

MANIPULACION DE GENOMAS VIRALES: UNA ESTRATEGIA DE CLONACION  
MOLECULAR DEL GENOMA DEL ADENOVIRUS 8 PROTOTIPO \*

Felipe García V. \*\*  
Raquel Ocaiones  
Isabella Borrero

I. INTRODUCCION

Los adenovirus humanos comprenden un grupo de 42 especies las cuales poseen características antigénicas y genéticas propias (1).

Los métodos desarrollados para el estudio del genoma adenoviral, han utilizado el clonaje de fragmentos de restricción en diferentes vectores (2). En este sentido la obtención de fragmentos del genoma adenoviral, es muy útil para la elaboración de mapas de restricción de regiones del ADN de estos virus.

Hasta el momento, solamente se reportan la construcción de genotecas de los serotipos 2 y 5 (3), 40 y 41 (4)(5). Los análisis hechos han apuntado la necesidad de construir genotecas para cada serotipo de adenovirus humano. El objetivo principal de dicho enfoque experimental es el obtener clones recombinantes para así analizar tanto la estructura como el funcionamiento de los diferentes genes adenovirales.

En este trabajo se reporta la estrategia de construcción de una genoteca de fragmentos de HindIII del genoma del adenovirus serotipo 8 cepa referencia. Los recombinantes obtenidos fueron analizados por restricción con el fin de confirmar el protocolo de clonación utilizado.

II. MATERIALES Y METODOS

Virus: El adenovirus tipo 8, fué obtenido de la colección de virus de la Sección de Virología del Departamento de Microbiología de la Universidad del Valle y propagado previamente en células de riñón humano embrionario (RHE).

---

\* Contribución Departamentos de Biología y Microbiología Universidad del Valle.

\*\* Respectivamente Biólogo Ph.D., Departamento de Biología y Biólogo M.Sc. Departamento de Microbiología. Universidad del Valle A.A. 25360 y A.A. 2188 Cali, Colombia.

**Multiplicación de los virus:** Los virus fueron cultivados en células de RHE obtenidas del banco de células de la Sección de Virología de la Universidad del Valle. Las monocapas celulares fueron infectadas con 1 ml. de una dilución  $5 \times 10^{-2}$  ó  $0,5 \times 10^{-1}$  de la suspensión de virus original. En el procedimiento empleado, el virus se dejaba absorber por 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ ., a continuación se adicionaba medio nutritivo de Eagles suplementado con suero fetal bovino al 2%,  $\text{NaH}_2\text{CO}_3$  al 2% y antibióticos (Penicilina/Estreptomocina) al 1%. Las botellas de cultivo fueron incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  y observadas diariamente con ayuda de un microscopio invertido hasta la aparición de efecto citopático.

