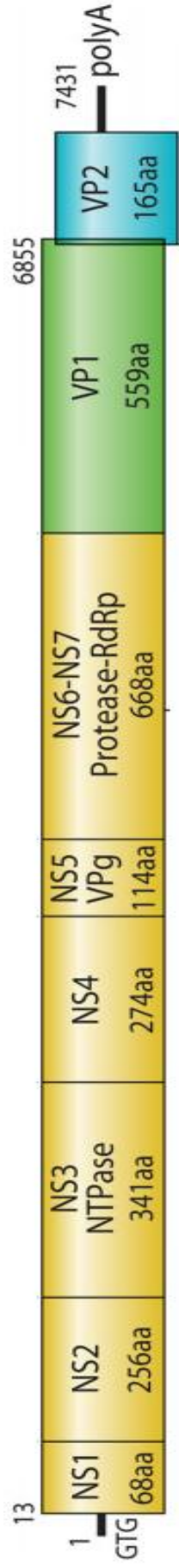
En Perú, un estudio de cohorte en una población infantil periurbana en Lima, el 13,2% de los niños son infectados con Sapovirus durante el segundo año de vida<sup>21</sup>. Por otro lado, Sapovirus presenta una prevalencia del 10% en casos de gastroenteritis aguda en niños menores de cinco años atendidos en el Hospital del niño (Lima), siendo el genogrupo I como predominante (Datos sin publicar, Sánchez et al, Laboratorio de virología molecular y nanotecnología, Universidad Peruana Cayetano Heredia,).

Sapovirus ha sido reportado en pacientes asintomáticos lo que ha permitido una fácil diseminación de partículas infecciosas que conllevan a la expansión de un brote<sup>22</sup>. Estudios de seroprevalencia de Sapovirus estiman que la mayor tasa de infección ocurre en niños después de los 2 años de edad, encontrando anticuerpos en más del 90% de muestras analizadas<sup>23</sup>, los cuales persisten hasta la edad adulta, con una prevalencia del 80 al 100% de las muestras analizadas<sup>24</sup>, lo que indicaría que las infecciones por Sapovirus se dan por lo menos una vez durante la vida de un individuo.

## **1.2 Organización genética y estructura:**

El genoma de Sapovirus presenta una cadena simple positiva de RNA, con una longitud de entre 7.1 a 7.7 kilo bases. Su genoma contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF), de los cuales el ORF1 codifica proteínas no estructurales, como la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRp) y la proteína mayor de cápside VP1 mientras que el ORF2 codifica la proteína menor de cápside VP2 (Figura 1). Algunos genogrupos de Sapovirus (GI, GIV y GV) contienen un tercer marco de lectura abierto, sin embargo, se desconoce la función de la proteína que codifica<sup>25</sup>.

La poliproteína traducida a partir del ORF1 es procesada en seis proteínas no estructurales y la proteína mayor de cápside VP1, por una proteasa propia del virus<sup>26</sup>. Entre las proteínas no estructurales mejor estudiadas, se encuentra la RNA polimerasa dependiente de RNA, la cual es esencial para la replicación del genoma que será empaquetado en las nuevas partículas infecciosas. Además, la secuencia codificante de la RNA polimerasa dependiente de RNA ha sido considerada para la genotipificación de Sapovirus, al igual que la secuencia de la proteína de cápside VP1<sup>27</sup>, en base

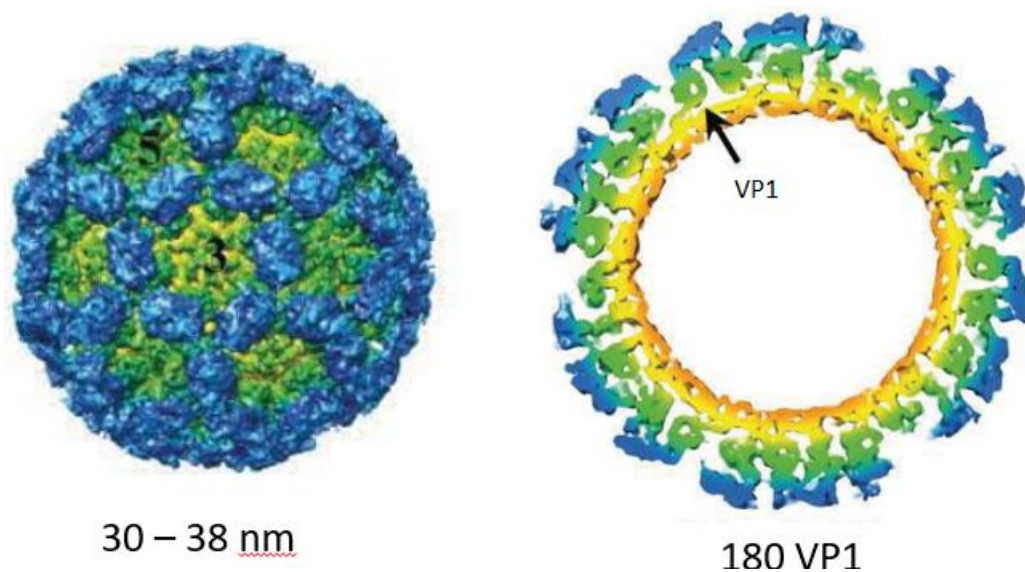


**Figura 1, Organización del genoma de Sapovirus GI.1.** El genoma de Sapovirus GI (7431 pb) comprende de dos Marcos de Lectura Abierto, el primero, codificante de proteínas no estructurales, como la ARN polimerasa dependiente de ARN, además de la proteína mayor de capsido VP1. Por otro lado, el segundo marco de lectura codifica la proteína menor de capsido VP2. Adaptado de Comprehensive review of human Sapoviruses, Oka et al. 2015 <sup>3</sup>.

a ello, se ha reportado casos de cepas recombinantes en Sapovirus, donde la secuencia de la RNA polimerasa dependiente de RNA pertenece a un genogrupo, mientras que la secuencia codificante de la proteína de cápside VP1 pertenece a otro distinto<sup>28</sup>, lo que indicaría una reasociación genética o recombinación homóloga entre los diversos genogrupos y genotipos de Sapovirus durante la replicación.

Al igual que otros miembros de la familia caliciviridae, Sapovirus no es cultivable, lo que ha imposibilitado el estudio in vitro de los procesos durante el ciclo infeccioso así como la identificación de los receptores de unión del virus. Sin embargo, estudios en Sapovirus porcino indicarían que los receptores del virus serían los ácidos salicílicos presentes en las glicoproteínas del tracto gastrointestinal<sup>29</sup>.

En base a la estructura, la proteína mayor de cápside VP1 (60 kDa) es esencial en la formación de partículas infecciosas (Figura 2), mientras que la proteína VP2 o proteína menor de cápside actúa como una coraza interna que estabiliza la estructura del virión<sup>30</sup>. Además, VP1 es la única proteína viral de Sapovirus la cual tiene contacto con los anticuerpos circulantes debido su exposición antigénica en la estructura de cápside<sup>31</sup>.



**Figura 2, Estructura molecular de la cápside de Sapovirus.** La estructura de Sapovirus es conformada por la interacción de 180 proteínas VP1, conformando la cápside de aproximadamente 38 nm. Adaptado de Antigenic and Cryo-Electron Microscopy Structure Analysis of a Chimeric Sapovirus Capsid, Miyazaki et al, 2016<sup>31</sup>.

### **1.3 Sistema de expresión de baculovirus para la generación de proteínas recombinantes**

El sistema de baculovirus ha conducido a la expresión eficaz de proteínas de diversos organismos eucariontes debido a la capacidad de realizar procesos post-traduccionales requerido para la obtención de proteínas recombinantes similares con las proteínas originales. Baculovirus es un virus de DNA de doble cadena de aproximadamente 153 mil pares de bases que infecta insectos del orden lepidoptera, hymenoptera, díptera, coleoptera y trichoptera<sup>32</sup>. Durante el ciclo infeccioso, baculovirus inserta su genoma de DNA dentro del núcleo celular, donde la maquinaria de traducción propia de la célula permite expresar proteínas virales. Debido a ello, y a la capacidad de cultivar células de insecto in vitro, baculovirus ha sido modificado para insertar genes foráneos dentro de su genoma para la expresión de proteínas recombinantes<sup>33</sup>. Sumado a ello, existen ciertas ventajas con respecto a la expresión de proteína recombinantes mediante el sistema de baculovirus, como la fácil manipulación de células de insecto y su capacidad para crecer en cultivos en suspensión, altos niveles de expresión, modificaciones post-traduccionales e inocuidad para el humano<sup>34</sup>.

En 1983, G. Smith y colaboradores reportaron por primera vez el uso del genoma de baculovirus como vector de expresión de proteínas recombinantes. En el estudio, se logró expresar el interferón beta humano obteniendo proteínas recombinantes funcionales en mayor concentración en comparación del sistema de expresión por *Escherichia coli*<sup>35</sup>.

De igual forma, el sistema de baculovirus ha logrado la expresión de pseudo-partículas virales de miembros de la familia caliciviridae, utilizados en estudios de seroprevalencia, ensayos de inmunogenicidad y antigenicidad, unión a receptores y en la obtención de anticuerpos para el desarrollo de ensayos inmunológicos (ELISA) para la captura de coproantígenos<sup>36</sup>. Sin embargo, diversos estudios que revelan diferencias significativas en estructura y longitud de las proteínas expresadas mediante Baculovirus, en comparación de las partículas originales<sup>37</sup>.

Diversos estudios han reportado la formación de pseudo-partículas virales en base a la expresión de la proteína VP1 de Sapovirus. En el 2008, Hansman y colaboradores expresaron la secuencia correspondiente al marco de lectura abierto 1 (ORF 1) de la variante Mc114 de Sapovirus GI mediante el sistema de baculovirus, el cual generó una poliproteína conteniendo las proteínas no estructurales y la proteína mayor de cápside VP1. Tras el clivaje por acción de la proteasa viral, se evidenció la formación de pseudo-partículas virales por la agrupación de VP1 recombinantes<sup>38</sup>.

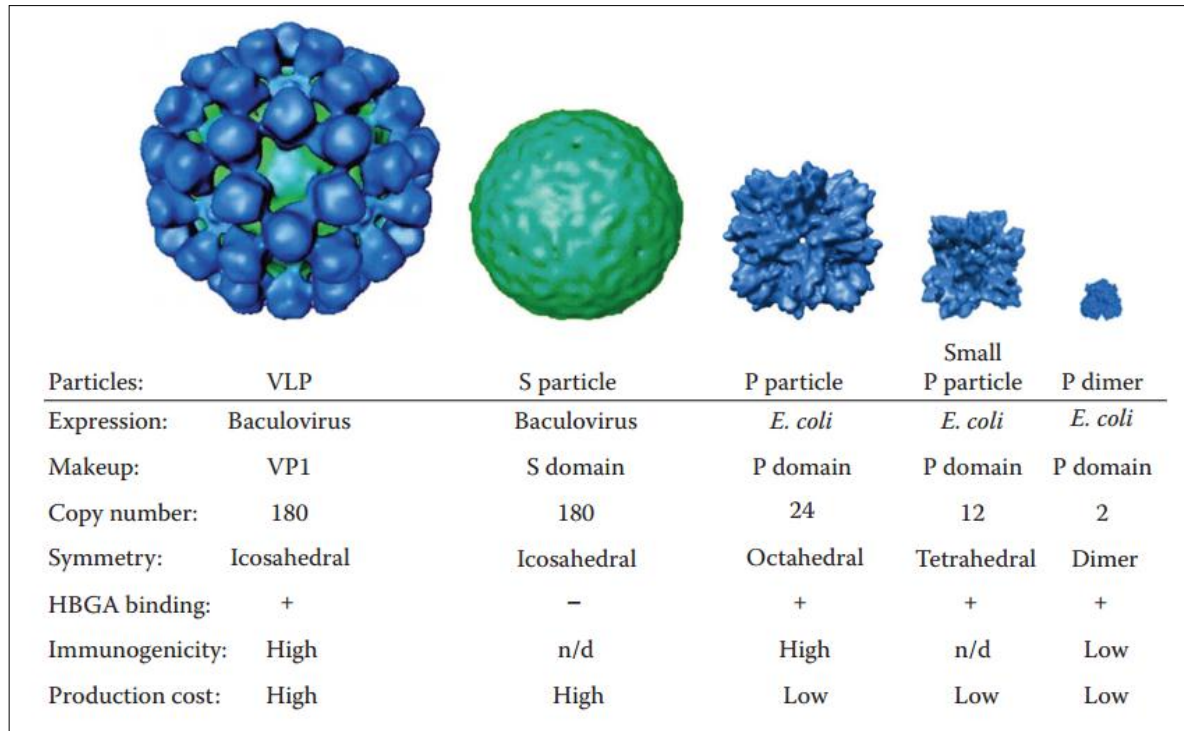
De igual forma, Oka y colaboradores reportaron la expresión de la proteína VP1 de Sapovirus GI.1, GII.3, GIV y GV, la cual condujo a la formación de pseudo-partículas virales mediante en el sistema de baculovirus con características similares a las estructuras nativas. Además, el suero Anti-VP1 de Sapovirus GI reaccionó de forma positiva ante la proteína VP1 de Sapovirus GV mediante western blot, indicando la existencia de epítopes conservados debido a la similitud genética entre ambos genogrupos<sup>39</sup>.

Actualmente, Sapovirus no presenta un sistema de cultivo celular lo que retrasa la búsqueda de fármacos y nuevos sistemas de tratamiento además de la obtención de una vacuna. Sin embargo, el desarrollo de nuevos métodos en la expresión de proteínas ha permitido la obtención de antígenos inmunogénicos de Sapovirus y Norovirus (Figura 3), los cuales han permitido estudios de inmunogenicidad y el desarrollo de posibles candidatos a vacunas<sup>40</sup>.

