

PRODUCCION DE ANTIGENOS RECOMBINANTES A PARTIR DE PROTEINAS IMMUNOGENICAS DE HERPESVIRUS FELINO 1 PARA EL DESARROLLO DE UN TEST DE DIAGNÓSTICO

Bianchi DS¹, Colina SE^{1,2}, Panei CJ^{1,2}, Fuentealba NA^{1,2}

1Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, La Plata, Buenos Aires, Argentina;

2 CCT- CONICET, La Plata, Buenos Aires, Argentina

INTRODUCCIÓN

La infección por Alfaherpesvirus felino 1 (FHV-1) representa aproximadamente la mitad de las infecciones virales felinas de las vías respiratorias superiores diagnosticadas (Maes, 2012). Esta virosis es de importancia clínica en todo el mundo, ya que afecta al 95% de la población felina, y de este porcentaje el 80% de los gatos permanece infectado de forma latente (Maggs y col.,1999).

El FHV-1 es un alfaherpesvirus que posee una única molécula de ADN de doble cadena, rodeado por una cápside de simetría icosaédrica. En la envoltura viral que rodea la cápside se encuentran localizadas diferentes tipos de glicoproteínas. La glicoproteína D (gD) es una de ellas y es esencial para la replicación viral (Willemse y col., 1995). Mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA) de competencia se detectaron en la gD al menos 4 epítopes diferentes (Horimoto y col., 1990).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es expresar la gD de FHV-1 utilizando la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* como sistema de expresión.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de la secuencia genómica de FHV-1 disponible en GenBank se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el gen que codifica la gD. Una vez amplificado se clonó en el vector pPIC9, que luego se utilizó para transformar por electroporación la cepa GS115 de *P. pastoris*. Las levaduras recombinantes obtenidas se cultivaron en medio BMGY a 30°C con agitación de 90 rpm, se centrifugaron a 3000xg durante 5 minutos, y se resuspendió el pellet obtenido en medio BMMY. La expresión de la gD fue puesta en evidencia mediante SDS-PAGE en una muestra de pellet celular a las 48 horas de inducción. Además, las muestras fueron analizados por *Western Blot*.

RESULTADOS

FIGURA 1

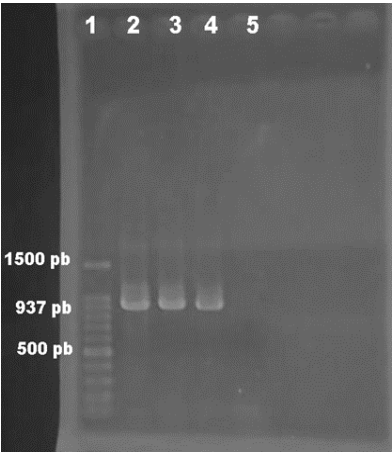


FIGURA 2

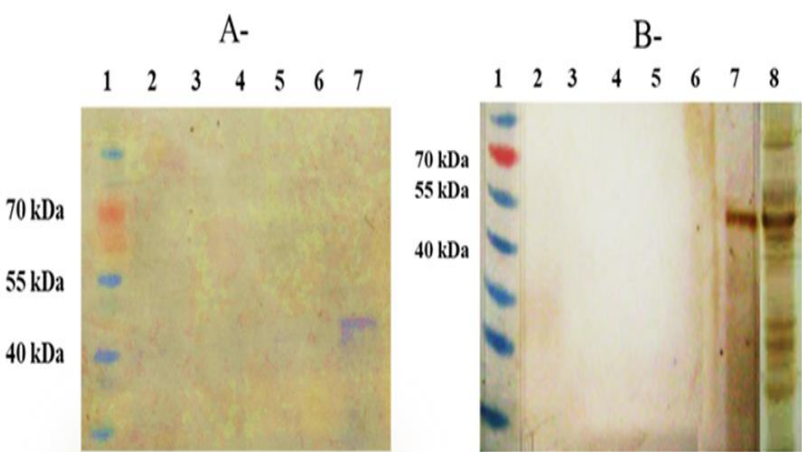


Figura 1: Amplificación por PCR de la glicoproteína D, utilizando como moldes tres muestra de ADN diferentes. Calle 1: Marcador de PM de 100 pb; Calles 2, 3 y 4: productos de PCR; Calle 5: control negativo.

Figura 2: A- SDS-PAGE Calle 1: Marcador de PM (*Page-Ruler, Fermentas*). Calles 2 a 7: pellets celulares correspondientes a colonias de GS115 recombinantes 1 a 6 tomadas a las 48 horas de inducción. B- *Western Blot*: Calle 1: prestain. Calles 2 a 7: pellets celulares correspondientes a las colonias 1 a la 6 a las 48 horas de inducción. Calle 8: control positivo

CONCLUSIONES

Se logró amplificar el fragmento que codifica para la gD de FHV-1. También, se logró expresar la gD utilizando el sistema de expresión de levadura *P. pastoris*.