

CONSTRUCCION DE GENETECAS DEL ADENOVIRUS HUMANO SEROTIPO 3

Felipe García V., Ph D.
Departamento de Biología
Gerardo Gallego B Sc.
Departamento de Microbiología
Isabella Borrero M Sc.
Departamento de Microbiología

Reportes previos han presentado protocolos para la construcción de genotecas de algunos serotipos de adenovirus. Actualmente es posible tener colecciones de genes de los adenovirus 2, 6, 8 y algunos serotipos del subgenero *D*. Sin embargo no se reporta en la literatura ninguna genoteca de adenovirus humano serotipo 3. En este proyecto se llevó a cabo la clonación del genoma del adenovirus serotipo 3 *GB* en dos distintos vectores de clonación: el plásmido *pBR322* y el *pUC13CAT*, también se efectuó la identificación mediante endonucleasas de restricción, de segmentos de *Hind III* de *Ad3* clonados.

La cepa de adenovirus serotipo 3 (*Ad3GB*) fue obtenida del laboratorio del Doctor P. Lodish de la "School of Public Health" de la Universidad de Harvard. Esta fue replicada en monocapas de células de Riñon Embrionario Humano (*REH*). Los viriones obtenidos después de un efecto citopático del 80%, fueron purificados en gradientes discontinuos de *CsCl*, de acuerdo con lo descrito por Yamamoto *et al* (1970) (1). La preparación del *DNA* viral se efectuó de acuerdo con Sambrook *et al* (1989) (2). El protocolo de clonación seguido para la construcción de la genoteca de *pBR322*, se muestra en la Figura 1. Los fragmentos de *Hind III* del *DNA* del serotipo

3 fueron ligados a extremos cohesivos de *Hind III* del vector *pBR322*. Cada plásmido recombinante se transformó en células de *Escherichia coli*, de la cepa *HB101* y los clones bacterianos se seleccionaron con base en el fenotipo *Amp^R Tet^S*.

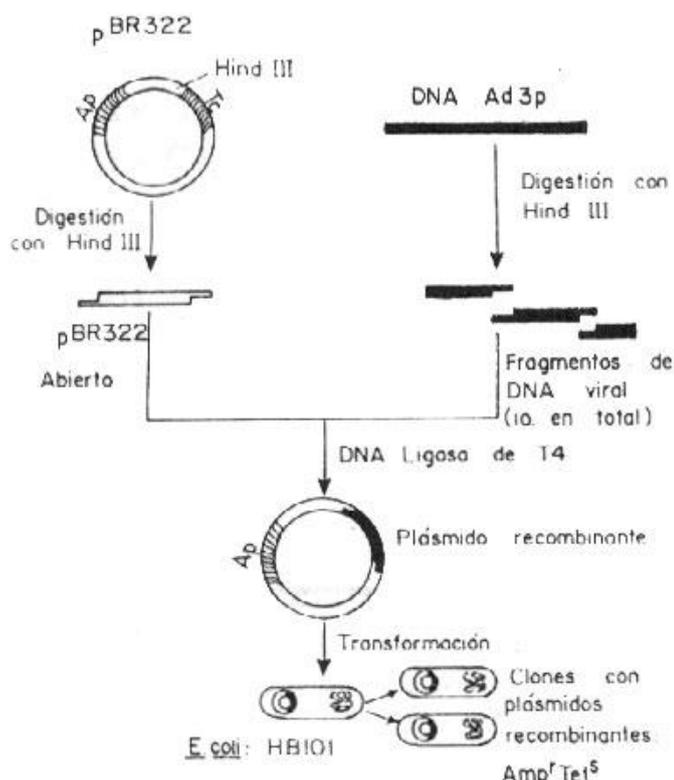


Figura 1. Clonaje molecular de fragmentos de *DNA* Viral en el plásmido vector *pB322*. (*AP*), marca de resistencia a Ampicilina; (*Tc*), marca de resistencia a Tetraciclina.

En la construcción de la genoteca de *pUC3 CAT*, se empleó el mismo protocolo, excepto que la selección de los plásmidos recombinantes se efectuó mediante hibridización en colonias empleando como sonda el *DNA* del serotipo 3 marcado con [α 32 p]dATP.

Los resultados de los experimentos de ligación efectuados, permitieron obtener 60% de eficiencia de ligación en ambos vectores. Por otro lado, la eficiencia de transformación fue 10^6 transformantes/ μ g de *DNA* en las dos genotecas construidas.

Cuando se efectuó la digestión con la endonucleasa *Hind III* de los clones bacterianos transformantes, fue posible obtener un perfil de restricción. Este consistió de clones recombinantes que podían ser agrupados en

ocho grupos distintos que contenían ocho de los diez segmentos de *Hind III* del adenovirus serotipo 3 cepa *GB*. La Figura 2 muestra el perfil de restricción de los ocho clones recombinantes obtenidos y además en la Tabla 1 se presenta la descripción detallada de la genoteca de adenovirus 3 cepa *GB* construida.

Del estudio de la genoteca de *pUC13-CAT*, fue posible ver que solamente se pudieron injertar los segmentos del *DNA* de *Ad3* que poseían tamaños moleculares de 5841bp (*B*); 3257bp (*F*); 2053bp (*G*) y 1663bp (*H*) que hibridaron positivamente con el *DNA* del *Ad3* marcado radioactivamente con fósforo isótopo ^{32}P . (Tabla 2).