En el Perú no se ha sido estudiada la seroprevalencia de Sapovirus debido a la falta de producción de antígenos recombinantes virales. De igual forma, el sistema de expresión de baculovirus no ha sido implementado en gran escala y de forma rutinaria el país, limitando la producción de proteínas recombinantes.

Debido a ello, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo la expresión de la proteína mayor de cápside de Sapovirus GI.1, el cual será usado como antígenos recombinantes que permitirán posteriores análisis de seroprevalencia además del desarrollo de técnicas de diagnóstico en base a

la detección de inmunoglobulinas IgA en saliva y heces, e IgM e IgG en muestras de suero<sup>41</sup>.



**Figura 3, Generación de antígenos de Norovirus mediante sistemas de expresión de proteínas.** La expresión de antígenos de Norovirus en *Escherichia coli* ha conducido a la formación de estructuras inmunogenicas sin semejanza a particulas nativas del virus, sin embargo, el sistema de Baculovirus conduce a la formación de Pseudo-particulas virales en base a la expresión de la proteína VP1, con altos niveles de inmunogenicidad Adaptado de Viral Nanotechnology, Khudyakov y Puempens, 2015 <sup>51</sup>.

## CAPÍTULO II

### HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 2.1 Hipótesis

- El sistema de Baculovirus permite la correcta expresión de la proteína mayor de Cápside VP1 de Sapovirus GI.1.

#### 2.2 Objetivos

##### *Objetivo general*

- Expresar mediante el sistema de Baculovirus la proteína mayor de cápside de Sapovirus GI.1 proveniente de una cepa aislada en Perú.

##### *Objetivos específicos*

- Diseñar cebadores específicos para la amplificar la secuencia del gen VP1 de Sapovirus GI.1.
- Aislar y amplificar el gen que codifica la proteína mayor de cápside VP1 de Sapovirus GI.1 a partir de una muestra autóctona del Perú.
- Insertar el gen codificante de la proteína VP1 en el genoma de Baculovirus mediante la transposición con el bÁcmido.
- Inducir la expresión de la proteína VP1 en células *Sf9* infectadas con baculovirus recombinantes.
- Detectar la expresión de la proteína mayor de cápside VP1.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Extracción de RNA viral

La extracción de RNA viral se realizó a partir de una muestra de heces identificada positiva para Sapovirus GI.1. La extracción se realizó mediante el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania) según protocolo de fabricante, en el cual, se añade 560µL de buffer AVL-Carrier a 140µL de muestra de heces resuspendida en buffer PBS. Luego de una incubación durante 10 minutos, se agrega 560µL de etanol absoluto, centrifugando a 14000 rpm durante 1 minuto. Luego, la muestra es sometida a lavado a través de columna de sílica, por medio de los buffers AW1 (500 µL) y AW2 (500 µL), centrifugando a 8000 rpm y 14000 rpm respectivamente. Finalmente, el RNA viral es eluido añadiendo 70µL de buffer AVE, centrifugando a 8000rpm durante 3 minutos.

#### 3.2 Diseño de cebadores para la amplificación del Gen VP1, elección de enzimas de restricción y análisis *in silico*.

Se realizó un alineamiento de las 6 secuencias completas correspondientes al gen de la proteína VP1 (reportadas en el NCBI, tabla 1) con el uso del programa bioinformático Unipro UGENE (UniPro, Rusia) para la obtención de una secuencia consenso tomada como base para la creación de cebadores que permitan la amplificación del gen VP1 de Sapovirus GI.1.

En el sistema de baculovirus, el primer paso es la inserción del gen de interés en el plásmido donador (vector de transferencia) PFastBac-HTa (Figura 4), el cual permitire su transposición en el bácmido que contiene el genoma de baculovirus, permitiendo su expresión (Figura 5)<sup>42</sup>. Debido a que la inserción del gen VP1 dentro del plásmido donador PFastBac-HTa está mediado por procesos de ligación, es necesaria la digestión previa con enzimas de restricción tanto del gen como del vector. Para ello, se analizó el corte por enzimas de restricción *in silico* con ayuda del programa bioinformático SnapGene (GLS Biotech, Estados Unidos) con la finalidad de seleccionar enzimas que no realicen cortes dentro del gen, permitiendo el proceso de

ligación en el vector PFastBac-HTa, siendo las enzimas seleccionadas NotI y XhoI. Los primers fueron creados a partir de las secuencias en los extremos de las regiones 5' y 3' del gen VP1, además, se añadieron las secuencias de las enzimas NotI y XhoI en la región 5' de los cebadores Directo y Reverso respectivamente (tabla 2), los cuales formaron los extremos cohesivos en el gen VP1, permitiendo su inserción en el plásmido PFastBac-HTa.

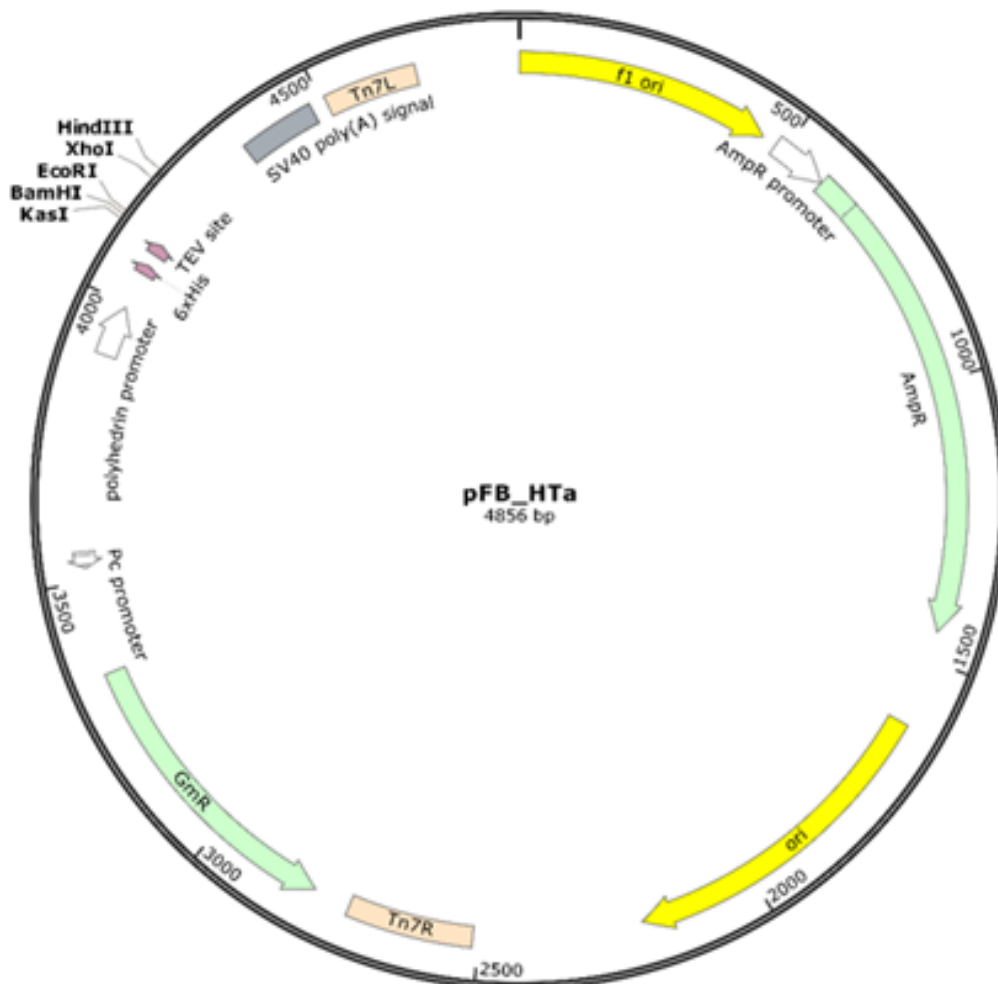
**Tabla 1, Secuencias del gen VP1 de Sapovirus GI.1 reportadas en el Centro Nacional de información en Biotecnología (NCBI, Estados Unidos).** *Las secuencias fueron tomadas como base para el alineamiento y obtención de la secuencia consenso del gen VP1.*

Variante	Secuencia reportada	Código de acceso NCBI
Sapporo	Polimerasa - VP1	U65427
MT	Genoma completo	HM002617
Manchester	Genoma completo	X86560
Mc114	Genoma completo	AY237422
Dresden	Genoma completo	AY694184
Lyon-30388	VP1 - VP2	AJ251991
N21	Genoma completo	AY237423
Chanthaburi-74/Thailand	Genoma completo	AY646854
NongKhai-50/Thailand	Genoma completo	AY646853

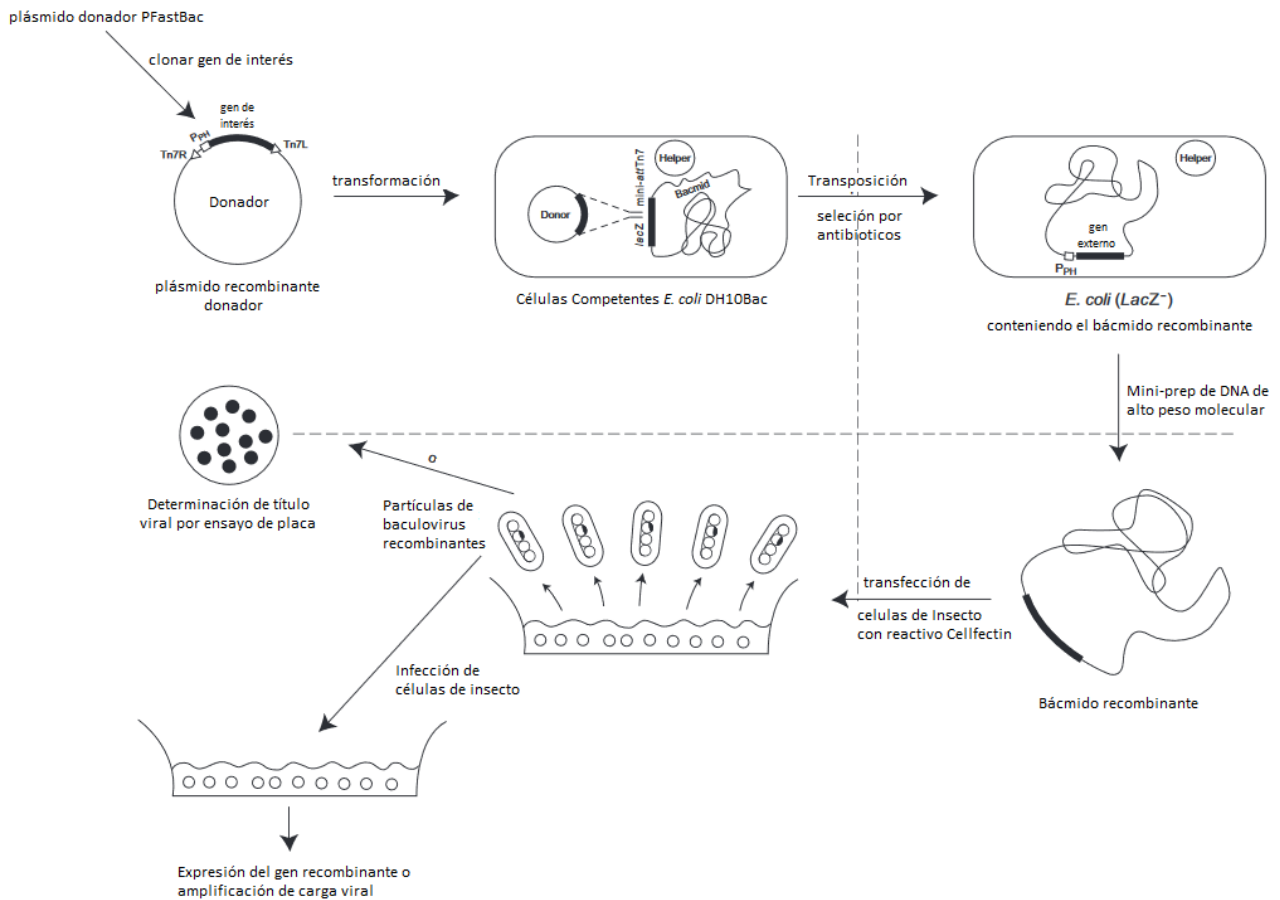
**Tabla 2, Nombre y secuencia de cebadores utilizados en el sistema de expresión por Baculovirus**

<i>Primer</i>	<i>Secuencia (5' → 3')</i>	<i>Polaridad</i>	<i>Blanco</i>	<i>Referencia</i>
Savl_VP1F_NotI	AATT <u>GCGGCCGCTT</u> ATGGAGGGCAATGGCTCCAATC <b>CAGAGC</b>	Directo	VP1	Diseñado en este estudio
Savl_VP1R_XhoI	TTAACTCGAGT <b>CATTGGAACACCCGTCTGGCCCTTCC</b> <b>CATGTTCCCAC</b>	Reverso	VP1	Diseñado en este estudio
pFastBacF	GGATTATTCATACCGTCCCA	Directo	PFastBac vector	Macrogen
pFastBacR	CAAATGTGGTATGGCTGATT	Reverso	PFastBac vector	Macrogen
pUC/M13 Forward	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	Directo	Bacmido	Invitrogen
pUC/M13 Reverse	AGCGGATAACAATTTACACAGG	Reverso	Bacmido	Invitrogen

*La región subrayada indica la secuencia de restricción enzimática, la región resaltada corresponde a la secuencia del gen VP1.*



**Figura 4, Mapa del vector donador PFastBac-HTa.** Se observa la presencia de la secuencia del sitio de inserción múltiple del gen de interés mediante restricción enzimática, además de la conferencia de resistencia a Ampicilina y Gentamicina. Las secuencias Tn7R y Tn7L permiten la transposición sitio-especifica en el báculo, permitiendo la inserción del gen de interés en el genoma de baculovirus. Además, agrega a la proteína recombinante una secuencia de 6 histidinas y un sitio de reconocimiento de la Proteasa TEV. Adaptado de SnapGene Software, GLS Biotech, 2015.



