

IV. DISCUSIÓN GENERAL

Este trabajo experimental se enmarca en la utilización de la bacteria *E. coli* como vector para la expresión heteróloga de proteínas, y arranca de un total desconocimiento sobre las causas que durante mucho tiempo han hecho imposible la expresión de la glicoproteína E del BoHV-1 en esta bacteria. En este trabajo hemos comprobado que la secuencia TRAPP, de tan sólo 5 aminoácidos, es la responsable de la no expresión de esta proteína en *E. coli*. A grandes rasgos, los logros de este trabajo han sido:

- i) identificar la secuencia peptídica TRAPP como la secuencia que resulta tóxica durante la expresión de la glicoproteína E en *E. coli*,
- ii) expresar la mayor parte del dominio extracelular de la gE en *E. coli*,
- iii) demostrar que la toxicidad que reside en la expresión de TRAPP prevalece en distintos contextos,
- iv) sugerir algunos mecanismos por los que la expresión de dicha secuencia resulta tóxica para *E. coli*,
- v) determinar que TRAPP, entre otras secuencias, no está codificada en ningún gen de *E. coli*,
- vi) valorar el papel que TRAPP puede jugar en el binomio estructura/función de la gE en el BoHV-1, y
- vii) diseñar un test ELISA de bloqueo para el diagnóstico diferencial de infección por BoHV-1.

IV.A. Precedentes

El interés en la expresión recombinante de la gE del BoHV-1 nace de la necesidad de desarrollar un kit de diagnóstico diferencial para la detección de animales infectados por este herpesvirus. El BoHV-1 es el agente etiológico más importante del cuadro de enfermedades respiratorias bovinas o BRD (Kahrs, 2001a). Es el responsable de los síndromes IBR e IPV, de la infección sistémica en terneros, inductor de conjuntivitis, enteritis, abortos y encefalitis (Kahrs, 2001c; Fenner *et al.*, 1992). La infección por BoHV-1 conlleva, además, un estado de inmunosupresión que predispone al animal a infecciones bacterianas secundarias. Este estado de infección, y el estrés que supone en ocasiones el transporte, generan un cuadro de pasteurelisis neumónica ('shipping fever') que puede causar la muerte del animal (Yates, 1982; Kahrs, 2001b).

El BoHV-1, igual que otros alphaherpesvirus, desarrolla un ciclo vital muy complejo que incluye la infección de por vida del sistema nervioso periférico del animal infectado. Si bien la vacunación contribuye de manera muy significativa a reducir la infección y los signos clínicos derivados de la misma, las vacunas no evitan la infección post-vacunación del animal (Kaashoek *et al.*, 1996). Los animales, aun vacunados, pueden convertirse así en un foco de infección latente o reservorio del BoHV-1. Actualmente, el control del BoHV-1 de muchos países se basa en la identificación serológica y el sacrificio de los animales infectados (Stegeman *et al.*, 1994). Para llevar a cabo estos programas de erradicación, se combina la administración de vacunas marcadoras con la utilización de un test serológico diferencial. Estas vacunas, defectivas en uno o más genes, generan una respuesta inmunitaria diferente a la que se produce tras la infección por el BoHV-1 wt. El test –generalmente un test ELISA de bloqueo– detecta la presencia de los anticuerpos dirigidos contra la/s glicoproteína/s ausente/s en la vacuna administrada (Kaashoek *et al.*, 1995; Letellier *et al.*, 2001).

Entre los años 1991 y 1994, nuestro grupo de investigación llevó a cabo la construcción del virus defectivo BoHV-1 gE⁻ para su posterior aplicación como vacuna marcadora (Rebordosa, 1996). Se propuso, asimismo, el futuro desarrollo de un test ELISA gE de bloqueo para diferenciar serológicamente los animales

vacunados con el BoHV-1 gE⁻ de los animales infectados con una cepa wt. El diseño del test contemplaba, inicialmente, la sensibilización del pocillo de ELISA con una forma recombinante de la gE del BoHV-1. Las pruebas de inmunodetección demostraron, no obstante, que ninguna de las formas expresadas de la glicoproteína en *E. coli* era reconocida por el antisuero de animales infectados con el BoHV-1 wt (Rebordosa, 1996). Ello indicaba que la conformación de la gE expresada no emulaba la conformación de la gE nativa del virus, y desaconsejaba la utilización de un organismo procariota como vector para la expresión recombinante de la gE. Finalmente, el test se ha desarrollado sensibilizando el pocillo de ELISA con virus BoHV-1 wt.

La expresión de la gE resultó ser, además, tóxica para *E. coli*. Si bien la expresión se limitó al dominio extracelular de la proteína sin las secuencias péptido señal y dominio transmembrana –potencialmente tóxicas debido a su marcado carácter hidrofóbico– todo intento de expresión periplasmático o citoplasmático comportaba la inhibición del crecimiento del cultivo y la casi nula acumulación de la proteína recombinante. Sólo la expresión citoplasmática de los fragmentos A4 y A1 de dicho dominio (Fig. 12) fusionados al extremo Ct de la MBP reflejaba un crecimiento no inhibido y una acumulación sustancial de la proteína recombinante. Por el contrario, la inducción de expresión del fragmento A5 era la que conllevaba la inhibición del crecimiento y la no acumulación de la proteína. Se pensó entonces que la conformación del fragmento A5, rico en estructuras tipo lazo con abundancia de aminoácidos P, R, T y G que determinan un carácter hidrofílico, podía ser objeto de proteólisis en el citoplasma de *E. coli*. Esto explicaría la no acumulación de la proteína recombinante, pero no aclaraba qué relación había entre esta falta de acumulación y la inhibición del crecimiento. Asimismo, cabía preguntarse por qué y cómo la inducción de dicho fragmento desencadenaba la toxicidad observada, y si solucionándola iba a ser posible la expresión del dominio extracelular íntegro de la gE en *E. coli*. Este marco experimental y de conjeturas son las que dieron pie al trabajo que aquí se ha presentado.

IV.B. Determinación de la secuencia TRAPP

Antes de discutir algunos de los estudios realizados, quisieramos matizar por qué al comienzo del trabajo no nos hemos referido nunca a la ‘expresión tóxica’ o ‘no tóxica’ de una determinada secuencia y sí, en cambio, a la ‘inducción de expresión que conlleva toxicidad’ o ‘que no conlleva toxicidad’. Hemos considerado oportuno hacer esta distinción desde un principio porque a nuestro entender los términos ‘expresión tóxica’ o ‘no tóxica’ asumen el hecho que esa expresión ha llegado a darse. Si bien la expresión es siempre evidente en los cultivos que acumulan la proteína recombinante, en los cultivos que no la acumulan no lo es en absoluto. Más adelante, sí hemos utilizado los términos de ‘expresión tóxica’ o ‘no tóxica’ porque para entonces se aportaban pruebas que demostraban que en todos los cultivos –y en particular los tóxicos– se había llegado a expresar, aunque fuera mínimamente, la proteína de interés.

La enzima exonucleasa BAL-31 ha sido utilizada por algunos autores para delimitar los determinantes antigénicos de distintas proteínas (Lenardo *et al.*, 1984; Keegan & Collett, 1986; Mason *et al.*, 1989). Los resultados aquí expuestos, validan la utilización de esta enzima como un método preciso también a la hora de identificar secuencias tóxicas de aminoácidos en una proteína. En el caso del fragmento A5 de la gE, la utilización de BAL-31 ha permitido obtener dos bancos BAL-31 de plásmidos de expresión en los que quedan representados formas delecionadas de A5 por sus extremos Nt (Δ Nt) o Ct (Δ Ct). En cada banco se han

identificado formas delecionadas tóxicas y no tóxicas, y la secuenciación de los productos de deleción de uno y otro ha permitido situar los límites Nt y Ct de la región tóxica del fragmento A5 entre los aminoácidos T₂₁₀-R₂₁₃ y P₂₁₆-R₂₂₂, respectivamente. Así, partiendo de una secuencia inicial de 66 aminoácidos, se ha conseguido en un principio acotar la región tóxica del fragmento A5 a la secuencia ²¹¹TTRAPPRRGHAR₂₂₂, de tan sólo 12 aminoácidos. Cabe señalar que, para identificar secuencias tóxicas mediante la exonucleasa BAL-31, es preferible que dicha toxicidad quede enmarcada en la secuencia lineal de aminoácidos. Aquellos casos en los que la toxicidad venga dada por una conformación compartida entre distintas secuencias serán, por el contrario, más difíciles de identificar.

El éxito del proceso de selección durante la construcción del banco de expresión BAL-31 Nt, se ha basado en el acierto a la hora de escoger las dianas de restricción que han permitido, por un lado, recuperar el producto de deleción y, por otro, insertar este producto en fase con la secuencia codificante para la subunidad de α -complementación LacZ α . A pesar de que se ha procurado que fueran traducidos —y fusionados a LacZ α — el menor número posible de aminoácidos, todos los productos de deleción seleccionados han interferido parcialmente en la actividad hidrolítica de la enzima. Ninguno de los clones seleccionados mostraba la coloración azul característica producto de la hidrólisis del X-Gal, sino más bien una tonalidad celeste, suficiente no obstante para poder distinguir un tipo u otro de clon. Aunque más adelante volveremos a incidir en el tema, queremos subrayar el hecho de que todos los productos tóxicos y no tóxicos seleccionados han sido traducidos fuera del marco de lectura de la gE, evitando de esta manera seleccionar en contra su posible toxicidad.

En los ensayos de expresión de las formas delecionadas del fragmento A5, se han caracterizado siempre dos tipos de productos. Por un lado, aquéllos cuya expresión conlleva la inhibición del crecimiento y no se acumulan en el citoplasma de *E. coli*, y por otro los que no conllevan un crecimiento inhibido y sí se acumulan en la bacteria. Esta diferencia ha sido máxima en los ensayos de expresión de las formas Δ Nt (Fig. 19A,B). En los ensayos de expresión de las formas Δ Ct y Δ Nt+ Δ Ct, la diferencia de A₅₅₀ entre cultivos de crecimiento inhibido o no inhibido ha sido menor (Fig. 16A,B y 24A,B). Este resultado sugiere que la expresión del fragmento A4 de la gE, común para las formas Δ Ct y Δ Nt+ Δ Ct, interfiere parcialmente con el crecimiento normal de *E. coli*. La interferencia del fragmento A1 contenido en las formas Δ Nt y Δ Nt+ Δ Ct ha sido, por el contrario, mínima. La clave para la expresión de la gE del BoHV-1 en *E. coli* está, sin embargo, en la secuencia de aminoácidos del fragmento A5 que expresan todos los cultivos de crecimiento inhibido. Todas las formas Δ Ct, Δ Nt y Δ Nt+ Δ Ct cuya expresión resulta tóxica contienen íntegra la secuencia de aminoácidos TRAPP. La substitución total de esta secuencia —p.e. TRAPP por TSHEF en el producto de expresión de pM Δ 1178A1— o bien parcial —p.e. TRAPP por SRAPP en el producto de expresión de pM Δ 4198A1, o TRAPH en el producto de expresión de pM Δ 410—, son condición suficiente para restablecer el crecimiento normal del cultivo y la acumulación del producto de expresión. La secuencia TRAPP es, por consiguiente, la secuencia mínima responsable de la toxicidad que conlleva la expresión de la gE del BoHV-1 en *E. coli*. Cabe notar que, aunque existe una relación directa entre la expresión de TRAPP y la toxicidad, no tenemos pruebas que indiquen qué mecanismo es el que hace tóxica la secuencia TRAPP. En consecuencia, sólo podemos atribuir la toxicidad de la gE al hecho que se expresa la secuencia TRAPP.

La identificación y substitución de la secuencia TRAPP ha llevado a expresar por primera vez en *E. coli*, aunque de forma insoluble, el dominio extracelular (V₄₀-Q₃₆₆) casi íntegro de la gE (Fig. 12). Como ya sucediera para las formas recombinantes de la gE expresadas previamente (Rebordosa, 1996), los ensayos

de inmunodetección indican que esta secuencia no es reconocida por el antisuero de animales infectados con el BoHV-1. Estos resultados sugieren que ni la conformación ni la inmunogenicidad nativas de la gE pueden ser reproducidas mediante la expresión de la proteína en *E. coli*. Asimismo, estos resultados invitan descartar definitivamente la posibilidad de substituir el BoHV-1 utilizado para sensibilizar la placa del test ELISA gE de bloqueo, por una forma recombinante procariota de la gE.

La MBP y la β -galactosidasa de *E. coli* son unas de las proteínas mejor caracterizadas y más frecuentemente utilizadas en biología molecular. Ambas proteínas han sido utilizadas como proteínas de fusión para facilitar la expresión, el plegamiento y la purificación de otras proteínas de interés biológico (Makrides, 1996; Baneyx, 1999). Los estudios de estructura/función, o de cómo diferentes partes de una misma cadena polipeptídica dan forma y función a la proteína, revelaron la existencia de dominios permisivos a la inserción de péptidos en la superficie de ambas proteínas (Betton *et al.*, 1993; Feliu & Villaverde, 1998). Estos dominios han permitido ensayar el efecto que tiene la secuencia TRAPP cuando se expresa en un contexto diferente al de la secuencia de aminoácidos de la gE. Los resultados obtenidos —más aparentes cuando TRAPP se expresa integrada en la MBP, que cuando lo hace en la ‘proteína LacZ’ (derivada de la β -galactosidasa)— no han podido ser más concluyentes: la expresión de TRAPP conlleva la inhibición del crecimiento de *E. coli* y la no acumulación de la proteína recombinante.

IV.C. Mecanismos de toxicidad de la secuencia TRAPP

Existen diferentes mecanismos por los que la expresión de una determinada proteína puede afectar el metabolismo e incluso resultar tóxica para *E. coli*. El diferente uso de codón entre especies eucariotas y procariotas es, en muchos casos, el origen de una expresión heteróloga deficiente en *E. coli* (Kane, 1995; Zahn, 1996). La eliminación de codones infrecuentes, o su substitución por unos de mayor uso en *E. coli*, ha supuesto una mejora sustancial en la expresión de algunas proteínas (Makoff *et al.*, 1989; Rangwala *et al.*, 1992; Al-Hillawi *et al.*, 1994). Sin embargo, en el caso de la secuencia TRAPP, la toxicidad asociada a su expresión no tiene nada que ver con un uso de codón ajeno al de *E. coli*. Todos los ensayos de expresión tóxica de la secuencia TRAPP integrada mediante adaptadores en la MBP, se han desarrollado siempre a partir del uso de codón óptimo de *E. coli*. Por otro lado, y a pesar de que los codones poco frecuentes se hallan casi en igual frecuencia en los fragmentos A4, A5 y A1 (Fig. 61), sí cabe la posibilidad que el diferente uso de codón entre *E. coli* y la gE del BoHV-1 sea la causa de la inhibición parcial del crecimiento asociado a la expresión del fragmento A4.

La activación de la maquinaria de degradación en respuesta a la expresión de determinadas proteínas también puede comportar cierta toxicidad al cultivo de expresión. Algunos autores han descrito que el procesamiento proteolítico (Viaplana *et al.*, 1997b) y la sobreexpresión de proteínas en *E. coli* (Dong *et al.*, 1995; Rinas, 1996) pueden acarrear la inhibición del crecimiento del cultivo. *E. coli* codifica para un elevado número de proteasas que se localizan en el citoplasma (Lon, ClpAP, ClpXP, ClpYQ), periplasma (OmpT), o bien adsorbidas a la membrana (FtsH), y que actúan como respuesta al estrés que conlleva la presencia de proteínas aberrantes o, sencillamente, la acumulación excesiva de algunas proteínas (Gottesman, 1996). La gran cantidad de bandas inmunodetectadas en el extracto crudo de los cultivos no inhibidos (no tóxicos) (Fig. 25, 31, 34C), puede corresponder a intermediarios estables de proteólisis que no interaccionan con otras

proteínas de *E. coli*, y por tanto no comprometen el crecimiento normal de la bacteria. En los cultivos tóxicos, en cambio, cabe pensar que una mayor inestabilidad de los intermediarios de proteólisis los ha llevado a interactuar con proteínas esenciales de la bacteria interfiriendo así en su crecimiento. Sin embargo, el hecho que la expresión de la secuencia TRAPP sea igual de tóxica en un cultivo de células XL1-Blue –no deficiente en proteasas– que en uno de células BL21(DE3) –deficiente para las proteasas Lon y OmpT– sugiere la posibilidad de que la toxicidad no sea consecuencia de un proceso proteolítico. En tal caso, el efecto tóxico que conlleva expresar TRAPP sería anterior a la proteólisis de la proteína expresada. Por otro lado, el hecho de que en ninguno de los cultivos de expresión de TRAPP se haya detectado un aumento en la transcripción del factor σ^{70} de respuesta al estrés celular (Fig. 45B, 46B), constituye un argumento más a favor de la no activación de la maquinaria de degradación en estos cultivos.

