

Tesis para optar al grado de Licenciado en Genética

Expresión en Escherichia coli de un fragmento del genoma del componente top de CHSV-4, y la determinación de su especificidad inmunológica mediante anticuerpos específicos contra la proteína de cubierta viral

Omar Luis Riva

**Universidad Nacional de Misiones
Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales**

**Cátedra de Planeamiento de Trabajo Científico
Licenciatura en Genética**

Realizado en el IBBM, UNLP

Posadas, Misiones

1998

Hoja de autores

Autor
Omar Riva

Director
Dr. Oscar Grau

Codirector
Dra. María L. García

a la memoria de “mi abuela” y a mamá

“En la biología nada tiene sentido, si no se observa bajo el prisma de la evolución”

Theodosius Dobzhansky

Mi reconocimiento:

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, por brindarme los recursos y el equipo necesario para la concreción de este trabajo.

A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación (SECyT), por otorgarme una pasantía de entrenamiento profesional.

Al laboratorio central del CICA, INTA de Castelar, por brindarme los recursos y equipos necesarios durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Secretaría de Bienestar Estudiantil de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, UnaM, por becarme durante los años de estudio.

Mi agradecimiento:

Al Dr. Oscar Grau, por brindarme la posibilidad de desarrollar mi trabajo de graduación en su grupo de investigación, por su dirección a la largo del trabajo y la lectura crítica de esta tesina. Por presentarme ante la SECyT para el otorgamiento de una pasantía de entrenamiento profesional.

A la Dra. María Laura García, por aceptar la codirección del trabajo, por su esmero, su apoyo, su afecto y confianza. Por su ayuda durante el desarrollo del trabajo y la escritura de la tesina.

Al Dr. R. Zandomeni, por diseñar la estrategia de clonado descrita en el presente trabajo, y facilitar el vector y cepa de expresión utilizados.

A mis compañeros del IBBM y del CICA, especialmente a Gonzalo Legarreta, Leandro Jones, M. E. Sanchez de La Torre, Selma Gago Zachert, Gabriela Naum, Martín Sarachu, Guillermo Chiarrone, Gabriela Pacheco, Paula

Facchio, Marcelo Berreta y Alejandra Tortorici, por el tiempo compartido dentro y fuera del laboratorio. Por el afecto y el apoyo constante, por la infinidad de consejos para optimizar el trabajo y la ayuda facilitada durante la escritura de la tesina.

A la Sra. Silvia Moya, por colaborar con esmero en la confección del presente trabajo.

A la familia Cap, por facilitarme el traslado diario al CICA. Por brindarme su invaluable apoyo durante mis primeros pasos.

A mi familia que siempre me apoyó, especialmente a mamá, y mis tios Ofelia y Horacio.

A Graciela Castelli y Juan Michalak, por ser mi segunda familia y apoyarme desde siempre.

A Silvio Krivokapich y Marcos Bonafede, por ser mis amigos desde el inicio de la carrera.

A Andrea por todo lo que es y será.

A la Franja Exactas, por las satisfacciones vividas.

Sumario

Indice.....	Página VI
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Materiales y Métodos.....	14
Resultados.....	37
Discusión.....	47
Figuras.....	51
Conclusión.....	57
Apéndice.....	58
Bibliografía.....	71

Indice

	Página
Resumen	1
Abstract	2
1.Introducción	3
1.1. Antecedentes históricos	5
1.2. Sintomatología general	7
1.2.1.Citrus Ringspot virus	8
1.2.2. Psorosis	9
1.3. Métodos de diagnóstico.....	9
1.4. Descripción del aislamiento CtRSV-4 de Florida	10
1.5. Importancia de la enfermedad en el mundo y la Argentina	11
1.6. Control de la enfermedad	12
2.Materiales y Métodos	14
2.1. Origen de los materiales utilizados	14
2.2. Purificación parcial del virus CtRSV-4	14
2.3. Cepa de <i>Escherichia coli</i> utilizada	15
2.4. Vector de clonado pET-10b	16
2.5. Purificación de DNA	17
2.5.1. Protocolo A	17
2.5.2. Protocolo B (modificación del protocolo A)	18
2.5.3. Protocolo C Purificación de DNA a partir de bloques de agarosa	19
2.6. Purificación de RNA total de <i>Escherichia coli</i>	20
2.7. Electroforesis de ácidos nucleicos	22
2.8. Geles desnaturalizantes <i>SDS/PAGE</i> (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio)	23
2.9. Técnica de Western-Blot	24
2.9.1. Protocolo de Western-Blot	25
2.10. Northern-Blot nativo	26
2.11. Digestión de DNA con enzimas de restricción	28
2.12. Ligación de DNA	29
2.13. Amplificación de fragmentos de DNA por la técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR)	29
2.13.1. Diseño de primers	30

2.13.2. Reacción de amplificación	30
2.13.3. Análisis por PCR de bacterias transformadas	31
2.14. Transformación de bacterias (Electroporación)	32
2.14.1 Preparación de bacterias electrocompetentes	32
2.14.2 Protocolo de electroporación	33
2.15. Inducción de la expresión de las proteínas clonadas	33
2.16. Construcción de sondas radiactivas, prehibridación e hibridación con el material de interés.	34
2.17. Secuenciación de DNA	35
3. Resultados	37
3.1. Clonado y expresión del RNA 3 del componente top de CtRSV-4	37
3.1.1. Estrategia utilizada	37
3.1.2. Amplificación del fragmento del RNA 3 de CtRSV-4	39
3.1.2.1. Primer directo	39
3.1.2.2. Primer reverso	40
3.1.2.3. Amplificación y purificación del fragmento CSA.....	41
3.1.3. Digestión del fragmento de PCR y su clonado en el vector y cepa de expresión	41
3.1.3.1. Digestión del fragmento CSA	41
3.1.3.2. Ligación del fragmento CS al vector de expresión pET-19b	42
3.1.3.3. Clonado del plásmido recombinante en la cepa de <i>E. coli</i> BL21 (DE)	42
3.1.3.4. Análisis de la secuencia nucleotídica de los clones del CS	43
3.1.3.5. Inducción de la síntesis y visualización del polipéptido CS	44
3.2. Análisis de la especificidad inmunológica de los polipéptidos inducidos	44
3.3. Detección de la expresión no inducida de los RNAs mensajeros de los polipéptidos clonados	46
4. Discusión	47
Figuras.....	51
5. Conclusiones	57
6. Apéndice:.....	58
6.1. Apéndice A: Análisis de secuencias.....	58
6.2. Apéndice B: Preparación de los medios de cultivo y soluciones de trabajo	62
6.2.1. Preparación de los medios de cultivo	62
6.2.2. Preparación de Buffers	63
6.2.3. Preparación de soluciones de trabajo	66
6.2.3.1 Soluciones para geles SDS-PAGE.....	68
6.3. Abreviaturas	69
7. Bibliografía	71

Resumen

El virus Citrus Ringspot Virus (CtRSV-4) de Florida, presenta características similares a las observadas al virus causante de la Psorosis de los cítricos (CPsAV 90-1-1) en Argentina. CtRSV-4 es aislado con menor dificultad y en mayor cantidad que el aislamiento Argentino. Ambos aislamientos están constituidos por dos componentes para ser infectivos: "top" y "bottom". Son virus a RNA cubiertos con una proteína a partir de la cual se obtuvieron antisueros policlonales que revelaron una fuerte reacción cruzada entre CtRSV-4 y CPsAV. El genoma está constituido por dos ssRNA en el top denominados RNA 2 y RNA 3, y por un ssRNA y un dsRNA en el bottom denominado RNA 1. Entre los aislamientos se determinó en el RNA2 una similitud e identidad aminoacídica del 96 y 92 % respectivamente.

Al plantear el trabajo, se sabía que en los virus multipartitos el gen que codifica la proteína de cubierta generalmente se localiza en los RNAs más pequeños, por lo que era de esperar que en el virus CtRSV el gen se localizara en alguno de los RNAs del componente top.

El objetivo del trabajo fue la expresión en *Escherichia coli* de un fragmento del marco de lectura abierto del RNA 3 del componente top de CtRSV- 4, y la determinación de su especificidad inmunológica.

Se diagramó una metodología rápida de clonado para la obtención del polipéptido de interés. Las proteínas logradas se ensayaron inmunológicamente mediante la técnica de Western-Blot con el antisuero anti-proteína de cubierta del virus CtRSV-4.

Los resultados obtenidos indican que el gen de la proteína de cubierta del virus CtRSV-4, se encuentra codificado en el ORF del RNA 3 del componente top.

ABSTRACT

The Citrus Ringspot Virus (CtRSV-4) from Florida, shows similar characteristics to Citrus Psorosis Virus (CpsAV 90-1-1) from Argentina. CtRSV-4 can be easily isolated from infected tissue in larger amount than the Argentine isolate. To be infective, both isolates must be constituted by two components: "top" and "bottom". CtRSV-4 and CpsAV are both RNA viruses with a coat protein from which polyclonal sera were obtained wich revealed strong cross reaction (García *et. al.*, 1994). The CtRSV-4 genome is constituted by two ssRNAs in the top componet (RNA 2 and RNA 3), and by an ssRNA and a dsRNA in the bottom one (RNA 1) (Derrick *et. al.*,1991; Sanchez de La Torre, *et. al.*, datps em prensa). The protein coded in RNA 2 presents an amino acidic similitude and identity of 96 and 92 %, respectively.

It is known that in the multipartite viruses the gene that codifies the coat protein is generally placed in the smaller RNAs, so in CtRSV this gene it was expected to be in any of the RNAs of the top component.

The aim of this work was the expression in *Escherichia coli* of a fragment of an open reading frame (ORF) of the RNA 3 of the CtRSV-4 top component and to test for its inmunological cross reaction with the viral coat protein.

A quick cloning methodology to obtain the polypeptide was designed. The proteins were immunological assayed by the Western-blot technique with the anti- coat protein antiserum of CtRSV-4.

The results indicate that the coat protein gene of CtRSV-4 is codified in the RNA 3 ORF of the top component.

1 Introducción

Algunos de los problemas mas significativos que enfrenta la citricultura en nuestro país son de origen sanitario, en particular por enfermedades de origen virósico. Para el caso de la psorosis, identificado como el principal enemigo de los citrus en Argentina, se estima que es responsable de la muerte del 5% de los árboles de naranjo por año (Larocca, 1985), lo cual significa un daño sustancial para una plantación perenne.

El virus asociado a la Psorosis de los cítricos (CPsAV) fue purificado y parcialmente caracterizado por García y col. (García *et al.*, 1991) a partir de un aislamiento recolectado en la EEA-INTA Concordia, Entre Ríos, denominado aislamiento 90-1-1.

El CPsAV presenta características similares a las observadas en el virus Citrus Ringspot Virus (CtRSV-4) que produce en Florida, USA (Wallace J.M. and Drake, 1968), una enfermedad similar a la psorosis argentina.

Por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa, se determinó que ambos virus están constituidos por dos componentes. Estos componentes se denominaron "top" (partículas observadas en las fracciones más cercanas al tope del gradiente de sacarosa), y "bottom" (partículas encontradas en las fracciones más rápidas del gradiente). De estos componentes, se purificó una proteína de 48 KDa para CtRSV-4 y de 50 KDa para CPsAV 90-1-1, que corresponderían a la proteína de cubierta viral (Derrick *et al.*, 1988; Garcia *et al.*, 1991).

A partir de las proteínas purificadas, se obtuvieron antisueros policlonales que revelaron una fuerte reacción cruzada entre CtRSV-4 y CPsAV 90-1-1 (Garcia *et al.*, 1994), que debido a su bajo título no son adecuados para ser utilizados en el diagnóstico de la enfermedad.

Bajo el microscopio electrónico CtRSV-4 y CPsAV 90-1-1 muestran la misma morfología, dos partículas filamentosas y delgadas de alrededor de 400-

600 y 2000 nm de longitud para el top y el bottom respectivamente (García *et al.*, 1994).

Ambos virus contienen RNA como material genómico. En particular, el bottom de CtRSV-4 presenta un RNA de doble cadena (dsRNA) de alrededor de 9000 pares de bases, y otro de 4000 bases de simple cadena (ssRNA) (Derrick *et al.*, 1991). Del componente top de CtRSV-4, se pueden aislar dos ssRNA de aproximadamente 1600 (RNA 2) y 1400 bases (RNA 3) (Sanchez de La Torre, datos en prensa).

Se clonó y secuenció el cDNA del RNA 3 del componente top de CtRSV-4, en donde se localizó un ORF de 439 aa (Sanchez de La Torre, datos en prensa).

Entre CtRSV-4 y CPsAV 90-1-1 existe una diferencia importante, la concentración en que se encuentran en los tejidos infectados en invernáculo. La de CPsAV es muy inferior y casi insuficiente para clonar el genoma viral. Por esta razón, basándose en las secuencias obtenidas a partir del aislamiento de Florida, se diseñan los primers para permitir el clonado del genoma de CPsAV 90-1-1.

Podemos afirmar, que los dos aislamientos estudiados presentan una estrecha relación basada en las características enunciadas. Además, comparten los mismos hospedantes cítricos y varios de los hospedantes herbáceos, ambos virus dependen de dos componentes para ser infectivos, presentan reacción cruzada de los antisueros policlonales contra ambas proteínas de cubierta, y se ha observado compatibilidad genómica entre los dos aislamientos que confirma el parentesco entre CtRSV-4 y CPsAV (García *et al.*, 1993). Hasta el presente entre ambos aislamientos, en el RNA 2, se encontró un 96% y 92 % de similitud e identidad aminoacídica respectivamente (Jones, comunicación personal).

En los virus multipartitos, el gen que codifica la proteína de cubierta se localiza generalmente en alguno de los RNAs más pequeños, por lo que es de esperar que el gen de la proteína de cubierta de CtRSV-4, se localice en alguno de los RNAs del componente top.

En éste capítulo se resume la historia de la enfermedad; la sintomatología observada; los métodos de diagnóstico utilizados; la descripción del aislamiento CtRSV-4; la importancia de la enfermedad en las regiones cítricas del mundo y la Argentina; y los controles implementados para combatirla.

En el presente trabajo se describe el clonado, expresión y determinación inmunológica, de un fragmento de la proteína codificada por el ORF localizado en el RNA 3 del componente top de CtRSV-4.

1.1. Antecedentes históricos.

A finales del siglo XIX se describió una enfermedad que afectaba a los cítricos, conocida en Florida (EEUU) con el nombre de gummosis y en California (EEUU) como Scaly bark gum.

En 1896, Swingle y Webber llamaron psorosis a una enfermedad que producía descascarado del tronco y ramas de los árboles. Posteriormente, con esta denominación se agruparon todas las enfermedades que presentaban un patrón de síntomas cloróticos en hojas jóvenes y/o descortezado del tronco, y que eran transmisibles por injerto. De esta manera se la diferenció de una enfermedad abiótica, sugiriendo además, su naturaleza viral. En el denominado complejo o grupo psorosis, se incluyeron muchas enfermedades que compartían estos síntomas comunes, suponiendo que eran causadas por distintas cepas o variedades del mismo agente patógeno.

En los años '30, Fawcett diferenció dos tipos de psorosis: el más común, al que denominó A que se caracterizaba por una descamación lenta del tronco y ramas principales, y un tipo rampante que se desarrollaba más rápidamente y afectaba incluso a ramas delgadas, al que llamó B. Posteriormente se describieron otros síntomas asociados con psorosis B, como son la formación de manchas cloróticas persistentes en hojas adultas y de

manchas y anillos en frutos (Fawcet y Bitancourt, 1943). Fawcet describió también por primera vez los síntomas de psorosis en hojas jóvenes (manchas y flecos cloróticos), y logró su transmisión por injerto junto con los síntomas de descamación en tronco, por lo que asumió una naturaleza vírica para esta enfermedad. Esta fue la primera ocasión en que una afección de los cítricos era atribuida a una infección vírica.