**Figura 5, Metodología en el sistema de expresión de Baculovirus.** El sistema de expresión de proteínas de Baculovirus se basa en la inserción de un gen de interés en un bacmido mediante transposición sitio-específica en bacterias DH10Bac. El bacmido recombinante obtenido es transfectado en células de insecto capaces de producir baculovirus recombinantes, conteniendo en su genoma la secuencia del gen de interés conduciendo a su expresión durante el proceso de infección celular. Adaptado de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins, Invitrogen, 2015 <sup>42</sup>.

### **3.3 Amplificación del Gen VP1 mediante RT-PCR.**

Se convirtió 7  $\mu\text{L}$  de RNA viral extraído a cDNA mediante el kit de retro-transcripción SuperScript III Reverse Transcriptase, según protocolo del fabricante (Invitrogen, Estados Unidos). Posterior a ello, se empleó 1  $\mu\text{L}$  de cDNA como templado para la amplificación del gen VP1 en función de los primers diseñados (Invitrogen, Estados Unidos) previamente y el uso de la enzima *Pfx50 High fidelity* (Invitrogen, Estados Unidos). Las condiciones de PCR utilizadas en la amplificación del gen fueron: 94°C por 2 minutos, seguido de un ciclo de 35 reacciones de 94°C por 15 segundos, 70°C por 30 segundos y 68°C por 2 minutos, finalmente, se sometió la reacción a 68°C durante 5 minutos. El producto obtenido se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **3.4 Digestión enzimática por enzimas de restricción.**

Con la finalidad de obtener los extremos cohesivos en el gen VP1 para su ligación en el vector de transferencia PFastBac-HTa, se digirió el gen VP1 con enzimas de restricción. Para ello, se purificó 100 $\mu\text{L}$  de producto de PCR (amplificación del gen VP1) con el uso de QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Alemania), según protocolo de fabricante. Brevemente, 100  $\mu\text{L}$  de producto de PCR fueron diluidos en 500 $\mu\text{L}$  de buffer PB, para colocarlo en una columna de sílica para la captura de DNA mediante centrifugación máxima durante 1 minuto. Posterior a ello, se lavó la muestra con 750  $\mu\text{L}$  de Buffer PE, finalmente eluido en 50 $\mu\text{L}$  de buffer de elución (EB). Obtenido el gen VP1 purificado, fue cuantificado la cantidad de DNA presente mediante el uso de Nanodrop-2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Para la digestión enzimática, se utilizó 1 $\mu\text{g}$  de producto de PCR y de plásmido PFastBac-HTa (Invitrogen), para ello, se incubó 33.4  $\mu\text{L}$  del gen VP1 purificado (equivalente a 1 $\mu\text{g}$ ) y 2 $\mu\text{L}$  de plásmido PFastBac-HTa (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) con 1 $\mu\text{L}$  de NotI (10U/ $\mu\text{L}$ ) y XhoI (20U/ $\mu\text{L}$ ), en buffer 3.1 (New England Biolabs, Estados Unidos) a 37°C durante 2 horas. Finalmente, se inactivaron las enzimas a 65°C durante 20 minutos.

### **3.5 Ligación del gen VP1 en el vector donador PFastBac-HTa.**

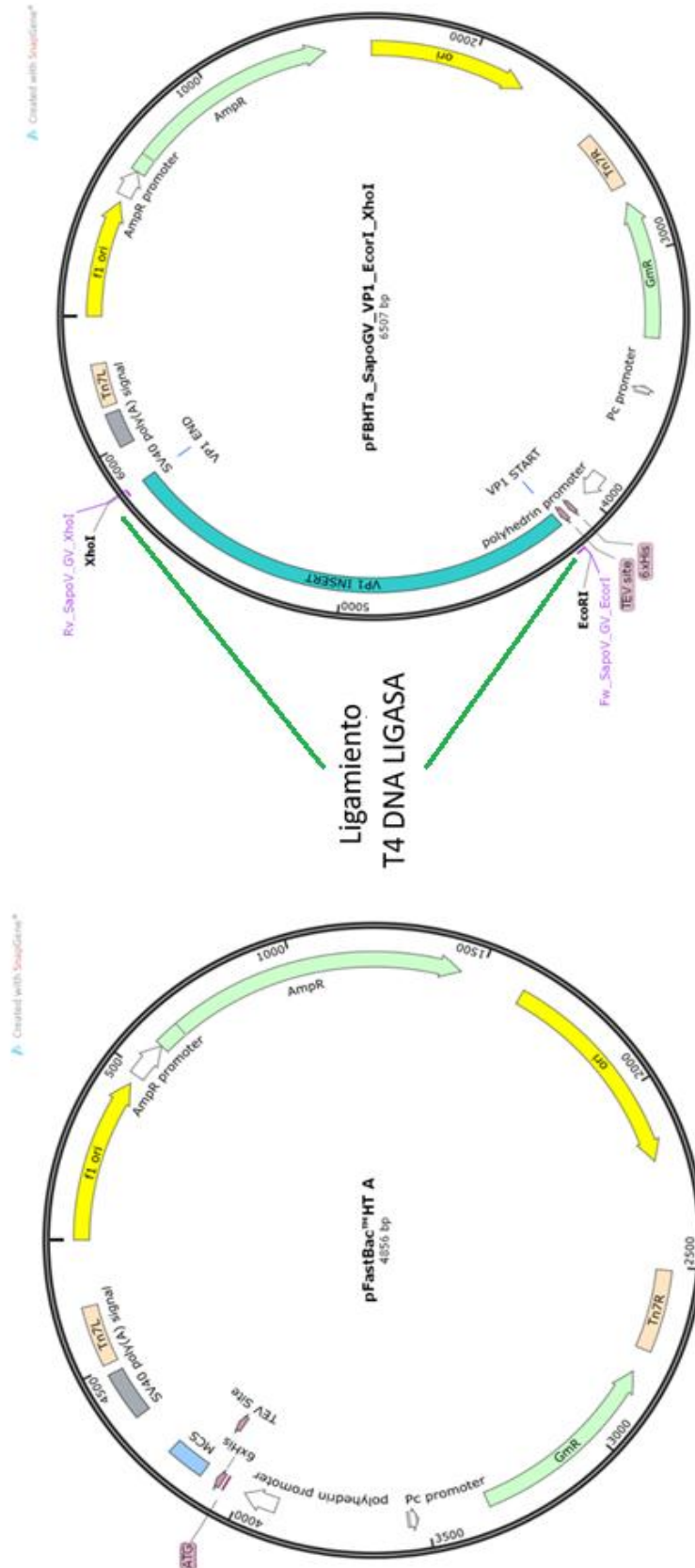
Para el ligamiento del gen VP1 en el vector PFastBac-HTa (Figura 6), se utilizó la enzima T4 Ligasa (New England Biolabs, Estados Unidos) según protocolo de fabricante. Para ello, se empleó una proporción de producto PCR: Plásmido de 3:1, y 400U de T4 DNA Ligasa (/μl). La mezcla se incubó a 16°C durante la noche.

### **3.6 Transformación bacteriana y extracción de ADN plasmídico para la obtención del vector PFastBac-HTa recombinante**

Con la finalidad de amplificar el vector PFastBac-HTa recombinante (con el inserto del gen VP1), fueron transformadas bacterias *Escherichia coli* DH5α con el vector recombinante mediante shock térmico. Este proceso consistió en la incubación de 100μL de células competentes *Escherichia coli* DH5α con 3μL de plásmido PFastBac-HTa recombinante en hielo durante 35 minutos, seguido de la exposición a 42°C durante 45 segundos, y nuevamente en hielo durante 2 minutos. Posteriormente se añadió 1 ml de medio S.O.C incubando a 37°C en agitación (200 rpm) durante 1 hora. Finalmente, se sembraron 50 μL de bacterias transformadas en placas de agar LB con Carbenicilina 100 μg/mL (Invitrogen, Estados Unidos), las placas se incubaron luego a 37°C durante la noche.

Obtenidas las colonias recombinantes, se seleccionaron 7 colonias como muestra inicial para la verificación del vector recombinante, las cuales fueron sembradas en 4 ml de caldo LB con Carbenicilina (100 μg/mL) incubando a 37°C durante la noche en agitación. Para la obtención del vector *PFastBac-HTa* recombinante (PFB-HTa con inserto del gen VP1) se extrajo empleando el kit QIAprep spin miniprep (QIAGEN, Alemania) según instrucciones del fabricante. Brevemente, se centrifugaron 2 ml de caldo con bacterias a 18000 rfc durante 5 minutos, luego, se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 250 μl de Buffer P1 (50mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100ug/mL RNase A), 250uL de Buffer P2 (200mM NaOH, 1% SDS) y 300μL de Buffer N3 (0.9 M potassium acetate, pH 4.8), la mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se colocó en columna de sílica para la captura y lavado del DNA plasmídico. El lavado se

realizó añadiendo 500  $\mu$ l de buffer PB seguido de 750  $\mu$ l de Buffer PE. Finalmente el plásmido se eluyó en 50  $\mu$ l de Buffer de elución (EB).



**Figura 6, Ligamiento In silico del gen VP1 de Sapovirus GI.1 en el vector PFastBac-HTa. Se muestra el lugar de inserción del gen VP1 en el vector PFastBac-HTa generando un plásmido recombinante de 6507 pares de bases. Adaptado de Snapgene Software, GLS Biotech, 2015.**

### **3.7 Análisis y confirmación de la inserción del gen VP1 en el vector donador PFastBac-HTa**

La inserción del gen VP1 dentro del vector PFastBac-Hta se confirmó mediante corte con enzimas de restricción. Para ello, se cuantificaron los plásmidos extraídos a partir de las colonias recombinantes con el uso de Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos). Se obtuvieron los datos de cuantificación de DNA a partir de la primera medición en base a la medición blanco (Buffer de elución EB) de 0 ng/μl. Luego, se incubó 1ug de DNA plasmídico con 1uL de NotI (10U/μl) y XhoI (20U/μl) a 37°C durante dos horas, seguido de 65°C durante 20 minutos para desactivar la enzima. Los productos digeridos fueron visualizados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

Para confirmar el mantenimiento del marco de lectura del gen VP1, se secuenció la región de clonamiento del vector PFastBac-HTa empleando los primers pFastBacF y pFastBacR (Invitrogen) en la compañía Macrogen (Estados Unidos). Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa UGENE pro.

### **3.8 Transformación en Bacterias DH10Bac y Generación de b́acmidos recombinantes**

Una vez obtenido el vector donador PFastBac-HTa recombinante, se seleccionó la clona PFBR3 (Tabla 3), la cual se diluyó agua de PCR para obtener una concentración final de 10 ng/μl para el proceso de transformación en bacterias DH10bac (Invitrogen, Estados Unidos) mediante choque térmico, incubando en medio S.O.C (Invitrogen) durante la noche. Para la identificación de las colonias de bacterias DH10Bac que realizaron la transposición con el vector PFastBac-HTa, se sembraron 50μL de las bacterias transformadas en agar LB, el cual contenía 50 μg/ml de Kanamicina (Invitrogen, Estados Unidos), 7 μg/ml de Gentamicina (Sigma Aldrich, Estados Unidos) y 10 μg/ml de tetraciclina (Sigma Aldrich, Estados Unidos). De igual forma, se añadieron 40 μg/ml de IPTG (Invitrogen, Estados Unidos) y 100 μg/ml de Bluo-Gal (Invitrogen, Estados Unidos), el cual permite la selección blanco-azul de colonias recombinantes. Se seleccionaron 5

colonias blancas las cuales fueron cultivadas en 3 ml de caldo LB con 50 µg/ml de Kanamicina (Invitrogen, Estados Unidos), 7 µg/ml de Gentamicina (Sigma Aldrich, Estados Unidos) y 10 µg/ml de Tetraciclina (Sigma Aldrich, Estados Unidos) incubándose a 37°C durante la noche, a 200 rpm.

### **3.9 Aislamiento de bácmidos recombinantes y análisis de la transposición del gen VP1 en el genoma de baculovirus.**

Para el aislamiento del bácmido recombinante, se empleó el kit de extracción de DNA plasmídico QIAprep spin miniprep (QIAGEN, Alemania). Se realizaron modificaciones en el proceso de lavado, para la obtención de DNA de alto peso molecular (Bácmido). Brevemente, se centrifugaron 2 ml de caldo con bacterias a 10000 rpm durante 5 minutos, luego, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300 µL de Buffer P1 (50mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100ug/mL RNase A), 300µL de Buffer P2 (200mM NaOH, 1% SDS) y 300µL de Buffer N3 (0.9 M potassium acetate, pH 4.8), centrifugando a 13000 rpm durante 10 minutos. Para la obtención de DNA de alto peso molecular, se diluyeron 700uL del sobrenadante en 800uL de Isopropanol manteniendo la muestra en hielo durante 10 minutos. Posterior a ello, se centrifugo a máxima velocidad durante 15 minutos, descartando el sobrenadante y lavando el pellet con 500ul de etanol al 70%. Finalmente, se centrifugo a máxima velocidad durante 10 minutos, resuspendiendo el pellet obtenido en 40uL de Buffer TE.