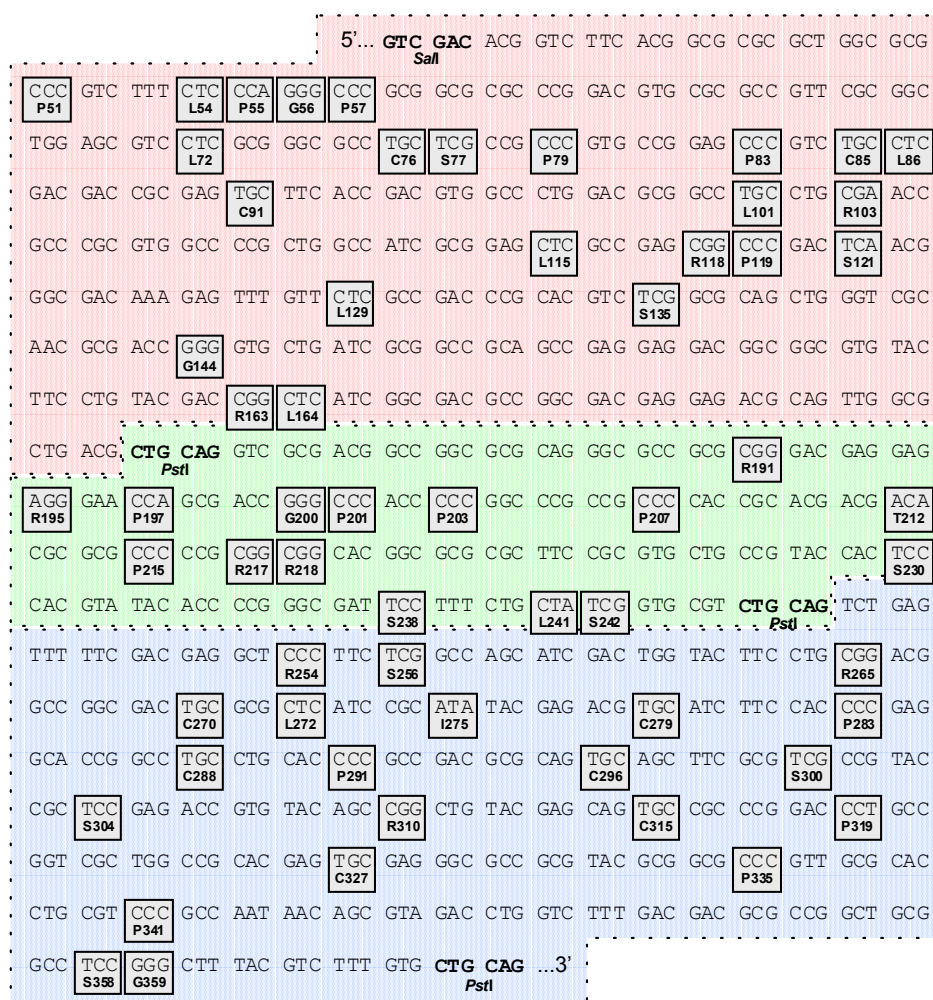


Figura 61. Distribución de codones extraños para *E. coli* en el dominio extracelular de la gE. La figura muestra la secuencia de DNA codificante para los fragmentos A4 (rojo), A5 (verde) y A1 (azul) en el marco de lectura de la gE. Sobre la secuencia se enmarcan los codones que *E. coli* utiliza con una frecuencia <1% (Kane, 1995). Para cada codón extraño se indica el aminoácido codificado y la posición que ocupa en la gE. En **negrita** se señalan las dianas de restricción *Sall* y *PstI* que delimitan, respectivamente, los fragmentos A4, A5 y A1.

Descartados el uso de codón y la activación de procesos proteolíticos como mecanismos de toxicidad asociados a la expresión de TRAPP, cabe considerar un tercer mecanismo: la competencia por un recurso. El hecho de que la expresión de la secuencia TRAPP resulte tóxica para *E. coli* puede significar que dicha

secuencia actúa como un inhibidor competitivo que capta o elimina un recurso esencial para el crecimiento de *E. coli*. En este caso, y a diferencia de los mecanismos anteriores, la toxicidad se debería directamente a la acción de la secuencia TRAPP expresada. La posibilidad de que la secuencia TRAPP compita con otras proteínas de *E. coli* que contienen esta misma secuencia es nula ya que ningún ORF de la bacteria codifica para la secuencia TRAPP. Otra posibilidad es que la secuencia TRAPP compita con proteínas de *E. coli* que contienen secuencias que guardan cierta homología con TRAPP como p.e. IKAPP en la subunidad V de la DNA helicasa (NP_417297.1) o SRVPP en una proteína quinasa (NP_416028.1).

Un aspecto que llama la atención es el diferente grado de toxicidad de la secuencia TRAPP cuando se expresa en marcos estructurales diferentes. Si bien tanto la hélice- α IV de la MBP como el lazo β^{14} - β^{15} de la 'proteína LacZ' (equivalente a la β -galactosidasa) son dominios externos permisivos (Betton *et al.*, 1993; Feliu & Villaverde, 1998), los resultados de expresar en uno y otro TRAPP, TTRAPP o TTTRAPP son bien distintos. Así, mientras que la expresión de cualquiera de estas secuencias substituyendo la hélice- α IV de la MBP ha resultado ser siempre tóxica para *E. coli* (Fig. 34A,B, 36A,B y 37A,B), la expresión de la secuencia TTTRAPP en el lazo β^{14} - β^{15} de la 'proteína LacZ' únicamente ha comportado la no acumulación de la proteína (Fig. 43A,B). Otro grupo de resultados refleja diferencias en la expresión de distintas secuencias TRAPP integradas en un mismo punto de la MBP. La expresión p.e. de la secuencia TRAPP en el lazo D₁₂₀-I₁₃₂ de la MBP resulta tóxica para la bacteria, pero no así la de la secuencia TTRAPP (Fig. 30A,B). Se observa por tanto, que la toxicidad asociada a la expresión de TRAPP depende en gran medida del lugar de inserción de la secuencia. Por otro lado, no obstante, la toxicidad que conlleva expresar TRAPP, TTRAPP o TTTRAPP en diferentes dominios de una misma proteína, así como en distintas proteínas de *E. coli*, es, muy probablemente, el producto de un mismo mecanismo. Es por ello que cabe preguntarse si el mecanismo tóxico asociado a la secuencia TRAPP depende realmente del marco estructural o conformacional del que forma parte TRAPP en la proteína, o si en realidad implica el paso previo de expresión de la proteína, esto es, su síntesis y su plegamiento.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la toxicidad asociada a la expresión de TRAPP no es consecuencia de un uso de codón distinto al de *E. coli*. Por otro lado, el crecimiento celular y la acumulación de la MBP que expresa la secuencia TTRAPP insertada en el lazo D₁₂₀-I₁₃₂ son una prueba directa de que dicha secuencia no bloquea los ribosomas de la bacteria. Así pues, en vistas de que TRAPP no interfiere en la síntesis de la proteína (entendida hasta su traducción), queda considerar si la expresión de la secuencia TRAPP interfiere con la maquinaria de plegamiento de las proteínas: las chaperonas moleculares.

Las chaperonas son un conjunto de proteínas que previenen o corrigen el plegamiento defectuoso y la agregación de las proteínas (Hayes & Dice, 1996; Hartl, 1996; Bukau & Horwich, 1998; Hartl & Hayer-Hartl, 2002; Carrió-Llach, 2002). Muchas de ellas son esenciales (Fayet *et al.*, 1989; Gerdes *et al.*, 2003) y se expresan de forma constitutiva. Las chaperonas interactúan con los dominios hidrofóbicos y las regiones desestructuradas de los polipéptidos sustrato, creando un entorno idóneo para que éstos adquieran su estructura definitiva, formen oligómeros o bien sean degradados. En *E. coli*, las chaperonas citosólicas actúan mediante dos mecanismos distintos. La chaperona Trigger Factor (TF) y el sistema Hsp70 (DnaK, DnaJ y GrpE) unen la cadena polipeptídica saliente del ribosoma y le proporcionan un estado competente para el plegamiento. Por otro lado, las chaperoninas o sistema Hsp60 (GroEL y GroES) capturan e internalizan algunos intermediarios de plegamiento proporcionándoles un entorno idóneo para adoptar su estructura nativa. Se estima que el 65-80% de las proteínas de *E. coli*, mayoritariamente pequeñas,

adquieren la conformación nativa de forma rápida después de que la chaperona TF y las del sistema Hsp70 se desprenden gradualmente de la cadena polipeptídica (Hartl & Hayer-Hartl, 2002). Los polipéptidos más largos, en cambio, permanecen más tiempo unidos a estas chaperonas, las cuales los estabilizan y asisten en su plegamiento co- y post-traducciona (10-20%), o bien los transfieren al sistema GroEL-GroES (10-15%).

El mecanismo general por el que GroEL-GroES asiste el plegamiento de las proteínas es mediante su encapsulación. Ésta, no obstante, está limitada a proteínas de un máximo de 55 kDa (Ewalt *et al.*, 1997). Algunos autores han descrito que GroEL-GroES también puede facilitar el plegamiento de proteínas mucho mayores, como la β -galactosidasa (Chaudhuri *et al.*, 2001), y es de suponer que para ello utiliza un mecanismo diferente. Si asumimos que la secuencia TRAPP neutraliza el sistema GroEL-GroES cuando es encapsulada, ese doble rasero basado en el tamaño de las proteínas a la hora de asistir su plegamiento puede explicar por qué es tóxica la expresión de TRAPP en la hélice- α IV de la MBP (<55 kDa), y por qué no lo es cuando se expresa en la 'proteína LacZ' (aprox. 116 kDa). Ello, no obstante, no explica entonces por qué son tóxicos los productos de delección del fragmento A5 expresados como proteína de fusión a la MBP (Δ Nt, Δ Ct o Δ Nt+ Δ Ct), si ninguno de ellos resultaría encapsulado debido a su tamaño (>55 kDa). Tampoco queda claro por qué desde el estado desplegado de la MBP, el efecto de TTRAPP iba a ser diferente si es expresada en el lazo D₁₂₀₋₁₃₂ o en la hélice- α IV. Por otro lado —y en el mismo supuesto que la secuencia TRAPP no es tóxica si no es encapsulada— no se explica entonces por qué no se acumula la 'proteína LacZ' que incorpora la secuencia TTTRAPP, o por qué sí lo hace sólo en condiciones de estrés térmico. Cabe señalar, no obstante, que precisamente a partir de esta última observación parece más evidente una posible competencia de la secuencia TRAPP con las chaperonas moleculares. El hecho que la 'proteína LacZ' que contiene la secuencia TTTRAPP sólo se acumule en condiciones de estrés celular puede significar que dicha secuencia compite con determinadas chaperonas en condiciones normales, y que ello hace necesaria una mayor síntesis de chaperonas para acumular la proteína.

Finalmente, planteamos la posibilidad que la secuencia TRAPP interfiera con la maquinaria bacteriana de síntesis de DNA y de proteínas de manera similar a como lo hacen algunos péptidos catiónicos antimicrobianos (Boman *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1999; Xiong *et al.*, 1999; Castle *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2000). Los péptidos catiónicos antimicrobianos constituyen un conjunto muy numeroso de moléculas efectoras de la respuesta inmune innata de todo tipo de organismos (Zasloff, 2002; Koczulla & Bals, 2003; Thomma *et al.*, 2002). Si bien la estructura de los péptidos catiónicos antimicrobianos es muy diversa —hélice- α lineal sin residuos C, hoja- β con dos, tres o cuatro puentes disulfuro, estructura de lazo con un puente disulfuro, y lineal no α -hélice con predominancia de uno o más aminoácidos— todos ellos adoptan una conformación marcadamente anfipática, en la que los grupos de aminoácidos hidrofóbicos y aminoácidos catiónicos se organizan espacialmente ocupando sectores distintos de la molécula. Este carácter anfipático permite a la mayoría de péptidos catiónicos antimicrobianos formar poros o bien desintegrar la membrana citoplasmática de las bacterias, provocando así la lisis celular (Shai, 2002). Existe, no obstante, un pequeño grupo de péptidos antimicrobianos cuyo mecanismo de acción no implica la destrucción de la membrana citoplasmática (Casteels & Tempst, 1994), pero sí el reconocimiento estereoespecífico de moléculas en el citoplasma bacteriano. Estos péptidos constituyen el grupo de péptidos 'short proline-arginine rich', actúan sobre todo en bacterias Gram-negativas, y como su nombre indica son generalmente cortos y ricos en los aminoácidos P y R (Otvos Jr., 2002). A este conjunto de péptidos pertenecen, entre otras, las apidecinas, drosocinas, formaecinas y pyrrolicinas. Se ha descrito que éstas últimas reconocen de manera específica el lipopolisacárido de membrana bacteriano y la chaperona DnaK, y

de manera inespecífica la chaperonina GroEL (Otvos Jr. *et al.*, 2000). En las pyrrohocorinas, el dominio rico en P y R localizado en la mitad Ct (Tabla XXVIIA) permite la entrada del péptido en la bacteria, mientras que la mitad Nt induce una disminución de la actividad ATPasa de la DnaK. La mitad Nt de las pyrrohocorinas une, además, la secuencia que enlaza las hélices- α D y E de la DnaK justo sobre el dominio de interacción con los péptidos desestructurados, bloqueando así la función de la chaperona (Kragol *et al.*, 2001; Kragol *et al.*, 2002).

TABLA XXVII. Secuencia de aminoácidos de algunos péptidos 'short proline-arginine rich'.
Secuencia traducida durante la selección de algunos productos Δ Nt del fragmento A5.

Péptido / Clon	Secuencia
A Drosocina	G--K PR PYS PRPT SH PRP IRV
Formaecina 1	G--R PNP VNNK PTPH PR-L
Pyrrhocoricina	V-DKGS-YL PRPT - PPRP IYNRN
Apidecina 1a	GNNRP-VYI PQP - RP PHP-RI
B Péptido PR-39	RRRPR PP YLPRPR PP FFF PP RL PP RI PP GF PP RF PP RF PP
Bactenecina Bac5	R FR PP IR R PP IR PP IR PP Y PP FP FR PP IR PP IF PP IR PP FR PP LR FP
Bactenecina Bac7	RRIR PR PP RL PR PR PP LP FP PR GP PR IP PR LP FP PR GP PP IR PP LP FP PR GP PR IP PR LP FP PR GP PP IR PP
C Fragmento A5 gE	PTPGPPPHRTT TRAPP RR
pU Δ 515	MTMITNSRPP PARRPTARRHARPRGG TARASACCR T PTTYTPRAIPFCYRCVCRHASLAL-LacZ α
pU Δ 715	MTMITNSR RRHARPRGG TARASACCR T PTTYTPRAIPFCYRCVCRHASLAL-LacZ α
pU Δ 54	MTMITNSR APP RRHGARFRVLPYHSHVYTPGD S FLLSVRLQACKLGTGR R FTTS
pU Δ 724	MTMITNSRVLPYHSHVYTPGD S FLLSVRLQACKLGTGR R FTTS

(A) Alineamiento de secuencia de péptidos 'short proline-arginine rich' aislados de insectos. (B) Péptidos 'short proline-arginine rich' aislados de mamíferos, pertenecientes a las cathelicidinas. Péptido PR-39 aislado del intestino de cerdo. Bac5 y Bac7 aislados de neutrófilos bovinos. (C) Fracción del fragmento A5 de la gE del BoHV-1 rica en P y R. Secuencia de aminoácidos traducidas durante la selección de productos Δ Nt del fragmento A5. [A, secuencias tomadas de Otvos Jr., 2002; B, Bac5 y Bac7 tomadas de Frank *et al.*, 1990; A y B, se señala en **negrita** la repetición de aminoácidos; C, se subraya la secuencia TRAPP y otras secuencias ricas en P y R]

La riqueza de residuos P y R no es por sí misma motivo suficiente de toxicidad, ni en los péptidos 'short proline-arginine rich' (Cudic & Otvos Jr., 2002) ni tampoco en el fragmento A5 de la gE. Durante la selección de los productos de delección Δ Nt (III.A.2.A.1.a.), se escogieron como válidos los productos Δ 515 y Δ 715 cuya traducción –en un marco de lectura distinto al de la gE– conlleva la presencia de numerosos residuos P y R que en ningún momento resultaron ser tóxicos para *E. coli* (Tabla XXVIIC). En cambio, el resultado de expresar TRAPP ya sea en Δ 515, Δ 715 o en cualquier otra secuencia, recuerda mucho la interrupción de los procesos metabólicos esenciales inducida por los péptidos formaecina y apidecina en las células en crecimiento (Mackintosh *et al.*, 1998; Casteels *et al.*, 1989). Igualmente, el descenso de actividad β -galactosidasa registrado cuando la enzima incorpora la secuencia TRAPP (III.B.2.B.1.d.), recuerda el efecto que tienen los péptidos pyrrohocoricina y drosocina sobre dicha actividad en un cultivo de *E. coli* TG1 (Kragol *et al.*, 2001). Así pues, cabe la posibilidad que la expresión de TRAPP resulte tóxica para *E. coli* porque, al igual que los péptidos 'short proline-arginine rich', interacciona y neutraliza de un modo específico un componente esencial de la maquinaria de plegamiento de las proteínas, como p.e. la DnaK. Sin ánimo de asignar a la gE del BoHV-1 o a la secuencia TRAPP una actividad bactericida, consideramos que la toxicidad que conlleva su expresión en *E. coli* se puede explicar en parte tomando como modelo el mecanismo de actuación de estos péptidos antimicrobianos. Conviene apuntar, además, que los resultados de viabilidad

obtenidos de los cultivos inhibidos sugieren que la expresión de TRAPP tiene un efecto propiamente bacteriostático, en contraposición al efecto bactericida de los péptidos 'short proline-arginine rich'.

IV.D. Aplicación a la expresión heteróloga en *E. coli*

La expresión heteróloga de proteínas tiene en la bacteria *E. coli* un sistema ideal debido a su elevada tasa de crecimiento y capacidad de producción, el reducido coste del medio de cultivo, su genética profusamente estudiada, y la disponibilidad de una gran variedad de vectores de expresión y de cepas hospedadoras. Sin embargo, y a pesar de todo lo que se sabe de *E. coli*, nunca está garantizado que cualquier proteína pueda ser expresada de manera eficiente en su forma activa, en su forma íntegra, y ni siquiera en cantidad suficiente. Ello se debe a las particularidades estructurales del gen que se expresa, a la estabilidad y eficiencia de traducción del mRNA, a la facilidad de plegamiento de la proteína, a la degradación de la proteína por parte de las proteasas celulares, a las diferencias de uso de codón, o incluso a la toxicidad que induce en *E. coli* la proteína expresada. S. C. Makrides y F. Baneyx recogen en sus respectivas publicaciones gran parte del progreso realizado en la expresión heteróloga de proteínas en *E. coli* (Makrides, 1996; Hannig & Makrides, 1998; Baneyx, 1999). Nosotros hemos querido abordar el problema de la toxicidad asociada a la expresión de proteínas en *E. coli*, y lo hemos hecho a partir de la experiencia que ha supuesto expresar el fragmento A5 de la gE del BoHV-1. En una primera ocasión creamos la aplicación ASAP ('Analysis of Sequence and Aminoacid Probabilities') que analiza la distribución de péptidos de hasta 4 aminoácidos en genomas completos (Serra-Hartmann *et al.*, 2000). Actualmente, estamos desarrollando la aplicación que se describe brevemente a continuación.