Fawcet, en 1939 amplió el término psorosis para incluir, además de la psorosis A y la B, otras enfermedades conocidas como concave gum, blind pocket y crinkly leaf, en base a que también estaban asociadas con la presencia de manchas y flecos cloróticos en hojas jóvenes.

Según Wallace, estas enfermedades junto con la denominada infectious variegation, serían tipos de psorosis y estarían causadas por razas de un mismo virus. Posteriormente, se puso de manifiesto que infectious variegation y crinkly leaf estaban causadas por ilarvirus, dejando de ser consideradas dentro del grupo psorosis.

Wallace en 1957, comprobó que al injertar trozos de corteza de las zonas descamadas de árboles con psorosis A en plantas de naranjo dulce en invernadero, éstas mostraban síntomas de psorosis B. Por el contrario, los síntomas de psorosis B no aparecían cuando se inoculaba con psorosis B o con corteza descamada de psorosis A, a una planta de naranjo dulce preinoculada con psorosis A (utilizando corteza sin síntomas). Wallace en 1957 (Wallace, 1957b), concluyó que la psorosis B no sería una forma distinta de psorosis, sino la reacción de una planta sana a un tipo particular de inóculo de psorosis A, y utilizó esta protección cruzada entre psorosis A y Psorosis B para diagnosticar psorosis A y estudiar su relación con otras enfermedades del grupo.

Posteriormente en los años sesenta se incorporan otras enfermedades en el grupo psorosis, las llamadas cristacortis e impietratura.

Wallace and Drake describieron en 1968 en California una enfermedad que, además de mostrar flecos cloróticos (flecking) similares a los inducidos por Psorosis A, se caracterizaba por la aparición de manchas amarillentas, a veces en forma de anillo, que persistían en las hojas adultas. Esta enfermedad fue

denominada Citrus Ringspot. Su descripción se llevó a cabo en base a los síntomas observados en 1944 en plantas de semilla de naranjo dulce, inoculadas por injerto a partir de un limonero de campo que presentaba una pequeña descamación en una rama.

Posteriormente se describieron diversas enfermedades que, en base a su sintomatología, se relacionaron con Citrus Ringspot. Así, de acuerdo con Timmer y Beñatena (1977), además de las enfermedades citadas, se podrían incluir en este grupo la Psorosis detectada en Concordia, Argentina (Pujol, 1966).

Estas enfermedades que compartían algunos síntomas, quedaron agrupadas como "complejo psorosis", siendo ocasionadas presumiblemente por distintas cepas o variedades de un mismo virus.

Posteriormente, el llamado complejo psorosis sería descartado por los avances realizados sobre el tema, quedando incluídas bajo los mismos síntomas, psorosis y Citrus Ringspot.

Dependiendo de los aislamientos que se comparen, CtRSV presenta similitudes importantes con psorosis, y en muchos casos son difíciles de distinguir entre sí. Por lo tanto, actualmente el término psorosis sólo se relaciona a ciertos aislamientos de psorosis y/o CtRSV, siendo consideradas como integrantes de la misma enfermedad (García, 1991). Se los propone dentro de un nuevo género, denominado Ophiovirus (Proposal for ICTV, 8TH report, 1998 Contributed by Milne, M. García and Grau).

1.2. Sintomatología general:

El síntoma común es la presencia de manchas y flecos cloróticos (flecking) en las hojas jóvenes (Fawcett, 1939), que son más fácilmente visibles al trasluz. Los flecos cloróticos se sitúan normalmente entre las nervaduras laterales de las hojas y paralelos a ellas. Tanto el número de hojas afectadas por planta, como el número de flecos por hoja es muy variable. Todos estos tipos de manchas suelen desaparecer a medida que la hoja alcanza la

madurez. En plantas indicadoras de semilla, la presencia de estos síntomas es más constante que en condiciones de campo.

1.2.1. Citrus Ringspot

El árbol del que se obtuvo el aislado inicial de Citrus Ringspot era un limonero, cuyo único síntoma visible era una pequeña lesión tipo psorosis en una rama.

Los primeros síntomas visibles en los naranjos dulces inoculados con el aislado original de Ringspot (Wallace y Drake, 1968), eran pequeñas manchas cloróticas, coincidentes en ocasiones con las nervaduras, que posteriormente se volvían amarillentas y podían tomar forma de anillo. Ocasionalmente aparecían pequeñas áreas necróticas en estas manchas. Cuando las hojas maduraban, las manchas y anillos se hacían más visibles y con frecuencia se fundían, dando lugar a manchas mayores de bordes difusos semejantes a los síntomas en hoja adulta de psorosis, aunque sin coloración parda en el envés. En ocasiones, el primer síntoma visible era una reacción de "shock" con abscisión de hojas y necrosis de los brotes jóvenes, similar al que muestran las plantas jóvenes inoculadas con psorosis.

Con posterioridad a la descripción de la enfermedad, se observaron nuevos síntomas en aislados de campo que se clasificaron como Ringspot. Así, se han descrito manchas y anillos en frutos (Timmer, 1974), deformación de hojas y presencia de "shock" en brotes jóvenes a campo (Pujol, 1966, Timmer, 1974), y descamación severa de troncos y ramas (variedades de Argentina, Texas y Florida).

1.2.2. Psorosis

El síntoma más característico y que sirvió para denominar a la enfermedad como psorosis, es la presencia de descamaciones en la corteza

del tronco y ramas principales de los árboles afectados (Swingle y Weber, 1896). Estas descamaciones suelen aparecer cuando los árboles infectados tienen de 5 a 25 años, aunque lo normal es que se formen después de los 10 años.

Las lesiones comienzan como pequeñas erupciones, que dan lugar a que zonas de la corteza cada vez mayores se levanten, se sequen y finalmente se desprendan. Cuando la descamación avanza, todo el tronco y parte de las ramas principales pueden verse afectados. En los límites de la zona en descamación, puede observarse exudación de goma. En las zonas subyacentes a las lesiones se producen capas de goma que invaden los vasos del xilema y bloquean la conducción de agua, que al principio es transparente pero progresivamente se vuelve parda tiñendo a la madera.

1.3. Método de diagnóstico

El diagnóstico de Citrus Ringspot y Psorosis , se lleva a cabo mediante ensayos de infectividad sobre plantas de semilla cultivadas en invernadero.

En el caso de Psorosis, las plantas indicadoras comunmente utilizadas son naranjos dulces de las variedades Pineapple, Hamlin o Madame Vinous de aproximadamente un año de edad, cultivados a partir de semilla en un invernadero con temperatura controlada (18-26°C). Estas plantas se inoculan por injerto con dos trozos de corteza de la planta a ensayar, y se podan a unos 10 cm por encima del punto de inoculación para forzar la brotación. Como controles, se incluyen plantas autoinoculadas y plantas inoculadas a partir de un aislado bien caracterizado de psorosis. La temperatura del invernadero es crítica para la expresión de síntomas y no debe exceder los 26°C.

A las 3 o 4 semanas de la inoculación aparecen los primeros síntomas que normalmente consisten en una reacción de "shock" (rizado de los brotes y posterior necrosis) en la primera brotación. Las hojitas nuevas sufren necrosis y abscisión, los brotes se curvan y se secan progresivamente terminando necrosándose en su totalidad, aunque suelen permanecer unidos a la planta

durante bastante tiempo. Los brotes que no sufren esta reacción, normalmente muestran manchas y flecos cloróticos transitorios en sus hojas jóvenes. Las siguientes brotaciones no suelen presentar reacción de shock y sólo muestran síntomas foliares en hojas jóvenes.

Los aislados de Citrus Ringspot inducen en plantas indicadoras de invernadero, una serie de síntomas que incluyen manchas y flecos cloróticos transitorios en hojas jóvenes. La reacción de shock que suele ocurrir en la primera brotación, también es inducida por la mayor parte de los aislados de psorosis. Los síntomas en hojas adultas tampoco son exclusivos de Ringspot, ya que también son inducidos por los aislados descritos como psorosis.

Otro método propuesto para el diagnóstico específico de Ringspot es la inoculación mecánica en *C. quinoa*. Esta especie desarrolla en pocos días lesiones cloróticas/necróticas cuando se inocula con aislados de Ringspot. Sin embargo, Garnsey y Timmer (1980) lograron la trasmisión de 3 aislados de psorosis B de California a *C. quinoa*, obteniendo los mismos síntomas.

Por lo tanto debemos concluir que por las técnicas de diagnóstico que se utilizan, no se pueden diferenciar Ringspot de psorosis.

1.4. Descripción del aislamiento CtRSV-4 de Florida

El aislamiento CtRSV-4 de Florida se transmitió a una gran variedad de hospedantes herbáceos, entre los que se encuentra *Chenopodium quinoa*, donde se producen lesiones cloróticas y necróticas (Garnsey y Timmer, 1980). A partir de lesiones individuales de *C. quinoa* se realizaron pasajes sucesivos a *Gomphrena globosa* (hospedante local y sistémico), y de ésta a pomelo Duncan donde se reprodujeron los síntomas típicos de la enfermedad. A partir del cítrico y de lesiones de *C. quinoa* se purificó un virus bipartito, cuyos componentes se separan mediante una centrifugación en gradiente de sacarosa.

Con la utilización del método ISEM, la microscopía electrónica reveló dos partículas morfológicamente similares, con forma de filamentos muy

flexibles en espiral y muy delgados (10 nm de diámetro), descritas junto a otras características del aislamiento en los párrafos introductorios.

Las preparaciones de ácidos nucleicos virales a partir de extractos crudos o parcialmente purificados no resultaron infectivos. Además se caracterizaron los ácidos nucleicos virales extraídos de fracciones infectivas del gradiente. A partir de las fracciones bottom (obtenidas dentro de las primeras 12 horas) se encontró ssRNA y dsRNA, pero éste último no fue detectado en preparaciones más viejas. Los pesos moleculares de los ssRNA son de $3,0$ y $4,0 \times 10^6$, y de $6,0 \times 10^6$ para el único dsRNA encontrado. Por otro lado, en las fracciones top se detectó sólo una banda de $0,6 \times 10^6$ aproximadamente. La presencia del dsRNA, asociado al componente bottom, esta relacionada a la infectividad del virus, ya que en los extractos no infectivos no se detectó el dsRNA; por lo tanto, el dsRNA sería un tercer componente que cosedimenta con el componente bottom y que es requerido para la infección en *C. quinoa* (Derrick *et al.*, 1991).

1.5. Importancia de la enfermedad en el mundo y la Argentina.

Psorosis es una de las enfermedades más importantes que afectó numerosas regiones citrícolas de mundo. En muchos países se introdujo la enfermedad en variedades de yemas no autóctonas, pero comercialmente importantes. Esto ocasionó la propagación de la enfermedad que produjo grandes pérdidas de árboles en Florida, Texas (USA), Argentina, Brasil, Israel, España, (Wallace, 1968), China, Uruguay y Egipto. En España, el 100% de las plantas estaban infectadas con uno o más virus, entre los que se incluía psorosis (Navarro, 1977).

Posteriormente, se aplicaron programas tendientes a obtener plantas libres de virus que en la mayoría de las regiones citrícolas del mundo, es la única manera de evitar la propagación del virus.

En 1965 Pujol y Beñatena encontraron en quintas cítricas de la provincia de Entre Ríos, una enfermedad que producía síntomas pertenecientes a psorosis (Pujol y Beñatena, 1965).

Hoy es en la Argentina una epidemia que afecta a los cítricos de la región de Concordia (Pcia de Entre Ríos), San Pedro (Pcia de Buenos Aires), Bella Vista (Pcia. De Corrientes) y Pcia de Misiones.

En los años sesenta, se aplicó un programa de selección de yemas importadas de Estados Unidos y Brasil, certificadas libres de psorosis. Los resultados obtenidos no fueron exitosos, debido a la diseminación natural de la enfermedad en nuestro país (Timmer y Beñatena, 1977).

1.6. Control de la enfermedad

Para el control de las enfermedades virales de plantas en general, se aplican diversas estrategias y técnicas, de acuerdo al conocimiento del agente causal y de las posibilidades con que se cuenta para combatirlo, dependiendo de la región, vectores, cepas disponibles, etc.

Para el caso de psorosis, se utilizaron distintas técnicas que se modificaron con el tiempo. En 1945, Wallace describió una metodología de diagnóstico que se utilizó como método preventivo (Wallace, 1945). Los árboles afectados con psorosis se descascaraban a mano, raspando hasta 1 mm de cambium y cortando el tejido desorganizado o de color anormal, alargando así la vida del árbol y manteniendo la producción por más tiempo. Este método daba buenos resultados principalmente en los primeros estadios de formación de la lesión.

Otro método, utilizado por Fawcett and Cochran, consistía en la aplicación de sustancias químicas como el dinitro-o-ciclohexafenol, para remover la corteza afectada. Sin embargo, ninguno de estos procedimientos logró eliminar por completo al virus.

Posteriormente, la contribución de los estudios de Fawcett sobre la ausencia de difusión natural de psorosis en California, llevó a la aplicación de programas preventivos en todo el mundo (Wallace, 1957a).

Ringspot se transmite principalmente por injerto y la vía primaria de difusión de la enfermedad es el material vegetal propagativo. Algunos autores sugirieron la presencia de un vector aéreo involucrado en la psorosis Argentina. Sin embargo, diversos intentos de conseguir la transmisión de Ringspot por insectos, especialmente áfidos, resultaron fallidos (Timmer and Garnsey, 1980).

La obtención de plantas madres libres de virus por medio de técnica de microinjerto y la producción de plantas nucelares, son los métodos más utilizados para la eliminación de esta enfermedad. La termoterapia se utilizó como método preventivo, aplicándose en la obtención de yemas y de plantas nucelares (Roistacher and Calavan, 1974). Sin embargo, la sanidad del material, depende del o de los métodos de diagnóstico que se utilicen para determinar la presencia del virus.

Actualmente en la Argentina, para lograr un control sanitario adecuado y liberar a las regiones cítricas de este tipo de afecciones, se creó el programa PROCITRUS, desarrollado por el INTA Concordia (PROCITRUS <http://www.inta.gov.ar/proynac/procit.htm>). El objetivo instrumental del PROCITRUS es la obtención, producción, mantenimiento y distribución de material de portainjertos y cultivares de especies cítricas, con identidad varietal y estado sanitario controlados, asegurando la disponibilidad y promoviendo el uso de material genética y sanitariamente superior para las nuevas plantaciones. La finalidad es mejorar la rentabilidad de las explotaciones y la competitividad de las exportaciones. En su esquema básico el programa PROCITRUS está compuesto por un trípode, conformado por un Centro Único de Introducción y Producción de Material Cítrico de alta sanidad e identidad varietal controlada; un Centro Proveedor de Material original controlado; y diversos Centros de Incremento y distribución de material de propagación.

2 Materiales y Métodos

2.1. Origen de los materiales utilizados.

La Ing. Sanchez de La Torre proporcionó para el presente trabajo de tesis, los clones y secuencias del aislamiento CtRSV-4.

El material del hospedante local *Chenopodium quinoa* sano e infectado con el virus, provino del invernáculo del IBBM.

El antisuero anti-CtRSV-4 fue cedido por el doctor E. Luisoni del Istituto di Fitovirología Applicata, Torino, Italy.

Los reactivos utilizados fueron de: Sigma Chemical Company , St. Louis, MO, USA; Boehringer Ingelheim, Heidelberg, Germany; Merck KgaA, Darmstadt, Germany; GIBCO BRL, Life Technologies, Gaithersburg, USA; CARLO ERBA Reagenti SRL, Milano Italy.

Las enzimas utilizadas fueron de: Promega Corporation, Madison, USA; New England Biolabs Inc., Beverly, Ma, USA.

Se utilizaron las siguientes membranas: Zeta-Probe Blotting Membranes, BioRad Laboratories, California, EEUU; Immobilon, Millipore Corporation, Bedford, MA.

Los equipos utilizados para PAGE - SDS y Western Blot, son de BioRad Laboratories, California, EEUU.

Los buffers y soluciones utilizadas, se describen en el Apéndice B.