Para confirmar la transposición del gen VP1 en el genoma de baculovirus, se empleó la técnica de PCR utilizando 1uL de bácmido y 0.5 µM de cebadores pUC\_M13 Directo y pUC\_M13 Reverso<sup>42</sup>, los cuales, se unen a los extremos de la región de transposición con el gen de interés. Las condiciones de ciclado fueron 93°C de desnaturalización inicial, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos y 72°C por 5 minutos, seguido de una extensión final a 72°C durante 5 minutos, según instrucciones del fabricante<sup>42</sup>. Finalmente, se utilizaron 5 µL de producto de PCR para ser analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **3.10 Transfección en células de insecto Sf9 con el báculo recombinante.**

Para la transfección se sembraron  $9 \times 10^5$  de células Sf9 (Invitrogen, Estados Unidos) en placas de ensayo de 6 pozos conteniendo 2 ml de medio SF-900 II (Invitrogen, Estados Unidos), las placas se incubaron a 27°C durante una hora. Para el proceso de transfección, los báculos recombinantes fueron cuantificados mediante el uso de Nanodrop 2000 (Thermo scientific, Estados Unidos), los datos de cuantificación de DNA fueron obtenidos a partir de la primera medición en base a la medición blanco (Buffer de elución EB) de 0 ng/ $\mu$ l. Se utilizó 5 ug de báculo (Clona BR2, Tabla 4) diluido en 100  $\mu$ L de medio Grace sin suplemento (Invitrogen, Estados Unidos), al cual se le agregó 7uL de Cellfectin® Reagent (Invitrogen, Estados Unidos) diluido en 100  $\mu$ L de medio Grace sin suplemento (Invitrogen, Estados Unidos) formado un complejo báculo-lípido incubado durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posterior a ello, se añadieron 0.8 ml de medio Grace sin suplemento a la solución. Luego de la incubación, se retiró el medio SF-900 II de cada pocillo con células, agregando la solución del complejo báculo-lípido (aproximadamente 1 ml) incubando durante 5 horas a 27°C. Finalmente, se removió el medio de transfección, agregando 2 ml de medio SF-900 II con antibióticos (Antibiotic-Antimycotic 100X, Invitrogen, Estados Unidos). Las células fueron incubadas a 27°C hasta la observación de signos de infección con el uso del microscopio invertido Olympus CKX31 (Olympus Corporation, Estados Unidos) con un aumento de 40X.

### **3.11 Obtención de la primera generación de baculovirus recombinantes**

El medio de cultivo celular del proceso de transfección, se recolectó y centrifugó a 14000 rpm durante 5 minutos; el sobrenadante obtenido fue almacenado a -80°C considerado como la primera generación de partículas virales recombinantes de baculovirus.

### **3.12 Aislamiento de DNA viral para la detección del gen VP1 en genoma de Baculovirus recombinantes**

Para detección del gen VP1 a partir de baculovirus recombinantes ensamblados luego del proceso de transfección, se procedió a la extracción del DNA viral a partir de 200  $\mu$ l del sobrenadante obtenido luego de 13 días

post-transfección. Para ello, se empleó el kit PureLink® Viral RNA/DNA (Invitrogen, Estados Unidos) según protocolo de fabricante. Brevemente, 200 µl de sobrenadante de lisis celular en 200uL de Buffer Lysis y 25uL de Proteinasa K se incubaron a 56°C durante 15 minutos. Posterior a ello, se agregó 250uL de etanol 100% transfiriendo la solución a columnas de sílica para la captura y lavado de DNA, la cual fue centrifugada a 6800 g durante 1 minuto mediante Buffer de lavado. Finalmente, el DNA fue eluido en 40 µl de Agua libre de nucleasas. El DNA viral fue cuantificado con el uso de Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Estados Unidos).

Con la finalidad de presenciar el gen VP1, se realizó PCR convencional empleando los cebadores SavI\_VP1F\_NotI y SavI\_VP1R\_XhoI (tabla 2), el producto obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### **3.13 Detección de la proteína mayor de cápside VP1 mediante Western Blot.**

Se tomaron 50µl de muestra de sobrenadante y pellet celular tanto del proceso de transfección y control negativo, a los cuales se le agregó 2uL de Sample Buffer (100µL DTT, 200µL Tracking Dye y 300µL de SDS). Se agregaron 10 µL de cada muestra y 10 µL de marcador Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards (Bio-Rad, Estados Unidos) en gel de poliacrilamida al 10%, sometiendo a corrida electroforética a 5 mA durante 25 minutos, seguido de 25 mA por 40 minutos. Se realizó el proceso de transferencia mediante cámara húmeda en papel de nitrocelulosa a 2 Amp durante 2 horas a -20°C. Luego, el papel de nitrocelulosa fue bloqueado con PBS-leche (Carnation Instant Nonfat Dry Milk, Nestle) al 5% durante 30 minutos. Posteriormente, se incubó en 5 mL de PBS-leche al 1% con 1 µL de Anticuerpo His-Tag Rabbit AB (Cell Signaling Technology, Estados Unidos) durante la noche. Finalmente, se incubó la nitrocelulosa en 5mL de PBS tween con 2.5 µL de anticuerpo Goat anti-rabbit IgG unido a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) durante 1 hora en agitación. Para el revelado, se lavó el papel de nitrocelulosa en agitación con PBS tween por triplicado con intervalos de 30 minutos. Luego, se incubó en PBS 1X y DAB 1X (Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina) para la reacción cromogénica con la peroxidasa unida al anticuerpo. Debido a ello, la reacción

permite la visualización de una banda en la lámina de nitrocelulosa luego de 20 minutos de incubación, lo que indica la presencia de la proteína de interés. Finalmente, la reacción fue detenida con la agregación de agua milliQ.

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS**

#### **4.1 Diseño de cebadores y selección de enzimas de restricción.**

El diseño in silico de cebadores para la amplificación del gen VP1 no mostró uniones inespecíficas dentro del genoma de Sapovirus, además de ser altamente específico para el gen VP1 según análisis en BLAST nucleotide (Instituto nacional de Salud, Estados Unidos). El cebador directo SavI\_VP1F\_NotI mostró tener 57.1% de porcentaje de Guanina y citosina con una temperatura de fusión a 71.7°C, mientras que el cebador reverso SavI\_VP1R\_XhoI contiene un 54.2 % en porcentaje de guanina y citosina con una temperatura de fusión de 70.8°C. Además, la diferencia en temperatura de fusión menor a 5°C permitió que ambos cebadores se unan a la secuencia específica en el gen VP1 a la misma temperatura durante el PCR. Por otro lado, las enzimas seleccionadas NotI y XhoI no mostraron cortes inespecíficos dentro de la secuencia codificante de VP1, siendo seleccionadas para la ligación en el vector PFastBac-HTa.

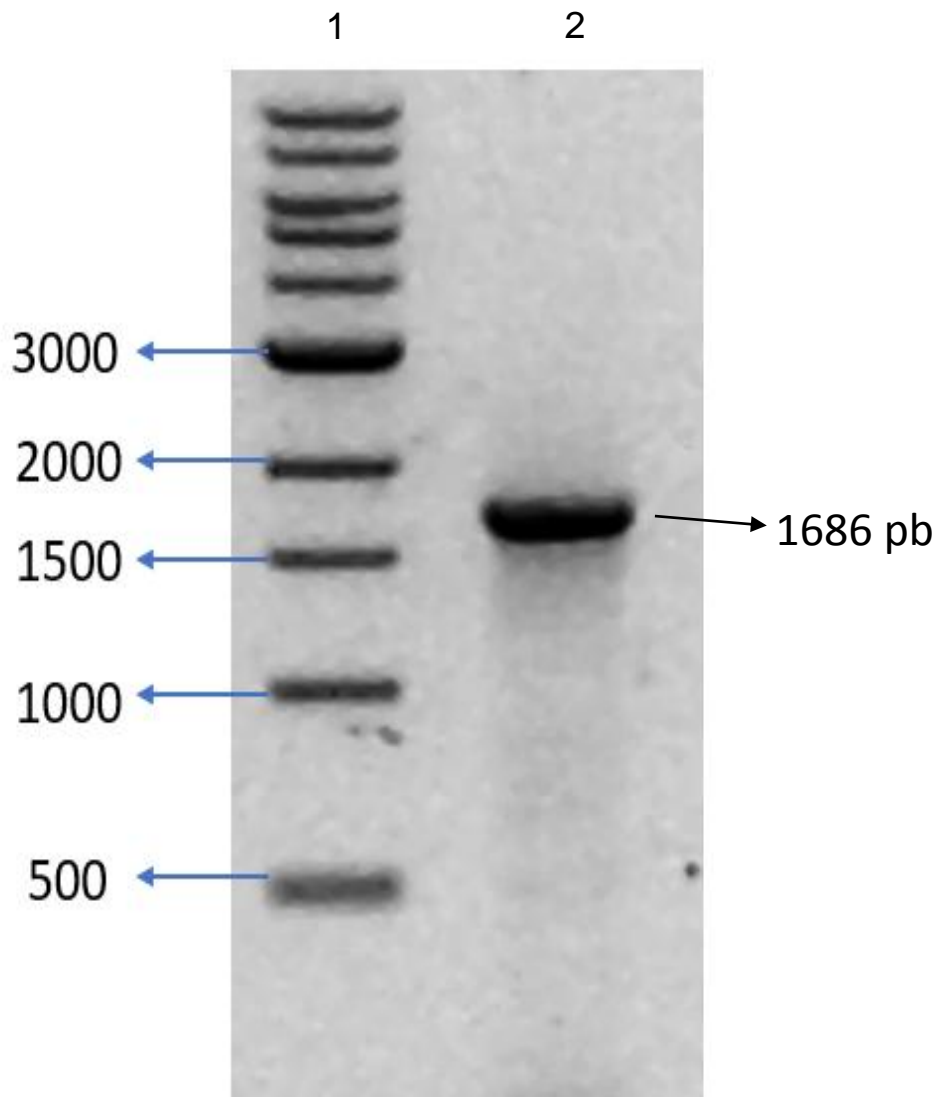
#### **4.2 Obtención y amplificación del gen VP1 mediante RT-PCR.**

La amplificación del gen VP1 resultó en la presencia de una banda de DNA en gel de agarosa al 1%, la que se ubicó entre las bandas de 1500 pb y 2000 pb (Figura 7). Esta banda es compatible con el gen codificante de la proteína VP1 de Sapovirus GI.1 que comprende 1686 bases<sup>43</sup>. Por otro lado, la reacción de amplificación no presentó bandas extras o productos inespecíficos. De igual forma, la purificación del producto obtenido mantuvo la integridad (el tamaño) del gen (Figura 8), alcanzando una concentración de 30 ng/μl en 50 μL de buffer de elución.

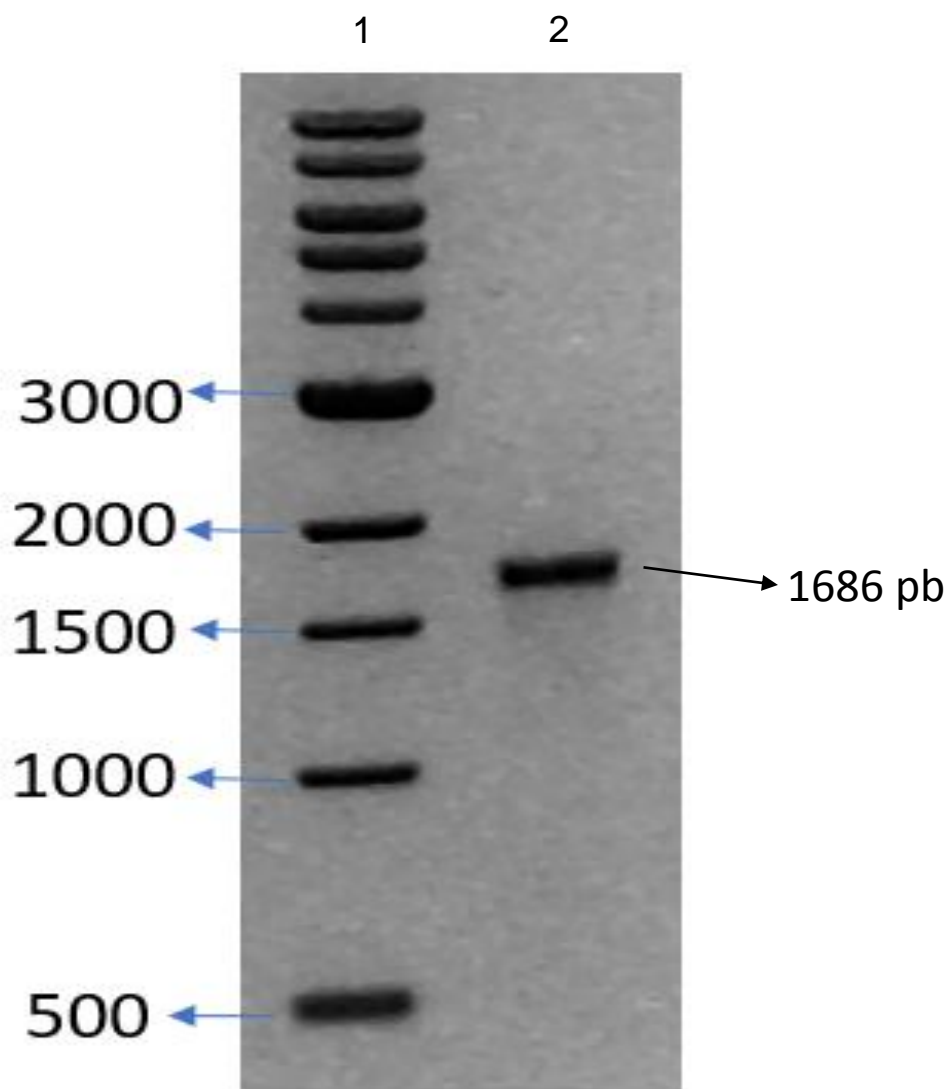
#### **4.3 Digestión con enzimas de restricción.**

La restricción enzimática al gen VP1 y el vector PFastBac-HTa con las enzimas NotI y XhoI no mostró cortes inespecíficos dentro de la secuencia de VP1, como se predijo in silico (SnapGene Viewer). De igual forma, el vector PFastBac-HTa se mostró linearizado debido al corte doble en su

