

Producción de la proteína p24 del virus de la Inmunodeficiencia Felina en un sistema bacteriano inducible por sal

Tizzano, MA(1); Manfredi MJ(1,3); Sguazza, GH(1); Echeverría, MG(1,2).

(1) CEMIBA- Facultad de Ciencias Veterinarias -UNLP, Argentina; (2) CCT- CONICET, Argentina; (3) CIC-PBA, Argentina.

Contacto: marccoantoniotizzano@gmail.com

El virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) es un Lentivirus con características genómicas, estructurales y bioquímicas similares al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). La enfermedad, conocida como síndrome de inmunodeficiencia felina se caracteriza por fiebre, linfadenopatías, leucopenia, anemia, anorexia y caquexia, agravada por infecciones secundarias y desórdenes neurológicos. La transmisión de esta enfermedad se produce principalmente por mordeduras, por la vía sexual, intrauterina pre e intra partum. La infección es más común en gatos mestizos, vagabundos o con libre acceso al exterior. El genoma del FIV está compuesto principalmente por tres marcos abiertos de lectura: gag, pol y env. El gen gag codifica la p50, un precursor que luego de ser clivado origina tres proteínas mayores del core: p24, p15 y p10. De éstas, la p24 ha sido identificada como antígeno asociado de grupo y es la proteína estructural predominante en el core viral. El objetivo de éste trabajo fue expresar la p24 en un sistema de expresión basado en bacterias inducibles por sal, para el diagnóstico de FIV. Para la producción de la p24 recombinante, se aisló el DNA proviral a partir de células infectadas con FIV y se utilizó como molde para la (PCR) con cebadores específicos para amplificar el ORF que codifica para la p24. El producto de PCR se clonó en el plásmido pCR2.1-TOPO. Luego de la ligación, el plásmido pCRtopo-p24 obtenido se introdujo en bacterias competentes (*Escherichia coli* TOP-10). A partir de un clon, pCRtopo-p24 se construyó el vector de expresión (pet22b+-p24) para la expresión de la p24 en bacterias *E. coli* BL21 SITM (Inducibles por sal). Se transformaron las bacterias y se ensayó la expresión de p24. Para ello se realizaron cultivos de 50 ml de 5 clones obtenidos los cuales fueron inducidos al llegar a una DO600 de 0,70 con (NaCl 0,3 M). Luego de 4 horas de inducción, se colectaron las bacterias por centrifugación y se sonicaron para analizar las proteínas citoplasmáticas mediante la técnica de SDS-PAGE/Western Blot (WB). En las calles correspondientes a los clones 1, 2, 3 y 5 se detectó una banda de peso molecular relativo correspondiente a 24KD que fue además reconocida específicamente por anticuerpos policlonales contra FIV y por un anticuerpo monoclonal Anti p24 comercial. Posteriormente se realizó un nuevo cultivo a mayor escala y se analizaron por WB, 10 sueros diagnosticados previamente por inmunocromatografía. Los resultados obtenidos de la expresión de la p24 con sal son comparables a los obtenidos mediante el agregado de IPTG como inductor de la expresión de proteínas recombinantes, lo cual constituye una ventaja en términos de costo de producción de proteínas recombinantes en

sistemas bacterianos. La proteína recombinante obtenida fué reconocida específicamente por anticuerpos mono y policlonales. A futuro se desarrollará una prueba ELISA indirecto con la p24 recombinante obtenida.