2.2. Purificación parcial del virus CtRSV-4

Para contar con un control positivo de la proteína de cubierta de CtRSV-4 durante los ensayos de Western-Blot, se purificó parcialmente al virus Citrus Ringspot siguiendo el protocolo descrito por (García *et al.*1991), hasta la

etapa P₅₄, denominada de esta manera debido a que se obtiene un precipitado con el virus a 54000 rpm en la ultracentrífuga.

Protocolo:

- 1- Molienda en mortero de lesiones de *Chenopodium quinoa* con buffer BH (10 ml por gr de lesión).
- 2- Filtración por gasa.
- 3- Reextracción del material retenido con BH y filtración por gasa.
- 4- Clarificación con Cl₄C 8% v/v, 10 minutos con agitación suave.
- 5- Centrifugación a baja velocidad (10000 xg) con rotor SS34 en Sorvall RC5C (Sorvall, Newtown. United States)
- 6- El pellet se descarta, el sobrenadante se denomina Extracto Crudo (EC).
- 7- Ultracentrifugación del sobrenadante a 54000 rpm por espacio de 1 hr a 4^oC, con rotor 70 Ti en Sorvall Combi Plus (Sorvall, Newtown. United States).
- 8- Resuspensión del pellet con buffer BH (1 µl por mg de tejido de partida), y centrifugación a baja velocidad a 4^oC 5 minutos en centrifuga de Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Germany).
- 9- El pellet se descarta, el sobrenadante contiene el virus.

2.3. Cepa de *Escherichia coli* utilizada

La cepa bacteriana que se utilizó en la expresión del polipéptido clonado, se denomina *E. coli* BL21(DE3). Esta cepa es lisogénica para el bacteriofago DE3, un derivado de lambda que posee la región de inmunidad del fago 21, y además una región de DNA que codifica para el gen lac I, el promotor lacUV5, y el gen para la T7 RNA Pol (Studier and Moffatt, 1986). Este fragmento de DNA esta inserto dentro del gen int, previniendo que DE3 se integre o se libere del cromosoma sin la ayuda de un fago helper. Una vez que el DE3 lisogénico esta formado, el único promotor conocido para dirigir la transcripción del gen de la T7 RNA Polimerasa es el lacUV5, que puede inducirse con la adición de

IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosido). La adición de IPTG a un cultivo de células lisogénicas induce la producción de la T7 RNA Pol, la cual transcribe el DNA clonado en el vector pET (Novagen catalog, 1996-97. <http://www.novagen.com/>).

- Genotipo:

- F⁻, No contiene el episoma F.

- OmpT, Deficiente en proteasa de la membrana externa

- hsdS_B (rB- mB-), eliminada la restricción y metilación del DNA de tipo I de *E. coli* B.

- gal⁻, incapaz de sintetizar galactosa.

- dcm, no metila citosinas en la secuencia CCWGG

- (DE3); lisogénia para el fago DE3.

Su genoma no porta resistencia para ningún antibiótico, de esta manera se pueden seleccionar las bacterias transformadas con el vector de interés, adicionando el antibiótico de elección al medio.

2.4. Vector de clonado pET-19b

Según, Novagen Vectors: <http://www.novagen.com/vectfram.html>

Los vectores pET fueron diseñados por Studier. Es uno de los vectores de traducción más utilizados para expresar genes con señales de reconocimiento de eucariotas. Contienen como sitio de unión para ribosomas la secuencia de la proteína mayor de la cápside del fago T7. El vector pET-19b cuenta con una región codificante para un péptido señal (oligohistidina), que se utiliza en la purificación de la proteína expresada.

Todos los vectores pET menos la serie 5, contienen codones de stop para la traducción en los tres marcos de lectura, que se ubican downstream del sitio de clonado y de la región del peptido señal. También, contiene detrás de los codones de stop mencionados, la región del terminador T7 para finalizar la transcripción.

El "pET System" es un sistema desarrollado para el clonado y expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. Estas quedan bajo el control de las señales de transcripción y traducción del bacteriofago T7. La expresión se induce activando la transcripción y traducción en la bacteria huésped, de la T7 RNA Polimerasa, que al ser tan activa y selectiva, casi todos los recursos de la célula se invierten en la proteína recombinante, observándose que al término de la inducción mas del 50% de las proteínas totales corresponden a la codificada en el vector de expresión.

Todos los vectores con la designación pET poseen el origen de replicación pBR322.

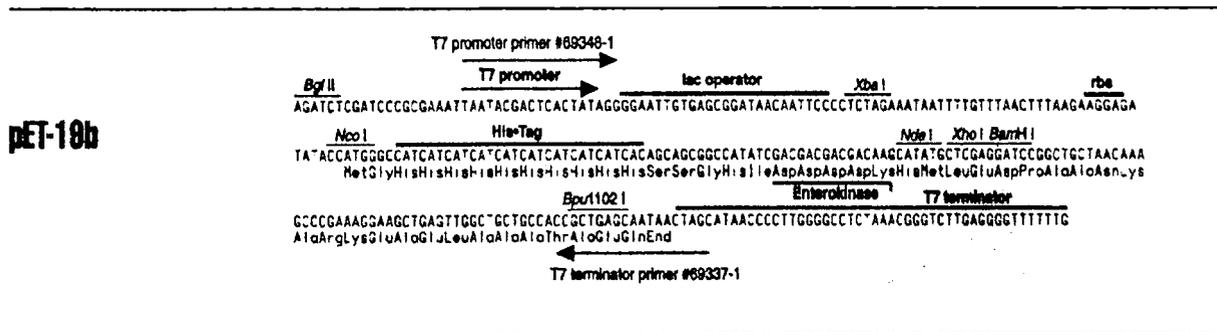


Figura 2.1: Región de clonado y expresión del vector pET-19b.

2.5. Purificación de DNA

2.5.1. Protocolo A: A modified Mini Alkaline - Lysis/PEG (Applied Biosystems, Inc., California, United States)

- 1- Cultivar las bacterias durante toda la noche a 37°C en medio terrific broth con ampicilina 0,02 mg/ml, a partir de colonias aisladas.
- 2- Centrifugar en un eppendorf 1,5 ml del cultivo saturado, durante 1 minuto a 10000 rpm, y descartar el sobrenadante (2 o 3 veces).
- 3- Resuspender el pellet en 200 µl de buffer GTE.

- 4- Adicionar 300 μ l de la solución recién preparada de 0,2N NaOH / 1% SDS, mezclar por inversión e incubar en hielo 5 minutos.
- 5- Neutralizar la solución agregando 300 μ l de acetato de potasio 3M.
- 6- Remover los restos celulares centrifugando por 10 min. a 14000 rpm, transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
- 7- Agregar RNAsa A a una concentración de 20 μ g / ml, incubar 20 min. a 37°C.
- 8- Agregar 400 μ l de cloroformo, mezclar y centrifugar 1 min. para separa las 2 fases y remover la fase acuosa a un tubo limpio (repetir 2 veces).
- 9- Precipitar el DNA agregando igual volumen de 100% isopropanol y centrifugar 10 min a 14000rpm.
- 10- Lavar el pellet con 500 μ l de ETOH 70%. Luego secar en centrifuga de vacio durante 3 min.
- 11- Disolver el pellet en 32 μ l de H₂O bidestilada estéril, y precipitar el plásmido con el agregado de 8 μ l de 4M NaCl y de 40 μ l de PEG₈₀₀₀ 13% autoclavado.
- 12- Mezclar e incubar la muestra en hielo por 20 minutos, luego centrifugar el DNA durante 15 minutos a 4°C.
- 13- Remover el sobrenadante y lavar el pellet con 500 μ l de etanol 70%. Luego secar en bomba de vacio durante 3 minutos. Resuspender con 20 μ l de H₂O bidestilada estéril, y almacenar a -20°C.

2.5.2 Protocolo B (modificación del protocolo A)

Utilizado en la purificación de DNA plasmídico de *E. coli* BL21(DE), debido al alto porcentaje de DNAsas que degradaban al DNA purificado.

El protocolo A se modificó en el paso 8. Se agregaron 400 μ l de fenol-cloroformo-isoamílico en lugar de cloroformo para extraer más agresivamente las proteínas. Se mezcló y centrifugó 1 minuto para separar las fases. Se removió la fase superior a un nuevo tubo y se procedió a una segunda

extracción con 400 μ l de cloroformo. Posteriormente se continuó con protocolo A.

2.5.4. Protocolo C: Purificación de DNA a partir de bloques de agarosa

El DNA se sometió a electroforesis en un gel de agarosa preparativo de la siguiente manera: Se siembra en la primera calle un marcador de peso molecular. En la segunda calle una alícuota del material a purificar, (calle analítica). En la tercer calle, (denominada preparativa), el resto del material a purificar.

Transcurrido el tiempo de corrida se separa la calle preparativa del resto del gel. La porción con la calle analítica, se sumerge en buffer TAE + bromuro de etidio 0.5 μ g/ml con agitación suave para permitir que este se intercale entre las bases del DNA. Posteriormente, la calle analítica se irradia con U.V. junto a una regla milimetrada, para medir la distancia de migración de la banda de interés.

Con la ayuda de la regla milimetrada, se corta el segmento de agarosa de la calle preparativa con el DNA a purificar y se coloca en un eppendorf estéril.

Se utilizaron 2 métodos para purificar el DNA contenido en el taco de agarosa:

A) Kit comercial GENE CLEAN II (Bio 101 Inc California USA)

1- Se pesan los tacos de agarosa y se adiciona 3 volúmenes de solución de NaI 6M. Se incuba a una temperatura entre 45^oC y 55^oC aplicando vortex a intervalos regulares, hasta disolver completamente la agarosa.

2- Se agregan 5 μ l de Glassmilk (matriz de sílice) dejándolo en hielo durante 15 minutos, agitando cada 2 minutos.

- 3- Centrifugar durante 5 segundos y descartar el sobrenadante.
- 4- El pellet se lava con 500 μ l de New Wash (NaCl, Tris, EDTA, etanol y agua) helada. Se centrifuga durante 1 segundo y se descarta el sobrenadante, este paso se repite 3 veces.
- 5- Se resuspende el pellet en 10 μ l de agua bidestilada estéril. Se calienta la muestra 2 o 3 minutos a 45-50⁰C. Se centrifuga 30 segundos y se retira el sobrenadante que contiene el DNA. Se repite el procedimiento y se almacena el DNA a -20⁰C.

B)

- 1- Se sumerge el taco de agarosa en 600 μ l de agua bidestilada estéril (helada).
- 2- Se repite 2 veces el procedimiento anterior, que tiene por objeto eliminar por difusión el bromuro de etidio y sales del buffer de corrida contenidos en la agarosa.
- 3- Se introduce el taco de agarosa en una columna Wizard (Wizard Plus Minipreps, Promega Corp, Madison. USA). Se centrifuga a 2500 rpm durante 3 minutos.
- 4- El líquido eluido contiene el DNA de interés.

2.6. Purificación de RNA total de *Escherichia coli*

A partir de cultivos de 12 a 16 hrs en LB + Amp se inoculó medio LB fresco. Se prosiguió con el cultivo y la inducción de los clones según se detalla en el punto 2.15. del capítulo Materiales y Métodos.

A los cultivos bacterianos inducidos y no inducidos, se les realizó el siguiente protocolo, modificado de Current Protocols in Molecular Biology, 1997, second Edition:

- 1- Centrifugar 10 ml de bacterias 15 min a 8240 xg en rotor universal 16R de Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Germany).
- 2- Retirar el sobrenadante. Resuspender en 10 ml. de protopasting buffer.
- 3- Introducir 15 minutos en hielo. Centrifugar 5 min a 5900 xg a 4 °C en rotor universal 16R de Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Germany).
- 4- Resuspender en 0,5 ml de Lysis buffer + 15 µl de DEPC.
- 5- Pasar a un tubo eppendorf, e incubar a 37°C 5 min. Introducir en agua hielo.
- 7- Agregar 250 µl de NaCl (solución saturada) y mantener 10 min en hielo.
- 8- Centrifugar 10 min. a 4°C. Pasar el sobrenadante a 2 tubos.
- 9- Agregar 1 ml de ETOH (helado) a cada tubo.
- 10- Precipitar toda la noche a -20°C.
- 11- Centrifugar 15 min a 4°C. Lavar con 500 µl ETOH 70%, (secar al aire).
- 12- Resuspender en 100 µl de de H₂O bidestilada esteril.
- 13- Agregar 150 µl de H₂O bidestilada esteril + 200 µl de fenol-agua pH 5.5 - 6
- 14- Centrifugar 7 minutos a 4°C.
- 15- Adicionar 1/10 de acetato de potasio 3 M.
- 16- Agregar 2 1/2 volúmenes de ETOH helado.
- 17- Precipitar durante toda la noche a -20°C.
- 18- Centrifugar 15 min a 4°C.
- 19- Lavar con ETOH 70% (secar al aire), y resuspender en 50 µl de H₂O bidestilada estéril.

Las muestras se analizaron por electroforesis en cubas lavadas con detergente, y tratadas con lavandina 2% durante 10 a 16 hrs. La agarosa y el TAE utilizados se esterilizaron en autoclave. La electroforesis se realizó a 4,6 volts/cm. El resultado se visualizó con bromuro de etidio 0,5 µg/ml, adicionado a la agarosa. Las muestras se conservaron a -20°C.

2.7. Electroforesis de ácidos nucleicos

Las muestras de ácidos nucleicos, se analizaron por electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis permite la separación de fragmentos de DNA según su tamaño molecular y la concentración de agarosa utilizada. Se empleó agarosa 0,8%, 1% y 2% (p/v), disuelta en el buffer TAE 1X, o TBE 1X, con bromuro de etidio a concentración final 0,3 µg/ml).

Antes de sembrar las muestras se adicionó 10 % v/v de buffer de siembra. Las electroforesis se realizaron a 5,5 volt./cm. en buffer TAE o TBE 1X, durante el tiempo necesario para la separación de los fragmentos. Como marcador de peso molecular se utilizó DNA del plásmido pcDNA II digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI / *Dde*I o *HAE*III, dando los siguientes fragmentos:

<i>Bam</i>HI/<i>Dde</i>I	<i>HAE</i> III
1204 pb.	657 pb
694 pb.	458 pb
540 pb.	434 pb
409 pb.	290 pb
166 pb.	272 pb
	267 pb
	174 pb
	142 pb
	102 pb
	80 pb
	44 pb
	29 pb
	24 pb

Concluída la electroforesis, el gel se observó en un transiluminador U.V. El bromuro de etidio es una molécula plana con 2 brazos que se intercala entre las bases apiladas del DNA. La posición de este grupo y su proximidad al DNA producen emisión fluorescente cuando el gel es iluminado por radiación

ultravioleta de 302 a 366 nm. El gel se fotografió utilizando una cámara Polaroid.

2.8. Geles desnaturalizantes SDS/PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio)

Según: Miniprotean II Electrophoresis cell manual, BioRad (BioRad Laboratories, California USA).

Se centrifugó en un eppendorf durante 1 minuto a 14000 rpm, 1,5 ml del cultivo inducido. Se retiró completamente el sobrenadante y se agregó 200 μ l de buffer de muestra para geles SDS/PAGE.

Las muestras se hirvieron durante 1 minuto y almacenaron a -20°C .

Las muestras se analizaron por electroforesis en el equipo Mini-Protean II, Electrophoresis Cell BioRad, que permite un análisis tres veces más rápido de las muestras de proteínas que con la utilización de los equipos convencionales, manteniendo inalterable el nivel de resolución. La construcción de los geles se realizó según indicaciones del fabricante, con separadores de 0.5, 0.75 o 1 mm de espesor.

Las muestras se sembraron en geles 15% de 10 o 15 calles. Se aplicaron 200 volt hasta el comienzo de la salida del colorante.