A partir del genoma de *E. coli*, hemos determinado la frecuencia relativa de uso de cada uno de los aminoácidos en el conjunto de sus proteínas, y hemos calculado el índice χ^2 que compara la frecuencia real y la teórica esperada de cada una de las 160000 posibles secuencias de 4 aminoácidos. Los resultados obtenidos reflejan que la distribución de aminoácidos en las proteínas de *E. coli* no es al azar, esto es, los aminoácidos muestran preferencias a la hora de combinarse. Por otro lado, algunos péptidos se hallan con una frecuencia muy superior a la teórica esperada, mientras que otros destacan por lo contrario. Entre estos segundos los hay incluso que no están codificados en ningún gen de *E. coli*. El hecho que un péptido muestre una frecuencia real ($Frec_{obs}$) muy superior a la teórica esperada ($Frec_{esp}$), cabe interpretarlo como que dicha combinación de aminoácidos resulta muy provechosa o 'favorable' para la bacteria. Por el contrario, si una determinada secuencia se halla con una frecuencia muy inferior a la esperada, se puede interpretar como que dicha secuencia ha sido seleccionada 'en contra' por ser contraproducente para *E. coli*. A modo de ejemplo, la secuencia TRAPP no se halla codificada en ningún gen de *E. coli* mientras que RAPP figura entre el 0.31% de las secuencias 'desfavorables' más divergentes. Cuando se inserta TRAPP en la hélice- α IV de la MBP en la proteína de fusión MBP-lacZ α , RAPP constituye la secuencia de 4 aminoácidos más desfavorable de las 454 que componen la proteína. Habida cuenta de la toxicidad que conlleva expresar TRAPP en *E. coli*, interpretamos que en el caso de RAPP la divergencia hallada es reflejo de su condición tóxica.

En base a los resultados obtenidos en la determinación de la secuencia TRAPP, hemos estimado oportuno crear un programa que represente gráficamente la divergencia asociada a cada uno de los péptidos

que componen una proteína cuando es expresada en *E. coli* (Fig. 62). De esta manera se pueden identificar secuencias ‘favorables’ y ‘desfavorables’ para *E. coli* dentro de una misma proteína. El programa representa gráficamente el cociente $(Frec_{\text{Obs}} - Frec_{\text{Esp}})^3 / Frec_{\text{Esp}}^2$, o índice JX, de los péptidos de 4 aminoácidos de una proteína. Un valor de JX positivo (+) significa que la secuencia es ‘favorable’, mientras que uno negativo (-) la define como ‘desfavorable’. Los valores de JX comprendidos entre +2 y -2 reflejan poca divergencia y corresponden, por lo general, a la mayoría de péptidos en una proteína. Cuanto mayor es el valor positivo de JX mejor considerada está la secuencia en particular. Por el contrario, cuanto mayor es el valor negativo de JX ($JX_{\text{máx}} \text{ negativo} = -18.8414$) peor valorada está dicha secuencia.

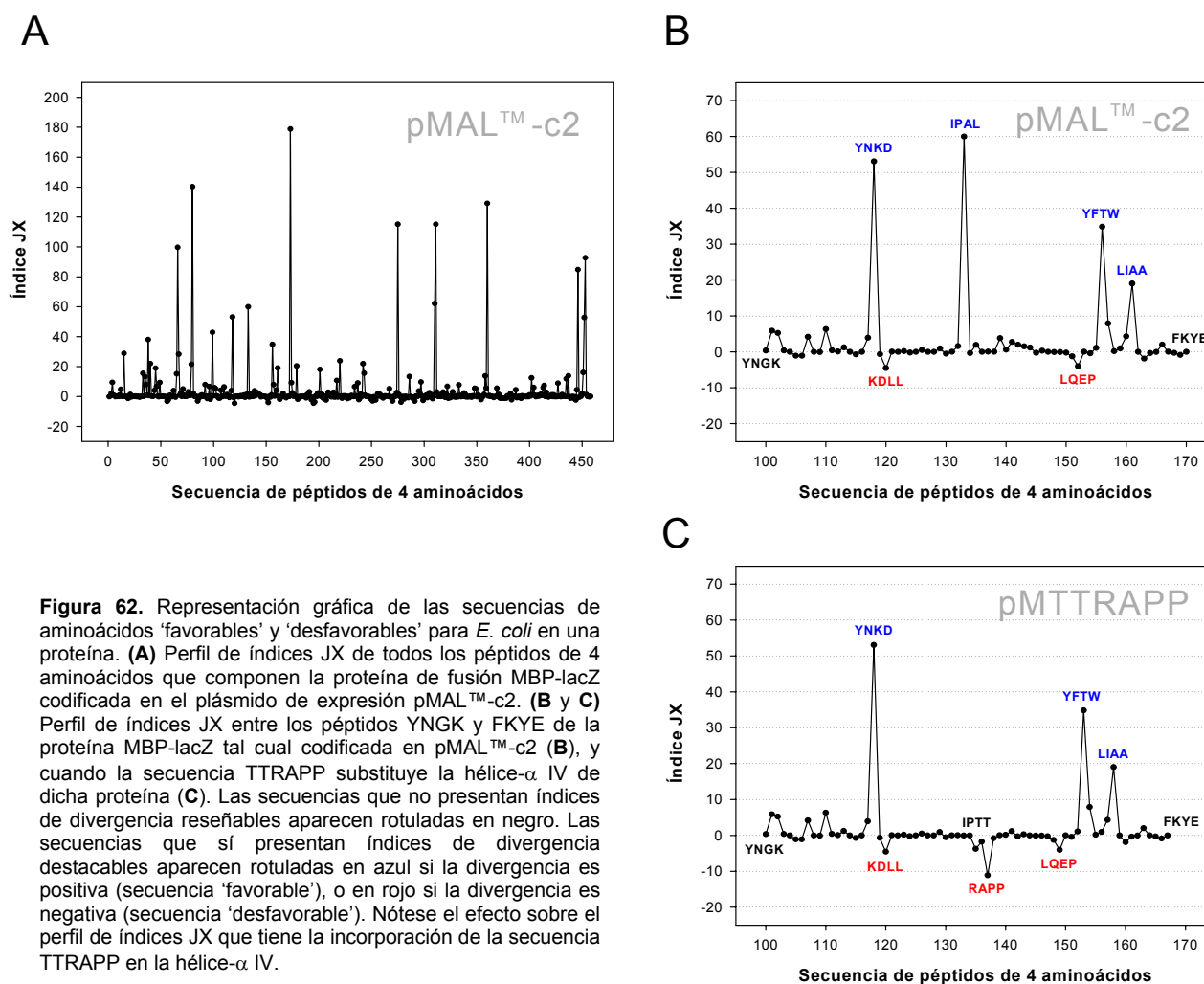


Figura 62. Representación gráfica de las secuencias de aminoácidos ‘favorables’ y ‘desfavorables’ para *E. coli* en una proteína. **(A)** Perfil de índices JX de todos los péptidos de 4 aminoácidos que componen la proteína de fusión MBP-lacZ codificada en el plásmido de expresión pMAL™-c2. **(B y C)** Perfil de índices JX entre los péptidos YNGK y FKYE de la proteína MBP-lacZ tal cual codificada en pMAL™-c2 **(B)**, y cuando la secuencia TTRAPP substituye la hélice- α IV de dicha proteína **(C)**. Las secuencias que no presentan índices de divergencia reseñables aparecen rotuladas en negro. Las secuencias que sí presentan índices de divergencia destacables aparecen rotuladas en azul si la divergencia es positiva (secuencia ‘favorable’), o en rojo si la divergencia es negativa (secuencia ‘desfavorable’). Nótese el efecto sobre el perfil de índices JX que tiene la incorporación de la secuencia TTRAPP en la hélice- α IV.

Queremos remarcar que el objeto de este programa no es determinar si la expresión de una secuencia o proteína particulares resulta o no tóxica para *E. coli*. En este sentido pensamos que la mejor manera de valorar la toxicidad de una proteína es la prueba experimental. La verdadera finalidad de este programa es, a tenor de unos resultados experimentales que denoten unos niveles nulos o casi nulos de expresión, reflejar qué secuencias de una proteína son ‘favorables’ o ‘desfavorables’ para *E. coli* atendiendo simplemente a la cantidad de veces que se hallan codificadas en su genoma. Si bien entendemos que las secuencias favorables son siempre aquéllas que sobreviven a una mayor presión selectiva, y que ésta actúa más eficazmente sobre proteínas que se expresan en abundancia, la imposibilidad de valorar el nivel de expresión

de las proteínas que conforman *E. coli* nos ha llevado a definir el carácter 'favorable/desfavorable' en base al número de veces que una secuencia aparece codificada en su genoma. Asumimos, por consiguiente, que podemos estar considerando como no favorable una secuencia que, aún expresándose de forma continuada y en abundancia y bajo una fuerte presión selectiva, aparece codificada tan sólo una vez en el genoma de *E. coli*. De igual modo, asumimos que podemos estar considerando como favorable aquella secuencia que, sin hacer gala de sobrevivir a una fuerte presión selectiva por lo exiguo de su expresión, aparece codificada un mayor número de veces en el genoma de la bacteria. Un caso práctico de aplicación de este programa es el que se deriva de cualquier intento infructuoso de expresión heteróloga en *E. coli*, como p.e. la expresión de dominio extracelular de la glicoproteína E1 del virus de la rubeola. En este dominio hallamos los péptidos FTYL, AGPY y RAGP que presentan índices JX de -8.6220, -9.1378 y -11.1207, respectivamente (Fig. 63A). En este caso, se puede sugerir expresar la proteína que incorpora los cambios conservativos L→I en FTYL, G→A en AGPY o R→K en RAGP, de manera que las secuencias resultantes muestran índices JX más favorables (0.0001, -1.6647 y -3.3190) y quizás más acordes con una expresión productiva. Otras opciones son eliminar parcial o totalmente las secuencias desfavorables, o bien expresar los fragmentos de la proteína que no las contienen.

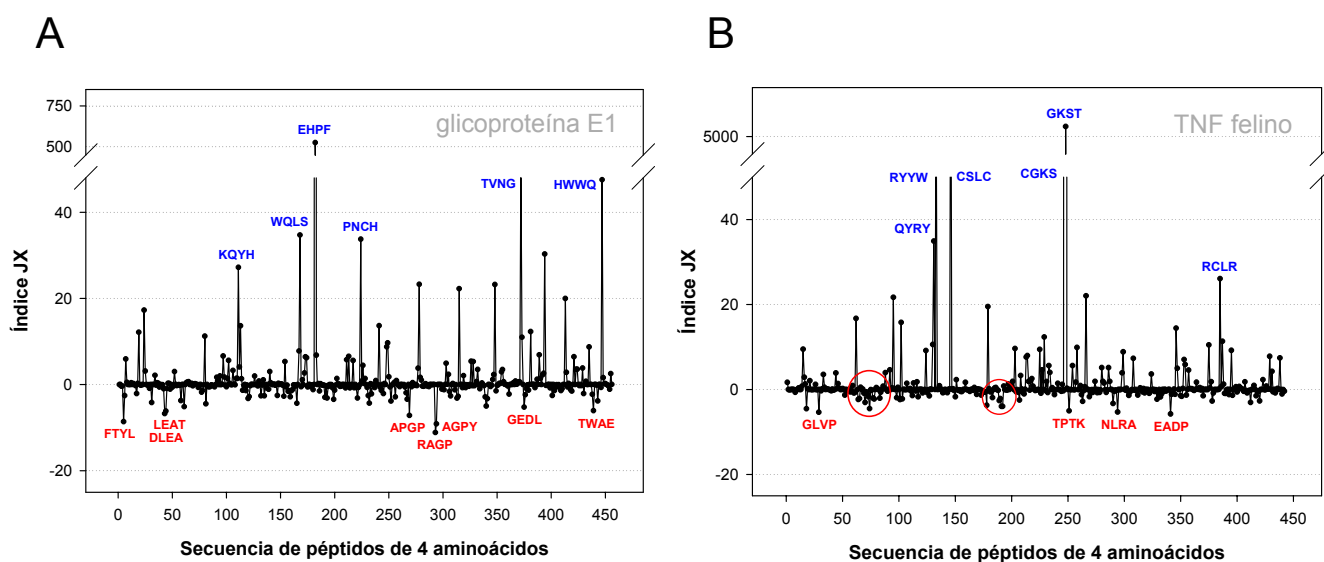


Figura 63. Perfil de índices JX del dominio extracelular de la glicoproteína E1 del virus de la rubeola y del factor de necrosis tumoral (TNF) felino cuando son expresados en *E. coli*. En la bibliografía no hallamos ninguna referencia sobre la producción de la glicoproteína E1 íntegra del virus de rubeola en *E. coli*, lo cual sugiere que dicha expresión pudiera ser tóxica para la bacteria. En cambio, sí hay pruebas documentadas de la toxicidad que induce la expresión del TNF felino en *E. coli* (Otto *et al.*, 1995). Las figuras **A** y **B** muestran en azul las secuencias con índices de divergencia positivos, mientras que las secuencias con índices de divergencia negativos se rotulan en rojo. En **A**, las secuencias desfavorables FTYL y TWAE no están codificadas en el genoma de *E. coli*. En **B**, se contabiliza un menor número de secuencias desfavorables que en **A**, pero en cambio hallamos determinadas regiones donde tienden a acumularse secuencias con índices de divergencia negativos (círculos rojos).

De los resultados obtenidos en la expresión de secuencias minoritarias o desfavorables en *E. coli*, deducimos que existe una relación entre este tipo de secuencias y el nivel de expresión y solubilidad de la proteína expresada. Las secuencias GPNL y LFQV tienen índices JX desfavorables de -10.8869 y -9.9519, respectivamente, muy próximos a los -11.1005 de la secuencia RAPP. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre con la expresión de TRAPP, la expresión de GPNL o LFQV integradas en la MBP conlleva altísimos niveles de acumulación de la proteína (Fig. 49B, 50B). Esta acumulación es, no obstante, 100% insoluble en forma de cuerpos de inclusión. Estos resultados sugieren que la expresión insoluble de proteínas en *E. coli*,

aparte de ser el producto de un proceso de plegamiento deficiente incapaz de llevar a la proteína a su estado nativo soluble, también es un reflejo de la expresión de secuencias 'desfavorables', posiblemente tóxicas, para la bacteria. Es probable, incluso, que sean estas secuencias 'desfavorables' las que hagan ineficaz la maquinaria celular de plegamiento de las proteínas. En este sentido, y acorde con la opinión de algunos autores (Carrió-Llach, 2002; Carrió & Villaverde, 2003), interpretamos que la expresión insoluble de proteínas y la formación de cuerpos de inclusión en el citoplasma de *E. coli*, obedece a un sistema celular activo de respuesta al estrés que busca la detoxificación.

IV.E. Función de la secuencia TRAPP en la glicoproteína E

Actualmente se sabe que la gE del BoHV-1 participa en la transmisión 'célula-a-célula' del virus. Ésta es la vía principal de transmisión del virus, sobre todo durante la etapa de reactivación que es cuando el virus es más vulnerable al sistema inmunitario. El dominio citoplasmático de la gE es esencial para la transmisión 'célula-a-célula' ya que en él residen las principales secuencias señal que permiten situar la progenie viral en la superficie basolateral de la célula infectada. El dominio extracelular, a su vez, permite la formación del complejo gE/I donde se hallan los dominios necesarios para interactuar con las proteínas extracelulares y con las proteínas de membrana de las células adyacentes. La caracterización *in vitro* de la cepa RAPPPr del BoHV-1 revela que la sustitución de la secuencia RAPPPr de la gE no conlleva la pérdida de la capacidad de transmisión 'célula-a-célula' asociada a la gE. Ello indica que la secuencia RAPPPr sustituida no participa en la función de la gE. La cepa RAPPPr del BoHV-1 muestra, en cambio, una tasa de liberación de los viriones al medio extracelular diferente a la de la cepa FM (wt) del virus, así como un pequeño incremento en su capacidad de transmisión. Estos cambios se pueden deber, en todo caso, a un cambio en el patrón de interacción del virus con los complejos de unión celular o con otras proteínas de la matriz extracelular.

Hay indicios que sugieren una posible participación de la secuencia TRAPP de la gE en su interacción con la gI así como con proteínas de la matriz extracelular. Se ha descrito que los 246 aminoácidos del extremo Nt de la gE del BoHV-1, y en particular la secuencia A₁₃₆-Q₂₄₆ que contiene TRAPP, son necesarios para la formación del complejo gE/I (Tyborowska *et al.*, 2000). Cabe la posibilidad que la sustitución de la secuencia RAPPPr de la gE en el BoHV-1 RAPPPr afecte parcialmente la formación del complejo gE/I, y que ello repercuta en la interacción del virus con las moléculas de adhesión celular (CAMs) de los complejos de unión. En condiciones normales, estas CAMs facilitan la salida del virión así como su circulación por el espacio intercelular (Dingwell & Johnson, 1998; Alconada *et al.*, 1998), de modo que un cambio en la interacción con ellas podría inducir la reducción en la tasa de liberación de viriones observada para el BoHV-1 RAPPPr. Otros estudios sugieren que el dominio de la gE del que forma parte la secuencia TRAPP puede interactuar con moléculas del citoesqueleto. Así, se ha hallado un elevado índice de similitud (28.5%) entre la secuencia L₁₆₄-R₂₁₈ de la gE y el dominio C de la sinapsina Ia (Rebordosa, 1996). Este dominio, el más conservado entre las sinapsinas, es considerado el nexo de unión entre las vesículas sinápticas y el citoesqueleto. Parece por tanto probable, que el dominio de la gE que contiene la secuencia TRAPP participe de algún modo en la interacción del BoHV-1 con proteínas de los complejos de unión o del espacio intercelular.