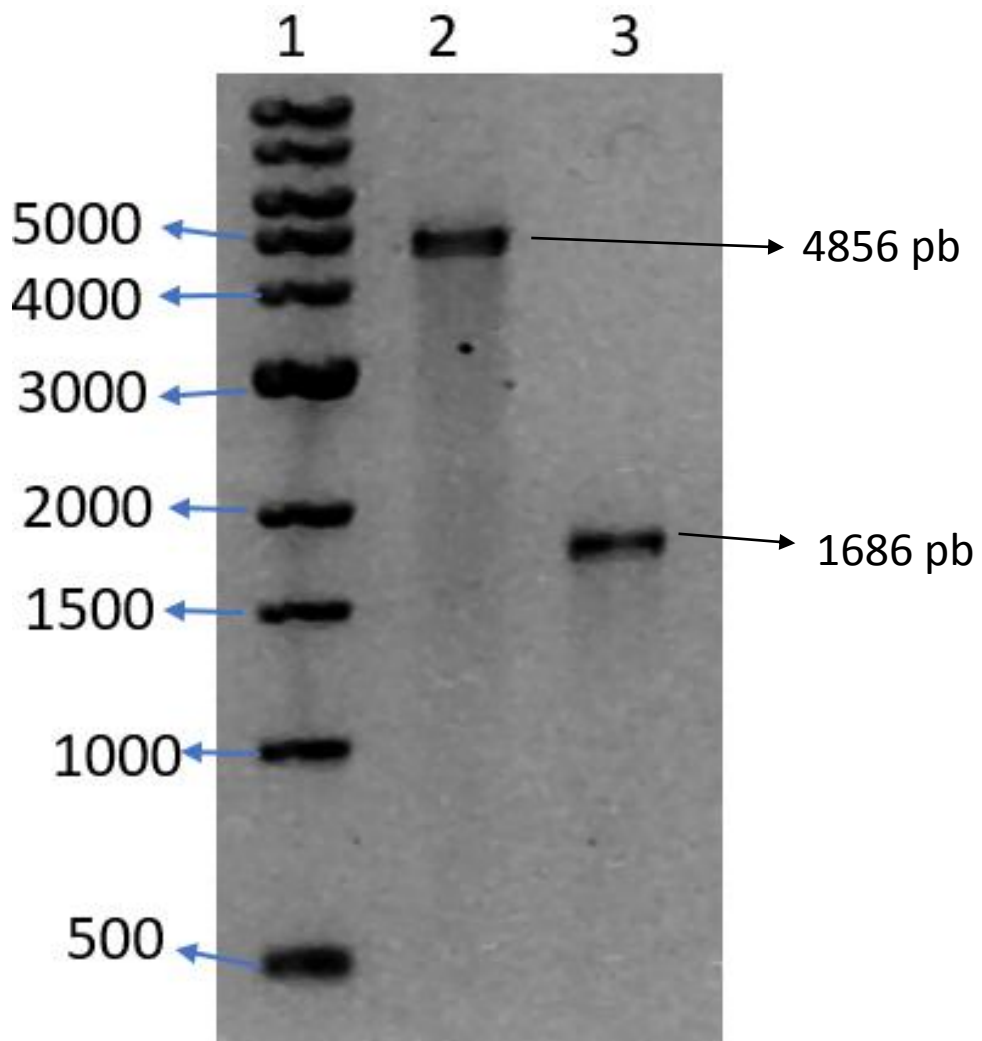
secuencia, generando los extremos cohesivos para la ligación con el gen VP1 (Figura 9).



**Figura 7, Amplificación del gen VP1 de Sapovirus GI.1 mediante PCR.** El producto obtenido se localiza entre las bandas de 1500 y 2000 pares de bases, demostrado la correcta amplificación del gen VP1. Carril 1: Ladder 1Kb (New England Biolabs, USA); carril 2: producto de amplificación.



**Figura 8, Purificación del producto de PCR del gen VP1.** Se observa la presencia de una banda de aproximadamente 1700pb, manteniendo la integridad del gen durante el proceso de purificación. Carril 1: Ladder 1Kb (New England Biolabs, USA); carril 2: producto de amplificación purificado.



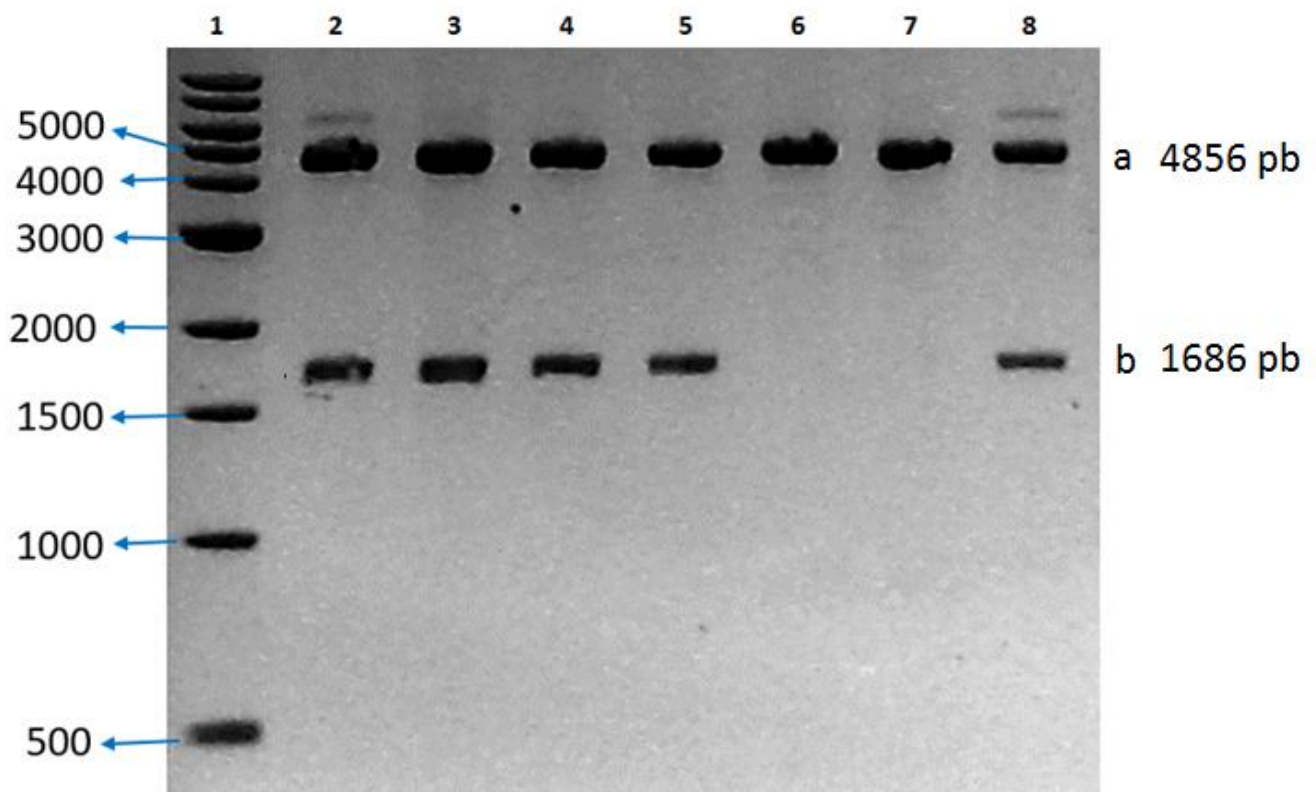
**Figura 9, Digestión enzimática del gen VP1 y vector PFastBac-HTa.** Se sometió a restricción enzimática mediante las enzimas NotI y XhoI. Se muestra la forma linearizada del vector PFastBac-HTa correspondiendo al tamaño de 4856pb (carril 2). La digestión enzimática de la secuencia de VP1 mantuvo la integridad del gen (carril 3), sin la generación de cortes inespecíficos. Carril 1: Ladder 1Kb (New England Biolabs, USA).

#### 4.4 Análisis de la clonación del gen VP1 en el vector PFastBac-HTa

De las siete colonias analizadas para determinar la presencia del gen VP1 en el vector PFastBac-Hta mediante restricción enzimática; 5 plásmidos presentaron el gen VP1 insertado en el vector PFastBac-HTa (Figura 10); es decir estos 5 plasmidos presentaron la banda de 1686 pares de bases (correspondiente a VP1) y la de 4856 bp (correspondiente a PFastBac-HTa) luego de la digestión con las enzimas NotI y XhoI. Por otro lado, se obtuvieron

altas concentraciones de plásmidos recombinantes durante el proceso de extracción (tabla 3).

De igual forma, el análisis por secuenciamiento demuestra la presencia del gen VP1 en el vector PFastBac-HTa, manteniendo el marco de lectura adecuado para su expresión (Figura 11). Además, se confirma la amplificación correcta mediante PCR al obtener la secuencia completa del gen VP1, manteniendo los nucleótidos desde el codón inicio de expresión, hasta el codón de terminación (Anexo 1).



**Figura 10, Ligamiento del gen VP1 en el vector PFastBac-HTa.** Se analizaron 7 plásmidos recombinantes siendo sometidos a restricción enzimática con NotI y XhoI, generando los productos pertenecientes al gen VP1 (b) y el vector PFastBac-HTa (a) (carriles 2, 3, 4, 5 y 8). Los plásmidos ubicados en los carriles 6 y 7 no presentaron la inserción del gen VP1 en el vector. (Carril 1: Ladder 1Kb, New England Biolabs, USA).



**Tabla 3. Concentración de plásmidos PFastBac-HTa recombinantes (PFBR).**

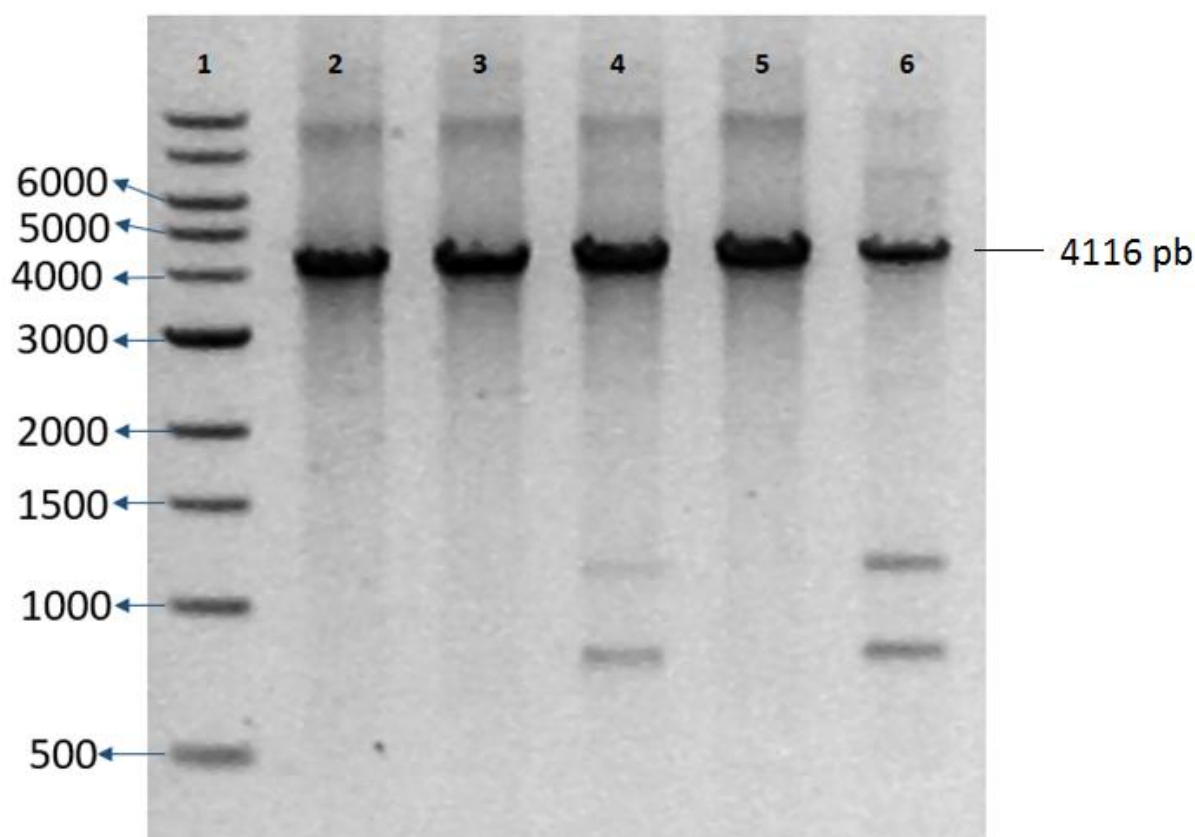
<b>Plásmido</b>	<b>Concentración (<math>\eta\text{g}/\mu\text{l}</math>)</b>	<b>A260/280</b>
PFBR1	549.8	1.88
PFBR2	580.9	1.89
PFBR3	497.8	1.89
PFBR4	536.1	1.89
PFBR5	476.7	1.87
PFBR6	440.3	1.9
PFBR7	591.6	1.89

#### **4.5 Aislamiento del bÁcrido recombinante y análisis por PCR.**

Se aisló el bÁcrido recombinante a partir de 5 colonias de bacterias DH10Bac (fenotipo blanco), la cuantificación en el Nanodrop 2000 mostro un promedio de 142,9  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ , con grados de pureza de DNA óptimos según el ratio de absorbancia A260/280 (tabla 4). Por otro lado, el análisis por PCR mostró la inserción del gen VP1 dentro del genoma de baculovirus. Según protocolo (Invitrogen, USA)<sup>42</sup>, la confirmación de la transposición del gen de interés en el genoma de baculovirus mediado por PCR, se da por la presencia de una banda cuyo tamaño dependerá del vector donador empleado y el tamaño del gen de interés (Anexo 2). Debido a la sumatoria del tamaño de bases del gen VP1 (1686 pb) con el tamaño de la secuencia de transposición en base al vector PFastBac-HTa (2430 pb), se obtuvo un producto de aproximadamente 4116 pares de bases, confirmando la presencia del gen VP1 en el genoma de baculovirus (Figura 12). Debido a ello, la clona BR2 fue seleccionada para el proceso de transfección, debido a una mayor concentración de DNA y la ausencia de bandas múltiples durante la confirmación por PCR.