Gel de separación (15%)

Agua bidestilada	2,5 ml
1.5M Tris-HCL Ph8.8	2,5 ml
10% SDS STOCK	100 μ l
Acrlamida/BIS (30% stock) desgasificada por 15 min.	5 ml
Persulfato de amonio 10% recien preparado	50 μ l

TEMED	<u>5 μl</u>
Volumen total	10 ml

Gel de stacking

Agua destilada	6.1 ml
0,5M Tris HCl, pH 6.8	2,5 ml
10% SDS	100 μ l
Acrilamida/bis (30% stock)	1.33 ml
Persulfato de amonio	50 μ l
TEMED	<u>10 μl</u>
Volumen total	10 ml

Finalizada la electroforesis, los geles se fijaron con 3 lavados de 5 minutos en la solución de fijación/decoloración con agitación suave. La coloración se realizó agregando cantidad suficiente de la solución de Coomassie blue 0.25%, agitando suavemente durante 30 minutos. La decoloración se realizó con la misma solución de fijación, realizando varios lavados hasta observar coloración azul solamente en las bandas de proteínas. Los geles se conservaron envueltos en saran-wrap a 4°C, o se secaron en papel de filtro durante 1 hr en bomba de vacío, o fueron fotografiados con un equipo Polaroid.

2.9. Técnica de Western-Blot

Southern (Southern, 1975), fue el primero en desarrollar la técnica de blotting con la transferencia de DNA desde un gel de agarosa hacia una membrana de nitrocelulosa. Towbin (Towbin, 1979), fue quien sentó las bases para la elusión de proteínas desde geles de poliacrilamida por corriente eléctrica.

El sistema que se utilizó en el presente trabajo es el mini Trans-Blot cell, que es un módulo intercambiable del componente Mini Electrophoresis System de BioRad (BioRad Laboratories, California, USA), que permite la transferencia de proteínas basándose en los principios de Towbin.

Para el blotting se utilizó la membrana de PVDF Inmobilon, comercializada por la empresa Millipore (Millipore corporation, Bedford, MA, USA). En las características que presenta la membrana, sobresalen su alta hidrofobia y resistencia mecánica. El material de construcción es el difluoruro de polivinilideno con microporos. Estos últimos y la amplia área de superficie interna y externa son los puntos accesibles para la adsorción de proteínas. Muestra gran resistencia al metanol, que distorsiona a otras membranas como la nitrocelulosa. Además resiste cualquier protocolo de inmunotinción.

2.9.1. Protocolo de Western-Blot

El protocolo utilizado se modificó de Mini Trans Blot Electrophoretic Transfer cell, Instruction manual, (BioRad Laboratories, California, USA); y de García (García, 1991).

- 1- Se equilibró el gel en buffer de transferencia por espacio de 15 a 30 minutos, este proceso facilitó la remoción de las sales y detergente del buffer de electroforesis.
- 2- Se cortó un trozo de membrana PVDF de las dimensiones del gel. El tratamiento de la membrana requirió una inmersión en metanol de 1 a 3 segundos, luego un lavado con agua bidestilada con el objeto de retirar el metanol de la misma. Posteriormente se la colocó en el buffer de transferencia durante 15 minutos.
- 3- Se saturaron con buffer de transferencia trozos de papel de filtro del tamaño del gel, y las almohadillas del equipo de sujeción.
- 4- El sandwich se armó de la siguiente manera: (almohadilla--papel de filtro--gel--membrana inmóvilon--papel de filtro--almohadilla) dentro del cassette de sosten.

5- El cassette se introdujo en el tanque de transferencia con 600 ml de buffer. Las condiciones de transferencia fueron 15 hrs a 150 ma, en heladera a 4°C.

6- Cumplido el tiempo de transferencia, el gel se coloreó con Coomassie Blue 0.25% para visualizar las proteínas no transferidas. La membrana con las proteínas transferida se cortó en la calle del marcador de peso molecular o alguna otra de interés, el trozo separado, se fijó 5 minutos con la solución de fijación, y se coloreó con Coomassie Blue. La membrana se decoloró con la misma solución de fijación. Posteriormente se dejó secar al aire.

- Transcurrida la transferencia, la membrana se bloqueó con 5% de leche descremada en buffer TBS durante 1hr.

- Se incubó con el primer anticuerpo anti-cubierta de CRSV-4 de conejo, diluido 1:500 en buffer TBS más 1% albúmina, durante 2 o más horas en agitación a 37°C.

- Luego de tres lavados de 5 minutos, el primero con buffer TBST y los dos últimos con buffer TBS, la membrana se incubó en el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA), diluido 1:4000 en TBS más 1% albúmina, durante 1 hr en agitación a 37°C.

- Se realizaron los mismo lavados que en el paso anterior, y se reveló con 5 µl de NBT más 4 µl de BCIP por ml del buffer de fosfatasa alcalina.

- Después del revelado la membrana se enjuagó con agua bidestilada y se dejó secar al aire.

*Para la manipulación de la membrana, se utilizaron guantes y pinzas.

2.10. Técnica de Northern Blot nativo

El protocolo utilizado se modificó de Molecular Cloning, A Laboratory Manual, second edition, 1989.

Para evitar la degradación del RNA por RNAsas, requiere preparar los materiales de la siguiente manera:

1-Cuba para electroforesis tratada con lavandina 2% durante toda la noche, o al menos durante 3 hrs.

2-Agarosa 2 % TAE autoclavada.

3-Buffer TAE 1X autoclavado.

4-Buffer NaPi 250mM autoclavado (como stock 10X)

5-Agua destilada estéril en cantidad (2-3 litros)

6-Tips, buffer de siembra para geles de agarosa, y eppendorfs esterilizados.

- Protocolo

El gel se trató con una solución desnaturalizante de NaCl 10mM-NaOH 50mM, por espacio de 10 min en heladera.

Transcurrida la incubación, la reacción se neutralizó con Buffer NaPi 25mM, durante 25 minutos en heladera (se enjuagó 2 veces primero para sacar los restos de NaCl-NaOH).

Se cortaron varios papeles de filtro y 1 trozo del tamaño del gel de membrana Zeta Probe, que es un derivado amino cuaternario de las membranas de nylon apropiada para aplicaciones de blott (Zeta -Probe, Blotting Membranes, Instruction Manual, BioRad Laboratories, California, USA). Esta última se sumergió durante media hora en buffer NaPi 25mM (mientras el gel se trataba con el mismo buffer).

Para permitir la transferencia del RNA a la membrana, se armó un "sandwich" con el gel, la membrana y los papeles de filtro. El buffer NaPi asciende por capilaridad por medio de un papel secante que pone en contacto al buffer con el gel, sobre éste último se encuentra la membrana Zeta Probe que retiene al RNA que es empujado hacia arriba. Por encima de la membrana se colocan trozos de papel que se recambian a medida que se humedecen, permitiendo de ésta manera un flujo continuo de líquido.

-El tiempo de transferencia se encuentra en relación con la cantidad de muestra sembrada y al % del gel de agarosa, (por lo general se deja toda la noche).

-Finalizada la transferencia la membrana se dejó secar al aire. Luego se fijó el material transferido con UV durante 3 min.

-La hibridación de la membrana con la sonda específica, y el revelado de la película fotográfica, se detalla en el ítem 2.16.

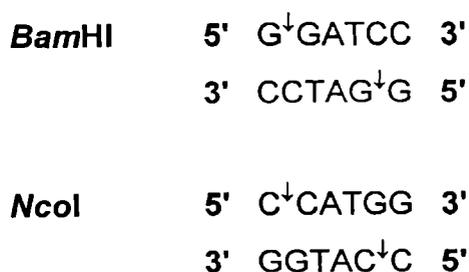
2.11. Digestión de DNA con enzimas de restricción

- Protocolo estandar para la digestión de 1 µg de DNA, tomado de: (New England Biolabs catalog, 1997 (New England Biolabs Ltd., USA)

Buffer 10X, específico para la enzima de restricción a utilizar	1 µl
BSA 10X (10mg/ml)	1 µl
DNA a digerir (1µg/µl)	1 µl
Enzima de restricción 20 U/µl	0,05 µl
H ₂ O	<u>6,95 µl</u>
Volumen final	10 µl

La mezcla se incubó a 37⁰C por 1 hr.

Las enzimas de restricción utilizadas, reconocen los sitios de corte que se detallan a continuación:





2.12. Ligación de DNA

El protocolo utilizado en las reacciones de ligación, se obtuvo de: Promega, Technical manual (Promega Corp, WI, USA):

- Mezcla estandar de ligación:

T ₄ DNA ligasa 10X Buffer	1 µl
Vector de clonado (50 ng)	1 µl
DNA a ligar	x µl
T ₄ DNA Ligasa (3000 U/ml)	1 µl
dH ₂ O	<u>x µl</u>
Vol. Total	10 µl

Las reacciones se incubaron durante toda la noche a 15⁰C o 4⁰C. Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla de ligación se almacenó a 4⁰C hasta su posterior utilización.

La masa de inserto necesario en la mezcla de ligación se obtuvo por la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{ng. de vector} \times \text{Kb de inserto}}{\text{Kb de vector}} \times \text{relación molar } \frac{\text{inserto}}{\text{vector}} = \text{ng de inserto necesarios}$$

2.13. Amplificación de fragmentos de DNA por la técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.13.1. Diseño de Primers

El diseño de los oligonucleótidos se realizó en el programa Amplify 1.2, a partir de la secuencia consenso del RNA 3 del componente top de CtRSV-4.

En el diseño se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- Una longitud mayor a 18 bases para evitar que la secuencia con la que hibrida aparezca al azar en otra región diferente a la esperada.
- Un contenido G + C de alrededor del 50%.
- Evitar el autoapareamiento en el extremo 3'.
- Evitar la presencia de secuencias palindrómicas dentro del primer.
- Evitar la presencia de varias bases complementarias contiguas dentro de la secuencia del primer.
- Considerar que en caso de complementariedad de bases, es preferible la formación de pares A-T que la de pares G-C.
- Evitar la presencia de polipurinas y de polipirimidinas.

La compra de los mismos se tramitó en la empresa comercial DNAgency (Malvern, PA, USA).

2.13.2. Reacción de amplificación

Las reacciones de PCR se realizaron en el ciclador Idaho 1605 Air Thermo-Cycler (Idaho Technology, USA), en el cual la transferencia de calor se produce por el aire caliente que rodea a las muestras cargadas en capilares de vidrio. En estos capilares, la conducción del calor a la muestra es más rápida que en tubos de plástico, debido al espesor de sus paredes (0,2 mm), y a su mayor proporción superficie volumen. Esto permite acortar notoriamente la duración de los programas de ciclado y hace innecesaria la adición de aceite mineral a las muestras. El agregado de BSA (seroalbúmina bovina) a la mezcla de reacción, en una concentración entre 250-500 µg/ml, es necesaria para

prevenir la desnaturalización de la enzima polimerasa en las superficies de contacto (The 1605 Air Thermo-Cycler, Idaho Technology, Idaho, USA).

Los programas de ciclado para capilares de 10 μ l fueron los siguientes:

- Desnaturalización: 1 minuto 30 segundos, a 94^oC
 - 35 Ciclos de amplificación, con las siguientes temperaturas y tiempos:
 - 0 segundos a 94^oC (desnaturalización)
 - 0 segundos a 50^oC (reasociación)
 - 20 segundos a 72^oC (elongación)
 - Extención final a 72^oC durante 2 minutos.
- La mezcla estandar para la reacción de PCR en 10 μ l de volumen fue la siguiente:

Buffer <i>Taq</i> DNA pol 10X	1 μ l
CL ₂ Mg 25 mM	0,6 μ l
Primer directo 5 μ M	1 μ l
Primer reverso 5 μ M	1 μ l
4 dNTPs cada uno 10 mM	0,2 μ l
BSA 5 μ g/ μ l	1 μ l
<i>Taq</i> DNA Pol 1U/0,2 μ l	0,03 μ l
dH ₂ O estéril	4,17 μ l
Molde	<u>1 μl</u>
Volumen final	10 μ l

2.13.3. Analisis por PCR de bacterias transformadas

Con palillo estéril se tocó la colonia o estría de interés. Se resuspendió en 50 μ l de H₂O destilada estéril, se colocó en agua hirviendo durante 10 minutos y luego se centrifugó 3 minutos a 14000 rpm. El sobrenadante contiene el DNA molde para la reacción de PCR.

Para la reacción se utilizaron los primers específicos diseñados para cada región, y además, los localizados en el vector de clonado pET19b, T7 dir. y T7 rev.

Secuencia del primer **T7 dir.**

5' TAATACGACTCACTATAGG 3'

Secuencia del primer **T7 rev.**

5' CCGCTGAGCAATAACTAGC 3'

La mezcla de la reacción de amplificación, y el programa de ciclado, se encuentran descritos en el ítem 2.13.2.

2.14. Transformación de bacterias (electroporación)

2.14.1 Preparación de Bacterias Electrocompetentes. (Pulse Controler, Operating Instruction and Applications Guide. Bio-Rad Laboratories, California, USA)

- 1- El día anterior sembrar un cultivo de bacterias en 20 ml de medio LB.
- 2- Inocular 1000 ml de LB (sin NaCl) con 10 ml (1/100) del cultivo saturado del día anterior.
- 3- Crecer con agitación (220 rpm), a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica $DO_{600} = 0.5$ a 0.8.
- 4- Dejar 30 min en hielo en cámara fría.
- 5- Centrifugar durante 15 min en 5 botellas (200 ml), en rotor GSA (Sorvall, Newtown, United States).
- 6- Sacar tanto sobrenadante como sea posible. Poner en hielo.
- 7- Resuspender en 1000 ml de glicerol al 10% (200 ml en cada botella)

- 8- Centrifugar 15 min a 4000 rpm.
 - 9- Resuspender en 500 ml de glicerol al 10% (100 ml en cada botella)
 - 10- Centrifugar 15 min a 4000 rpm.
 - 11- Resuspender en 2 ml de glicerol esteril 10 %.
 - 12- Congelar rápidamente en alcohol a -80°C en alícuotas de 100 μl , y conservar a -135°C .
- * El glicerol debe estar a 4°C .

2.14.2 Protocolo de electroporación. De Operating Instructions and Applications Guide, BioRad (BioRad Laboratories, California USA)

- 1- Descongelar las bacterias electrocompetentes. Mezclar bien en un eppendorf previamente enfriado 100 μl de bacterias y de 1 a 5 μl de la mezcla de ligación. Dejar en hielo por 1 minuto.
- 2-Ajustar las condiciones del electroporador a 25 μF y 2.2 KV (para cubetas de 0,2 cm), y a 200 Ohm.
- 3-Colocar la mezcla en una cubeta de electroporación (previamente enfriada) e introducirla en el electroporador.
- 4-Aplicar el impulso eléctrico, sacar la cubeta y agregar inmediatamente 1 ml de medio SOC para recuperar las bacterias transformadas (el proceso debe realizarse rápidamente para obtener mayor número de transformantes).
- 5-Pasar el ml de medio con las bacterias a un recipiente e incubar por espacio de 1 hr. A 37°C .
- 6-Plaquear alícuotas en cajas de petri con LB sólido y antibiótico de elección.

2.15. Inducción de la síntesis de las proteínas recombinantes

La inducción se realizó según el siguiente protocolo (modificado de: pET System manual 7th edition, <http://www.novagen.com/techfram.html>):

- Se tocó la colonia con palillo estéril, y se inocularon 10 ml de LB líquido con ampicilina, dejando crecer el cultivo durante toda la noche a 37°C en agitación.
- Al día siguiente se inoculó 10 ml de LB con 1 ml del cultivo del día anterior, y se dejó crecer en agitación a 37°C, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 1 (OD₆₀₀ = 0.6 a 1). El valor 0 de absorbancia se calibró con LB.
- El control negativo de inducción, se retiró del agitador y se dejó a 4°C en la heladera (para detener el crecimiento), mientras que el cultivo a inducir se le agregó IPTG en una concentración final de 1mM, dejándolo en agitación a 37°C por espacio de 3 a 4 horas.

2.16. Construcción de sondas radiactivas, prehibridación e hibridación con el material de interés

El siguiente protocolo se modificó de Molecular Cloning, a laboratory manual, second edition, 1989.