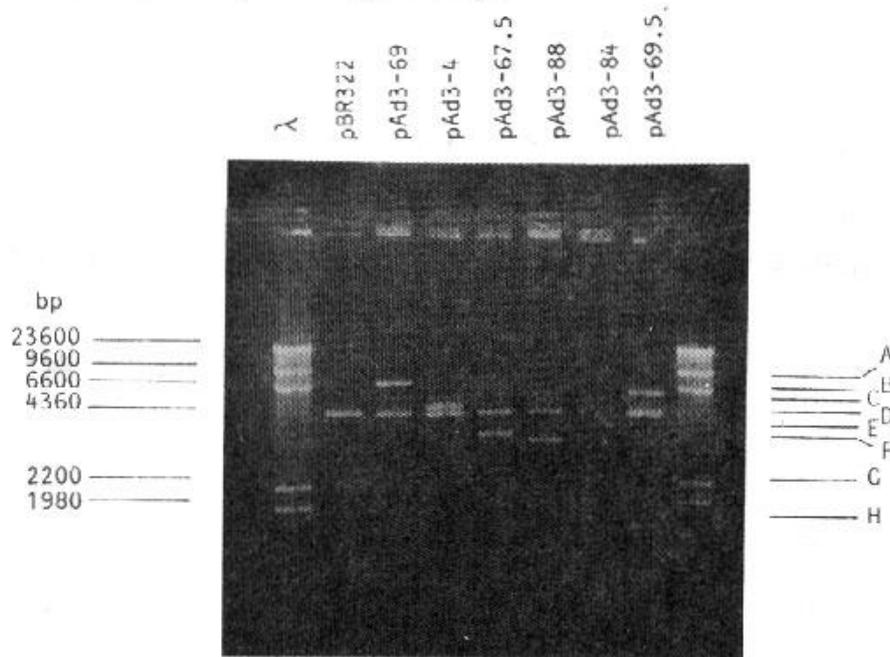


Figura 2. Perfiles de restricción de clones recombinantes, conteniendo fragmentos de restricción con terminales de *Hind III* injertados en el vector *pBR322*. Se presenta el tamaño molecular de los fragmentos injertados en pares de bases (*bp*).

Cuando se efectuó el análisis de restricción del clon *pAd3-67.5*, que contiene el segmento *D* de *Hind III*, se pudo establecer que no tiene sitios para *BamHI*, *Sma I*, *Kpn I*. Por otro lado el análisis del fragmento *A*(7363 *bp*) mostró un patrón de restricción para *Kpn I*, en el cual se detectaron dos sitios los cuales originaban fragmentos 3600*bp*, 920*bp* y 2830*bp*; el patrón de *BamHI* fue de 4841*bp* y 2510*bp*, con *Sma I* se obtuvieron dos fragmentos de 6050*bp* y 1300*bp*. Finalmente el segmento *C*(4743) exhibió

un patrón de dos segmentos de *BamHI* cuyos tamaños moleculares fueron de 3460bp y 1270bp; el análisis con *Sma I* reveló dos fragmentos cuyos tamaños eran de 3750bp y 990bp; *Kpn I* cortó el segmento C en un sitio generando fragmentos de 3360bp y 1380bp respectivamente.

Este trabajo permitió la clonación del genoma del adenovirus serotipo 3 cepa GB en dos vectores diferentes. Los tamaños de las genotecas construidas fueron de 92% para pBR322 y de 36.5% para el caso de pUC13 CAT. Por otro lado fue posible localizar nuevos sitios para las endonucleasas de restricción *Sma I* y *Kpn I* en una extensión del genoma del adenovirus serotipo 3 equivalente a 10584bp (segmentos B y C de *Hind III*).

TABLA 1. Descripción de la Genoteca de DNA de Adenovirus de Serotipo 3 en pBR322

| FRAGMENTO** | CLON | TAMAÑO (bp) | % DEL GENOMA* |
|-------------|--------------------------------------|-------------|---------------|
| A | pAd3-2; pAd3-62 pAd3-63; pAd3-27 | 7363 | 20,8 |
| B | pAd3-69; pAd375 | 5841 | 16,5 |
| C | pAd3-4; pAd3-14 | 4744 | 13,4 |
| D | pAd3-67,5 | 4461 | 12,6 |
| E | pAd3 88 | 3363 | 9,5 |
| F | pAd3 82; pAd3-84 pAd3 56 | 3257 | 9,2 |
| G | pAd3 68; pAd3 70 pAd3-71; pAd3-81 | 2053 | 5,8 |
| H | pAd3 69,5 | 1663 | 4,7 |

* total de genoma clonado, 92,5%

** Se clonó el 80% de los fragmentos de restricción de *Hind III*

TABLA 2. Descripción de la Genoteca de DNA de Adenovirus de Serotipo 3 en pUC13-CAT

| FRAGMENTO** | CLON | TAMAÑO (bp) | % DEL GENOMA* |
|-------------|--|-------------|---------------|
| B | pUAd3-20; pUAd3-40 pUAd3-29; pUAd3-56 | 5841 | 16,5 |
| E | pUAd3-27; pUAd3-88 | 3363 | 9,5 |
| G | pUAd3-15 | 2053 | 5,8 |
| H | pUAd3-87 | 1663 | 4,7 |

* total de genoma clonado, 36,5%

REFERENCIAS

1. Yamamoto, K., Alberts, B., Benzinger, L. et al *Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylenglicol and its application to large scale virus purification.* *Virology* **40**: 734 (1970)
2. Sambrook, J., Fritsth, E., Maniates, T. *Molecular Cloning. A laboratory Manual.* 2a. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1989)

(Este trabajo se llevó a cabo con fondos de la Vicerrectoria de Investigaciones de la Universidad del Valle y del programa ARI/BOSTID/NIH)