Otro dato que sugiere que la secuencia TRAPP en la gE pudiera interactuar con componentes de la matriz extracelular, es su prevalencia en las proteínas de la matriz extracelular o de secreción que refleja la Tabla XI. La secuencia de aminoácidos TTRAPP, precisamente la que se halla en la gE del BoHV-1, aparece codificada, entre otras proteínas, en el colágeno cuticular COL-41 del nemátodo *C. elegans*, en la quitinasa de *C. Elegans* y de las especies de camarón *L. vannamei* y *M. japonicus*, en sendas proteínas de ratón y de rata que presentan un dominio de unión extracelular, en la proteína salivar de adhesión SGS-3 de la mosca *D. simulans*, o en una lectina del nemátodo *T. canis*. En el caso de la proteína salivar de adhesión SGS-3 (SGS3_DROSI, P13729), la secuencia TTRAPP se halla repetida tres veces de forma espaciada (₅₉TTTTT TRAPPTKPTCKSTSTTTTTTRAPPTKPTCKSTSTTTTTTRAPPTTT₁₀₉), mientras que en el colágeno cuticular de *C. elegans* (YQ36_CAEEL, NP 510522), la secuencia TRAPP se halla repetida cuatro veces de forma consecutiva (₃₀₅GTRAPPATRAPPATRAPPATTRAPP₃₂₉). Ante estas secuencias, resulta tentador atribuir a la secuencia TRAPP cierta relevancia para preservar la estructura/función de las respectivas proteínas, e incluso asignarle la condición de 'motif' funcional implicado en el reconocimiento de componentes de la matriz extracelular.

Un último dato que sugiere que la secuencia TRAPP, o el dominio del que forma parte, pudiera participar de algún modo en el reconocimiento de la gE con otras proteínas, nace de los estudios sobre complementación de funciones de las gE del BoHV-1 (no neurovirulento) y del BoHV-5 (neurovirulento) (Chowdhury *et al.*, 2000). Se ha demostrado que mientras las gE y gI de las dos especies de virus complementan sus funciones *in vitro*, el dominio extracelular de la gE del BoHV-1 no complementa la función del dominio extracelular de la gE del BoHV-5 *in vivo*. Los índices de identidad y de similitud entre ambas gE son del 72% y 77%, respectivamente. Las diferencias se localizan básicamente en el dominio extracelular y ocupan el extremo Nt de la gE madura, gran parte del fragmento A5 –en el que reside la secuencia TRAPP–, y una pequeña secuencia de 12 aminoácidos entre el fragmento A1 y el dominio transmembrana (Fig. 11). Ante estos resultados, cabe la posibilidad que el dominio que contiene la secuencia TRAPP pueda ser determinante a la hora de interactuar con determinadas proteínas y definir así el tropismo celular del BoHV-1.

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones que se derivan de este trabajo experimental son las siguientes:

1. La secuencia de aminoácidos Thr₂₁₂–Pro₂₁₆ (TRAPP) de la glicoproteína E (gE) del herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) inhibe el crecimiento celular al ser expresada en *E. coli*.
2. La toxicidad que conlleva la expresión de la secuencia TRAPP se debe, directa o indirectamente, a la propia naturaleza de la secuencia y no responde a un uso de codón ajeno a *E. coli*. La supresión parcial de la secuencia TRAPP es condición suficiente para restablecer el crecimiento normal del cultivo y la acumulación, aunque de forma insoluble, de la secuencia Val₄₀–Gln₃₆₆ del dominio extracelular de la gE del BoHV-1 en el citoplasma de *E. coli*.
3. La expresión de la secuencia de aminoácidos TRAPP integrada en la MBP también resulta tóxica para el cultivo de *E. coli*. La expresión de TRAPP como inserción en el lazo Asp₁₂₀–Ile₁₃₂ o substituyendo la hélice- α IV de la MBP tiene, no obstante, efectos diferentes. La toxicidad depende del punto de integración de la secuencia en la MBP y, en última instancia, de la conformación que adquiere la proteína resultante.
4. La expresión de la secuencia de aminoácidos TRAPP integrada en el lazo que une las hojas- β antiparalelas β^{14} y β^{15} de la 'proteína LacZ' conlleva la no acumulación de esta proteína en *E. coli*. La no acumulación de la 'proteína LacZ' no correlaciona con una inhibición del crecimiento de los cultivos. Las condiciones de estrés térmico favorecen la expresión y la acumulación de la 'proteína LacZ' que contiene la secuencia TRAPP.
5. La expresión de la secuencia TRAPP conlleva la inhibición del crecimiento del cultivo pero no compromete la viabilidad de las células. La expresión de TRAPP tiene pues un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de *E. coli*.
6. La no acumulación de proteínas que contienen la secuencia TRAPP en *E. coli* no se debe, en principio, a la actividad de las principales proteasas de la bacteria: Lon y OmpT. La secuencia TRAPP tampoco induce una respuesta 'heat-shock' mediada por un aumento del nivel de transcripción del factor σ^{70} .
7. La secuencia de aminoácidos TRAPP no se halla codificada en ninguno de los 4279 ORF que componen el genoma de *E. coli*. La secuencia RAPP pertenece a un reducido grupo de secuencias de 4 aminoácidos que se hallan representadas en *E. coli* con una frecuencia menor a la que se espera de una hipotética distribución al azar de los aminoácidos. La expresión de algunas de estas secuencias integradas en la MBP no inhibe el crecimiento del cultivo pero sí conlleva la acumulación insoluble de la proteína recombinante resultante.
8. El dominio de la gE del cual forma parte la secuencia RAPP parece jugar un papel en el binomio estructura/función de esta glicoproteína en el BoHV-1. La substitución de la secuencia RAPP conlleva una tasa de liberación de los viriones al medio extracelular más lenta que la de viriones BoHV-1 FM (wt). Por otro lado, la capacidad de transmisión 'célula-a-célula' de los viriones RAPP es similar, si no superior, a la de viriones FM.

9. El dominio extracelular de la gE expresado en *E. coli* no es reconocido específicamente por el antisuero de terneras infectadas con el BoHV-1. El dominio expresado de la gE no emula pues la conformación nativa de dicha glicoproteína en el BoHV-1. Los epítomos inmunodominantes de la gE son, por consiguiente, conformacionales y no pueden ser reproducidos mediante la expresión de fragmentos de la secuencia polipeptídica en un sistema procariota.

10. Se ha obtenido un panel de anticuerpos monoclonales contra la gE del BoHV-1 con objeto de utilizarlos en un test de diagnóstico veterinario de infección por BoHV-1. Si bien el test de diagnóstico diseñado precisa de un ulterior desarrollo, por el momento se ha mostrado sensible y específico para la detección de anticuerpos contra la gE del BoHV-1.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.A. Equipo de laboratorio

En este apartado se lista el conjunto de equipos de laboratorio utilizados de manera regular durante el desarrollo de este trabajo experimental:

- Agitadores de balanceo SBS (modelo AB-2), magnético METROHM (modelo E 349 A), rotativo BRAUN (modelo Certomat R) y rotativo SELECTA (modelo Rotabit).
- Agitador vórtex HEIDOLPH BIOBLOCK SCIENTIFIC (modelo Top-Mix 94323).
- Autoclave MATACHANA (modelo 140 L2).
- Balanza SARTORIUS (modelos PT 1200 portable y de precisión R 200 D research).
- Baños termostáticos GRANT (modelo W6), HUBER (modelo Polystat) y LKB (modelo 2219 Multitemp II).
- Bloque termostático BIOBLOCK (modelo 92617).
- Cabina de flujo laminar TELSTAR (modelos AV-100 y BIO-II-A).
- Cámara fotográfica POLAROID (modelo MP-4 Land Camera).
- Centrifugas de sobremesa EPPENDORF (modelo 5415 C), minifuga HERAEUS (modelo Christ Minifuge T) y SORVALL (modelo RC5 C).
- Congeladores LIEBHERR (modelo No-Frost, sistema electrónico 6, -20°C), FORMA BIO-FREEZER (modelo 81100, -80°C) y JOUAN (modelo VX 430, Series-2, -80°C).
- Contador geiger portátil MINI-INSTRUMENTS LTD (modelos Series 900 y 5.10).
- Equipo de electroforesis BIORAD (modelos Mini-Protean II, Mini-Subcell y Wide Mini-Subcell).
- Equipo de electrotransferencia BIORAD (modelo Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell).
- Espectrofotómetro UV-visible CARY (modelo 1E).
- Estufas HERAEUS (modelo KT-500) y de cultivo MEMMERT (modelo B50).
- Frigoríficos BAUKNECHT y PHILIPS.
- Fuentes de alimentación ISCO (modelo 453) y LKB-BROMMA (modelo 2297 Macrodrive 5).
- Incubadores bacteriológico por aire con agitación BRAUN (modelo Certomat H) y NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC CO., INC. (modelo G-24)
- Jeringas HAMILTON-Microliter (serie 700, #702) y PHARMACIA-BIOTECH (modelo Macrophor).
- Lupa binocular WILD HEERBRUGG, acoplada a sistema de microfotografía WILD MPS 51 S.
- Microscopio invertido Leitz (modelo Labovert).
- Nivelador de geles de secuenciación LKB-BROMMA (modelo 2010-100 Macromould).
- pH-metro MICROPH (modelo 2001 Crison).
- Pipeta automática KARTELL (modelo Pluripet-Fixopet, 2-20 µl, 20-200 µl, 200-1000 µl).
- Pipeta electrónica BIOHIT (modelo Proline electronic, 50-1000 µl).
- Rotor SORVALL (modelo SS-34).
- Sistema de purificación de agua MILLIPORE (modelo Milli-RO 15).
- Sistema de ultrapurificación de agua MILLIPORE (modelo Milli-Q plus).
- Sonicador
- Transiluminadores UV FOTODYNE INC. (modelo 3-3002) y UV SPECTROLINE (modelo TC-365^A, 365nm).
- Unidad de secuenciación PHARMACIA LKB (modelo Macrophor).

VI.B. Material biológico

VI.B.1. Cepas bacterianas

Las cepas de *E. coli* utilizadas durante el desarrollo de este trabajo son las que se describen a continuación:

VI.B.1.A.1. *XL1-Blue*

La cepa XL1-Blue de *E. coli* (Bullock *et al.*, 1987) (Stratagene) es básicamente una cepa de clonación. Es portadora del episoma F' que contiene una delección parcial del gen *lacZ* codificante para la β-galactosidasa (*lacZ*ΔM15). Cuando estas células devienen recombinantes pueden recuperar la actividad β-galactosidasa mediante α-complementación (ver 5.3.1.2.7.), y si además crecen en presencia de un sustrato cromogénico de dicha enzima, se las puede seleccionar y aislar. Esta cepa se ha utilizado como hospedadora habitual de todos los vectores plasmídicos utilizados en el desarrollo de este trabajo experimental. También se ha utilizado, sin embargo, como cepa de expresión de proteínas recombinantes codificadas en plásmidos construidos de la serie pMAL™-c2.

Genotipo {Fenotipo}: *recA1 endA1 gyrA46* {Nal^r} *thi hsdR17* {r_K⁻ m_K⁺} *supE44 relA1 lac*; F' [*proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ*ΔM15 Tn10 {Tet^r}]

VI.B.1.A.2. BL21 (DE3)

La cepa BL21(DE3) de *E. coli* (Studier & Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990) (Novagen) es básicamente una cepa de expresión. Esta cepa se ha utilizado para la expresión de proteínas recombinantes cuyas secuencias codificantes se hallan bajo el control del promotor del bacteriófago T7. La cepa BL21(DE3) es lisogénica para el bacteriófago λ DE3 que es portador del promotor *lacUV5* y de la fusión entre un fragmento inicial del gen *lacZ* y el gen de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (T7 RNA polimerasa). La derepresión del promotor *lacUV5* permite la transcripción del gen de la T7 RNA polimerasa y su posterior traducción. La T7 RNA polimerasa transcribe entonces la secuencia codificante de la proteína recombinante a partir del promotor del bacteriófago T7 en el plásmido de expresión.

La cepa BL21(DE3) carece del episoma F' y no permite la selección de colonias recombinantes mediante α -complementación del gen *lacZ*. Se trata, no obstante, de una cepa hospedadora muy adecuada para la expresión de proteínas sensibles a fenómenos de proteólisis pues es deficiente en la proteasa Lon (o La) (es una cepa de la clase B) y en la proteasa periplasmática *ompT*. Consecuentemente, esta cepa también se ha utilizado para valorar la actividad proteolítica asociada a la expresión de proteínas recombinantes.

Genotipo {Fenotipo}: *ompT [dcm] [lon] hsdS_B {r_B⁻ m_B⁻} gal λ DE3 (cl857^{ts} ind1 Sam7nin5 lacUV5-T7 gene1); F⁻*

VI.B.1.A.3. BL26

La cepa BL26 de *E. coli* (Studier & Moffatt, 1986) es un derivado de la cepa BL21 con fenotipo Lac⁻. Esta cepa es básicamente una cepa de expresión, no lisogénica para el bacteriófago λ DE3 y no portadora del episoma F'. Se ha utilizado para la expresión de proteínas recombinantes cuya secuencia codificante se halla bajo el control del promotor λ P_{RP_L termoinducible (reprimido a su vez por cl857^{ts}) en plásmidos construidos de la serie pJX.}

Genotipo {Fenotipo}: *ompT [dcm] [lon] hsdS_B {r_B⁻ m_B⁻} gal lac; F⁻*

VI.B.1.A.4. MC4100 λ HS1

La cepa MC4100 λ HS1 de *E. coli* (Yano *et al.*, 1987) deriva de la cepa MC4100. Esta cepa es lisogénica para un derivado del bacteriófago λ pF13 portador del gen *lacZ* bajo el control del promotor *rpoD_{hs}*. Esta cepa se ha utilizado como cepa de expresión para el seguimiento de la actividad heat-shock que conlleva la expresión de proteínas recombinantes. El gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa actúa como gen 'reporter' o marcador y permite cuantificar la actividad heat-shock que se transcribe a partir del promotor *rpoD_{hs}*.

Genotipo {Fenotipo}: *araD139 Δ (argF-lac)U169 rpsL150 {Str^r} relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR λ pF13-(PrpoD_{hs}-lacZ); F⁻*

VI.B.2. Líneas celulares eucariotas

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo experimental son las que se describen a continuación:

VI.B.2.A.1. Madin Darby Bovine Kidney (MDBK)

La línea celular MDBK (ATCC CCL-22) fue establecida en 1957 a partir de riñón de buey adulto. Se caracteriza por ser de crecimiento rápido y por su facilidad de cultivo. Esta línea celular se ha utilizado para el aislamiento y cultivo de los

virus BoHV-1 FM, BoHV-1 gE⁻ y BoHV-1 RAPPR⁻ –éste último producto de este trabajo experimental– y ha sido cedida por los Laboratorios Hipra S.A.

VI.B.2.A.2. Georgia Bovine Kidney (GBK)

La línea celular GBK también fue establecida a partir de riñón de buey adulto. Es una línea celular de fácil cultivo que se ha utilizado únicamente para los experimentos de transfección conjunta de DNA vírico y DNA plasmático mediante electroporación. Esta línea celular ha sido cedida por los Laboratorios Hipra S.A.

VI.B.2.A.3. NSI-D8

La línea celular de mieloma NSI-D8 ha sido utilizada únicamente para la obtención de anticuerpos monoclonales (VI.G.)

VI.B.3. Virus

Durante el desarrollo de este trabajo experimental se ha utilizado la cepa FM del herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1 FM) y la cepa vírica recombinante BoHV-1 gE⁻ (Rebordosa, 1996). Asimismo, se ha obtenido la nueva cepa viral recombinante BoHV-1 RAPPR⁻. La cepa BoHV-1 FM ha sido cedida por Laboratorios Hipra S.A. y corresponde a un aislado de campo a partir de un brote de IBR detectado en Ciudad Real (España) en 1988. La identificación del virus como BoHV-1 fue realizada por los mismos laboratorios mediante inmunofluorescencia.

VI.B.4. Vectores

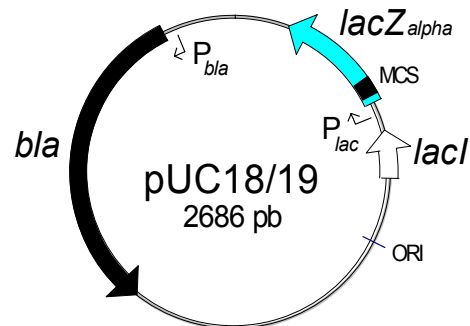
Los vectores utilizados en este trabajo experimental se pueden agrupar en vectores de clonación y vectores de expresión.

VI.B.4.A. Vectores de clonación

VI.B.4.A.1. pUC18/19 y pUCBM20/21

Los vectores de la serie pUC (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) poseen un replicón derivado del plásmido pMB1. Este replicón presenta la mutación puntual de un nucleótido muy cercano al origen de transcripción de la RNA polimerasa I, y no existe en consecuencia un control sobre el número de copias del plásmido en la célula. Se dice que los plásmidos de la serie pUC son de elevado número de copias, pudiéndose contabilizar 500-700 por célula. Estos plásmidos contienen el gen *bla* codificante para la β -lactamasa y que confiere resistencia a antibióticos β -lactámicos (Fig. 64). Las células de *E. coli* hospedadoras para vectores portadores del gen *bla* pueden por tanto crecer en presencia de este tipo de antibióticos (p.e. ampicilina). Los vectores pUC contienen la región reguladora (promotor y operador) del operón *lac* (P_{lac}) y la secuencia de DNA codificante para los primeros 146 aminoácidos de la β -galactosidasa (*lacZ α*). La expresión de este fragmento puede complementar la actividad β -galactosidasa en cepas con genotipo *lacZ Δ M15* (XL1-Blue) o *lacZ58* y que expresan una β -galactosidasa deficiente en esos primeros 146 aminoácidos (se habla entonces de α -complementación). Todos los vectores de la serie pUC son compatibles con los cebadores de secuenciación pUC/M13 universal ('forward') y reverso ('reverse').