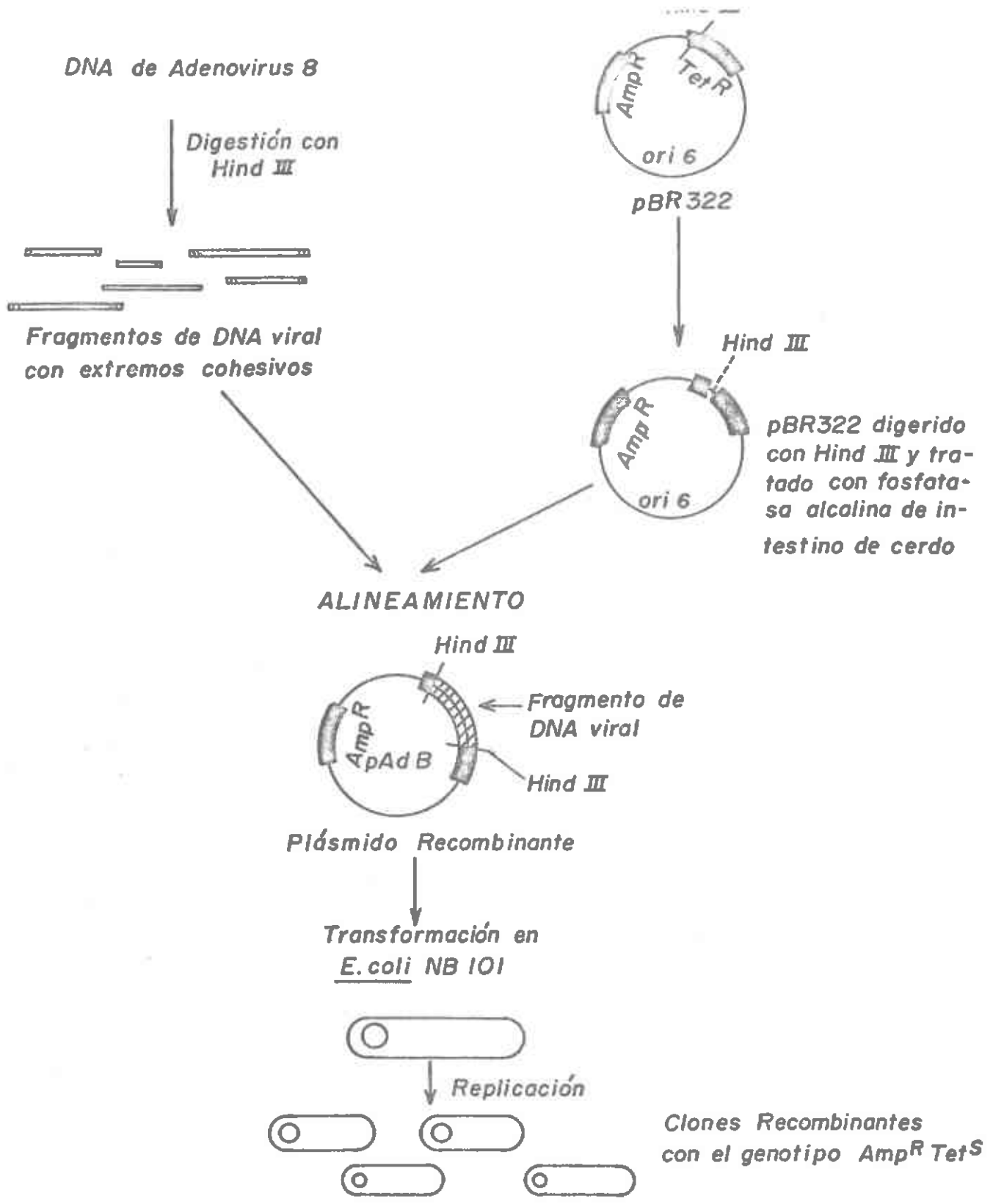
**Extracción del DNA viral:** El DNA de adenovirus 8 fué extraído empleando el método desarrollado por Hirt (1967)(6). El DNA obtenido fué cuantificado visualmente mediante tratamiento con Bromuro de Etidio.

**Clonaje molecular:** Fragmentos de DNA de Ad8 obtenidos por digestión con la endonucleasa HindIII, fueron clonados en la cepa de E. coli HB101 utilizando plásmido pBR322 como vector. La metodología empleada fué la descrita por Maniatis (1982)(Figura 1). El procedimiento fué llevado a cabo en las siguientes etapas:

Para la ligación del DNA viral con DNA de plásmido se emplearon 500 ng de DNA de Ad8 digerido con HindIII que fueron ligados con 70 a 100 ng de plásmido pBR322. La reacción de ligación se llevó a cabo en tampón de reacción (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; MgCl 0,1 M; DTT 0,1; ATP 1 mM) con 11 unidades de DNA ligasa de T4, en un volumen final de 20 ul a  $13^{\circ}\text{C}$  durante 16 a 20 horas.

En la transformación bacteriana, se siguió el procedimiento descrito por Hanahan (1983) (7). Una colonia de E. coli HB101 ( $\text{Amp}^{\text{R}} \text{Tet}^{\text{S}}$ ), era cultivada en 30 ml de caldo LB a  $37^{\circ}\text{C}$  y en agitación constante, hasta obtener una densidad optica a 600 nm de 0,35 a 0,40. Las bacterias eran centrifugadas a  $4.000 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y el precipitado fué resuspendido en una solución de CaCl 50 mM-Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y almacenado por 2 a 4 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, 200 ul de las células competentes se mezclaban con 100 ng de DNA recombinante obtenido como se describe en el numeral 9,2 y la mezcla era incubada en hielo por 30 minutos y luego a  $42^{\circ}\text{C}$  por 2 minutos. Finalmente se adicionaba 1 ml de LB, se incubaba a  $37^{\circ}\text{C}$  por 45 minutos en agitación suave y alicuotas de 100 ul eran esparcidas en cajas de Petri que contenían agar LB suplementado con ampicilina (50 ug/ml). Los cultivos eran incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  por 12 a 14 horas hasta obtener la aparición de colonias.