**Tabla 4. Concentración de bácmidos recombinantes (BR).** Los bácmidos fueron extraídos mediante lisis alcalina de alto peso molecular.

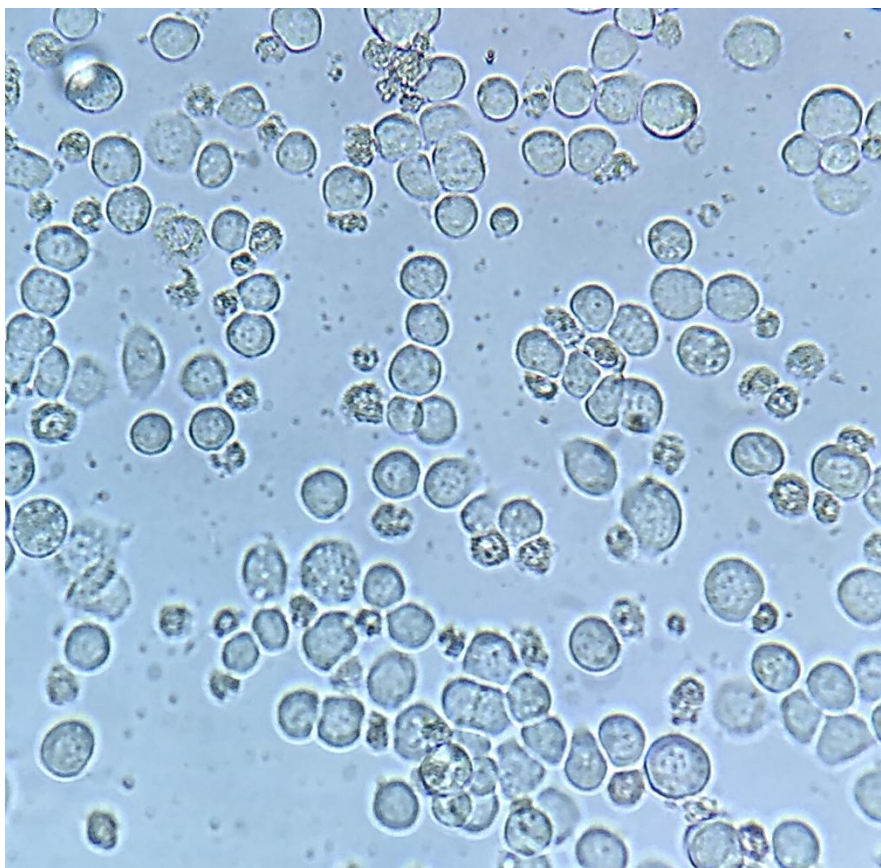
Bácmido	Concentración ( $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ )	A260/280
BR1	83.1	1.95
BR2	202.5	1.94
BR3	22.7	1.92
BR4	158.8	1.93
BR5	247.6	1.94



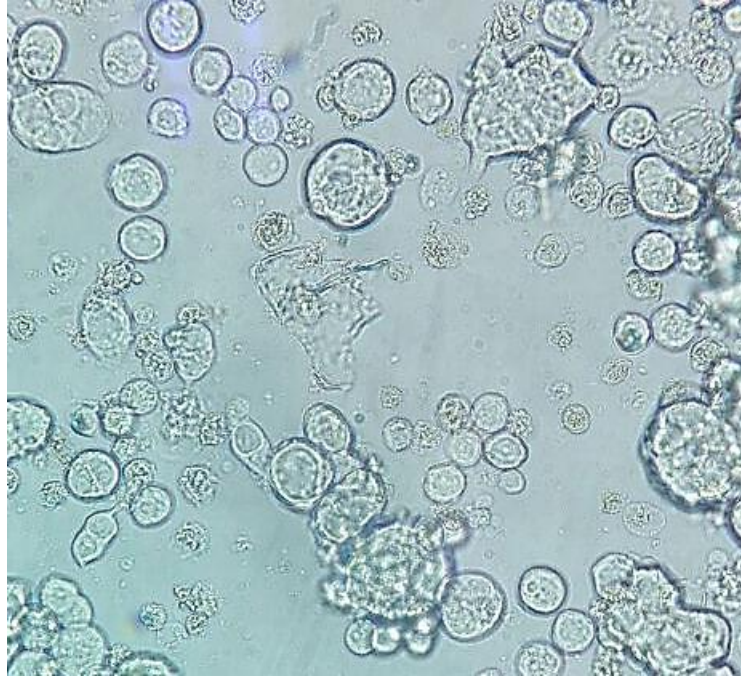
**Figura 12, Análisis de bacmidos recombinantes mediante PCR.** Se analizó por PCR el bacmido recombinante aislado a partir de 5 colonias obtenidas en la transformación. El producto amplificado pertenece a la sumatoria de la secuencia transponible en el bacmido y vector PFastBac-HTa (2430 pb) más el tamaño del gen VP1 (1686 pb), generando una amplificación de aproximadamente 4116 pares de bases en las 5 colonias seleccionadas (Carriles 2, 3, 4, 5 y 6). (Carril 1: Ladder 1Kb, New England Biolabs, USA).

#### 4.6 Mantenimiento y transfección de células Sf9.

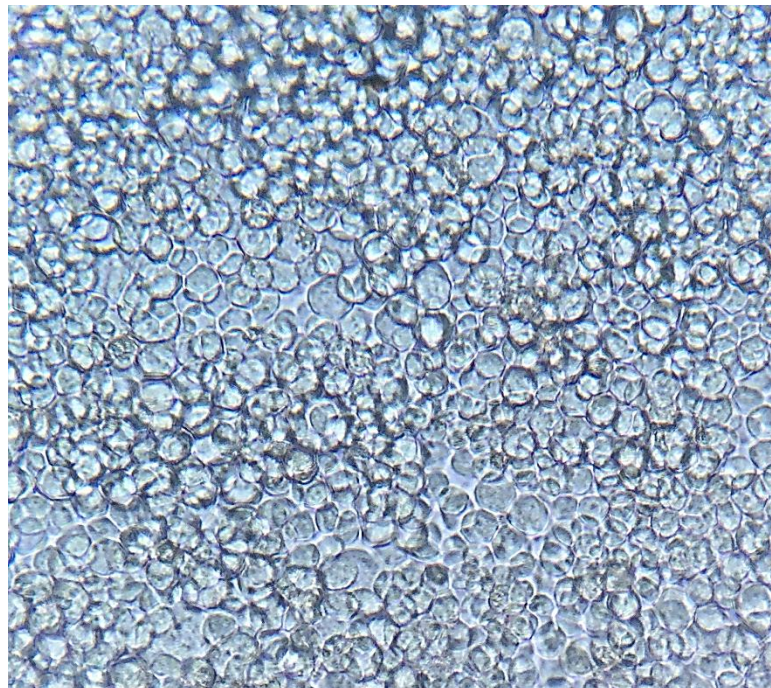
El mantenimiento de células Sf9 se condujo adecuadamente (Figura 13), incubando en medio SF900-II (Invitrogen) a 26°C en presencia de oxígeno. El proceso de transfección generó signos de infección viral 13 días post-transfección, observando agrandamiento en el diámetro de las células, presencia de cuerpos de inclusión y lisis celular. (Figura 14), por otro lado, el control negativo mantuvo el crecimiento óptimo de las células Sf9, generando crecimiento por encima de la monocapa celular debido al alcance de confluencia total en el pozo de ensayo (Figura 15).



**Figura 13, Células Sf9.** Células Sf9 cultivadas en medio SF900-II a 27°C en presencia de oxígeno. Se observa la forma esférica característica de la línea celular, además de fuerte adherencia a la base de sustrato. Observadas en microscopio invertido Olympus CKX31 en aumento de 40X.



**Figura 14, Células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes.** Células sf9 infectadas con baculovirus 13 días post-transfección, se observa agrandamiento del diámetro celular, presencia de cuerpos de inclusión y lisis celular. Observadas en microscopio invertido Olympus CKX31 en aumento de 400X.

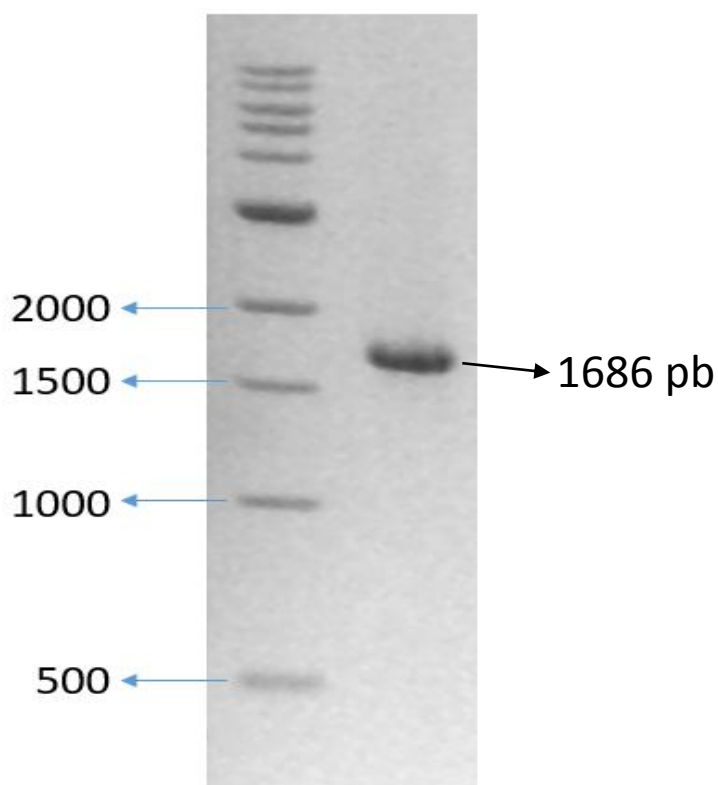


**Figura 15, Células Sf9 como control negativo en el proceso de transfección.** Células sf9 sin inóculo de bacmido recombinante 13 días post-transfección, se observa aumento en el crecimiento celular con una confluencia de 100% y crecimiento por encima de la monocapa. Observadas en microscopio invertido Olympus CKX31 en aumento de 400X.

#### 4.7 Confirmación de la presencia del gen VP1 en genoma de baculovirus recombinantes post-transfección.

Se extrajo DNA viral a partir del sobrenadante post-transfección, obteniendo una concentración de báculo de 149.7  $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ , indicando la presencia de partículas virales de baculovirus ensambladas luego del proceso de transfección con genoma viral (Báculo). Además, se estimó una concentración de  $1 \times 10^7$  ufp/ml en la primera generación de baculovirus recombinantes post-transfección, según protocolo del fabricante<sup>42</sup>.

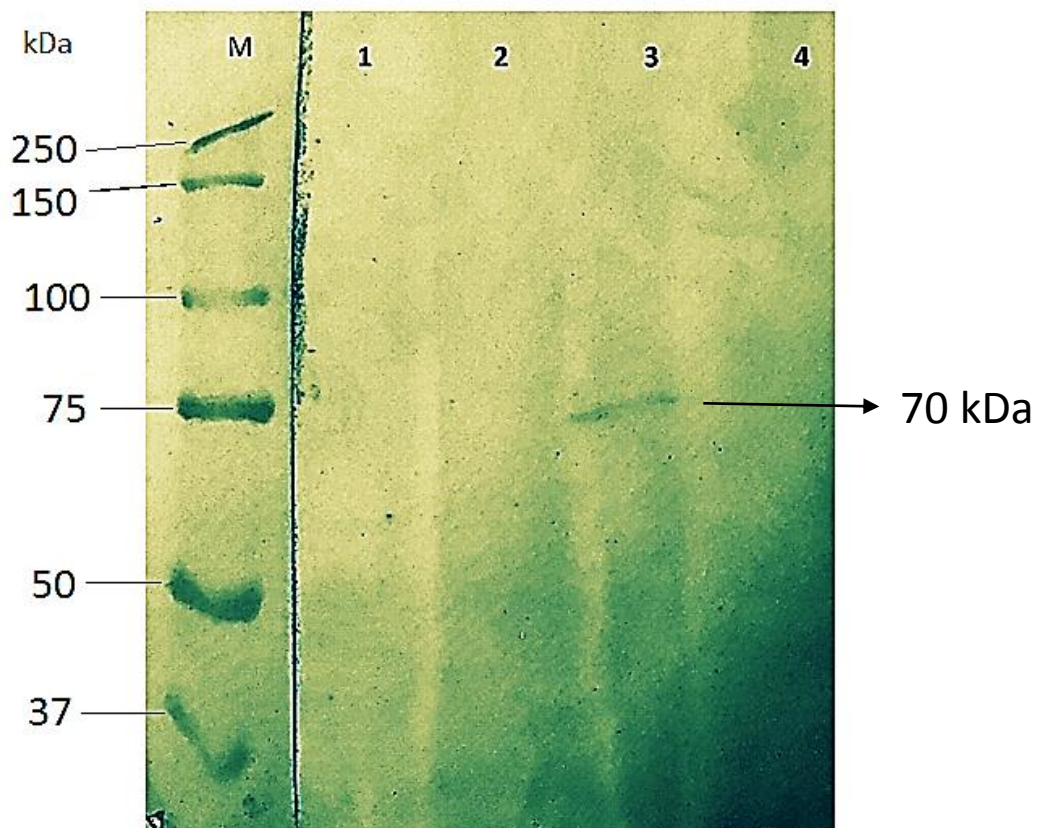
Por otro lado, el análisis del producto de amplificación por PCR para determinar la presencia del gen VP1 en el genoma de baculovirus, mostró la presencia de una banda de aproximadamente 1686 pb en gel de agarosa al 1% (Figura 16).