Los plásmidos pUC18/19 son plásmidos pequeños, de 2686 pb, portadores de una secuencia de inserción múltiple (MCS) o 'polylinker' de 54 pb situada entre el promotor P_{lac} y el gen $lacZ\alpha$. La diferencia entre los plásmidos pUC18 y pUC19 radica en la orientación de la MCS.



pUC18

```

M T M I T N S S S V P G D P L E S T C R H A S L A L A ...
5' .ATGACCATGATTACGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCC.3' .lacZα
... TACTGGTACTAATGCTTAAAGCTCGAGCCATGGGCCCTAGGAGATCTCAGCTGGAGCTCCGTACGTTCTCGAACCCTGACCCG...
EcoRI  Acc65I  BamHI  Sall  SphI
Sacl  SmaI  XbaI  PstI  HindIII

```

pUC19

```

M T M I T P S L H A C R S T L E D P R V P S S N S L A ...
5' .ATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCACCTGGCC.3' .lacZα
... TACTGGTACTAATGCGGTTTCGAAACGTACGGACGTCAGCTGAGATCTCCTAGGGGCCATGGCTCGAGCTTAAGTGACCCG...
HindIII  PstI  XbaI  SmaI  Sacl
SphI  Sall  BamHI  Acc65I  EcoRI

```

Figura 64. Diagrama de los plásmidos pUC18 y pUC19, y descripción de su MCS. Bajo la secuencia de DNA se señala las dianas de restricción que componen cada MCS. Sobre la secuencia de DNA se señala la secuencia de aminoácidos que codifica cada MCS. ORF: *bla* (β -lactamasa), *lacZ α* (subunidad β -galactosidasa de α -complementación), *lacI* (represor); ori (origen replicación); MCS ('polylinker'); P_{bla} , P_{lac} (promotores).

Los plásmidos pUCBM20/21 (Boehringer Mannheim) son idénticos a los plásmidos pUC18/19 pero con 2722 pb y 2725 pb, respectivamente, debido a que presentan una MCS con mayor número de dianas de restricción (Fig. 65). De nuevo, la diferencia entre el pUCBM20 y pUCBM21 radica en la orientación de la MCS.

pUCBM20

```

M T M I T N S R G S T R L K A A A V P G P S T L E L C R H A I S H G S L A L A ...
5' .ATGACCATGATTACGAATTCCTGGGATCCAGCGTCTTAAGCGCCGCGGTACCGGGCCCGTCTAGAGCTCTGCAGGCATGCGATATCCCATGGAAGCTTGGCACTGGCC.3' .lacZα
... TACTGGTACTAATGCTTAAAGGCCCCTAGTGCAGCAATTCGCGCCGCGCCATGGCCCGGGCAGCTGAGATCTCGAGACGTCGGTACGCTATAGGCTACCTCGAACCCTGACCCG...
EcoRI  BamHI  BfrI  NotI  Acc65I  Sall  Sacl  SphI  NcoI
SmaI  MluI  XbaI  PstI  EcoRV  HindIII

```

pUCBM21

```

M T M I T P S F H G I S H A C R A L E S T G P V P R P H L S Y A W I P G N S L A ...
5' .ATGACCATGATTACGCCAAGCTTCCATGGGATATCGCATGCCTGCAGAGCTCTAGAGTCGACGGGCCCGGTACCGCGGCCGCACTTAAGTTACGCGTGGATCCCCGGGAATTCACCTGGCC.3' .lacZα
... TACTGGTACTAATGCGGTTTCGAAAGGTACCGTACGGACGTCGAGATCTCAGCTGCCCGGCCATGGCGCCGCGTGAATCAATGCGCACTTAGGGGCCCTTAAGTGACCCG...
HindIII  EcoRV  PstI  XbaI  ApaI  NotI  BfrI  MluI  SmaI
NcoI  SphI  Sacl  Sall  Acc65I  BamHI  EcoRI

```

Figura 65. Descripción de la MCS de los plásmidos pUCBM20 y pUCBM21. Bajo la secuencia de DNA se señala las dianas de restricción que componen cada MCS. Sobre la secuencia de DNA se señala la secuencia de aminoácidos que codifica cada MCS.

VI.B.4.A.2. pUC118/119

Los vectores pUC118/119 son plásmidos fagémidos, es decir, incorporan las secuencias necesarias para el inicio y terminación de la síntesis de DNA del bacteriófago filamentosos M13, así como para el empaquetamiento de este DNA en

las partículas víricas. Estos plásmidos permiten pues la obtención directa de DNA plasmídico monohebra mediante la infección de un bacteriófago M13 auxiliar. Salvo por la presencia de esta secuencia propia del bacteriófago M13, los plásmidos pUC118 y pUC119 son idénticos a los plásmidos pUC18 y pUC19, respectivamente (Fig. 66).

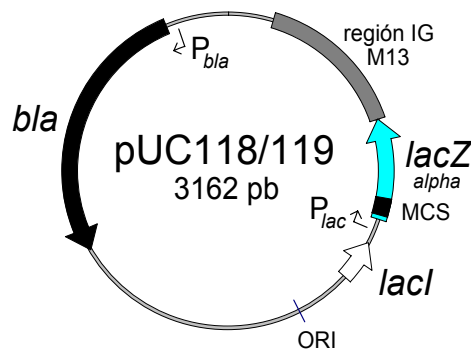
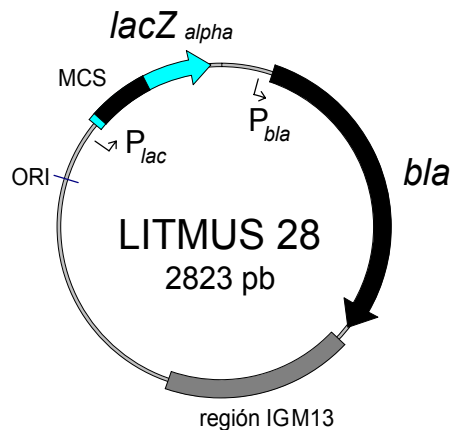


Figura 66. Diagrama de los plásmidos pUC118 y pUC119. ORF: *bla* (β-lactamasa), *lacZ*_{alpha} (subunidad β-galactosidasa de α-complementación), *lacI* (represor); ori (origen replicación); región IG M13 (origen replicación bacteriófago M13); MCS ('polylinker'); P_{bla}, P_{lac} (promotores).

VI.B.4.A.3. LITMUS 28

LITMUS 28 es un plásmido fagémido de 2823 pb que tiene un origen de replicación del bacteriófago M13 (Fig. 67). Es también un plásmido de elevado número de copias pues tiene el origen de replicación de los plásmidos de la serie pUC. LITMUS 28 contiene el gen *bla* que codifica para la β-lactamasa y el gen *lacZ*_α que permite seleccionar clones transformantes por α-complementación. Presenta una secuencia promotora del bacteriófago T7 a ambos extremos de la MCS que permite la transcripción a RNA del fragmento de DNA insertado. LITMUS 28 es compatible con los cebadores de secuenciación pUC/M13 universal ('forward') y reverso ('reverse').



M T M I T P S Y V I R L T S G Q I F E C I A R T V R L E E F L Q D I
 5' .ATGACCATGATTACGCCAAGCTACGTAATACGACTCACTAGTGGGCAGATCTTCGAATGCATCGCGGCACCGTACGTCTCGAGGAATTCCTGCAGGATATC
 ... TACTGGTACTAATGCGGTTTCGATGCATTATGCTGAGTGCATCCCGTCTAGAAGCTTACGTAGCGCGCGTGGCATGCAGAGCTCCTTAAGGACGCTCCTATAG
 SnabI Spel BglII NsiI BssHII BsiWI XhoI PstI EcoRI EcoRV
 W I H E A S H G D V T G S R Y L G E L W Y P L V K A L S E S Y Y G L ...
 TGGATCCACGAAGCTTCCCATGGTGACGTCACCGGTTCTAGATACCTAGGTGAGCTCTGGTACCCTCTAGTCAAGGCCTTAAGTGAGTCGTATTACGGACTG. 3' .lacZα
 ACCTAGGTGCTTCGAAGGGTACCAGTGCAGTGGCCCAAGATCTATGGATCCACTCGAGACCATGGGAGATCAGTCCCGGAATTCACCTCAGCATAATGCCTGAC...
 BamHI HindIII NcoI AatII AgeI XbaI AvrII SacI Acc65I StuI BfiI

Figura 67. Diagrama del plásmido LITMUS 28, y descripción de su MCS. Bajo la secuencia de DNA se señala las dianas de restricción que componen la MCS. Sobre la secuencia de DNA se señala la secuencia de aminoácidos que codifica la MCS. ORF: *bla* (β-lactamasa), *lacZ*_{alpha} (subunidad β-galactosidasa de α-complementación); ori (origen replicación); región IG M13 (origen replicación bacteriófago M13); MCS ('polylinker'); P_{bla}, P_{lac} (promotores).

VI.B.4.B. Vectores de expresión

VI.B.4.B.1. pMAL™-p2/c2

Los plásmidos pMAL™-p2 y pMAL™-c2 (New England Biolabs) son vectores de expresión de *E. coli* de 6721 pb y 6646 pb, respectivamente (Fig. 68). Son vectores de bajo número de copias (15-20 copias/célula), con el origen de replicación del plásmido pBR322 y el gen *rop* implicado en el control del número de copias. Ambos vectores contienen el gen *bla* codificante para la β -lactamasa y están diseñados para la expresión de proteínas fusionadas al extremo Ct de la MBP de *E. coli* (di Guan *et al.*, 1988; Maina *et al.*, 1988). La proteína de fusión expresada puede ser purificada en un solo paso gracias a la afinidad que la MBP tiene por la resina de amilosa entrecruzada (Kellermann & Ferenci, 1982)

El plásmido pMAL™-p2 mantiene el péptido señal del gen *malE* para el transporte de la proteína de fusión al espacio periplasmático. Por el contrario, la expresión de la proteína de fusión a partir del plásmido pMAL™-c2 es citoplasmática. La inserción de la secuencia de DNA a expresar se da en la MCS situada entre los genes *malE* y *lacZ α* de manera que se pueden seleccionar los clones transformantes portadores del inserto por α -complementación. Ambos vectores utilizan el promotor de expresión fuerte *tac* (P_{tac}) y las señales de inicio de traducción del gen *malE* para expresar las secuencias insertadas (Amann & Brosius, 1985; Duplay *et al.*, 1984). El P_{tac} es un promotor híbrido que toma la caja '-10' del promotor *lacUV5* y la caja '-35' del promotor *trp*, resultando así 5-10 veces más eficiente que el promotor *lacUV5* (Amann *et al.*, 1983). El P_{tac} contiene además la región del operador *lac* por lo que la expresión a partir de este promotor puede ser inhibida por el represor codificado en el gen *lacI^q*. Este gen es una variante del gen *lacI* que asegura la sobreexpresión del represor en las células transformantes. Entre los genes *malE* y *lacZ α* también se halla la secuencia que codifica para los aminoácidos IEGR que constituyen la diana de la proteasa específica Factor Xa que permite separar la MBP de la proteína de fusión. Este plásmido presenta además una señal de parada de traducción (STOP) al final del gen *lacZ α* . Por ello, y salvo que el fragmento de DNA insertado incorpore una señal STOP propia, la proteína de fusión expresada contiene siempre parte de la secuencia Nt de la β -galactosidasa.

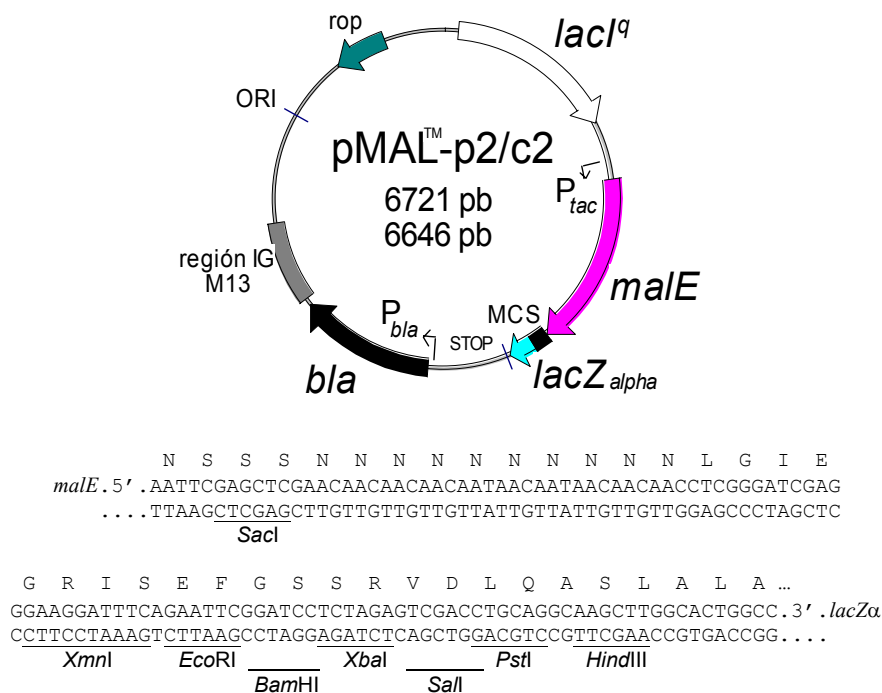


Figura 68. Diagrama de los plásmidos pMAL™-p2 y pMAL™-c2, y descripción de su MCS. Bajo la secuencia de DNA se señala las dianas de restricción que componen la MCS. Sobre la secuencia de DNA se señala la secuencia de aminoácidos que codifica la MCS. ORF: *bla* (β -lactamasa), *lacZ α* (subunidad β -galactosidasa de α -complementación), *malE* (MBP), *lacI^q* (represor); ori (origen replicación); región IG M13 (origen replicación bacteriófago M13); MCS ('polylinker'); P_{bla} , P_{tac} (promotores).

VI.B.4.B.2. pET-21a(+)

Los vectores de la serie pET (Novagene, AMS Biotechnology) fueron desarrollados inicialmente en el grupo de investigación de F. W. Studier (Studier & Moffatt, 1986; Rosenberg *et al.*, 1987; Studier *et al.*, 1990). El sistema pET constituye una estrategia muy poderosa de clonación y expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*. En este sistema la expresión del polipéptido de interés se realiza bajo el control del promotor del bacteriófago T7 y tras proveer a la célula hospedadora de una fuente de RNA polimerasa de T7.

El plásmido pET-21a(+) (5443 pb) es un vector de expresión citoplasmática, de reducido número de copias y portador del gen *bla* codificante para la β -lactamasa (Fig. 69). También es portador del origen de replicación del bacteriófago f1 para la producción de DNA monohebra. Este vector es un ejemplo de vector de traducción pues las secuencias de DNA que se desean expresar no precisan ni de la secuencia de unión de ribosoma ni del codón de inicio de traducción propios. La secuencia promotora de expresión es un promotor híbrido T7/*lac* que consta del promotor T7 y el operador *lac*. El plásmido pET-21a(+) contiene además una copia del gen *lacI* que codifica para el represor Lac. La expresión en pET-21a(+) se ha llevado a cabo en la cepa BL21(DE3) de *E. coli* que contiene una copia del gen de la RNA polimerasa de T7 bajo el control del promotor *lacUV5*. En esta cepa el represor Lac de pET-21a(+) inhibe, por un lado la transcripción de la RNA polimerasa de T7 desde el promotor *lacUV5* y, por otro, la transcripción a partir del promotor T7/*lac* de la secuencia de DNA insertada. La adición del inductor de expresión IPTG “desreprime” ambos promotores *lacUV5* y T7/*lac*, e induce la expresión de la RNA polimerasa de T7 a partir de *lacUV5*. Ésta transcribe entonces la secuencia de DNA insertada a partir del promotor T7/*lac*. Este doble control sobre la expresión de proteínas permite mantener estables en *E. coli* incluso las secuencias más tóxicas.

pET-21a(+) presenta asimismo las secuencias T7•Tag[®] y His•Tag[®] para la inmunodetección y purificación, respectivamente, del polipéptido expresado. La secuencia T7•Tag[®] se traduce fusionada al extremo Nt del polipéptido de interés y se puede detectar mediante un anticuerpo anti-T7•Tag[®]. La secuencia His•Tag[®] se traduce en forma de 6 aminoácidos histidina fusionados al extremo Ct del polipéptido de interés. Esta secuencia de histidinas permite la purificación del polipéptido expresado mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC, ‘Immobilized Metal Affinity Chromatography’). El vector pET-21a(+) incorpora también una señal STOP de finalización de traducción corriente abajo de la secuencia His•Tag[®].