**Identificación de colonias recombinantes:** Las colonias bacterianas crecidas en placas de agar LB con ampicilina que portaban plásmidos recombinantes fueron seleccionadas por su sensibilidad a la tetraci-



**Fig.1- Representación del procedimiento utilizado para la clonación de los fragmentos de DNA de Adenovirus 8 originados por la digestión con *Hind III***

ciclina cultivándolas en placas de agar LB suplementado con 12,5 ug/ml de tetraciclina.

Las colonias con el fenotipo  $Amp^r Tet^s$  fueron utilizadas para extracción de DNA de plásmido, empleando el método de lisis alcalina (Birmboim & Doly, 1979) (8); 1,5 ml de cultivo fueron centrifugados a 12.000 rpm en una microcentrífuga Beckman, el precipitado obtenido fué resuspendido en 100 ul de solución de lisis (glucosa 0,05 M; EDTA 0,01 M; Tris-HCL 25 mM pH 7,5 y 6 mg/ml de lisozima) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos.

Posteriormente, se adicionó una solución de NaOH 0,2 N, SDS 1% siendo incubada a temperatura ambiente por 5 minutos, luego 150 ul de acetato de potasio 5M pH 8,0 colocando la mezcla en hielo por 5 minutos y finalmente se centrifuga a 12.000 rpm por 5 minutos.

El DNA de plásmido presente en el sobrenadante, fué precipitado con 2 volúmenes de etanol absoluto y resuspendido en 25 ul de Tris-EDTA pH 8,0 que contenía 50 ug/ml de Ribonucleasa A. Alícuotas de 5 a 9 ul del DNA se digirieron con 2 a 8 U. de HindIII y los productos de la digestión analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

### III. RESULTADOS

**Restricción del DNA del adenovirus tipo 8:** El DNA del adenovirus tipo 8 obtenido por el método de Hirt, fué sometido a digestión total con la endonucleasa HindIII. En la Tabla 1 se consignan los pesos moleculares de cada uno de los fragmentos visualizados.

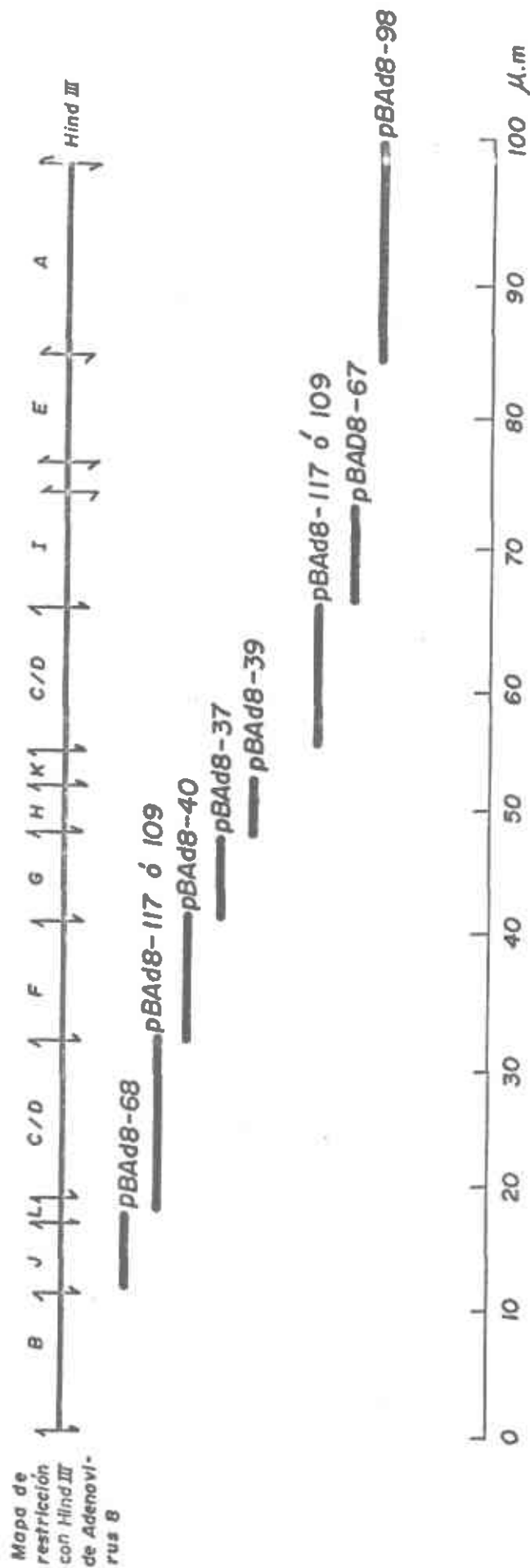
La enzima originó 11 fragmentos, los cuales fueron designados con letras mayúsculas desde la A hasta la K, con pesos moleculares desde  $4,4 \times 10^6$  d (A) hasta  $0,4 \times 10^6$  d (K). Los fragmentos C y D de  $3,1 \times 10^6$  d (4,65 Kb), no pudieron ser separados bajo las condiciones empleadas en la electroforesis. Según los resultados obtenidos fué posible estimar que el DNA del adenovirus tipo 8 cepa prototipo empleado en el estudio, posee un peso molecular de  $23,06 \times 10^6$  d ó 34.600 pares de bases.