**Figura 16, Presencia del Gen VP1 de Sapovirus GI.1 en el genoma de baculovirus recombinantes post-transfección.** Se observa la amplificación del Gen VP1 mediante PCR a partir de ADN viral extraído post-transfección (Carril 2). (Carril 1: Ladder 1Kb, New England Biolabs, USA)

#### 4.8. Análisis de la presencia de la proteína VP1 mediante Western Blot.

Se observó la presencia de una banda de proteína de aproximadamente 75 kDa tras el análisis por western blot en el carril correspondiente al pellet celular de las células transfectadas con báculo recombinante (Figura 17) debido a la unión del anticuerpo anti-His con la secuencia de 6 histidinas (conferido por el vector PFastBac-HTa), en el lado N-terminal de la proteína. Por otro lado, ni el sobrenadante ni el pellet celular del control negativo mostraron la presencia de proteína con cola de histidina al igual que el sobrenadante obtenido tras el proceso de transfección, demostrando la presencia de la proteína VP1 expresada en el interior de las células Sf9 infectadas con báculo recombinante.



**Figura 17, Análisis por western Blot de la presencia de la proteína VP1.** Se observa la presencia de la proteína VP1 en el carril 3, correspondiente al pellet celular post-transfección de aproximadamente 70 kDa. Los carriles 1 y 2, corresponde a pellet celular y sobrenadante del control negativo respectivamente, el carril 4 muestra la ausencia de VP1 en el sobrenadante obtenido post-transfección.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

El presente estudio es uno de los primeros orientados al clonamiento y expresión de proteínas de la cápside de Sapovirus. Los resultados obtenidos muestran la expresión de la proteína VP1 de Sapovirus en el sistema de expresión de baculovirus, el que podrá ser empleado para el desarrollo de pruebas inmunológicas y futuros estudios epidemiológicos.

En el presente estudio se diseñaron primers en base a secuencias consenso de Sapovirus GI.1 el cual amplificó un producto que oscila entre 1500 y 2000 pares de bases concordante con lo reportado anteriormente (Okada et al<sup>40</sup>) quienes reportan que el tamaño correspondiente a la cápside de Sapovirus GI.1 es de 1686 bases. Estos primers no se generaron productos inespecíficos permitiendo la correcta amplificación del gen VP1, mostrando especificidad a pesar de tener una mayor temperatura de alineamiento a la secuencia objetivo (70°C) en comparación con la temperatura de extensión de la DNA polimerasa pfx50 (68°C).

Durante la digestión enzimática del gen VP1, según protocolo de fabricante, las enzimas de restricción NotI y XhoI podrían digerir 1 µg de DNA en cortos periodos de 5 a 10 minutos<sup>44,45</sup>. Sin embargo, el periodo de digestión se extendió por 2 horas debido al primer intento de ligación del gen VP1 en el vector PFastBac-HTa donde se obtuvieron plásmidos recombinantes, por lo que se asumió que el tiempo para generar los extremos cohesivos era de corta duración. La extensión del tiempo de incubación pudo generar los extremos cohesivos en el gen VP1 para el adecuado ligamiento en el vector PFastBac-HTa. El uso combinado de las enzimas NotI y XhoI durante la extensión en el proceso de digestión, no generó actividad nucleásica aleatoria (del inglés star activity) debido a la integridad del vector PFastBac-HTa y el gen VP1, sin la presencia de cortes inespecíficos en la secuencia (Figura 9), esto debido al uso del buffer NEBuffer 3.1 (New England Biolabs, Estados Unidos), donde ambas enzimas presentan actividad al 100% sin la generación de actividad nucleásica aleatoria (Double digest finder tool, New England Biolabs)<sup>46</sup>.

La ligación del gen VP1 en el vector PFastBac-HTa se logró adecuadamente. El gen VP1 estuvo presente en 5 plásmidos PFastBac-HTa extraídos a partir de 7 colonias recombinantes seleccionadas, corroborando que la restricción enzimática permitió la digestión óptima de la cantidad de DNA perteneciente al gen VP1, necesaria para lograr la ligación en el vector PFastBac-HTa. La actividad de la enzima NotI es sensible a la presencia de DNA superenrollado, requiriendo 5 veces más la concentración enzimática para la digestión de 1 µg de DNA<sup>45</sup>. La forma superenrollada de DNA se encuentra comúnmente en DNA plasmídico<sup>47</sup>, impidiendo la exposición de la secuencia de restricción; es posible que la extensión en el periodo de incubación haya permitido superar la baja actividad de la Enzima NotI sobre DNA superenrollado, como estaría el vector PFastBac-HTa.

La confirmación de la inserción del gen VP1 en el vector PFastBac-HTa por secuenciamiento demostró el correcto marco de lectura del gen VP1 a partir del codón de iniciación presente en el vector PFastBac-HTa. Además, el gen VP1 no mostró mutaciones, lo que significaría que la enzima *pxf50* DNA polymerase (Invitrogen, USA) no causó incorporaciones erróneas de nucleótidos durante el proceso de replicación en la reacción de cadena de la polimerasa, ya que además esta polimerasa presenta actividad exonucleasa para la corrección de errores durante la replicación<sup>48</sup>.

La transformación del vector PFastBac-HTa recombinante en bacterias DH10Bac, condujo adecuadamente a la transposición del gen VP1 en el genoma de baculovirus. Sin embargo, la confirmación de la transposición mediante PCR muestra bandas extras en las colonias BR3 y BR5 debido a la presencia de DNA plasmídico de bajo peso molecular el cual pudo haber sido aislado en el proceso de extracción de báculo recombinante. Por otro lado, la concentración de báculo recombinante varía según la clona obtenida alcanzando una máxima concentración de 247.6 ng/µl. Las bajas concentraciones pueden deberse al periodo de incubación de las bacterias DH10Bac, las cuales presentan un periodo de replicación lento debido a la presencia del báculo exógeno y plásmido "helper"<sup>42</sup>. El báculo recombinante extraído fue a partir de clonas incubadas durante 16 horas, por lo que aumentar el periodo de incubación puede resultar en el aumento de la concentración de báculo recombinante. Por otro

lado, la extracción de plásmido de alto peso molecular puede interferir en la pureza de la muestra, siendo lavado mediante Etanol de manera mecánica, sin la participación de captura de DNA en columnas de sílica.

Durante el periodo de transfección, según protocolo de fabricante<sup>42</sup>, se esperaba obtener la primera generación de baculovirus recombinantes luego de tres días post-transfección, sin embargo, durante el proceso realizado, se esperó hasta la observación de lisis celular mostrándose luego de 13 días, pudiendo deberse a la baja eficiencia de transfección debido a la concentración de bécido recombinante utilizado para el proceso de transfección (5µg) al igual que la cantidad del reactivo cellfectin (Invitrogen, Estados Unidos), el cual recubre el DNA bajo un complejo lipídico de tal forma que permite el ingreso a la célula a través de la membrana celular. Otros factores que pueden afectar la eficiencia de transfección es la integridad del bécido, el cual es sensible a daños mecánicos debido al tamaño de la secuencia (135 Kb). A pesar de ello, se pudieron ensamblar partículas virales de Baculovirus conteniendo el gen VP1 en su genoma y observar la expresión de la proteína VP1 por las partículas de baculovirus.

La expresión de la proteína VP1 pudo ser localizada en el interior de las células sf9 tras el análisis mediante western blot. El análisis por western blot mostró un tamaño de aproximadamente 70 a 75 kDa, en comparación con el peso real de la proteína de 60 kDa<sup>3</sup>, esto debido al contenido de aminoácidos extra conferidos en el vector PFastBac-HTa desde el codón inicio para la expresión, siendo 39 aminoácidos extra presente en la proteína VP1 (Figura 18). Por otro lado, no se detectó la proteína VP1 en el sobrenadante, lo que confirma la presencia de VP1 en el interior de las células demostrado en el western blot. Además, a pesar de la presencia de lisis celular liberando a la proteína VP1 al exterior, esta pudo estar diluida en el medio dificultando su detección.



**Figura 18, Análisis *in silico* del proceso de traducción en el vector PFastBac-HTa.** La etiqueta roja (ATG PFB-HTa) indica el inicio de expresión de proteínas en el sistema de baculovirus. La etiqueta azul indica el codón de inicio de la proteína VP1, generando 39 aminoácidos extra en el proceso de traducción (Adaptado de Snapgene Software, GLS Biotech, 2015)

Para la detección de VP1 mediante la presencia de cola de histidinas en la proteína, se debió someter a denaturación proteica mediante DTT debido a que esta secuencia de aminoácidos se encontraría en el interior de las pseudo-partículas virales ensambladas imposibilitando su exposición hacia el anticuerpo, sin embargo, es necesaria la evaluación de la formación de esta estructura debido a la presencia de aminoácidos extra los cuales podrían interferir en la formación de pseudo-partículas virales.

Estudios han demostrado la formación de pseudo-partículas virales en base a la expresión de la proteína VP1 de Sapovirus en células de mamíferos, en el 2009, Oka y colaboradores lograron expresar la proteína mayor de capsido de sapovirus mediante el sistema de vaccinia virus<sup>49</sup>, obteniendo la formación de pseudo-partículas virales, además del tamaño correspondiente de 60 kDa en el análisis por western blot. Cabe destacar que la expresión estuvo dada desde el codón de inicio perteneciente a la proteína VP1. Debido a ello, sería adecuada la expresión del gen VP1 en vector que permita la expresión de proteínas desde el codón de inicio correspondiente, obteniendo una forma similar a la forma nativa. De igual forma, se ha reportado la función de la proteína VP2 como estabilizador en la estructura de capsido viral. En el 2014, Lin y colaboradores demostraron la función estabilizadora de la proteína VP2 en la formación de pseudo-partículas virales de Norovirus a distintos niveles de pH<sup>50</sup>, por lo que expresar la proteína VP2 de Sapovirus en conjunto con VP1, podría generar con mayor eficacia pseudo-partículas virales, mejorando la exposición de antígenos.

## CONCLUSIONES

1. Se pudieron diseñar cebadores para amplificación del gen VP1 de Sapovirus GI.1 mediante PCR sin la generación de productos inespecíficos.
2. El gen VP1 de Sapovirus fue ligado correctamente en el vector PFastBac-HTa, sin la alteración del marco de lectura para la expresión.
3. Se dio la transposición sitio-específica del gen VP1 en el genoma de baculovirus contenido en el báculo, generando báculos recombinantes en bajas concentraciones para la transfección en células Sf9.
4. Se ensamblaron partículas infecciosas de baculovirus conteniendo el gen VP1 en el genoma viral.
5. Las células Sf9 transfectadas lograron expresar la proteína VP1, confirmando la presencia de una banda de aproximadamente 75 kDa mediante western Blot.
6. La presencia de VP1 se dio mediante la detección de la secuencia de 6 histidinas añadida en el lado N-Terminal de la proteína VP1 por el vector PFastBac-HTa.

## RECOMENDACIONES

1. Para la obtención de mayor concentración de báculo recombinante, se recomienda el incubar las células E. coli DH10Bac durante 48 horas debido al lento metabolismo que presentan.
2. El uso de una mayor concentración de báculo recombinante aseguraría una eficaz transfección de células Sf9, además de prolongar el periodo de incubación con cellfectin recubriendo la mayor cantidad de ADN bajo una membrana lipídica.
3. El recolectar las células infectadas antes de la generación de lisis celular podría aumentar la concentración de proteínas recombinantes, pudiendo ser purificadas a partir del pellet celular.
4. Para la expresión de pseudo-partículas virales, se recomienda utilizar vectores que permitan la expresión de la proteína de interés a partir de su propio codón de inicio, evitando la formación de aminoácidos extras que pueden interferir en el ensamble de estructuras secundarias.
5. La concentración de proteínas recombinantes permitirá un mejor análisis mediante western blot. Se recomienda aplicar métodos de purificación de proteínas recombinantes, como el uso de columnas con resinas de Niquel con alta afinidad a proteínas fusionadas a cola de histidinas.