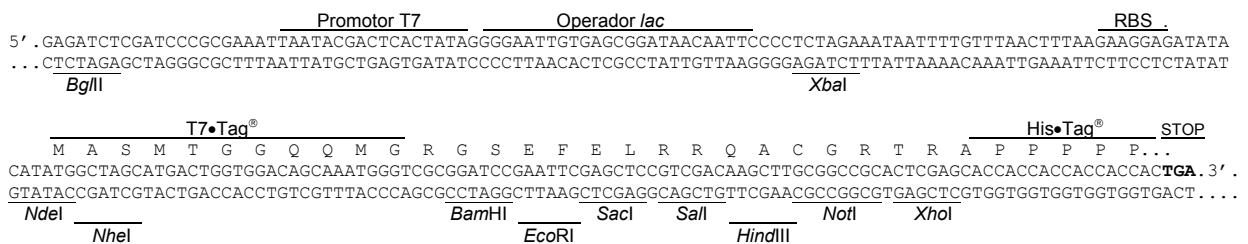
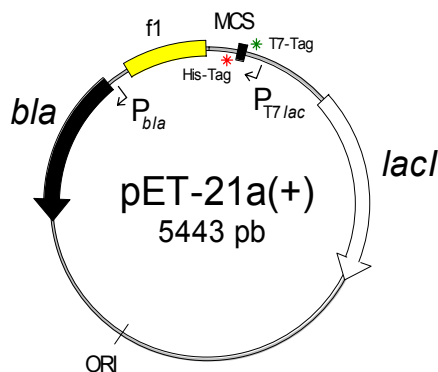


Figura 69. Diagrama del plásmido pET-21a(+), y descripción de su MCS. Bajo la secuencia de DNA se señala las dianas de restricción que componen la MCS. Sobre la secuencia de DNA se señala la secuencia de aminoácidos que codifica la MCS. ORF: *bla* (β -lactamasa), *lacI* (represor); ori (origen replicación); f1 (origen replicación bacteriófago f1); MCS ('polylinker'); P_{bla} , $P_{T7/lac}$ (promotores); RBS (secuencia de unión de ribosoma); T7•Tag[®] (secuencia de inmunodetección específica); His•Tag[®] (secuencia de inmunodetección y purificación específicas).

VI.B.4.B.3. pET-22b(+)

El plásmido pET-22b(+) es un vector de expresión periplasmática de 5493 pb. Este vector comparte idénticas características con el plásmido pET-21a(+), pero además incorpora la secuencia que codifica para el péptido señal del gen de la enzima pectato liasa (*peIB*) de *Erwinia carotovora* en sustitución de la secuencia T7•Tag® (Fig. 70). El péptido señal *peIB* se traduce fusionado al extremo Nt del polipéptido de interés y lo dirige al espacio periplasmático. En este trabajo, no obstante, el plásmido pET-22b(+) se ha utilizado sólo de manera puntual por las posibilidades que ofrece su MCS para construir un segundo plásmido de interés.

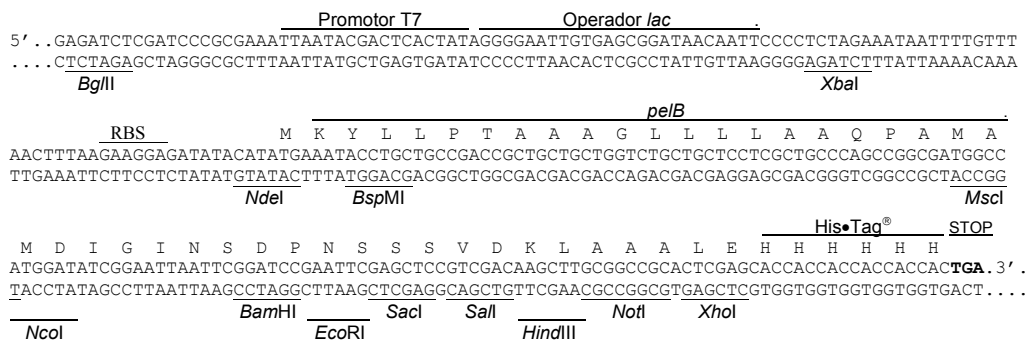


Figura 70. Descripción de la MCS del plásmido pET-22b(+). Bajo la secuencia de DNA se señala las dianas de restricción que componen la MCS. Sobre la secuencia de DNA se señala la secuencia de aminoácidos que codifica la MCS. RBS (secuencia de unión de ribosoma); *peIB* (secuencia péptido señal); His•Tag® (secuencia de inmunodetección y purificación específicas).

VI.B.4.B.4. pcDNA3

El plásmido pcDNA3 (Invitrogen) es un vector de expresión de 5446 pb (Fig. 71). Este vector utiliza el promotor fuerte de citomegalovirus (CMV) para la expresión constitutiva y abundante de proteínas en líneas celulares de mamífero. Es portador de los genes que confieren resistencia a los antibióticos ampicilina y neomicina. Como en el caso de pET-22b(+), el vector pcDNA3 sólo se ha utilizado de forma puntual para la construcción de un plásmido de interés aprovechando las posibilidades que ofrece su MCS.

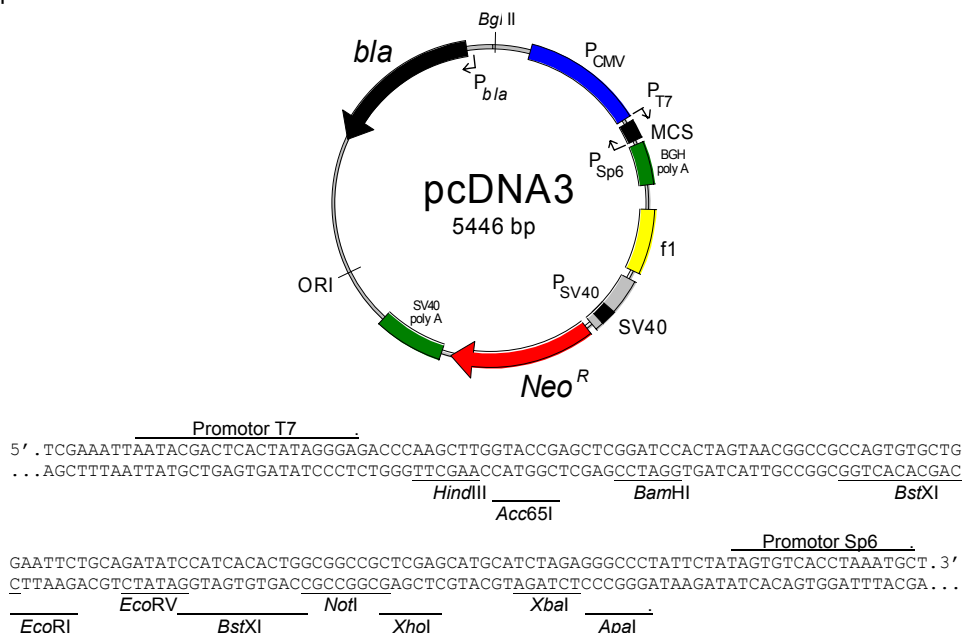


Figura 71. Diagrama del plásmido pcDNA3, y descripción de su MCS. Bajo la secuencia de DNA se señala las dianas de restricción que componen la MCS. ORF: *bla* (β -lactamasa) *Neo^R* (resistencia a neomicina); ori (origen replicación); f1 (origen replicación bacteriófago f1); SV40 (origen replicación SV40); MCS ('polylinker'); *P_{bla}*, *P_{T7}*, *P_{Sp6}*, *P_{CMV}*, *P_{SV40}* (promotores).

VI.C. Métodos de cultivo

VI.C.1. Cultivo de cepas bacterianas y clones transformantes

VI.C.1.A. Medios de cultivo

Los medios de cultivo de las cepas bacterianas y los clones transformantes utilizados en este trabajo experimental son los que se describen a continuación:

VI.C.1.A.1. *LB Miller (caldo o agar)*

El medio LB Miller (Sambrook *et al.*, 1989a; Sancho Valls *et al.*, 1996) corresponde a la formulación básica de Luria-Bertani (LB) posteriormente modificada por Miller quien aumentó la concentración de cloruro sódico. Este medio se ha utilizado para el mantenimiento y cultivo de las diferentes cepas bacterianas utilizadas y los clones transformantes obtenidos. Este medio puede ser líquido (caldo) o sólido (agar).

Método de elaboración: 1L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Bacto-triptona (ADSA-micro)	10 g
Extracto de levadura (ADSA-micro)	5 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	10 g
Agar para bacteriología (ADSA-micro) (sólo si va a ser medio sólido) ..	15 g

Añadir 0.9 L de agua Milli-Q y disolver.

Enrasar a 1 L con agua Milli-Q.

Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.

Si procede, preparar placas de cultivo sólido con 12-15 ml de medio cada una.

Conservar a T° amb (medio líquido) o a 4°C (medio sólido).

NOTA: En algunas referencias se indica que se debe ajustar a pH 7.0 con NaOH 5M. En este trabajo, sin embargo, no ha sido necesario.

VI.C.1.A.2. *2xYT (caldo)*

El medio 2xYT (Sambrook *et al.*, 1989a) es un medio de cultivo más rico que el LB Miller, y se ha utilizado para el crecimiento de clones transformantes en cultivo líquido con requerimiento de una densidad celular elevada.

Método de elaboración: 1L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Bacto-triptona (ADSA-micro)	16 g
Extracto de levadura (ADSA-micro)	10 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	5 g

Añadir 0.9 L de agua Milli-Q y disolver.

Enrasar a 1 L con agua Milli-Q.

Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.

Conservar a T° amb.

NOTA: En algunas referencias se indica que se debe ajustar a pH 7.0 con NaOH 5M. En este trabajo, sin embargo, no ha sido necesario.

VI.C.1.A.3. TYG (caldo)

El medio TYG (pMAL™-2 System Manual, New England Biolabs, 1992) es un medio de cultivo rico utilizado específicamente para el cultivo de expresión de clones transformantes para vectores de la serie pMAL™-c2.

Método de elaboración: 1L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Bacto-triptona (ADSA-micro)	10 g
Extracto de levadura (ADSA-micro)	5 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	5 g
D-glucosa monohidratada (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O) (Merck).....	2 g

Añadir 0.9 L de agua Milli-Q y disolver.

Enrasar a 1 L con agua Milli-Q.

Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.

Conservar a T^a amb.

NOTA: En algunas referencias se indica que se debe ajustar a pH 7.0 con NaOH 5M. En este trabajo, sin embargo, no ha sido necesario.

Según fuera el caso, estos medios de cultivo han sido suplementados además con antibiótico, inductor de expresión (IPTG) o substrato cromogénico (X-Gal).

VI.C.1.B. Condiciones de cultivo. Mantenimiento y antibióticos

VI.C.1.B.1. *Cultivo en medio sólido*

El cultivo en medio sólido se ha realizado sobre medio de cultivo LB Miller agar. Este tipo de cultivo se ha llevado a cabo para seleccionar y aislar clones transformantes así como para valorar de forma cualitativa la toxicidad de diferentes productos de expresión. Según la finalidad del cultivo, los aprox. 15 ml de medio LB Miller agar han sido suplementados con antibiótico, IPTG o X-Gal. El cultivo se ha llevado a cabo en placas de 90 mm de diámetro. La siembra ha sido por vertido o por agotamiento de estría, y la incubación ha sido siempre con la placa invertida.

VI.C.1.B.2. *Cultivo en medio líquido*

El cultivo en medio líquido se ha llevado a cabo en diferentes tipos y volúmenes de medio de cultivo según cual fuera su finalidad (Tabla XXVIII). El cultivo en medio líquido se ha desarrollado a una relación volumétrica mínima 4:1 de recipiente y medio de cultivo. Los cultivos se han mantenido en agitación a 300-320 rpm durante el tiempo de incubación del mismo.

TABLA XXVIII. Medio de cultivo y volumen de los cultivos líquidos realizados

Finalidad del cultivo líquido	Medio cultivo (caldo)	Volumen de cultivo
Extracción de DNA plasmídico		
escala miniprep	2xYT	2.5 ml
escala mediprep	2xYT	12.5 - 50 ml
Inóculo de cultivo		
elaboración de células competentes	LB Miller	2.5 ml
expresión de proteína recombinante	LB Miller	2.5 ml
Elaboración de células competentes	LB Miller	80 ml
Expresión de proteína recombinante	LB Miller / TYG	80 ml

El medio de cultivo líquido utilizado para la extracción de DNA plasmídico, la expresión de proteína recombinante o para inóculo siempre ha sido suplementado con antibiótico. Por el contrario, el medio LB Miller utilizado para la elaboración de células competentes o la reconstitución de células recién transformadas no ha sido suplementado con antibiótico. El medio líquido de los cultivos de expresión a partir de promotores P_{tac} o $P_{T7/tac}$ ha sido suplementado además con IPTG una vez alcanzada la densidad celular deseada.

El crecimiento de un cultivo se ha hallado a partir de su densidad celular. Si bien la atenuancia (D) es el término generalmente aceptado para representar la densidad celular de un cultivo, consideramos que la medición realizada sobre diluciones 1:10 en medio de cultivo fresco reduce considerablemente la dispersión o reflexión de la luz pudiéndose así utilizar el término absorbancia (A). La densidad celular de los cultivos se ha representado pues como la A a una longitud de onda λ de 550 nm, y se representa como A_{550} .

VI.C.1.B.3. Tiempo de incubación

El tiempo de incubación o de crecimiento de un cultivo obedece en parte al genotipo *rec* (de recombinación) de las cepas bacterianas utilizadas. La relación entre la densidad óptica de un cultivo y el número de células viables por ml de cultivo varía en función de si una cepa es *rec*⁺ o *rec*⁻. Para las cepas *rec*⁺ BL21(DE3), BL26 o MC4100 λ .HS1 una A_{550} de 0.2 supone, aprox., 5×10^7 células/ml, mientras que para la cepa *rec*⁻ XL1-Blue (portadora de la mutación *recA1* por la que se previene la recombinación entre el DNA de la célula huésped y el DNA introducido asegurando así la estabilidad de los insertos) una A_{550} de 0.5 supone, aprox., 5×10^7 células/ml. Para obtener pues el mismo número de células viables XL1-Blue que BL21(DE3), BL26 o MC4100 λ .HS1 se ha requerido siempre un tiempo de incubación superior en el cultivo de las primeras (Tabla XXIX).

El tiempo de incubación de un cultivo también se ha revelado crítico en los casos concretos de clones transformantes que expresan secuencias que resultan tóxicas para la propia célula hospedadora. Con el fin de evitar la preselección de las células y clones más favorecidos, se optado siempre por un tiempo de incubación corto. Los cultivos en medio sólido se han incubado el tiempo justo y necesario para poder reconocer y seleccionar una colonia. Los cultivos en medio líquido con los tiempos de incubación más cortos han sido los cultivos inóculo, los cultivos destinados a la elaboración de células competentes y los cultivos de expresión.

TABLA XXIX. Tiempo de incubación de los cultivos sólidos y líquidos realizados

Tipo de cultivo	<i>rec</i> ⁺ (BL21(DE3), BL26, MC4100 λ .HS1)	<i>rec</i> ⁻ (XL1-Blue)
Medio sólido		
LB Miller	10-12 h	14-16 h
LB Miller Amp	10-12 h	14-16 h
LB Miller Amp IPTG X-Gal	10-12 h	14-16 h
LB Miller IPTG	—	14-48 h
Medio líquido		
Extracción de DNA plasmídico		
escala miniprep	12-14 h	12-14 h
escala mediprep	12-14 h	12-14 h
Inóculo para		
elaboración de células competentes	6- 8 h	8-10 h
expresión de proteína recombinante	6- 8 h	8-10 h
Elaboración de células competentes	2 h	3 h
Expresión de proteína recombinante	2 h (tiempo pre-inducción) ≤ 7 h (tiempo de inducción)	3 h (tiempo pre-inducción) ≤ 7 h (tiempo de inducción)

VI.C.1.B.4. Temperatura de incubación

La temperatura de incubación o de crecimiento del cultivo de células XL1-Blue o BL21(DE3) ha sido generalmente de 37°C tanto sobre medio sólido como en medio líquido. No obstante, cuando estas células han sido hospedadoras de plásmidos de expresión pJX que contienen el promotor termoinducible λ P_RP_L cI857^{ts}, la temperatura de incubación ha sido 30°C durante la fase de crecimiento y 37-42°C durante la fase de inducción de expresión. Las células BL26 hospedadoras de plásmidos de expresión pJX han sido incubadas a 30°C durante la fase de crecimiento del cultivo y a 42°C durante la inducción de expresión. Los cultivos de células MC4100 λ HS1, utilizadas para valorar la respuesta heat-shock inducida por la expresión de proteína recombinante, han sido incubados a 30°C para evitar la activación de dicha respuesta durante el crecimiento del cultivo, y a 37-42°C para inducir la expresión y/o la respuesta heat-shock.

VI.C.1.B.5. Conservación

La conservación de los diferentes clones transformantes se ha revelado especialmente crítica debido a la manipulación de secuencias potencialmente tóxicas para la célula hospedadora. Siempre se ha procurado manipular cultivos sólidos y líquidos frescos y crecidos a una A_{550} baja para evitar en lo posible la preselección de los clones transformantes más favorecidos.

La conservación de las cepas bacterianas y de los clones transformantes obtenidos se ha llevado a cabo de manera diferente según fuera el plazo de mantenimiento. El mantenimiento a corto plazo (1-4 semanas) se ha realizado como cultivo de agotamiento por estría sobre medio LB Miller agar suplementado con antibiótico. Una vez crecido, la placa de cultivo se ha conservado sellada e invertida a 4°C. Para la conservación a largo plazo (ilimitado) primero se ha hecho un cultivo líquido en medio preferiblemente LB Miller suplementado con antibiótico y crecido a una $A_{550} \leq 2$. A continuación se ha recogido la fracción celular por centrifugación y se ha resuspendido en medio de cultivo fresco con antibiótico. Finalmente se ha añadido glicerol estéril a una concentración final 10-12%, se ha homogeneizado la suspensión y se ha conservado a -80°C. Para recuperar una cepa o clon transformante congelado a -80°C se ha tomado 2-3 μ l de un vial parcialmente descongelado en hielo picado y se ha inoculado en 2.5 ml de medio LB Miller suplementado con antibiótico. A partir de este cultivo líquido se ha sembrado un cultivo de agotamiento por estría sobre medio LB Miller agar suplementado con antibiótico.

VI.C.1.B.6. Antibióticos

Los antibióticos utilizados para el cultivo y mantenimiento de las diferentes cepas bacterianas y clones transformantes obtenidos son los que se describen a continuación:

VI.C.1.B.6.a. Ampicilina

La ampicilina (Amp) es un antibiótico derivado de la penicilina con actividad bactericida que actúa sobre la síntesis de la pared celular de las células en crecimiento. Este antibiótico se ha utilizado para el aislamiento, crecimiento y mantenimiento de todos los clones transformantes de cepas XL1-Blue, BL21(DE3), BL26 o MC4100 λ HS1. Todos los vectores utilizados en este trabajo son portadores del gen de resistencia *bla* que codifica para la enzima periplasmática β -lactamasa que rompe el anillo β -lactamo del citado antibiótico.