La sonda utilizada se construyó con los primers específicos del fragmento amplificado por PCR.

-Mix para la síntesis de la sonda radiactiva:

-1 µl del fragmento de PCR (aprox 100ng)

-22,5 µl de agua

-Desnaturalizar a 100°C durante 3 minutos.

-Colocar inmediatamente en agua hielo

-Agregar 4 µl de Buffer New England Biolabs 2, 10X.

2 µl de 3dNTP's - dA (10 mM cada uno)

2 µl de los primers específicos.

1,5 µl α³²P dATP (aprox 35-40 µCi)

1,5 µl de DNA pol Large fragment (Klenow)

Volumen total de la reacción 40 µl.

- Dejar la mix a temperatura ambiente durante 3 a 5 horas.

- Pasar por una columna Centri-Sep (Princeton Separations, Inc) con sephadex G-50 (previamente hidratada), para retener los nucleótidos no incorporados.
- Desnaturalizar la sonda por calor durante 3 a 5 minutos en hielo y agregar la solución de prehibridación (aproximadamente 5 ml por reacción).
- Se deja hibridar con la membrana Zeta-Probe en la que se transfirió el RNA de interes, a 65⁰C durante toda la noche en horno de hibridación.
- Transcurrido el tiempo se realizan a la membrana, en el mismo tubo de hibridación, los siguientes lavados:

2X SSC-0,1% SDS a 65⁰C durante 10 o 15 minutos.

1X SSC-0,1% SDS a temperatura. ambiente durante 10 o 15 minutos

0,5X SSC-0,1% SDS a temperatura. ambiente durante 10 o 15 minutos

- Posteriormente, se envuelve con saran-wrap la membrana Zeta-Probe que contiene la sonda hibridada con el RNA de interes, y se la coloca sobre una placa radiográfica en un "chasis" para permitir la exposición. Se la deja a -80⁰C durante 12 hrs.

El revelado se realizó de la siguiente manera:

- Dejar la película 5 minutos en revelador, y luego 5 minutos en fijador. Enjuagar con agua destilada.
- Se deja secar al aire

2.17. Secuenciación de DNA.

Las reacciones de secuenciación se realizaron en el servicio de secuenciación del CICA (INTA de Castelar). Se utilizó el Kit Taq Dye Deoxy Terminator Cyler Sequencig (Applied Biosystems, inc., CA, United States) y el equipo de secuenciación Applied Biosystems Model 373A DNA Sequencing System Equipement.

Los resultados se analizaron con el Wisconsin Package Version 9.0 GCG (Wisconsin, USA), mediante los siguientes programas:

- Bestfit: alinea el mejor segmento de similitud entre dos secuencias, utilizando el alogaritmo de Smith y Waterman (Smith and Waterman, 1981).

- Gap: Utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970) para localizar el alineamiento de dos secuencias completas de DNA.
- Peptidemap: Crea un mapa peptídico de cualquier secuencia aminoacídica.
- Peptidesort: Permite estudiar la composición de los fragmentos peptídicos obtenidos de la digestión de una secuencia aminoacídica.
- Map: El programa mapea una secuencia de DNA con enzimas de restricción y realiza la traducción en aminoácidos de la secuencia de interés, además puede crear un mapa peptídico de una secuencia aminoacídica.

La secuencia 5'→3' de cada clon se construyó alineando las secuencias logradas con los primers directo y reverso. La confirmación de la secuencia, se logró por consenso con más de 2 secuencias provenientes de eventos de secuenciación diferentes.

Para evitar la degradación del RNA por RNAsas, requiere preparar los materiales de la siguiente manera:

1-Cuba para electroforesis tratada con lavandina 2% durante toda la noche, o al menos durante 3 hrs.

2-Agarosa 2 % TAE autoclavada.

3-Buffer TAE 1X autoclavado.

4-Buffer NaPi 250mM autoclavado (como stock 10X)

5-Agua destilada estéril en cantidad (2-3 litros)

6-Tips, buffer de siembra para geles de agarosa, y eppendorfs esterilizados.

- Protocolo

El gel se trató con una solución desnaturalizante de NaCl 10mM-NaOH 50mM, por espacio de 10 min en heladera.

Transcurrida la incubación, la reacción se neutralizó con Buffer NaPi 25mM, durante 25 minutos en heladera (se enjuagó 2 veces primero para sacar los restos de NaCl-NaOH).

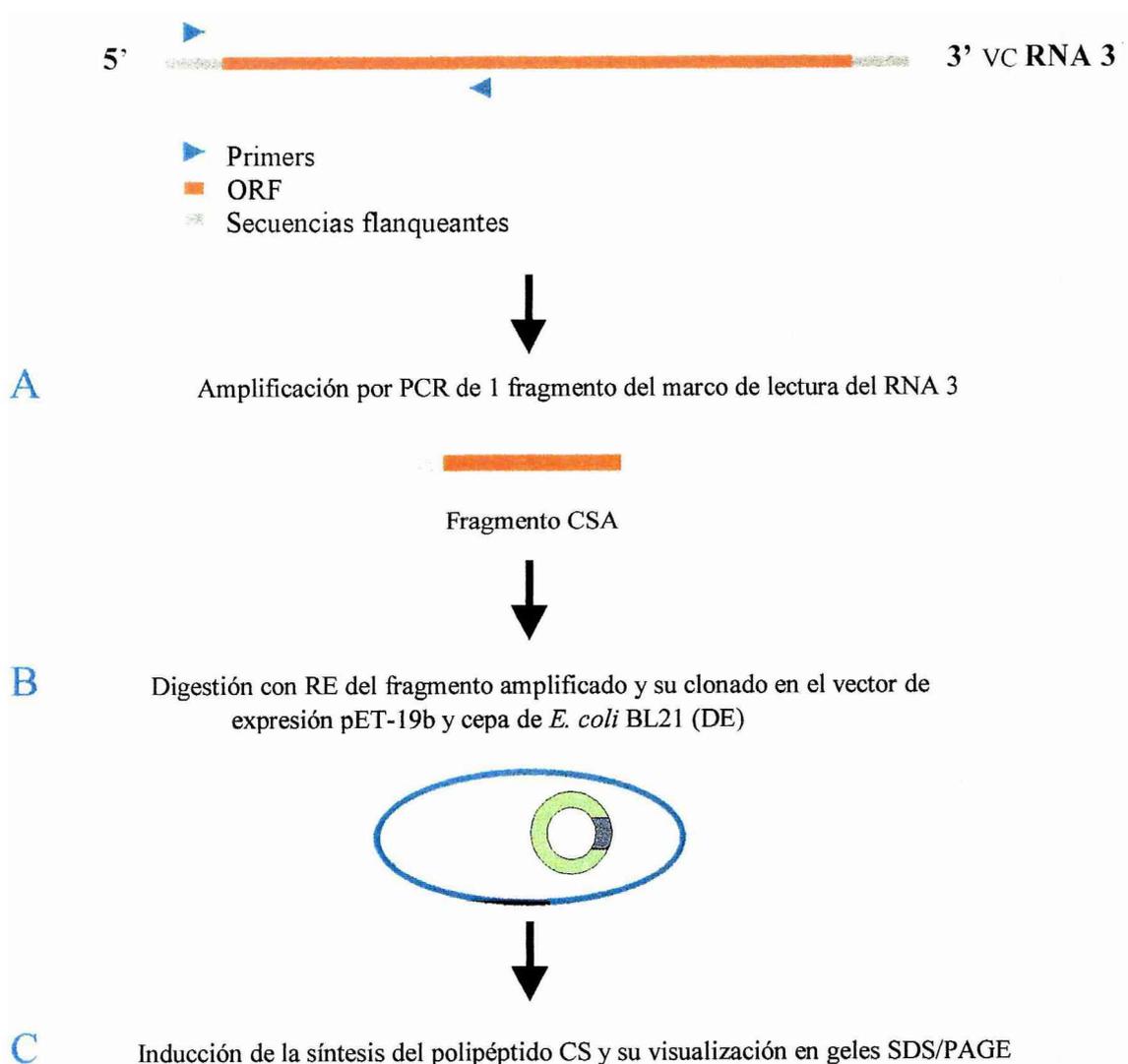
Se cortaron varios papeles de filtro y 1 trozo del tamaño del gel de membrana Zeta Probe, que es un derivado amino cuaternario de las membranas de nylon apropiada para aplicaciones de blott (Zeta -Probe, Blotting Membranes, Instruction Manual, BioRad Laboratories, California, USA). Esta última se sumergió durante media hora en buffer NaPi 25mM (mientras el gel se trataba con el mismo buffer).

Para permitir la transferencia del RNA a la membrana, se armó un "sandwich" con el gel, la membrana y los papeles de filtro. El buffer NaPi asciende por capilaridad por medio de un papel secante que pone en contacto al buffer con el gel, sobre este último se encuentra la membrana Zeta Probe que retiene al RNA que es empujado hacia arriba. Por encima de la membrana se colocan trozos de papel que se recambian a medida que se humedecen, permitiendo de esta manera un flujo continuo de líquido.

de expresión del polipéptido clonado (pET manual, 1996), o interrumpir la traducción generando polipéptidos incompletos.

Por otro lado, se detectaron codones de stop ubicados en el adaptador utilizado durante la construcción de la biblioteca genómica de CtRSV-4. Estos codones impedirían la traducción si se clonara, un fragmento liberado con las enzimas de restricción localizadas en el polilinker del vector en donde se construyó la biblioteca de CtRSV-4.

Se diseñó una estrategia rápida de clonado y expresión, que se esquematiza a continuación:



Por medio de la técnica de PCR se amplificó 1 fragmento del RNA 3, que evitó los codones de stop mencionados en el párrafo anterior. Además, la técnica presentó las ventajas del bajo costo y simplicidad práctica. Cualquier mutación introducida por la *Taq* polimerasa durante la reacción de amplificación, sería fácilmente detectada por medio del análisis de secuenciación.

3.1.2. Amplificación del fragmento del RNA 3 de CtRSV-4

En la etapa A de la estrategia, se amplificó por PCR un fragmento del RNA 3 del componente top, que se denominó **CSA**. Abarcó desde el nucleótido 43 al 557 de la secuencia consenso del RNA, con una longitud de 515 nucleótidos. En el fragmento amplificado, el marco de lectura se inicia a partir del nucleótido 22.

Los primers se diseñaron en el programa Amplify 1.2. Las secuencias de los mismos portaron mutaciones con respecto al consenso del RNA 3. Las mutaciones crearon sitios de corte para enzimas de restricción, que permitieron la ligación del fragmento amplificado por PCR con el vector de expresión pET-19b en el marco de lectura apropiado. En el diseño de los primers, se respetó el número de nucleótidos requerido por las enzimas de restricción desde el sitio de corte hasta el extremo libre del fragmento amplificado, para permitir una correcta digestión del DNA lineal (New England Biolabs, 1997).

3.1.2.1. Primer directo

El primer directo (**LP55**) posee una longitud de 34 pb, abarcó desde la base 43 a la 76 de la secuencia consenso del RNA 3.

cambiando una Guanina por una Timina, y en la 540 cambiando una Citosina por una Guanina.

3.1.2.3. Amplificación y purificación del fragmento CSA

El fragmento CSA se amplificó a partir del clon 47 de la biblioteca genómica del componente top de CtRSV-4. En la figura 3.1. se puede observar la ubicación del clon seleccionado con respecto a la secuencia consenso complementaria del RNA 3.

El plásmido del clon 47 se purificó por el método 2.5.1.A del capítulo materiales y métodos. De la purificación se diluyó una alícuota 1/1000 para las reacciones de PCR. Se amplificó por quintuplicado con el objeto de obtener una masa suficiente del fragmento CSA. El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa 0,8% TAE. El fragmento amplificado se purificó del gel de agarosa por el método 2.5.4.B del capítulo Materiales y Métodos.

Se analizó en un gel de agarosa 0,8% TAE una alícuota del fragmento CSA junto a un estandar, para cuantificar la masa del material purificado. Se estimaron 720 ng de DNA recuperados.

3.1.3. Digestión del fragmento de PCR y su clonado en el vector y cepa de expresión

En la etapa B se realizó la digestión del fragmento de PCR CSA, su ligación al vector de expresión, y el clonado en la cepa de expresión *E.coli* BL21 (DE).

3.1.3.1. Digestión del fragmento CSA

La totalidad del producto CSA recuperado, se digirió con las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI*. Con la misma mezcla de digestión, se digirió una

alícuota de un clon cuyo inserto se libera con las enzimas de restricción mencionadas, con el objeto de controlar el proceso de digestión.

Las digestiones se analizaron en un gel de agarosa 0,8% TAE. En la calle correspondiente al control del proceso de digestión, se observó el vector linearizado y un fragmento liberado con un peso molecular de 525 pb concordante al esperado, lo que indica una correcta digestión del DNA.

El fragmento digerido (denominado **CS** de 471 pb), proveniente del fragmento de PCR CSA (515 pb), se purificó del gel de agarosa con el método 2.5.4.B del capítulo materiales y métodos.

Una alícuota del fragmento CS purificado, se analizó en un gel de agarosa 0,8% TAE junto a un estandar de masa cuantificado. Se estimaron 200 ng de DNA recuperados.

3.1.3.2 Ligación del fragmento CS al vector de expresión pET-19b

La ligación del fragmento CS (471 pb) con el vector de expresión se realizó de acuerdo a los pasos detallados en el protocolo de ligación del capítulo Materiales y Métodos. En la mezcla de ligación, la relación molar entre inserto/vector se ajustó en 1/8.

La mezcla de ligación se incubó durante toda la noche a 4°C.

3.1.3.3. Clonado de los plásmidos recombinantes en la cepa de *E. coli* BL21 (DE)

La transformación de la cepa de *E. coli* BL21 (DE), se realizó de acuerdo a lo descrito en el capítulo Materiales y Métodos. Se utilizaron bacterias electrocompetentes con una eficiencia de 8×10^8 UFC por μg de DNA transformante.

Las bacterias electroporadas se plaquearon en cajas de LB + Amp. Se obtuvieron más de 200 colonias transformantes (clones **CS**). Se seleccionaron

20 colonias al azar para confirmar por PCR la presencia de los plásmidos recombinantes. Los productos se analizaron en un gel de agarosa 0,8% TAE. En la figura 3.2. se observan los clones (1, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 18, 19) que presentaron una banda del peso molecular esperado (515 pb).

3.1.3.4. Análisis de la secuencia nucleotídica de clones CS

Los plásmidos de los clones seleccionados 1CS y 8CS, se purificaron por el método 2.5.2 descrito en el capítulo Materiales y Métodos.

Las reacciones de secuenciación se realizaron con el servicio que cuenta el CICA, INTA de Castelar. Para las reacciones se utilizaron los primers T7dir y T7rev, localizados en el vector de expresión. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas, se analizaron en los programas detallados en el punto 2.17. del capítulo Materiales y Métodos. Estas se compararon con la secuencia consenso del RNA 3 que no presenta diferencias con la del clon 47, del cual se amplificó el fragmento clonado.

El clon 1CS presentó una mutación puntual en el nucleótido 209, cambiando una Guanina por una Adenina. Esta mutación no alteró el marco de lectura, pero si al aminoácido 70 involucrado del polipéptido expresado. Este último cambió de Glicina al Acido Glutámico. Los cambios se resaltan con color azul en el esquema comparativo del Apéndice A.

En el clon 8CS se detectaron 2 mutaciones puntuales, una en el nucleótido 22 cambiando una Citosina por Timina, y otra en la posición 349 cambiando Guanina por Adenina. Los cambios no alteraron el marco de lectura del polipéptido clonado, pero si los aminoácidos 8 y 117 cambiando Prolina por Serina y Acido Glutámico por Lisina respectivamente. Estos cambios se detallan con color azul en el esquema del Apéndice A.