## ANEXO 1

Secuencia de la región codificante de la proteína VP1 de Sapovirus GI.1 aislado en Perú (código de Muestra: PNV 6255). Obtenida en este estudio.

```
5'-ATGGAGGGCA ATGGCTCCAA TCCAGAGCCA AAGCAGAGCA ATAACCCGAT
GGTCGTTGAC CCACCTGGTA CAACAGGTCC GACCACATCC CACGTTGTTG
TTGCTAATCC GGAGCAACCC AATGGGGCCG CACAGCGCCT GGAGCTGGCT
GTTGCCACTG GTGCAATCCA ATCCAATGTC CCTGAGGCAA TACGTAAC TG
CTTTGCAGTC TTTCGTA CTTTGGAA CGACAGGATG CCCACGGGAA
CTTTTCTTGG ATCTATATCG CTTTCATCCCA ACATTAACCC GTACACTGCT
CACCTCTCCG GGATGTGGGC CGGGTGGGGC GGTAGTTTTG AGGTCCGGTT
ATCGATCTCT GGTTCTGGCG TGTTCCGCTGG GCGCATCATT GCTTCTGTCA
TACCACCAGG GGTTGATCCC TCGTCCATCA GGGATCCAGG CGTGTTGCCT
CACGCTTTTCG TTGATGCTCG CATCACTGAG CCAGTTTCTT TCATGATCCC
TGATGTCAGA GCTGTGGATT ACCACAGGAT GGACGGTGCT GAGCCCCTT
GCTCGCTAGG ATTTTGGGTT TACCAACCAT TGCTCAACCC GTTTTCCACA
ACCGCCGTTT CAACATGTTG GGTGTCAGTG GAGACTAAAC CAGGTGGTGA
CTTTGATTTCT GCCTACTAAG ACCACCAGGC CAACAGATGG AGAATGGGGT
TTCACCAGAA GGCCTGTTGC CCAGGCGCCT AGGTTACTCAC GCGGTAACCG
TGTTGGTGGC TTGGTGGTTG GTATGATCTT GGTGGCTGAG CACAAGCAGG
TTAACAGACA CTTCAATTCC AATTCAGTCA CTTTTGGTTG GTCCACGGCA
CCTGTCAACC CAATGGCGGC AGAGATTGTG ACAAACCAGG CACATTCAAC
ATCACGCCAT GCTTGGCTTT CCATTGGAGC TCAAACAAG GGGCCACTGT
TTCCCGGAAT ACCCAACCAT TTCCCGGATT CGTGTGCATC AACCAATCGTG
GGGGCCATGG ACACCTCCCT TGGTGGCCGG CCGTCTACTG GGGTATGTGG
ACCTGCCATA AGCTTTCAGA ACAACGGTGA TGTGTACGAG AATGACACTC
CCTCAGTCAT GTTTGCCACT TATGACCCAC TTACGTCAGG CGCGGGGGTT
GCTCTTACCA ACAGCATCAA CCCC GCATCC CTAGCACTGG TGC GCATATC
CAACAATGAC TTTGACACTA GTGGCTTTGC CAACGACAAG AATGTGGTGG
TTCAAATGTCA TGGGAGATGT ACACAGGCAC CAATCAAATA AGAGGCCAGG
TCACGCCAAT GTCTGGCACT AATTACACCT TTACATCTAC AGGTGCAAAC
ACCCTTGTGT TGTGGCAGGA GCGCATGCTC AGCTATGATG GACACCAAGC
AATACTGTAC TCGTCACAAT TGGAGAGGAC GGCTGAGTAC TTTCAGAACG
ACATAGTCAA CATACTGAA AACTCCATGG CAGTGTTCAA TGTGGAAACC
AACTCTGCAT CTTTTCAAAT TGGCATCAGA CCTGATGGTT ATATGGTGAC
AGGTGGCTCC ATTGGTATTA ATGTGCCTCT TGAACCCGAA ACCCGATTCC
AATACGTTGG AATTCTCCCT TTGTCCGCAG CTTTATCTGG GCCCAGTGGG
AACATGGGAA GGGCCAGACG GGTGTTCCAA TGA - 3'
```

## ANEXO 2

Tamaño del producto de PCR mediante los primers pUC\_M13 directo y reverso, según variante del vector donador PFastBac, para la confirmación de transposición en el Bámido. (Adaptado de Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System, An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins, Invitrogen, 2015) <sup>42</sup>.

<b>Muestra</b>	<b>Tamaño de Producto de PCR Estimado</b>
Bámido Solo	300 pb
Transposicion de Bámido con PFastBac 1	2300 + tamaño de gen de interés
Transposicion de Bámido con PFastBac-HT	2430 + tamaño de gen de interés
Transposicion de Bámido con PFastBac Dual	2560 + tamaño de gen de interés

## BIBLIOGRAFIA

1. G. Hansman, K. Katayama, N. Maneekarn, S. Peerakome, P. Khamrin, S. Tonusin, et al. Genetic Diversity of Norovirus and Sapovirus in Hospitalized Infants with Sporadic Cases of Acute Gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 42. 1305-1307 (2004)
2. G. Wang, Z. Shen, F. Qian, Y. Li, Z. Yuan, J. Zhang, et al. Genetic diversity of sapovirus in non-hospitalized adults with sporadic cases of acute gastroenteritis in Shanghai, China. *J. Clin. Virol.* 59. 250-254 (2014).
3. T. Oka, Q. Wang, K. Katayama, L.J. Saif. Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 28. 32-53 (2015).
4. BR. Bank-Wolf, M. Koning, HJ. Thiel. Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses. *Vet. Microbiol.* 140, 204-212 (2010).
5. TH. Flewett, H. Davies. Caliciviruses in man. *Lancet.* 307. 311 (1976).
6. DA. McSwiggan, D. Cubitt, W. Moore. Calicivirus associated with winter vomiting disease. *Lancet* 1215, (1978).
7. R. Simpson, D. Aliyu, M. Iturriza-Gomorra, U. Desselberger, J. Gray. Infantile viral gastroenteritis: On the way to closing the diagnostic gap. *J. Med. Virol.* 70. 258-262. (2003)
8. L. Dufkova, I. Scigalkova, R. Moutelikova, et al. Genetic diversity of porcine sapoviruses, kobuviruses, and astroviruses in asymptomatic pigs: an emerging new sapovirus GIII genotype. *Arch. Virol* 150. 549-558. (2013)
9. G. Reuter, J. Zimsek-Mijovski, M. Poljsak-Prijatelj, et al. Incidence, Diversity, and Molecular Epidemiology of Sapoviruses in Swine across Europe. *J. Clin. Microbiol.* 48. 363-368 (2010).
10. Scheuer K, Oka T, Hoet A, Gebreyes W, Molla B, Saif L, et al. Prevalence of Porcine Noroviruses, Molecular Characterization of Emerging Porcine Sapoviruses from Finisher Swine in the United States, and Unified Classification Scheme for Sapoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 57. 2344-2353. (2013)

11. Kitamoto N, Oka T, Katayama K, Li TC, Takeda N, Kato Y, et al. Novel monoclonal antibodies broadly reactive to human recombinant sapovirus-like particles. *Microbiol. Immunol.* 56. 760–770 (2012).
12. Harada S, Oka T, Tokuoka E, Kiyota N, Nishimura K, Shimada Y, et al. A confirmation of sapovirus re-infection gastroenteritis cases with different genogroups and genetic shifts in the evolving sapovirus genotypes, 2002-2011. *Arch. Virol.* 157.1999–2003. (2012).
13. Oka T, Katayama K, Hansman GS, Kageyama T, Ogawa S, Wu FT, et al. Detection of Human Sapovirus by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. *J. Med. Virol.* 78. 1347–1353 (2006).
14. T. Farkas, X. Deng, G. Ruiz-Palacios, A. Morrow, X. Jiang. Development of an Enzyme Immunoassay for Detection of Sapovirus-Specific Antibodies and Its Application in a Study of Seroprevalence in Children. *J. Clin. Microbiol.* 44. 3674–3679 (2006).
15. Lopman BA, Reacher MH, Van Duynhoven Y, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg. Infect. Dis.* 9. 90–96 (2003).
16. Wu FT, Oka T, Takeda N, Katayama K, Hansman GS, Muo CH, et al. Acute Gastroenteritis Caused by GI/2 Sapovirus, Taiwan, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 14. 1169–1171 (2008).
17. Romani S, Azimzadeh P, Mohebbi SR, Bozorgi SM, Zali N, Jadali F. Prevalence of sapovirus infection among infant and adult patients with acute gastroenteritis in Tehran, Iran. *Gastroenterol. Hepatol. Bed. Bench.* 5. 43-48 (2012).
18. Lee LE, Cebelinski EA, Fuller C, Keene WE, Smith K, Vinjé J, et al. Sapovirus outbreaks in long-term care facilities, Oregon and Minnesota, USA, 2002–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 18. 873-876 (2012).
19. K. Hedlund, E. Rubilar-Abreu, L. Svensson. Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994-1998. *J. Infect. Dis.* 181. 275–280 (2000).

20. S. Usuku, M. Kumazaki. A Gastroenteritis Outbreak Attributed to Sapovirus Genogroup V in Yokohama, Japan. *J. Infect. Dis.* 67. 411–412 (2014).
21. Liu X, Jahuir H, Gilman RH, Alva A, Cabrera L, Okamoto M, et al. Etiological Role and Repeated Infections of Sapovirus among Children Aged Less than 2 Years in a Cohort Study in a Peri-urban Community of Peru, *J. Clin. Microbiol.* 54. 1598-1604 (2016).
22. Matson DO, Estes MK, Tanaka T, Bartlett AV, Pickering LK. Asymptomatic human calicivirus infection in a day care center. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 9. 190–196 (1990)
23. S. Nakata, M. Estes, S. Chiba. Detection of human calicivirus antigen and antibody by enzyme-linked immunosorbent assays. *J. Clin. Microbiol.* 26. 2001–2005. (1988).
24. Sakuma Y, Chiba S, Kogasaka R, Terashima H, Nakamura S, Horino K, et al. Prevalence of antibody to human calicivirus in general population of northern Japan. *J. Med. Virol.* 7. 221-225 (1981).
25. Liu X, Yamamoto D, Saito M, Imagawa T, Ablola A, Tandoc A, et al. Molecular detection and characterization of sapovirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in the Philippines. *J. Clin. Virol.* 1386-6532 (2015).
26. Oka T, Yamamoto M, Katayama K, Hansman GS, Ogawa S, Miyamura T, et al. Identification of the cleavage sites of sapovirus open reading frame 1 polyprotein. *J. Genl. Virol.* 8. 3329–3338 (2006)
27. Fullerton SW, Blaschke M, Coutard B, Gebhardt J, Gorbalenya A, Canard B, et al. Structural and Functional Characterization of Sapovirus RNA -Dependent RNA Polymerase. *J. Virol.* 81. 1858-1871 (2007).
28. Tung GP, Shoko O, Werner E, Hideki K, Hiroshi U. Novel Recombinant Sapovirus, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 12. 865–867 (2006).

29. Kim DS, Hosmillo M, Alfajaro MM, Kim JY, Park JG, Son KY, et al. Both alpha2,3- and alpha2,6-linked sialic acids on O-linked glycoproteins act as functional receptors for porcine sapovirus. *PLoS. Pathog.* 10. e1004172 (2014).
30. Chen R, Neill JD, Estes MK, Prasad BV. X-ray structure of a native calicivirus: structural insights into antigenic diversity and host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103. 8048-8053 (2006).
30. J. Harris, B. Lopman, S. O'Brien. Infection control measures for norovirus: a systematic review of outbreaks in semi-enclosed settings. *J. Hosp. Infect.* 74, 1-9 (2010).
31. Miyazaki N, Taylor DW, Hansman GS, Murata K. Antigenic and cryo-electron microscopy structure analysis of a chimeric sapovirus capsid. *J Virol*; 90(5):2664–75. (2015)
32. G. Blissard, G. Rohrmann. Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu. Rev. Entomol.* 35. 127-55 (1990)
33. V. Luckow. Baculovirus systems for the expression of human gene products. *Curr. Opin. Biotech.* 4. 564-572 (1993).
34. M. van Oers, Opportunities and challenges for the baculovirus expression system, *J. Invertebr. Pathol.* 107. 3-15 (2011).
35. Smith GE, Summers MD, Fraser MJ. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. Production of Human Beta Interferon in Insect Cells Infected with a Baculovirus Expression Vector. *Mol Cell Biol*; 3(12):2156–65 (1983).
36. Hansman GS, Guntapong R, Pongsuwanna Y, Natori K, Katayama K, Takeda N. Development of an antigen ELISA to detect sapovirus in clinical stool specimens. *Arch. Virol.* 151. 551-561 (2006)
37. L. White, M. Hardy, M. Estes. Biochemical characterization of a smaller form of recombinant Norwalk virus capsids assembled in insect cells. *J. Virol.* 71. 8066-8072 (1997).

38. Hansman GS, Oka T, Takeda N. Sapovirus-like particles derived from polyprotein. *Virus Res*; 137(2):261–5. (2008)
39. Hansman GS, Natori K, Oka T, Ogawa S, Tanaka K, Nagata N, et al. Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Arch Virol*; 150(1):21–36. (2005)
40. Parra G, Bok K, Taylor R, Haynes JR, Sosnovtsev SV, Richardson C, et al. Immunogenicity and specificity of norovirus Consensus GII.4 virus-like particles in monovalent and bivalent vaccine formulations. *Vaccine*. 30. 3580-3586 (2012).
41. P. Kan, H. Verspaget, A. Peña. ELISA Assay for Quantitative Measurement of Human Immunoglobulins IgA, IgG, and IgM in Nanograms. *J. Immunol. Methods*. 57. 51-57 (1983).
42. Invitrogen. Bac-to-Bac Baculovirus Expression System. An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Corporation. (2004).
43. Okada M, Yamashita Y, Oseto M, Ogawa T, Kaiho I, Shinozaki K. Genetic variability in the sapovirus capsid protein. *Virus Genes*. 33. 157-161(2006).
44. New England BioLabs. XhoI, NEB [Internet]. (2017). Disponible en: <https://www.neb.com/products/r0146-xhoi>
45. New England Biolabs. NotI Digestion Protocol, NEB [Internet]. (2017) Disponible en: <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/6D1004FC499F4BDE92274FA21E0D2179/Datacards%20or%20Manuals/R0189Datasheet-Lot0521212.pdf>
46. New England Biolabs. Double Digest Finder, NotI and XhoI, NEB [Internet]. (2017). Disponible en: <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder?enzyme1={6D1004FC-499F-4BDE-9227-4FA21E0D2179}&enzyme2={69E7E307-0F85-40E0-85D1-1114E13B0B18}>
47. R. Clowes. Molecular Structure of Bacterial Plasmids. *Bacteriol. Rev*. 36. 361-405. (1972)

48. H. Kong, RB. Kucera, W. Jack. Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile archaea *Thermococcus litoralis*. Vent DNA polymerase, steady state kinetics, thermal stability, processivity, strand displacement, and exonuclease activities. *J. Biol. Chem.* 268. 1965-1975. (1993).
49. Oka T, Yamamoto M, Miyashita K, Ogawa S, Katayama K, Wakita T, et al. Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiol. Immunol.* 53. 49-52. (2009).
50. Lin Y, Fengling L, Lianzhu W, Yuxiu Z, Yanhua J. Function of VP2 protein in the stability of the secondary structure of virus-like particles of genogroup II norovirus at different pH levels: function of VP2 protein in the stability of NoV VLPs. *J. Microbiol.* 52. 970-975. (2014).
51. Y. Khudyakov, P. Pumpens. *Viral Nanotechnology*. Vol. 1. 1th Ed. Broken Sound Parkway NW: CRC Press; 2016.