Método de elaboración: Amp 50 mg/ml; 2 ml

Pesar y poner en un vial 100 mg de ampicilina (Boehringer Mannheim, Promega).
Añadir 2 ml de agua Milli-Q y disolver.
Esterilizar por filtración con filtro de acetato de celulosa 0.22 μ m (Millipore, Corning).
Preparar alícuotas y conservar a -20°C.

Aplicación:

50 µg/ml en cultivo sólido y líquido de todos los clones transformantes excepto los que lo son para vectores de la serie pMAL™-c2.
100 µg/ml en cultivo sólido y líquido de los clones transformantes para vectores de la serie pMAL™-c2.

VI.C.1.B.6.b. Tetraciclina

La tetraciclina (Tet) es un antibiótico bacteriostático que une la subunidad ribosomal 30S e impide la síntesis proteica bacteriana. Este antibiótico se ha utilizado únicamente en la siembra en estría y en el inóculo del cultivo de células de la cepa XL1-Blue para la obtención de células competentes. El transposón Tn10 integrado en el DNA celular es portador del gen de resistencia *tet* que codifica para una proteína TetA. Esta proteína se inserta en la membrana citoplasmática y, mediante el transporte activo de la tetraciclina al espacio periplasmático, mantiene mínima la concentración intracelular del antibiótico (Eckert & Beck, 1989; Yamaguchi *et al.*, 1990).

Método de elaboración: Tet 12.5 mg/ml; 5 ml

Pesar y poner en un vial 62.5 mg de tetraciclina (Promega).
Añadir 5 ml de etanol absoluto (Carlo Erba) y disolver.
Preparar alícuotas y conservar a -20°C.

Aplicación:

12.5 µg/ml en cultivo sólido y líquido. En los cultivos en medio sólido se suplementa por vertido sobre la placa de medio.

VI.C.1.B.6.c. Estreptomicina

La estreptomicina (Str) es un antibiótico aminoglucósido con actividad bactericida que une la subunidad ribosomal 30S e induce la traducción incorrecta del RNA mensajero (mRNA). Este antibiótico se ha utilizado únicamente en la siembra en estría y en el inóculo del cultivo de células MC4100λHS1 destinado a la obtención de células competentes. Esta cepa es portadora de la mutación *rpsL150* que afecta a la subunidad S12 del ribosoma 30S y ello confiere resistencia frente al antibiótico.

Método de elaboración: Str 50 mg/ml; 2 ml

Pesar y poner en un vial 100 mg de estreptomicina (Promega).
Añadir 2 ml de agua Milli-Q y disolver.
Esterilizar por filtración con filtro de acetato de celulosa 0.22 µm (Millipore, Corning).
Preparar alícuotas y conservar a -20°C.

Aplicación:

20-30 µg/ml en cultivo sólido y líquido. En los cultivos en medio sólido se suplementa por vertido sobre la placa de medio.

VI.C.1.B.7. Inductor de expresión y sustrato cromogénico

Todos los vectores de clonación utilizados contienen, en este orden, un promotor, una MCS y un gen *lacZα* codificante para los primeros 146 aminoácidos de la enzima β-galactosidasa. Cuando una cepa bacteriana que contiene la delección *lacZΔM15* (o *lacZ58*) y que abarca los primeros 146 aminoácidos del gen *lacZ*, es a su vez transformante para un vector con un promotor P_{lac} o P_{tac} y se cultiva en presencia de un inductor de expresión, entonces los productos de *lacZα* y *lacZΔM15* se complementan (α-complementación). El resultado es una β-galactosidasa enzimáticamente activa que puede hidrolizar un sustrato cromogénico confiriendo así una coloración determinada al clon transformante en particular. En caso de que en este clon transformante se trunque la expresión del producto de *lacZα* debido a la inserción

de una secuencia de DNA en la MCS del vector, entonces se anula la α -complementariedad y la colonia crece incolora (blanquecina) en presencia del inductor de expresión y del sustrato cromogénico. Este es el principio mediante el cual se ha seleccionado los clones transformantes para vectores con inserciones de DNA.

El inductor de expresión y el sustrato cromogénico de la enzima β -galactosidasa utilizados para la selección de clones transformantes y la expresión de proteína recombinante han sido, respectivamente, el isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) y el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal).

VI.C.1.B.7.a. IPTG

El IPTG es un inductor no degradable de los promotores P_{lac} y P_{tac} a los que se une irreversiblemente. Esta unión no permite la represión del promotor por parte del represor codificado en el gen *lacI* (o *lacI^q*) y estimula así la transcripción del DNA que se encuentra corriente abajo ('downstream').

Método de elaboración: IPTG 200 mg/ml (0.84 M); 1 ml

Pesar y poner en un vial 200 mg de IPTG (Boehringer Mannheim).
Añadir 0.8 ml de agua Milli-Q y disolver.
Enrasar a 1 ml con agua Milli-Q.
Esterilizar por filtración con filtro de acetato de celulosa 0.22 μ m (Millipore, Corning).
Preparar alícuotas y conservar a -20°C .

Aplicación:

71 μ g/ml (0.3mM) en cultivo sólido y líquido. De manera excepcional, en este trabajo también se ha utilizado a 238-476 μ g/ml (1-2mM) en cultivo líquido.

VI.C.1.B.7.b. X-Gal

El X-Gal es un sustrato cromogénico de la enzima β -galactosidasa. Ésta está formada por 4 monómeros iguales de 1023 aminoácidos cada uno y codificados en el gen *lacZ*. El polipéptido formado por los primeros 146 aminoácidos de un monómero se puede asociar al polipéptido formado por los 877 aminoácidos restantes y dar lugar a una molécula enzimáticamente activa. Este fenómeno se denomina α -complementación.

Método de elaboración: X-Gal 20 mg/ml; 5 ml

Pesar y poner en un vial de polipropileno 100 mg de X-Gal (Boehringer Mannheim).
Añadir 5 ml de N,N-dimetil formamida (Fluka) y disolver.
Preparar alícuotas y conservar a -20°C protegido de la luz.

Aplicación:

45-80 μ g/ml de cultivo. En este trabajo únicamente se ha utilizado en cultivos sobre medio sólido.

El medio de cultivo sólido suplementado con IPTG y X-Gal se ha preparado añadiendo éstos al medio esterilizado y atemperado ($<50^{\circ}\text{C}$) antes de repartirlo en placas. Este medio se ha utilizado para el cribado de colonias XL1-Blue transformantes así como para valorar cualitativamente la toxicidad del producto de expresión. El medio de cultivo sólido suplementado únicamente con IPTG se ha utilizado para valorar cualitativamente la toxicidad del producto de expresión en células hospedadoras XL1-Blue. NUNCA se ha utilizado cultivos crecidos en medio sólido suplementado con IPTG o IPTG/X-Gal para el aislamiento de colonias transformantes. Este aislamiento se ha hecho SIEMPRE a partir de placas de cultivo réplica de las anteriores pero suplementadas únicamente con antibiótico.

El IPTG también se ha añadido al cultivo en medio líquido de células XL1-Blue, BL21(DE3) o MC4100λHS1 para inducir la expresión de proteínas recombinantes a partir de promotores P_{tac} (en plásmidos de la serie pMAL™-c2) o P_{T7lac} (en plásmidos de la serie pET).

VI.C.1.C. Cultivos de expresión de proteínas recombinantes. Fraccionamiento del cultivo

VI.C.1.C.1. *Cultivo de expresión de proteína recombinante*

En este trabajo experimental se ha utilizado células XL1-Blue, BL21(DE3), BL26 y MC4100λHS1 de *E. coli* para llevar a cabo la expresión de proteínas recombinantes codificadas en plásmidos pMAL, pET o pJX (Tabla XXX).

TABLA XXX. Cepas de *E. coli* y plásmidos utilizados en la expresión de proteínas recombinantes

Cepa de <i>E. coli</i>	Plásmido
XL1-Blue	pMAL, pET, pJX
BL21(DE3)	pET
BL26	pJX
MC4100λHS1	pMAL

El método que se ha seguido para la expresión de proteína recombinante depende del promotor a partir del cual se inicia la expresión. En líneas generales el método utilizado es el que se describe a continuación:

Inóculo

1. Transferir una colonia transformante a partir de una siembra fresca por agotamiento en estría a 2.5 ml de medio LB Miller/Amp (50-100 µg/ml). Incubar a 37°C y 300 rpm, 8-10 h.
2. Medir la A_{550} de una dilución 1:10 del inóculo. Comprobar que la A_{550} del inóculo es ≤ 2 .
3. Centrifugar el inóculo (12000xg, 1 min). Resuspender la fracción celular en 2.5 ml de medio LB Miller/Amp fresco y mantenerla en frío.

Cultivo

4. Atemperar 80 ml de medio de cultivo en un frasco tipo Erlenmeyer (300-500 ml) a la temperatura de crecimiento del cultivo. Utilizar medio TYG/Amp (100 µg/ml) si la expresión va a ser a partir de un plásmido pMAL, o bien medio LB Miller/Amp (50 µg/ml) en caso contrario.
5. Inocular los 80 ml de medio con 0.8 ml de inóculo (1:100). Incubar a 37°C y con agitación a 320 rpm. La temperatura de crecimiento ha sido 30°C únicamente cuando se ha expresado proteínas a partir del promotor termoinducible $\lambda_{PRP_L c/857^{ts}}$ o cuando se ha ensayado la expresión en células MC4100λHS1.
6. Medir la A_{550} del cultivo a intervalos de 45-60 min.
7. Extraer 1 ml de cultivo cuando: A_{550} es aprox. 0.2 (células BL21(DE3) y BL26, aprox. 2 h de crecimiento), A_{550} es aprox. 0.4 (células MC4100λHS1, aprox. 2 h) o A_{550} es aprox. 0.5 (células XL1-Blue, aprox. 3 h). Centrifugar la alícuota extraída (12000xg, 1 min) y guardar la fracción celular en hielo. Esta fracción constituye el control del cultivo no inducido (No ind).
8. Inducir la expresión de proteína recombinante mediante adición de IPTG a una concentración final 0.3mM (promotores P_{tac} o P_{T7lac}) o por cambio de temperatura de crecimiento a 42°C (promotor $\lambda_{PRP_L c/857^{ts}}$).
9. Medir la A_{550} del cultivo a intervalos de 60 min durante aprox. 7 h (tiempo total de inducción). Extraer al mismo tiempo 1 ml del cultivo, centrifugarlo (12000xg, 1 min) y guardar la fracción celular en hielo. Estas fracciones constituyen las muestras de inducción del cultivo a tiempos parciales.

10. Si procede, conservar el cultivo en hielo para su fraccionamiento. De lo contrario, inactivarlo por autoclavado o por adición de un volumen igual de hipoclorito sódico preparado al 10%.

Procesado de las muestras de cultivo

11. Resuspender la fracción celular en 150 µl de agua Milli-Q estéril.
12. Añadir 50 µl de tampón de aplicación de proteínas x4 reductor. Agitar suavemente con vórtex.
13. Incubar las muestras al baño maría (95-100°C), 4-5 min.
14. Centrifugar las muestras (12000xg, 1 min). Guardar a -20°C o bien en hielo picado si se prevee aplicarlas en breve en un análisis electroforético.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón de aplicación de proteína 4x reductor: 0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 8% (p/v) SDS, 40% (v/v) Glicerol, 0.2% (p/v) Azul de Bromofenol, 20% (v/v) β-Mercaptoetanol ó 400mM DTT; 50 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

SDS (Fluka)	4.0 g
Azul de Bromofenol (Merck)	0.1 g

Añadir:

1M Tris HCl pH 6.8	12.5 ml
agua Milli-Q	4.5 ml

Homogeneizar y disolver.

Añadir 23 ml de glicerol 87% (v/v) (Fluka) estéril y homogeneizar la mezcla.

Conservar a T^a amb.

IMPORTANTE: Cuando se vaya a utilizar, añadir 0.25 volúmenes de la cantidad tomada (p. e., si se toman 100 µl entonces añadir 25 µl) de β-Mercaptoetanol (Fluka) o de 2M DTT.

Tris HCl 1M pH 6.8; 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 12.11 g Tris base (Serva).

Disolver en 80 ml de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 6.8 con HCl 2N y enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.

Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.

Conservar a T^a amb.

DTT 2M; 5 ml

Pesar y poner en un vial 1.54 g 1,4-Ditiotreitol (DTT) (C₄H₁₀O₂S₂) (Boehringer Mannheim).

Disolver en 5 ml de 10mM acetato sódico pH 5.2.

Esterilizar por filtración con filtro de acetato de celulosa 0.22 µm (Millipore, Corning).

Preparar alícuotas y conservar a -20°C.

VI.C.1.C.2. Fraccionamiento del cultivo

El fraccionamiento del cultivo de expresión permite valorar la solubilidad de la proteína recombinante expresada. El método utilizado, y que se describe a continuación, sólo se ha aplicado en cultivos de expresión de clones transformantes para construcciones plasmídicas basadas en el plásmido pMALTM-c2.

1. Centrifugar el cultivo (4000xg, 5 min, 4°C) y descartar el sobrenadante.
2. Resuspender la fracción celular en 5 ml (aprox. 1/15 del volumen inicial del cultivo) de tampón de lisis.
3. Congelar la suspensión celular a -20°C, 14-16 h.
4. Descongelar la suspensión celular en agua fría.
5. Añadir 50 µl de PMSF 100mM (concentración final 1mM). Homogeneizar la suspensión suavemente.
6. Añadir lisozima (Fluka) a una concentración final 100 µg/ml. Homogeneizar la suspensión suavemente.

7. Añadir 0.5 ml de Triton X-100 1% (v/v). Homogeneizar la suspensión suavemente.
8. Incubar la muestra a 30-37°C durante 45-60 min.
9. Sonicar la muestra con sonda de aguja 40T (B. Braun Diessel Biotech). Aplicar 4 pulsos de 1 min a 48-50W con un ciclo de repetición de 0.5. Mientras procede la sonicación la muestra debe estar siempre en hielo picado. Incubar la muestra 1 min en hielo picado entre pulso y pulso.
10. Centrifugar la muestra (9000xg, 20 min, 4°C).
11. Recuperar el sobrenadante (constituye la fracción soluble). Resuspender el sedimento de centrifugación en 5 ml de tampón de lisis (constituye la fracción insoluble). Para homogeneizar la fracción insoluble puede aplicarse 1 pulso de sonicación de 1 min a 40W con un ciclo de repetición de 0.5.
12. Si procede, analizar por electroforesis las fracciones soluble e insoluble obtenidas.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón de lisis: 50mM Tris HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA; 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	0.60 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	0.58 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O) (Serva)	37.2 mg

Disolver en 90 ml de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 8.0 con HCl 1N y enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.

Conservar a 4°C.

PMSF 100mM; 2 ml

Pesar y poner en un tubo 35 mg de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (C₇H₇O₂SF) (Merck).

Disolver en 2 ml de isopropanol (Carlo Erba).

Preparar alícuotas y conservar a -20°C.

Solución Triton X-100 1% (v/v); 10 ml

Transferir a un vial 0.1 ml de Triton X-100 (Fluka).

Homogeneizar en 9.9 ml de agua Milli-Q.

Conservar a T° amb.

La cantidad de proteína de fusión expresada se ha cuantificado mediante el programa informático Bio Image Intelligent Quantifier versión 2.1 (B.I. Systems Corporation), y se ha expresado como la intensidad integrada del área que delimita la banda. El valor numérico se ha hallado según la fórmula "(Intensidad Integrada banda - Ruido de Fondo banda) / A₅₅₀".

VI.C.2. Cultivo de líneas celulares eucariotas

VI.C.2.A. Medios de cultivo

El cultivo de las líneas celulares MDBK y GBK utilizadas en este trabajo experimental se ha llevado a cabo empleando como medio base la modificación Glasgow del medio MEM ('minimum essential media') (GMEM). El medio base GMEM se ha preparado dos veces concentrado (GMEM2x) y se ha utilizado como medio madre para la preparación del medio completo (GMEM completo) en sus versiones líquida (Medio A y Medio C) y semisólida (GMEMss). El método de elaboración de estos medios es el que se recoge a continuación.

VI.C.2.A.1. GMEM completo líquido

Medio A: 1x GMEM, 0.5mM piruvato, 0.2% (p/v) triptosa fosfato, 10% (v/v) FCS, 50 µg/ml gentamicina.

Método de elaboración: 1 L

Poner en un vaso de precipitados:

GMEM 2x	0.5 L
Solución piruvato 100mM (Gibco BRL, Biochrom KG)	5 ml
Gentamicina 50 mg/ml (Gibco BRL, Biological Industries)	1 ml
Caldo triptosa fosfato 5% (p/v)	40 ml
FCS	100 ml

Enrasar a 1 L con agua Milli-Q.
Conservar a 4°C.

Medio C: equivale a un Medio A concentrado 1.5 veces (Medio A 1.5x).

Método de elaboración: 1 L

Poner en un vaso de precipitados:

GMEM 2x	0.75 L
Solución piruvato 100mM (Gibco BRL, Biochrom KG)	7.5 ml
Gentamicina 50 mg/ml (Gibco BRL, Biological Industries)	1.5 ml
Caldo triptosa fosfato 5% (p/v)	60 ml
FCS	45 ml

Enrasar a 1 L con agua Milli-Q.
Conservar a 4°C.