3.1.3.5. Inducción de la síntesis y visualización del polipéptido CS

La etapa C del diagrama corresponde a la inducción de la síntesis del polipéptido CS y su visualización en geles SDS/PAGE. Para esto, los clones CS cuya secuencia se determinó por el análisis de secuenciación, se cultivaron e indujeron por el método detallado en el capítulo de Materiales y Métodos.

Las muestras de proteínas totales de los clones CS inducidos, se analizaron en geles SDS/PAGE 15%. La coloración de los geles se realizó con Coomassie Blue, como se detalla en el ítem 2.8. del capítulo Materiales y Métodos. El peso molecular esperado para el polipéptido CS fue de 19,5 KDa. En la figura 3.3. se observa una banda en el clon inducido 1CS cuyo peso molecular se calculó en 19.5 KDa, y otra banda en el clon inducido 8CS cuyo peso molecular se estimó levemente superior al esperado. La observación de al menos en el clon 1 CS de una banda del peso molecular esperado, sugirió la obtención del polipéptido de interés.

3.2. Análisis de la especificidad inmunológica de los polipéptidos inducidos

La determinación inmunológica de las proteínas 1CS y 8CS, se realizó mediante de la técnica de Western Blot e inmunotinción con fosfatasa alcalina + sustrato.

Las preparaciones de proteínas totales de los clones 1CS y 8CS inducidos y no inducidos, se sometieron a electroforesis en geles SDS/PAGE 15% junto a preparaciones de planta sana y enferma con el virus CtRSV-4, denominadas P₅₄ sano y enfermo respectivamente. El volumen sembrado de material enfermo (control positivo), se ajustó experimentalmente en 0,065 gr de lesiones de *Chenopodium quinoa*. También se sembraron preparaciones de proteínas totales de *E. coli* BL21(DE) sin plásmido, que se utilizaron para discriminar las bandas inespecíficas detectadas por el anticuerpo anti-cubierta de CtRSV-4.

Las condiciones de transferencia tales como: temperatura, composición del buffer y duración, se ajustaron experimentalmente, realizando modificaciones al protocolo original (Garcia, 1991).

Las condiciones óptimas de transferencia, incubación con los anticuerpos y revelado de las membranas, se detallan en el apartado 2.9.1 del capítulo Materiales y Métodos.

El revelado de las membranas con las proteínas transferidas, mostró el reconocimiento específico por parte del anticuerpo anti-CtRSV-4 de las proteínas inducidas de los clones 1AS y 8CS. También se observó nítidamente la detección del virus en las muestras de control positivo. Además, en las preparaciones de P₅₄ sano y enfermo, se detectó una proteína de aproximadamente 18 KDa, que sugiere la identificación de una proteína inespecífica de planta por parte del antisuero. En los clones CS inducidos y no inducidos se detectó otra proteína de un peso molecular de 14 KDa aproximadamente. Esta también se visualizó en las calles de bacterias sin plásmido, lo que sugiere el reconocimiento de una proteína bacteriana inespecífica. En la figura 3.4. se pueden observar los resultados descriptos.

Los clones CS codifican el extremo amino de la proteína localizada en el RNA 3 del componente top del virus CtRSV-4. El reconocimiento específico por el antisuero anti-cubierta de CtRSV-4 de las proteínas expresadas, indica el hallazgo del gen que codifica la proteína de cubierta del virus en estudio.

En algunas preparaciones de clones CS no inducidos, se observó una banda tenue localizada a la misma altura que las proteínas CS inducidas. Se descartó la posibilidad de detectar una proteína de *E. coli*, dado que en las muestras de bacterias sin el vector no se la visualizó. Se pensó en un escape en el sistema de represión del polipéptido clonado, descrito en el apartado 2.4. del capítulo Materiales y Métodos. Este evento es probable, ya que el represor lac no se encuentra unido constantemente al DNA (Benjamin Lewin, 1997), permitiendo la transcripción de la T7 RNA pol, y del polipéptido clonado.

3.3. Detección de la expresión no inducida de los RNAs mensajeros de los polipéptidos clonados

Para demostrar que los RNAs codificantes de los polipéptidos clonados en el sistema de expresión pET-19b y *E. coli* BL21 (DE), presentan una transcripción basal no inducida, se realizó un Northern Blot nativo del RNA total bacteriano de los clones CS. Con esta técnica de alta sensibilidad es posible detectar los transcritos (RNAm) realizados por la T7 RNA pol.

Para ello se purificaron los RNAs totales de los clones 1 y 8CS (inducidos y no inducidos), y de *E. coli* BL21 (DE) sin plásmido, siguiendo los pasos del protocolo descrito en el ítem 2.6 del capítulo Materiales y Métodos. Las muestras de RNA se analizaron en un gel de agarosa 2% (figura 3.5.). Los pasos seguidos durante la transferencia de las muestras, y las precauciones en el manejo del material, se describen en el capítulo Materiales y Métodos.

La sonda radiactiva para la detección del RNAm de los clones CS, se construyó según lo descrito en el capítulo Materiales y Métodos. La reacción de hibridación se incubó durante toda la noche.

En la Figura 3.6. se puede observar el resultado del revelado de la película fotográfica. Las bandas con marca más intensa corresponden a los transcritos de los clones 1 y 8CS inducidos. Al lado de estos, se encuentran las bandas con marca de menor intensidad, que corresponden a las calles de los clones no inducidos. También se observa la ausencia de marcado en la calle correspondiente a la bacteria sin plásmido. Estos resultados confirmaron la existencia de transcritos no inducidos en los clones CS.

4 Discusión

Actualmente se cuenta con un método de diagnóstico de la enfermedad que requiere largos períodos de tiempo y es de alto costo. Existe la necesidad de un método de detección no biológico para el virus causante de la Psorosis de los cítricos, que sea rápido, confiable y de bajo costo. Esta enfermedad, como se detallara en el capítulo introductorio, es una de las enfermedades transmisibles mas importantes que afectan la citricultura de la Argentina y el mundo. Recientemente Garcia *et al.*, 1997a, b, publicaron trabajos acerca de métodos de diagnóstico basados en técnicas serológicas y de RT-PCR, con resultados alentadores. El hallazgo del gen de la proteína de cubierta viral, es de fundamental importancia para el desarrollo de técnicas sensibles y más económicas, que permitan identificar a campo al agente causal de la enfermedad.

Con el objetivo de identificar el gen de la proteína de cubierta en el RNA 3 del componente top, se diseñó una estrategia rápida de clonado y expresión en el sistema *E. coli* / pET-19b. Esta demostró ser una alternativa práctica en respuesta a la necesidad de resultados experimentales a corto plazo.

Para la expresión del marco de lectura completo del RNA 3 de CtRSV-4, se requiere del análisis de la secuencia consenso, como la localización de codones no usuales para la maquinaria de síntesis bacteriana, o la existencia de un sitio secundario de iniciación de la traducción (pET System manual, Novagen, WI, USA). Tales estudios no pudieron realizarse, debido a que al comienzo del presente trabajo, no se contaba con la secuencia completa del ORF confirmada por varios clones de la biblioteca genómica de CtRSV-4. Por tal razón, se decidió clonar un fragmento que corresponde a los primeros 157 aa del marco de lectura codificado en el RNA 3.

En el sistema de expresión se utilizó el vector pET-19b, que contiene 2 posibles sitios de inserción que aportan el codon de iniciación de la traducción.

Ellos son los sitios de corte de las enzimas de restricción *NdeI* y *NcoI*. Si se elige el sitio de inserción *NdeI*, el polipéptido expresado será una proteína de fusión que portará en el extremo amino un dominio de oligohistidina (His-Tag), que se utiliza para la purificación de la proteína expresada. Además, se ha descrito que cuando el segundo aminoácido de una proteína en *E. coli* es Leu, el polipéptido es poco estable en el interior de la bacteria. Este evento se debe a la rápida remoción del aminoácido fMet y a la posterior degradación a que queda expuesta el resto de la proteína (pET System manual, Novagen, WI, USA). Debido a que el clonado mediante el sitio *NdeI* permite la inserción de cualquier aminoácido detrás del codon de iniciación, el segundo aminoácido del fragmento del RNA 3 sería una Serina (TCG), que difiere en una letra con respecto al codon de Leucina (TTG). Dado que la secuencia consenso del RNA 3 no se encontraba totalmente confirmada, para evitar el riesgo de clonar un fragmento con una Leucina como segundo aminoácido, se decidió evitar el clonado con el sitio de restricción *NdeI*. Además, las experiencias previas en el laboratorio señalaron que la linearización del vector con enzimas de restricción muy próximas como por ejemplo *NdeI* y *BamHI* (ver esquema del vector, pág.16 del capítulo Materiales y Métodos), podría generar productos con digestiones parciales que disminuirían la eficiencia del clonado.

Por las razones expuestas, se decidió ligar el fragmento del RNA 3 mediante el sitio de inserción *NcoI*. Este último, no aporta el dominio HIS-TAG al polipéptido expresado, pero asegura que el segundo aminoácido de la cadena polipeptídica comience con G. De esta manera el segundo aminoácido del polipéptido CS fue una Alanina (GCG).

La transformación de *E. coli* con el vector recombinante, generó más de 200 clones transformantes. Del análisis de 20 clones seleccionados al azar, 13 contenían el fragmento de interés. Al realizar la inducción de los mismos, 2 de ellos mostraron una banda diferencial en geles SDS/PAGE 15%, de los cuales el clon 1CS presentó una banda de un peso molecular similar al esperado (19,5 KDa), y el clon 8CS una banda levemente superior al esperado. La diferencia observada puede deberse a distintas concentraciones de sales o de proteínas

totales en las muestras. Este resultado sugirió que al menos el clon 1CS presentaba el polipéptido clonado.

Se analizó la secuencia nucleotídica de los clones 1CS y 8CS. En las secuencias de estos clones, no se localizaron mutaciones que alteraran el marco de lectura de los polipéptidos inducidos.

Se transfirieron a membranas de PVDF muestras de proteínas totales de los clones 1CS y 8CS, para ser testeadas inmunológicamente con el anticuerpo anti-cubierta de CtRSV-4. Dentro de las condiciones de transferencia, la adición de SDS 0,05% al buffer permitió transferir a ciertas proteínas retenidas en los geles de poliacrilamida. El agregado del detergente no incrementó la temperatura del buffer durante la transferencia, como tampoco afectó la antigenicidad de las proteínas inducidas (Mini Trans-Blot Electrophoresis Transfer Cell, Inst. Manual, BioRad).

Se sospechaba que uno de los RNAs del componente top portaba el gen de la proteína de cubierta viral. De ambos RNAs, el RNA 3 por tener una longitud aproximada de 1400 pb, codificaría un polipéptido con un peso molecular aproximado al observado para la proteína de cubierta del virus. Los resultados logrados apoyan la decisión de clonar y expresar un fragmento del RNA 3. Los polipéptidos clonados fueron detectados por el anticuerpo anti-CtRSV-4, confirmando que el gen de la proteína de cubierta de CtRSV-4, se encuentra codificado en el RNA 3 del componente top.

En ciertas preparaciones de clones CS no inducidos, se detectó una pequeña banda localizada a la misma altura que las proteínas inducidas 1CS y 8CS. Se descartó la posibilidad de detectar una proteína bacteriana inespecífica, dado que los controles de bacteria sin plásmido y bacteria con el vector ligado a otro inserto no mostraron la banda descrita. Se pensó en un escape en el sistema de represión de la traducción del polipéptido clonado. Este evento es probable, ya que el represor lac no se encuentra ligado de manera permanente al DNA (Benjamin Lewin, 1997). De esta manera, se permitiría a la RNA pol de la cepa de *E. coli* BL21 (DE) transcribir en baja frecuencia el gen de la T7 RNA pol. Una vez sintetizada la enzima del fago T7,

y bajo el mismo principio, el promotor del DNA clonado quedaría libre para la transcripción de los fragmentos CS.

La comprobación experimental de que los polipéptidos clonados en el sistema de expresión pET-19b y *E. coli* BL21 (DE), presentan una transcripción basal no inducida, se realizó mediante la técnica de Northern Blot nativo. Con esta técnica de alta sensibilidad, es posible detectar los transcritos (RNAm) realizados por la T7 RNA pol de los fragmentos CS. Los resultados confirmaron la existencia de transcritos realizados por la T7 RNA pol, es decir que el sistema de represión de la transcripción utilizado, no fue lo suficientemente eficiente para reprimir totalmente la transcripción del fragmento clonado de la proteína de cubierta viral.

Sabiendo ahora que el gen que codifica la proteína de cubierta de CtRSV-4 esta localizado en el RNA 3 del componente top, es posible preparar antisueros anti-cubierta que permitirán incrementar la sensibilidad de las técnicas de detección inmunológica. Además, se podrán realizar estudios para conocer parte del ciclo infectivo del virus en plantas infectadas, empleando técnicas de inmuno-histoquímica sobre tejidos infectados, y otras técnicas que requieran del conocimiento del gen de la proteína de cubierta.

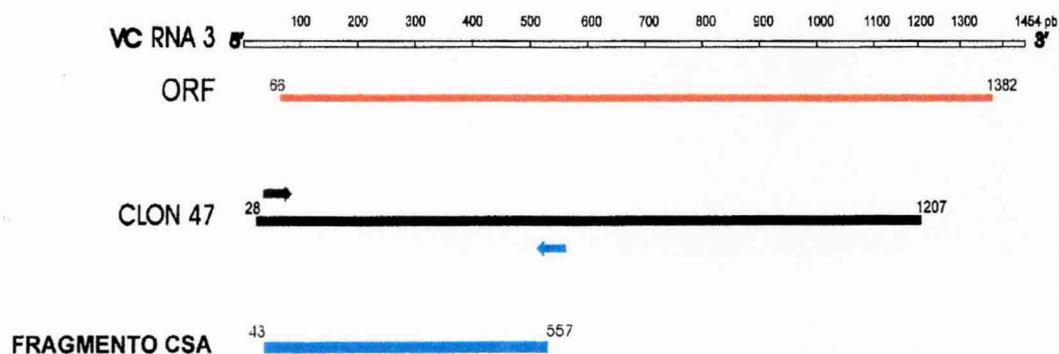


Figura 3.1: Esquema del RNA 3 del componente top de CtRSV-4, y de las longitudes del marco de lectura abierto y el clon de la biblioteca genómica de CtRSV-4, utilizado para amplificar por PCR el fragmento CSA. En azul se esquematiza la ubicación de los primers y del fragmento CSA con respecto a las coordenadas del RNA 3.

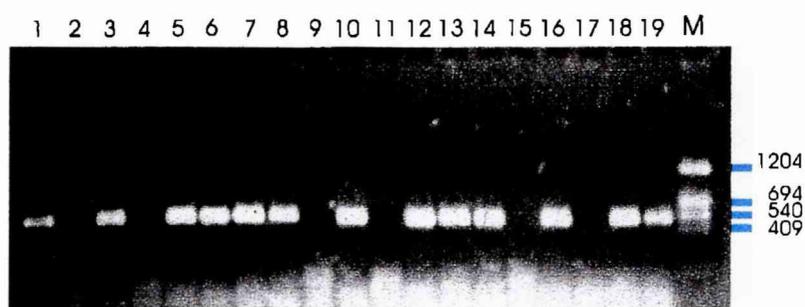


Figura 3.2: Análisis por electroforesis en gel de agarosa 0,8% TAE de la confirmación por PCR de la presencia de los insertos CS en las colonias transformadas. Se puede apreciar una leve distorsión en el frente de corrida. Calles 1, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 18 y 19, corresponden a los clones CS positivos; calle M, marcador de peso molecular pcDNAII cortado con *Bam*HI/*Dde*I.