**Clonaje molecular de fragmentos de DNA viral:** La figura 1 presenta un esquema de la estrategia utilizada para la clonación del genoma del adenovirus 8 cepa referencia. En todas las experiencias los fragmentos de DNA viral del adenovirus tipo 8 obtenidos por digestión con la endonucleasa HindIII, fueron ligados al plásmido pBR322 previamente digerido con la misma enzima. Los plásmidos recombinantes así construídos fueron utilizados para transformar células de E. coli, HB101. La eficiencia de transformación fué de aproximadamente  $10^4$  transformantes de E. coli por ug de DNA.

TABLA 1. Pesos moleculares de los fragmentos de HindIII del DNA de los adenovirus tipo 8 cepa referencia.

ADENOVIRUS	FRAGMENTO	P.M. $\times 10^{-6}$ d	P.M. Kb.
Tipo 8	A	4,4	6,6
	B	3,8	5,7
	C / D	3,1	4,65
	D / C	3,1	4,65
	E	2,3	3,45
	F	1,9	2,85
	G	1,5	2,25
	H	1,0	1,5
	I	0,9	1,4
	J	0,66	1,0
	K	0,4	0,6
		23,06	34,6

**Fig. 2 - Representación esquemática de la asignación genética de cada uno de los plásmidos recombinantes que portan fragmentos de DNA del Adenovirus serotipo 8**



células infectadas sin necesidad de realizar la purificación del virus. La eficiencia del método de Hirt radica en que las moléculas de DNA son obtenidas tanto del núcleo de la célula (donde se acumulan para después ser utilizadas en el ensamblaje de los nuevos viriones) como de los mismos virus que han sido formados. Por otro lado, las preparaciones obtenidas son apropiadas para realizar estudios moleculares pues son relativamente libres de DNA celular (Hirt, 1967)(6).

Uno de los objetivos del presente trabajo fué la clonación de fragmentos de DNA viral obtenidos por digestión total con la endonucleasa HindIII. De acuerdo a los mapas de restricción del Ad8 reportados por Tacaks (1983)(9), la mayoría de sitios para esta enzima están localizados entre 18 a 68,8 u.m. del extremo izquierdo del genoma. Estos coinciden con secuencias específicas de DNA viral que son altamente conservadas las cuales pueden variar pero no desaparecer. Esta característica debe ser tenida en cuenta cuando se desea estudiar a nivel molecular el genoma de los adenovirus, pues es una propiedad de los virus propagados en cultivos celulares que fragmentos de DNA viral pueden desaparecer o ser reemplazados ocasionalmente por secuencias de DNA celular. La pérdida del genoma ha sido observada en el área correspondiente al fragmento Sal I-A, el cual está localizado en el lado derecho del DNA del adenovirus tipo 8 (Tacaks, et al. 1983) (9).

Además de las consideraciones anteriores, la digestión con la endonucleasa HindIII origina fragmentos de DNA pero su rango de tamaño (9 a 0,6 Kb) pueden ser ligados con alta eficiencia a extremos cohesivos del DNA del vector. Por otro lado, también son fáciles de detectar en geles de agarosa, bajo las condiciones de la electroforésis empleadas en el trabajo.

Con base en las evidencias presentadas, el clonaje molecular de fragmentos de HindIII de DNA de Ad8 es una buena alternativa para obtener material que pueda ser utilizado para llevar a cabo estudios de patogenicidad y de otras características de este virus.