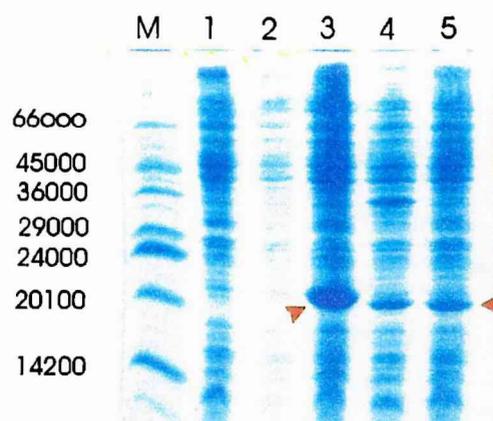


Figura 3.3: Análisis por electroforesis en gel SDS/PAGE 15%, de muestras de proteínas totales de *E. coli* BI21(DE), clones 1 y 8CS inducidos y no inducidos: Calle 1, clon 8CS no inducido; calle 2, clon 1CS no inducido; calle 3, clon 8CS inducido; calles 4 y 5, clon 1CS inducido; calle M, marcador de peso molecular Dalton Mark VII (Sigma). Las flechas indican las proteínas inducidas 8CS (calle3), y 1CS (calles 4 y 5).

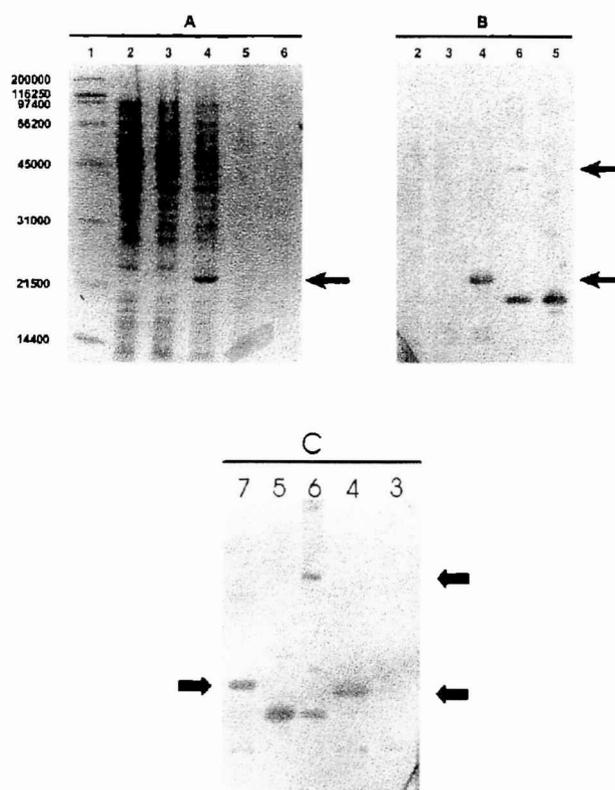


Figura 3.4: Análisis en gel SDS/PAGE (A) y Western Blot (B y C), de proteínas totales de *E. coli* BL21 (DE), clon 1CS inducido y no inducido, y P₅₄ sano y enfermo; en C además, el clon 8CS inducido. Las tres figuras de geles distintos. Calle 1, marcador de peso molecular Broad Range (BioRad); calle 2, *E. coli* BL21 (DE); calle 3 clon 1CS no inducido; calle 4, clon 1CS inducido; calle 5, P₅₄ sano; calle 6, P₅₄ enfermo; calle 7, clon 8CS inducido. Las flechas marcan en A, la proteína inducida 1CS; en B, la flecha superior marca la detección de la proteína de cubierta viral, la inferior la detección de la proteína inducida 1CS (19,5 KDa); en C, la flecha superior marca la detección de la proteína de cubierta de CtRSV-4, las inferiores (izquierda) la detección de la proteína inducida 8CS (20 KDa, aprox.), (derecha) la detección de la proteína inducida 1CS.

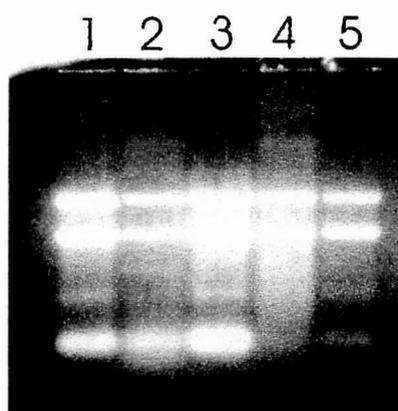


Figura 3.5: Análisis por electroforesis en gel de agarosa 2% TAE, de muestras de RNA total de *E. coli* BL21(DE) y clones 1 y 8 CS inducidos y no inducidos: Calle 1, *E. coli* BL21 (DE); calles 2 y 3, clon 1CS inducido y no inducido respectivamente; calles 4 y 5, clon 8CS inducido y no inducido respectivamente.

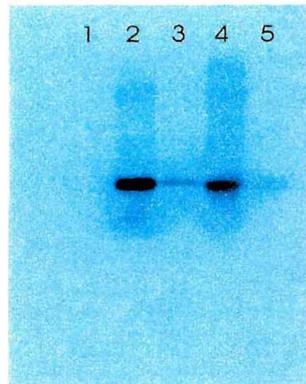


Figura 3.6.: Análisis por Northern Blot nativo de muestras de RNA total de *E. coli* BL21(DE) y clones CS inducidos y no inducidos: Calle 1, *E. coli* BL21 (DE); calle 2, clon 1CS inducido; calle 3, clon 1CS no inducido; calle 4, clon 8CS inducido; calle 5, clon 8CS no inducido.

5- Conclusiones

- * Se amplificó por medio de la técnica de PCR 1 fragmento de DNA de un clon correspondiente al marco de lectura codificado en el RNA 3 del componente top de CtRSV-4.

- * El fragmento amplificado se clonó y sintetizó con éxito en el sistema de expresión pET-19b / *Escherichia coli* BL21(DE).

- * Se confirmó la autenticidad de los clones obtenidos determinándose su secuencia nucleotídica comparándola con la secuencia consenso del RNA3.

- * El análisis de la especificidad inmunológica de los polipéptidos expresados, indica que el ORF presente en el RNA 3 del componente top de CtRSV-4, codifica el gen de la proteína de cubierta del virus CtRSV-4.

6 Apéndice

6.1. Apéndice A: Análisis de secuencias

Secuencia consenso del RNA 3 de CtRSV-4

```
5' 1 GATACTTTTT TTTGTGGAAA AAGCATCATT TTGTCAAGTT TTCAACTAAA TACTAAGAAC TGAAAATGTC
71 GATTCTTATT AAAGTGTAC AGCTGATTGA TGCCAAAGCA AAATGGGAAA GTGACAAAGA GAATTGCCCT
141 GCTGAAATAA CAACTCTCCT GAAAACATAT GGAGTTCTGA GAGAGACTGG AGCATTAAAGC TCAAAAAGCA
211 CAGCTTATCT GGCTGGATTG TCAAAAGACA AGAGAGTAAT CCTAACTGAT GAAGGATTAG CAGAGTTCAA
281 GAATGTTGAA AATCCTCATG ATCAGGGAGA GAAGCCAACA TTTTCATTGG CCTCATCCAG CAACATCAAG
351 ATAACGATA TAGAGTTTAT CAAACAGAAA ATGGAGCAGG AGACGTTTCA AATTGATCAA CTGAAGCTCA
421 AGGAACAAAT TGAGAATTTT ATCAAAACAG TGACTCTTGA TGATGAATCT TACTACTGAGG GTGAGATAGT
491 CATCAAGCAT TTTGGTAACC CAGATGCTGA GCTCAATATG CTTGTGACTG CTGGAACAAA AATACTGGAT
561 TTCCTGGAAA AGCTGATGAC AAAAGGAAAG TTCCTGAATT TGTCAGTCA AACTGTATG ATGGTGACGT
631 GAGTTTGTC AAAATCAGTG ATGAGTTGAG CCATGCTCCA ACCAAGAAAT TCCCTGCAAG GGTATTTCTC
701 AAGATTGATA TTGATAACTT GCCAAGTGCT GTTTGTCTCA GATGCAAAC GAATATTGCT GGAATCGAT
771 CTGTGAGGTA TGCCAGCTTT GCAAGCAGCT GGTCTAGTAT ATGTTTCAAT GAAAGGAGAC ACTAAATCAC
841 TCAACTTGTT CAAGATAGAG CAAGTTGATG GGGTCTGTGA TTCTGATATT GTCAAAAATA TCAGGGTAGC
911 CAAGAGAGCA ATTCAAGCTG CTTTTGTACT TGTTTTCACA CAAGGGTCGC TTCAAACAAA GCAAAGTTG
981 TCCCCTGCTG TTGGTGCAAC TCCTGAGTCC TTGATGCCTT TACTAGAAAC AAACCAGAAG ATGAGAAGG
1051 CAATTGCAAT TAGGGATTTC CTAAAACGA TGGAAGGTCA ATGGAAAAAC CAGAAGCGAC TCCACCCCTT
1121 ATCTGATGAG AAACCGACAA TCAAGAACTT CACCTTGAAG CTAACATGCG CTATAATCTA CAGCCTCACT
1191 CCAGATGGAA GAACTGACAT GGCAGAGAGG ATAATATCCG ACAATAATAA GGGGTTTCAG AATGATAGGA
1261 ACTTTTTTGG TGATGGTGAA GGGCCAATAA GGACATGGAG TGTGTTGACA AAACCAGAGG CAGATTTGAG
1331 CAATATAACA GTCGACGGTC TCAAAGGTAT CTTTGGGGTG GCTGCGACTA TGTAATTGCA TTCTTTATTA
1401 ATGCTGTGTG CTTGCATGTT ATCGTTTTAA ATAAACAAA GTTCCCAAT TCGG 3'
```

En negro se identifica al marco de lectura codificado en el RNA 3 del componente top de CtRSV-4. En color azul, se detallan las secuencias flanqueantes del marco de lectura localizado en el RNA 3.

Alineamiento de la secuencia nucleotídica del clon 1CS con el consenso del RNA 3

Clon 1CS	5' 1	ATGGCGATTCCCT	12
consenso	5' 28 ATTTTGTCAAGTTTCAACTAAATACTAAGAAGTAAAAATGTCGATTCCCT		77
	13 ATTTAAAGTGTACAGCTGATTGATGCCAAAGCAAAATGGGAAAGTGACAA		62
	78 ATTTAAAGTGTACAGCTGATTGATGCCAAAGCAAAATGGGAAAGTGACAA		127
	63 AGAGAATTGCCCTGCTGAAATAACAACCTCTCCTGAAAACATATGGAGTTC		112
	128 AGAGAATTGCCCTGCTGAAATAACAACCTCTCCTGAAAACATATGGAGTTC		177
	113 TGAGAGAGACTGGAGCATTAAAGCTCAAAAAGCACAGCTTATCTGGCTGGA		162
	178 TGAGAGAGACTGGAGCATTAAAGCTCAAAAAGCACAGCTTATCTGGCTGGA		227
	163 TTGTCAAAAGACAAGAGAGTAATCCTAACTGATGAAGGATTAGCAGGGTT		212
	228 TTGTCAAAAGACAAGAGAGTAATCCTAACTGATGAAGGATTAGCAGAGTT		277
	213 CAAGAATGTTGAAAATCCTCATGATCAGGGAGAGAAGCCAACATTTTCAT		262
	278 CAAGAATGTTGAAAATCCTCATGATCAGGGAGAGAAGCCAACATTTTCAT		327
	263 TGGCCTCATCCAGCAACATCAAGATAACTGATATAGAGGTTATCAAACAG		312
	328 TGGCCTCATCCAGCAACATCAAGATAACTGATATAGAGGTTATCAAACAG		377
	313 AAAATGGAGCAGGAGACGTTTCAAATTGATCAACTGGAGCTCAAGGAACA		362
	378 AAAATGGAGCAGGAGACGTTTCAAATTGATCAACTGAAGCTCAAGGAACA		427
	363 AATTGAGAATTTTATCAAACAGTGACTCTTGATGATGAATCTTACACTG		412
	428 AATTGAGAATTTTATCAAACAGTGACTCTTGATGATGAATCTTACACTG		477
	413 AGGGTGAGATAGTCATCAAGCATTTTGGTAACCCAGATGCTGAGCTCAAT		462
	478 AGGGTGAGATAGTCATCAAGCATTTTGGTAACCCAGATGCTGAGCTCAAT		527
	463 ATGCTTGTG.....		471 3'
	528 ATGCTTGTGACTGCTGGAACAAAATACTGGATGGTCTAGTATATGTTTC		577 3'

En color azul se resalta el nucleótido cambiado del clon 1CS con respecto a la secuencia consenso del RNA 3. En color rojo se resalta la mutación introducida durante el diseño del primer directo.

Alineamiento de la secuencia aminoacídica del clon 1CS con el consenso del RNA 3

Clon 1CS	M A I P I K V S Q L I D A K A K W E S D
Consenso	M S I P I K V S Q L I D A K A K W E S D
	K E N C P A E I T T L L K T Y G V L R E
	K E N C P A E I T T L L K T Y G V L R E
	T G A L S S K S T A Y L A G L S K D K R
	T G A L S S K S T A Y L A G L S K D K R
	V I L T D E G L A G F K N V E N P H D Q
	V I L T D E G L A E F K N V E N P H D Q
	G E K P T F S L A S S S N I K I T D I E
	G E K P T F S L A S S S N I K I T D I E
	V I K Q K M E Q E T F Q I D Q L K L K E
	V I K Q K M E Q E T F Q I D Q L K L K E
	Q I E N F I K T V T L D D E S Y T E G E
	Q I E N F I K T V T L D D E S Y T E G E
	I V I K H F G N P D A E L N M L V
	I V I K H F G N P D A E L N M L V

En color azul se detalla el aminoácido cambiado del clon 1CS con respecto a la secuencia consenso del RNA 3. En color rojo se identifica el aminoácido cambiado durante el diseño del primer directo del fragmento amplificado.

Alineamiento de la secuencia nucleotídica del clon 8CS con la secuencia consenso del RNA 3

Clon CS8	5'	1	ATGGCGATTCCT	12
Consenso		28	ATTTTGCAAGTTTCAACTAAATACTAAGAAGTAAAATGTCGATTCCT	77
		13	ATTAAAGTGCCACAGCTGATTGATGCCAAAGCAAATGGGAAAGTGACAA	62
		78	ATTAAAGTGTCACAGCTGATTGATGCCAAAGCAAATGGGAAAGTGACAA	127
		63	AGAGAATTGCCCTGCTGAAATAACAACCTCTCCTGAAAACATATGGAGTTC	112
		128	AGAGAATTGCCCTGCTGAAATAACAACCTCTCCTGAAAACATATGGAGTTC	177

113	TGAGAGAGACTGGAGCATTAAAGCTCAAAAAGCACAGCTTATCTGGCTGGA	162
178		227
163	TTGTCAAAGACAAGAGAGTAATCCTAACTGATGAAGGATTAGCAGAGTT	212
228		277
213	CAAGAATGTTGAAAATCCTCATGATCAGGGAGAGAAGCCAACATTTTCAT	262
278		327
263	TGGCCTCATCCAGCAACATCAAGATAACTGATATAGAGGTTATCAAACAG	312
328		377
313	AAAATGGAGCAGGAGACGTTTCAAATGATCAACTGGAGCTCAAGGAACA	362
378		427
363	AATTGAGAATTTTATCAAACAGTGACTCTTGATGATGAATCTTACTG	412
428		477
413	AGGGTGAGATAGTCATCAAGCATTTTGGTAACCCAGATGCTGAGCTCAAT	462
478		527
463	ATGCTTGTG.....	471 3'
528		577 3'

En color azul se resaltan los nucleótidos cambiados del clon 8CS con respecto a la secuencia consenso del RNA 3. En color rojo se marca la base mutada durante el diseño del primer directo.

Alineamiento de la secuencia aminoacídica del clon 8CS con el consenso del RNA 3

Clon CS8	M A I P I K V P Q L I D A K A K W E S D
Consenso	M S I P I K V S Q L I D A K A K W E S D
	K E N C P A E I T T L L K T Y G V L R E
	K E N C P A E I T T L L K T Y G V L R E
	T G A L S S K S T A Y L A G L S K D K R
	T G A L S S K S T A Y L A G L S K D K R
	V I L T D E G L A E F K N V E N P H D Q
	V I L T D E G L A E F K N V E N P H D Q

```

G E K P T F S L A S S S N I K I T D I E
G E K P T F S L A S S S N I K I T D I E

V I K Q K M E Q E T F Q I D Q L E L K E
V I K Q K M E Q E T F Q I D Q L K L K E

Q I E N F I K T V T L D D E S Y T E G E
Q I E N F I K T V T L D D E S Y T E G E

I V I K H F G N P D A E L N M L V
I V I K H F G N P D A E L N M L V

```

En Azul se identifican los aminoácidos cambiados del clon 8CS con respecto a la secuencia consenso. En color rojo se resalta el aminoácido modificado durante el diseño del primer directo del fragmento CS.

6.2. Apéndice B: Preparación de los medios de cultivo y soluciones de trabajo

6.2.1. Preparación de medios de cultivo

-Medio LB Líquido

A 950 ml de agua destilada agregar:

Triptona o (Bacto triptona o bacto peptona)	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	10 g

Ajustar el volumen a 1000 ml.

Agitar hasta que los solutos se disuelvan completamente.

Autoclavar.20 minutos a 1 atmósfera.

-Medio LB sólido

Para LB sólido agregar 1,5 % de agar al LB líquido.

-Medio SOB

Bactotripton	20 gr
Extracto de levadura	5 gr
NaCl	0,5 gr

Se disuelven los solutos en 950 ml de agua bidestilada. Posteriormente se agregan 10 ml de una solución de KCl 250mM, se ajusta a pH 7 con 5N NaOH y se lleva el volumen a 1 litro. Se esteriliza en autoclave 20 minutos a 1 atmósfera.

Antes de usar se agrega MgCl₂ estéril a concentración final 10mM

-Medio SOC

Se adiciona al SOB glucosa a concentración final 20mM, estéril por filtración a través de un filtro de 0,2 micras.

-Terrific Broth

Bactotripton	12 gr
Extracto de levadura	24 gr
Glicerol	8 ml

Se disuelven en 900 ml de agua bidestilada. Se esteriliza en autoclave y antes de usar se agregan 100 ml de una solución estéril de KH₂PO₄ (0,17M) y K₂HPO₄ (0,72M).

6.2.2. Preparación de buffers

-Buffer GTE

glucosa	50 mM
Tris-HCl (pH 8)	25 mM
EDTA (pH 8)	10 mM

Esterilizar por filtración en filtro de 0,2 micras.

-Buffer TAE 50X

Tris base	242 gr.
Acido acético glacial	57.1 ml.
EDTA	100 ml.

Llevar a 1 litro con agua destilada.

-Buffer TBE 5X

Tris base	54 gr.
Acido bórico	27,5 gr.
EDTA 0,5 M	2 ml.

-Buffer T₄ DNA ligasa 10X

Tris-HCl pH: 7,8	300 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	5 mM 10X

-Buffer de siembra 10X para agarosa.

TBE 10X

Glicerol	50%
Azul de bromofenol	0,25%

-Buffer de muestra 4X para geles de acrilamida

Agua destilada	3.8 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0 ml
Glicerol	0.8 ml
10% SDS	1.6 ml
2-mercaptoetanol	0.4 ml
1% Azul de bromofenol	0.4 ml

-Buffer de corrida para geles de poliacrilamida 5X pH 8.3

Tris base	15 gr/L
Glicina	72 gr/L
SDS 10%	5 gr/L

Almacenar a 4°C

-Buffer de transferencia 1X, para Western Blot

Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol (v.v)	20 %
SDS	0,05 %

Disolver los solutos en agua bidestilada.

Puede almacenarse a temperatura ambiente.

-Buffer TBS

Tris-HCl pH 7,5	20mM
NaCl	0,5M

-TBST

Buffer TBS más 0,05% Tween-20.

-Buffer Fosfatasa Alcalina

NaCl	100mM
MgCl	5mM
Tris-HCl pH 9.5	100mM

-Buffer de homogeinización (BH)

Tris-HCl pH 8	0,05M
Cisteína	0,1%
Acido ascórbico	0,1%
2-mercaptoetanol	0,5%

-Buffer protoplasting

Tris-HCl pH 8	15mM
Sacarosa	0,45M
EDTA	8mM

-Buffer de lisis

Tris-HCl pH 7.4	30mM
NaCl	100mM
EDTA	5mM
SDS	1%

6.2.3. Preparación de soluciones de trabajo

Preparación de Ampicilina

La concentración de la solución stock es 1000X, que corresponde a 200 mg/ml en agua bidestilada

-Esterilizar por filtración en filtro de 0,2 micrones.

Preparación de RNAsa A

Disolver RNAsa pancreática a una concentración 10mg / ml en 10 mM tris Cl (pH 7.5), 15 mM NaCl. Calentar a 100°C por 15 minutos. Enfriar lentamente a temperatura ambiente. Alicuotar y conservar a -20°C.

-NBT

Disolver 0,25 gr de nitroblue tetrazolium en 5 ml de dimetilformamida al 70%.

-BCIP

Disolver 0,1 gr de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato en 2 ml de dimetilformamida al 100%.

-Solución SSC 20X

NaCl	3M
Citrato trisodico	0,3M

-Solución de prehibridación

SDS 1%

6xSSC

Denhardt 5X

tRNA 3mg/ml

Se alicuota y congela a -20°C

-Solución de Denhardt 100X

BSA 2%

Polivinilpirrolidona 2%

Ficoll 2%

6.2.3.1. Soluciones para geles SDS-PAGE

1- Acrilamida/bis (30% T, 2,67%)C

Acrilamida 29,2 gr/100ml

N'N'-bis-metilen-acrilamida 0,8 gr/100ml

Preparar con agua destilada, filtrar y almacenar a 4°C en oscuridad por un máximo de 30 días.

2- 1,5 M Tris-HCl, pH 8.8

Preparar con agua destilada y almacenar a 4°C.

3- 0,5 M Tris-HCl, pH 6.8

Preparar con agua destilada y almacenar a 4°C

4- 10%SDS

Disolver 10 gr de SDS en 100 ml de agua destilada.

5- Solución Fijador/decolorante.

MeOH 40%

CH₃COOH 10%

Llevar al volumen deseado con agua destilada.

6- Solución de coloración

Coomassie Blue R-250 0,1%

Se disuelve en la solución de fijación / decoloración.

6.3 Abreviaturas

EEA: Estación experimental agropecuaria

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

CPsAV: Citrus Psorosis Asosiated Virus

CtRSV-4: Citrus Ringspot Virus

KDa: Kilodalton

ssRNA: RNA simple cadena

dsRNA: RNA doble cadena

aa: Aminoácido

ORF: Open reading frame (marco de lectura abierto)

MLG: María Laura García

Cm: Centímetro

Pcia: Provincia

Ing: Ingeniero

Mg: miligramo

ml: mililitro

Min: Minutos

μl: Microlitro

U.V.: Luz ultravioleta

rpm: Revoluciones por minuto

p/v: Peso sobre volúmen

pb: Pares de bases

hr: Hora

ma: Miliampéres

NBT: Nitroblue Tetrazolium en dimetilformamida

BCIP: 5-Bromo-4-Cloro-3-indolilfosfato en dimetilformamida

Corp: Corporation

WI: Wisconsin

dNTP-dA: dNTPs sin agregado de dATP.

Secuencia vcRNA: secuencia complementaria del RNA viral

Dir: Directo

Rev: Reverso

fMet: Fenil metionina

pol: polimerasa

BSA: Albúmina Sérica Bovina

7 Bibliografía

Bibliografía específica:

-Casafús, C. and Costa, N. (1984). Recent experiments and studies on the type of psorosis from Concordia, Argentina. En Proc. 9th. Conf. Int. Organ. Citrus Virol. Pp 171-176.

-Derrick, K. S., Bransky, R. H., da Graca, J. V., Lee, R. F., Timmer, L. W. And Nguyen, T. K. (1988). Parcial characterization of a virus associated with citrus ringspot. *Phytopathology* 78, 1298-1301.

-Derrick, K. S., Lee, R. F., Hewitt, B. G. and Barthe, G. A. (1991). Characterization of citrus ringspot virus. En Proc. 11th. Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV, Riverside. *Florida Agricultural Experiment Station Journal Series* , R-00626.

-Fawcett, H. S. and Bitancourt, A. (1943). Comparative symtomtology of psorosis varieties on citrus in California. *Phytopatology* 33, 837-864.

-Fawcett, H. S. (1939) New information on psorosis or Scaly bark of citrus. *The California Citrograph* 18, 326.

-García M.L., Grau O., Sarachu A. N. (1991). Citrus psorosis es probably caused by a bipartite ssRNA virus. *Reserch in Virology*, 142, 303-311.

-García M. L. (1991), Tesis Doctoral. Psorosis de los cítricos: Purificación y caracterización del virus asociado a la Enfermedad. Universidad Nacional de La Plata.

-García M. L., Derrick K. S., and O. Grau (1993). Citrus psorosis associated virus and citrus ringspot virus belongs to a new virus group. En Proc.12th Conf. Int. Org. Citrus virol., pp 430-431. Ed. R H. Brlansky, R. F Lee and L. W. Timmer, IOCV, Riverside, CA.

-García M. L., Dal Bó E., Grau O., and Milne R. G. (1994). The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. Journal of General Virology, 75, 3585-3590

-García M. L., Sanchez de La Torre M. E., Costa N., and O. Grau (1997 a). Detection of citrus ringspot virus and citrus psorosis associated virus using PCR. En Proc.13th Conf. Int. Org. Citrus virol., pp 336-338. Ed. J. V. da Graca, P. Moreno and R. K. Yokomi, IOCV, Riverside, CA.

-Garcia M. L., Sanchez de La Torre M. E. Dal Bó E., Djelouah K., Rouag N., Luisioni E., Milne R. G., Grau O. (1997b). Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA. Plant Pathology 46, 830-836.

-Garnsey, S. M. and Timmer, L. W. (1980). Mechanical transmissibility of citrus ringspot virus isolates from Florida, Texas and California. En Proc.8th Conf. Int. Org. Citrus virol., pp 174-79. Ed. E.C. Calavan, S. M. Garnsey and L. W. Timmer, IOCV, Riverside, CA.

-Hénaut and Danchin. Codon usage in *E. coli*. <http://www.biology.ualberta.ca/pilgrim.hp/codontable.html>

-Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during assembly of the Head of bacteriophage T4, Nature, 227,680-685 (1970)

- Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during assembly of the Head of bacteriophage T4, *Nature*, 227,680-685 (1970)
- Larocca, L.H. (1985). La citricultura en la provincia de Entre Rios. *Jornadas Técnicas de Citricultura*, pp.42-55. INTA
- Navarro, L. (1977). Citrus virus disease in Spain in relation to plant production: present and future prospects. *En Proc. Int. Soc. Citriculture* 1, 136-140.
- Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970). A general Method Applicable to que Search for Similarities in Amino Acid Sequence of two Proteins. *Journal of Molecular Biology* 48, 443-453.
- Programa PROCITRUS. <http://www.inta.gov.ar/proynac/procit.htm>.
- Pujol, A. R. (1966). Difusión natural de psorosis en plantas cítricas. *Inst. Nac. Tecnol. Agropec., Estac. Exp. Agropec. , Concordia. Serie técnica* 8, 15.
- Pujol, A. R., And Beñatena, H. N. (1965). Study of psorosis in Concordia, Argentina. *En Proc. 3rd Conf. Int. Org. Citrus Virol.*, pp. 170-174. Ed. W.C. Price Univ. Florida Press, Gainesville.
- Roistacher, C. N., and Calavan, E. C. (1974). Inactivation of five citrus viruses in plants held al Warm glasshouse temperatures. *Plant Dis. Rep.* 58, 850-853.
- Ruggieri, G. (1961). Observations and research on impietratura. *En Proc. 3rd Conf. Int. Org, Citrus Virol.*, pp. 182-86. Ed. W.C. Price, Univ. Florida Press, Gainesville.
- Smith, T. F. and Waterman, M.S. (1981). Comparison of Bio-Sequenses. *Advances in Applied Mathematics* 2, 482-489.
- Southern, E. M., (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel Electroforesis. *J. Mol. Biol.*, 98,503.

-Timmer, L. W. And Beñatena, H. N. (1977). Comparison of psorosis and other viruses causing leaf flecking. En citrus. Proc. Int. Soc. Citriculture 3, 930-935.

-Timmer, L. W. (1974). A necrotic strain of citrus ringspot virus and its relationship to citrus psorosis virus. Phytopathology 64, 389-394.

-Timmer, L. W. and Garnsey, S. M. (1980). Natural spread of citrus ringspot virus in Texas and its association with psorosis-like diseases in Florida and Texas. En Proc. 8th Conf. Int. Org. Citrus Virol., pp. 167-193. Ed. E. C. Calavan, S. M. Garnsey and L. W. Timmer, IOCV, Riverside, CA.

-Wallace, J. M. (1945). Technique for hastening foliage Symptoms of psorosis of citrus. Phytopathology 35, 535-541.

-Wallace, J. M. (1957a). A half century of research on psorosis. En Citrus Virus Disease. Univ. Of California. Div. Agr. Sci., Ed. J. M. Wallace, Berkely.

-Wallace, J. M. (1957b). Virus Strain interference in relation to symptoms of psorosis disease of citrus. Hilgardia 27, 223-246.

-Wallace, J.M. and Drake, R.L. (1968). Recents developments in the Citrus Psorosis diseases. En Proc. 4th Conf. Int. Org. Citrus virol., pp 177-1831. Ed. J.F.L.Childs, Florida Press Gainesville IOCV, Riverside, CA.

Bibliografía general:

-Preparation of Plasmid DNA: A modified Mini Alkaline - Lysis/Peg. Precipitation Procedure. Applied Biosystems, inc, California, United States.

-Genes VI, (1997); Por Benjamin Lewin. Publicado en los EEUU por Oxford University Press, Inc., New York.

- Mini-Trans Blot Electrophoretic Transfer Cell, Instructions Manual, Bio-Rad Laboratories, California, USA.
- Mini-Protean II Electrophoresis Cell, Instruction Manual, BioRad Laboratories, , California, USA.
- Current Protocols in Molecular Biology (1994-1997). Por Frederrick M. Ausubel, Roger Bunt, Robert E. Kingston, David D. Moore, J. G. Seidman, John A. Smith, Kevin Struhl. Editado por John Wiley & Sons, Inc. USA.
- Guide to Protein Purification (1990). By Murray P. Deutscher. Methods in Enzymology; Editors in Chief: John N. Abelson, Melvin I. Simon. Copyright Academic Press, Inc.
- Molecular Cloning, a laboratory manual, (1989). segunda edición. Por J. Sambrook, T. Maniatis. Editado por Cold Spring Habor Laboratory Press.
- New England Biolabs Inc, 1997 catalog. Beverly, Ma, USA.
- Novagen Inc., 1996-97 catalog. Wisconsin. USA.
- Novagen Vectors: <http://www.novagen.com/vectfram.html>.
- Promega Biological Research Products, 1997 catalog. Wisconsin, USA.
- pET System manual 7th edition, <http://www.novagen.com/techfram.html>
- Promega Corp., pGEM-T Technical manual. Wisconsin, USA
- Pulse Controier, Operating Instruction and Applications Guide. Accesory for bacterial and fungal electrotransformation. Bio-Rad Laboratories, California, USA.
- The 1605 Air Thermo-cycler, User's guide, Idaho Technology. Idaho USA.
- Wisconsin Package Version 9.0,. Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. USA.

-Pulse Controller, Operating Instruction and Applications Guide. Accessory for bacterial and fungal electrotransformation. Bio-Rad Laboratories, California, USA.

-The 1605 Air Thermo-cycler, User's guide, Idaho Technology. Idaho USA.

-Wisconsin Package Version 9.0,. Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. USA.

-Zeta-Probe Blotting Membranes, User's Manual, BioRad Laboratories, California, USA.

-Immobilon Tech Protocol. Millipore Corporation, Bedford, MA. USA.

-GenClean II KIT. User's guide. (1989). Bio 101 Inc, California. USA