En el trabajo realizado es importante subrayar el hecho que la clonación de los segmentos de HindIII del Ad8, fué hecha empleando preparaciones de DNA obtenidas de acuerdo al método de Hirt (1967) (6). Las colonias transformantes obtenidas con plásmidos recombinantes, pueden contener segmentos de DNA celular. Por lo tanto, no es posible afirmar con certeza sobre el origen viral de los fragmentos que han sido clonados. A pesar de esto, existe alta probabilidad que los plásmidos recombinantes porten DNA de virus teniendo en cuenta el tamaño molecular de los fragmentos clonados, pues con base en este criterio se pudieron aislar plásmidos que contenían insertos con pesos moleculares semejantes a 8 fragmentos de HindIII del DNA del Ad8. Por otro lado, la procedencia viral de estos fragmentos puede ser respaldada por la presencia en la

mezcla de ligación de exceso de DNA viral en relación con DNA celular y por la alta eficiencia del método de Hirt para la extracción selectiva de DNA de virus.

La clonación de fragmentos de DNA adenoviral obtenido por el método de Hirt también ha sido realizada por otros investigadores (Kidd, et al 1985)(4). Estos autores clonaron fragmentos de DNA de Ad40 y 41, obtenidos por digestión con la endonucleasa *Pst* I, con el fin de construir una sonda de DNA específica para estos dos serotipos.

Los estudios realizados por Green et al. (1979)(11) y Wadell et al (1984) (12), demostraron que la homología del genoma entre los diferentes adenovirus humanos es solamente del 9 al 20%, aunque la región de mayor homología que es compartida por todos los 42 serotipos conocidos no ha sido aún definida. Por esta razón, se hace difícil la construcción de una sonda DNA que pueda reconocer ácido nucleico de todos los tipos de adenovirus, haciéndose necesaria la construcción de sondas específicas. Con base en este postulado es importante el desarrollo de estrategias de clonación efectivas y que permitan construir genotecas de todos los serotipos de adenovirus humanos.

## V. RESUMEN

El DNA del adenovirus prototipo 8 fué digerido con *Hind*III y los fragmentos se clonaron en el sitio de *Hind*III del plásmido vector pBR322. Los recombinantes obtenidos fueron seleccionados por su fenotipo  $Amp^R Tet^S$ . Los DNA de ochenta colonias ( $Amp^R Tet^S$ ) fueron digeridos con la enzima *Hind*III y los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa. El análisis demostró la presencia de ocho clones recombinantes que contienen insertos que comigran con fragmentos obtenidos por la digestión de DNA de Ad8. Con base en los resultados fué posible obtener una genoteca que representa el 81,0% del genoma de este virus.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. Ginsberg, H.S., 1984. The Adenoviruses. New York and London. Plenum Press.
2. Takiff, H.C.; Reinhold, W.; Garon, C.; Straus, S.S. 1984. Cloning and physical mapping of enteric Adenoviruses (Candidate types 40 and 41). J. Virol. 51: 131-136.

3. Stenlund, A., Perricaudet, M., Tiollais, P., Petterson, P.V., 1980. Construction of restriction enzyme fragment libraries containing DNA from human adenovirus types and 5. *Gene*. 10: 47-52.
4. Kidd, A.H., Harley, E.H., Erasmus, M.J., 1985. Specific Detection and typing of adenoviruses types 40 and 41 in stool specimens by Dot-blot hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 22: 934-939.
5. Niel, C., Gómez, S.A., Leite, J.P., Pereira, N.G., 1986. Direct detection and differentiation of fastidious and nonfastidious adenoviruses in stool by using a specific nonradiative probe. *J. Clin. Microbiol.* 24: 785-789.
6. Hirt, B., 1967. Selective extraction of polyoma from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* 26: 365-369.
7. Hanahan, D., 1981. Studies on transformation of Echerichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-560.
8. Birnboim, M., Doly, J., 1979. Large scale alkaline lysis method. Plasmid purification. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513-1517.
9. Tacaks, W., 1984. Adenovirus Map. in *Genetics Maps* Ed. Cold. Spring Harbor Press.
10. Horwitz, M.S., 1985. Adenoviral diseases in B.M. Fields (Ed). *Virology*. Raven. Press, N.Y.
11. Green, M., Mackey, K., Wolt, W., Ridden, P., 1979. Thirty one human adenoviruses serotypes (1-31) from five groups based upon DNA genome homologies *Virology*. 93: 481.
12. Wadell, G., 1984. Molecular epidemiology of human adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 110: 191-220.