*VI.C.2.A.2. GMEM completo semisólido*Método de elaboración: 100 ml

Disponer de 66.6 ml (2/3 del volumen final) de Medio C. Precalear a 42°C en baño termostático.
Fundir la solución de agarosa al 3% en un microondas, llevándola repetidamente al punto de ebullición. Atemperarla a 42°C en baño termostático.
Mezclar los 66.6 ml de Medio C con 33.4 ml de agarosa al 3%. Homogeneizar y atemperar la mezcla a 42°C.
Añadir 4 ó 12 ml de la mezcla sobre la monocapa celular crecida en una placa de cultivo de 60 ó 90 mm de diámetro, respectivamente. Dejar solidificar el medio durante 15-20 min a T^a amb antes de introducir el cultivo en el incubador.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.GMEM 2x: 1L

Pesar y poner en un vaso de precipitados 12.9 g medio en polvo Instamed MEM-GLASGOW (Biochrom KG).
Añadir 5.5 g bicarbonato sódico (NaHCO₃) (Fluka).
Disolver en 1 L agua Milli-Q.
Ajustar a pH 6.7-6.8 (0.2-0.3 unidades por debajo de pH 7.0, que es considerado el pH de trabajo).
Esterilizar por filtración con copa filtrante de acetato de celulosa de 0.22 µm (Nalgene).

Caldo triptosa fosfato 5% (p/v): 250 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 12.5 g de triptosa caldo (ADSA-micro).
Disolver en 250 ml agua Milli-Q.
Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.

Suero Bovino Fetal (FCS)

Diferentes suministradores (Cultek, Harlan, Reactiva, etc.). Todos los sueros usados han pasado un examen conforme sustentan de manera satisfactoria el crecimiento de células MDBK y GBK.
El FCS se inactiva 30 min a 56°C en un baño termostático. Se conserva en alícuotas y congelado a -20°C.

Solución de agarosa 3%: 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 3 g SeaPlaque GTG Agarose (agarosa de bajo punto de fusión, calidad DNA) (FMC).
Añadir 97 ml agua Milli-Q y homogeneizar.
Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.

VI.C.2.B. Condiciones de cultivo. Cultivos de mantenimiento y conservación

Las líneas celulares MDBK y GBK han sido utilizadas para el cultivo y titulación de virus BoHV-1 FM, BoHV-1 gE⁻ y BoHV-1 RAPPR⁻. Tanto para el cultivo de virus como para su titulación se precisan monocapas celulares con un 95-100% de confluencia de crecimiento. En este capítulo se describen las condiciones de cultivo, cultivos de mantenimiento y métodos de conservación mediante los cuales se ha dispuesto de las monocapas celulares necesarias.

VI.C.2.B.1. *Condiciones de cultivo*

El cultivo de las líneas celulares MDBK y GBK se ha llevado a cabo en frascos de cultivo (Falcon, TPP, Costar) de 175 cm² de superficie o sobre placas de 60-90 mm de diámetro (Costar, Nunc) preparadas para cultivos celulares. La superficie de estos recipientes presenta unas características idóneas de carga e hidrofiliidad que permiten la adhesión celular y el crecimiento de las células formando monocapas.

La incubación de los cultivos celulares se ha llevado a cabo en un incubador con camisa de agua ('water jacket') a 37°C y en una fase gaseosa al 5% de CO₂.

VI.C.2.B.2. *Cultivo de mantenimiento*

Las células MDBK y GBK crecen adheridas a una superficie formando una monocapa. Cuando dicha monocapa presenta un 95-100% de confluencia celular, las células que la forman deben ser desprendidas y repartidas en nuevos frascos de cultivo para que la línea celular se mantenga en crecimiento. Las proteínas del tipo colágeno o fibronectina son las que median en la adhesión de la célula a la superficie de cultivo. Un método clásico para desprender las células adheridas es la tripsinización (Freshney, 1983). La tripsina adicionada directamente al cultivo hidroliza las proteínas de adhesión. Esta técnica se ha utilizado rutinariamente en el mantenimiento de las líneas celulares utilizadas, y el método es el que se describe a continuación:

1. Partir de un frasco de cultivo con un 95-100% de confluencia celular.
2. Aspirar el medio de cultivo con una pipeta Pasteur estéril.
3. Lavar la monocapa celular de restos de medio con Earle's Balanced Salt Solution (EBSS). Para superficies de cultivo de 175 cm² y 75 cm² utilizar 6 y 4 ml de EBSS, respectivamente.
4. Aspirar el EBSS con una pipeta Pasteur estéril.
5. Añadir solución de tripsina a la monocapa celular y distribuirla homogéneamente por toda la superficie del cultivo. Para superficies de cultivo de 175 cm² y 75 cm² utilizar 3 y 2 ml de solución de tripsina, respectivamente.
6. Dejar las células expuestas a la tripsina 3-4 min hasta que las células se empiezan a desprender y el medio se vuelve turbio. Un tiempo excesivo de tripsinización compromete la viabilidad celular. El desprendimiento de las células se puede acelerar golpeando los flancos del frasco de cultivo.
7. Añadir 4-5 ml de Medio A a las células desprendidas para evitar la sobretipsinización de las células.
8. Recoger la suspensión celular con una pipeta Pasteur estéril y transferirla a un vial estéril de centrifugación.
9. Centrifugar la suspensión celular a 250xg, 10 min a T^a amb.
10. Aspirar el sobrenadante de centrifugación con una pipeta Pasteur estéril.
11. Deshacer el botón de células sedimentadas golpeando la base del vial con el dedo. Resuspender dichas células en un volumen adecuado de Medio A.

La suspensión celular obtenida se puede utilizar para, (i) sembrar nuevos frascos de cultivo y mantener así la línea celular en crecimiento (cuando las células obtenidas de 1 frasco de cultivo se reparten en 4 nuevos frascos de cultivo se

obtienen nuevas monocapas 100% confluentes al cabo de 4-5 días), o (ii) conservar la línea a largo plazo congelando la suspensión celular en nitrógeno líquido.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

EBSS: 1 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Cloruro potásico (KCl) (Fluka)	0.4 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	6.8 g
Bicarbonato sódico (NaHCO ₃) (Fluka)	2.2 g
Sodio dihidrógeno fosfato monohidratado (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) (Merck) ..	0.14 g
D-glucosa monohidratada (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O) (Merck)	1.0 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O) (Serva)	0.2 g

Disolver en 1 L agua Milli-Q.

Esterilizar por filtración con copa filtrante de acetato de celulosa de 0.22 µm (Nalgene). También se puede esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos, pero para ello el medio no debe contener ni glucosa ni EDTA; éstos se deberán suplementar posteriormente estériles por filtración con filtro de acetato de celulosa 0.22 µm (Millipore, Corning).

Solución de tripsina: 1 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tripsina (Sigma)	0.5 g
Cloruro potásico (KCl) (Fluka)	0.4 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	8.0 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O) (Serva)	0.2 g
Trisodio citrato dihidratado (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O) (Panreac)	0.35 g

Disolver en 1 L agua Milli-Q.

Esterilizar por filtración con copa filtrante de acetato de celulosa de 0.22 µm (Nalgene). Preparar alícuotas y conservar a -20°C.

VI.C.2.B.3. Conservación de líneas celulares

La conservación de líneas celulares se ha realizado de manera diferente según fuera el plazo de requerimiento de las mismas. Para disponer de ellas a corto plazo se han conservado como un cultivo de mantenimiento. Para disponer de ellas a un plazo más largo, primero se han congelado en nitrógeno líquido y, en caso de necesitarlas, se han descongelado y se ha iniciado un cultivo de mantenimiento.

El método seguido para la congelación de líneas celulares ha sido el siguiente:

1. Tripsinizar un cultivo de mantenimiento.
2. Calcular la concentración celular de la suspensión obtenida. Para ello se utiliza una cámara de recuento de Neubauer y se cuentan las células al microscopio. Para una cámara de Neubauer de 5x5 cuadros y una superficie total de recuento de 1 mm², la concentración de células (nº células/ml) se calcula mediante la fórmula "(media de células en 10 campos) x factor de dilución aplicado x 25 cuadros x 10⁴ =". El factor 10⁴ es un factor que depende del tipo de cámara de recuento utilizada.
3. Centrifugar la suspensión celular a 250xg, 10 min. a T^a amb. Aspirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril.
4. Resuspender las células en el volumen necesario de FCS 8% DMSO (C₂H₆SO) (Sigma) frío para que la concentración celular final sea 2x10⁷ células/ml. La adición de FCS 8% DMSO frío sobre la suspensión celular debe ser lenta y con agitación continua del vial pues el DMSO resulta muy tóxico para las células y debe diluirse rápidamente.
5. Repartir la suspensión celular en 2-3 criotubos por cada frasco de cultivo de 175 cm² inicial.
6. Congelar las células según la secuencia 2 h a -20°C, 14 h a -80°C y finalmente en nitrógeno líquido.

El método seguido para la descongelación de líneas celulares ha sido el siguiente:

1. Descongelar un criotubo de células congeladas en nitrógeno líquido en un baño a 37°C. La descongelación procede en aprox. 1 min.
2. Incubar las células descongeladas en hielo picado para minimizar la toxicidad del DMSO.
3. Recuperar la suspensión de células descongeladas con una pipeta Pasteur estéril y diluirla en 5 ml de Medio A preenfriado en hielo.
4. Centrifugar la suspensión celular a 250xg, 10 min. a T^a amb.
5. Eliminar el sobrenadante de centrifugación por aspiración con una pipeta Pasteur estéril.
6. Resuspender el sedimento de células en 5 ml de Medio A atemperado a 37°C.
7. Sembrar las células resuspendidas en un frasco de cultivo de 175 cm² con 36-40 ml de Medio A. Incubar 14-16 h, 37°C.
8. Eliminar, si procede, las células muertas en suspensión en el medio. Para ello se aspira el medio con una pipeta Pasteur estéril y se lava la monocapa con 3 ml de EBSS. Reponer 36-40 ml de Medio A atemperado a 37°C en el frasco de cultivo.

Las células MDBK y GBK recién descongeladas e incubadas en condiciones normales en un frasco de cultivo de 175 cm² pueden formar una monocapa celular 95-100% confluyente en 3-4 días.

VI.C.3. Cultivo de virus

El cultivo de virus se ha llevado a cabo sobre monocapas de células MDBK, y por consiguiente las condiciones de cultivo que se refieren a estas células afectan también a los virus. Las partículas víricas se han obtenido a partir del sobrenadante de infección de estas células. En este apartado me referiré a los métodos utilizados para la infección de células MDBK para producir virus, la titulación de suspensiones víricas, la purificación de partículas víricas y su conservación.

VI.C.3.A.1. Infección de cultivos celulares

La infección de cultivos celulares para la producción de virus se ha desarrollado sobre monocapas celulares crecidas en frascos de cultivo de 175 cm² de superficie. Para cada lote de producción de virus se ha dispuesto habitualmente de hasta 7 monocapas celulares 95-100% confluentes, contabilizando 1-5x10⁷ células totales en cada una de ellas. La infección de la monocapa celular se ha llevado a cabo a una m.o.i. de 0.1-0.01, es decir, en una relación de 1 partícula vírica por cada 10-100 células. El método que se ha seguido para la infección es el que se describe a continuación:

1. Disponer de hasta 7 monocapas celulares en frascos de cultivo de 175 cm² de superficie con 40 ml de Medio A cada uno.
2. Retirar 20 ml de Medio A de cada uno de los frascos de cultivo.
3. Preparar la suspensión de virus a utilizar en 7 ml finales de Medio A y a una m.o.i. total de 0.1-0.01.
4. Añadir 1 ml de la suspensión vírica preparada a cada frasco de cultivo.
5. Incubar las monocapas 1-3 h a 37°C para que se produzca la adsorción del virus sobre las células.
6. Retirar el sobrenadante por aspiración con una pipeta Pasteur estéril.
7. Añadir 40 ml de Medio A atemperado a 37°C a cada frasco de cultivo e incubar a 37°C.

La tasa de proliferación vírica depende del tipo de virus. La infección de una célula por una partícula vírica desencadena un efecto citopático que en el caso de BoHV-1 lleva finalmente a la muerte de la célula MDBK. La infección de una partícula vírica BoHV-1 sobre una monocapa celular acaba estableciendo un núcleo de infección. Éste se visualiza como un conjunto de células con notables cambios morfológicos, que acaban muriendo dando lugar a la formación de una calva. Cuando una monocapa de células MDBK se infecta con la cepa viral BoHV-1 FM, las calvas comienzan a ser visibles a las 24 h post-infección. En condiciones normales el efecto citopático es total a las 72 h post-infección.

VI.C.3.A.2. Titulación de suspensiones víricas

Las suspensiones víricas deben ser tituladas para determinar, p.e., qué volumen de la misma se necesita para cumplir con la m.o.i. requerida en un lote de producción de virus. La titulación de suspensiones víricas se ha llevado a cabo sobre monocapas celulares crecidas en placas de 60 mm de diámetro, y consiste en infectar una monocapa celular con un volumen conocido de la suspensión vírica y en contabilizar las calvas que se forman a raíz de dicha infección. El método utilizado es el que se describe a continuación:

1. Tripsinizar una monocapa de células 95-100% confluyente de un frasco de cultivo de 175 cm² de superficie.
2. Contabilizar al microscopio y mediante una cámara de Neubauer el número de células/ml.
3. Disponer de 6 placas de cultivo de 60 mm de diámetro y sembrar en cada una de ellas 1x10⁶ células en un volumen final de 5 ml de Medio A por placa. Procurar que la suspensión celular sea homogénea pues la variación en la concentración local de células afecta mucho al tamaño de la calva y por consiguiente su detección.
4. Incubar las placas 24-48 h hasta que se obtenga una monocapa 95-100% confluyente.
5. Hacer un banco de diluciones de la suspensión vírica problema. Si ésta es el sobrenadante 72 h post-infección de BoHV-1FM se recomienda utilizar diluciones 10⁻⁴-10⁻⁶.
6. Aspirar el Medio A de cada placa con una pipeta Pasteur estéril.
7. Añadir a cada placa 1.5 ml de Medio A atemperado a 37°C y suplementado con 100 µl de una dilución de la suspensión vírica.
8. Incubar las monocapas celulares 1-3 h a 37°C para que se produzca la adsorción del virus.
9. Aspirar el sobrenadante de cada placa con una pipeta Pasteur estéril.
10. Cubrir las monocapas celulares con 4 ml de medio GMEMs y dejar solidificar 15-20 min a T^a amb.
11. Incubar las monocapas celulares a 37°C hasta que las calvas sean visibles (para el virus BoHV-1FM son suficientes 72 h de incubación).
12. Retirar el medio GMEMs y teñir las monocapas celulares 3 min con 1 ml de solución de Giemsa (Merck).
13. Lavar las monocapas con agua y contabilizar bajo una lupa las calvas formadas.

En las condiciones descritas, calva formada tiene su origen en una única partícula vírica infectiva. Así pues, del recuento de calvas y teniendo presente las diluciones realizadas se puede calcular el título de partículas víricas infectivas en la suspensión problema.

VI.C.3.A.3. Purificación de partículas víricas

La purificación de partículas víricas es necesaria cuando se precisa de DNA viral o bien de antígeno viral para la obtención de anticuerpos. Mediante la purificación de partículas víricas se eliminan de la suspensión moléculas contaminantes de origen celular. El método utilizado para la purificación de partículas víricas consiste en el bandedo del virus en un gradiente de tartrato sódico-potásico. El método utilizado y que se describe a continuación es una variación del descrito por V. Misra (*Misra et al.*, 1981).

1. Infectar 6-8 monocapas de células MDBK o GBK en frascos de cultivo de 175 cm² de superficie.
2. Recoger el sobrenadante del cultivo infectado cuando se observe efecto citopático en el 100% de la monocapa celular (aprox. 72-96 h post-infección).
3. Clarificar el sobrenadante del cultivo infectado mediante centrifugación (1000xg, 30 min 4°C).
4. Sedimentar las partículas víricas del sobrenadante clarificado mediante centrifugación (48000xg, 2h 4°C). El sedimento que se obtiene de partículas víricas BoHV-1 dibuja una forma en herradura característica.
5. Resuspender el sedimento de partículas víricas en pases sucesivos de tampón STE 1x frío (4°C). El volumen total final de tampón a emplear debe ser 6 ml.
6. Montar un gradiente discontinuo 10-50 % de tartrato sódico-potásico en dos tubos de polialómero para ultracentrifugación. Utilizar para ello un aparato formador de gradientes (Buchler Instrumets, modelo Auto Densi-Flow IIC). Colocar, en este orden y en cada tubo, 6 ml de tampón STE 1x tartrato sódico-potásico al 50%(p/v), 6 ml al 40%(p/v), 6 ml al 30%(p/v), 6 ml al 20%(p/v) y 6 ml al 10% (p/v).
7. Depositar la suspensión vírica resuspendida sobre la capa de tartrato sódico-potásico al 10% (p/v) de uno de los tubos. El otro tubo sirve de contrapeso en la centrifugación.
8. Enrasar los tubos de ultracentrifugación con tampón STE 1x.
9. Ultracentrifugar los gradientes de tartrato sódico-potásico a 100000xg, 2 h 4°C (Rotor Beckman SW-27)
10. Recuperar la interfase de partículas víricas utilizando el aparato formador de gradientes. Esta interfase se forma entre las capas de tampón STE 1x tartrato sódico-potásico al 40% (p/v) y al 50% (p/v), y presenta un aspecto lechoso.
11. Diluir la interfase de partículas víricas en 30 ml de tampón STE 1x frío (4°C).
12. Ultracentrifugar a 100000xg, 2 h 4°C.
13. Resuspender el sedimento de partículas víricas en 150-200 µl de tampón STE 1x frío (4°C).

El título de una suspensión purificada de partículas víricas BoHV-1 FM obtenida a partir de 6-8 monocapas de 175 cm² es aprox. 3×10^{10} pfu totales, esto es, 4×10^9 pfu/monocapa. La suspensión purificada de partículas víricas constituye la suspensión vírica madre para nuevas infecciones. Asimismo, a partir de esta suspensión se puede extraer DNA viral o bien antígeno para la obtención de anticuerpos. La suspensión purificada y suplementada con glicerol estéril al 15% se conserva a -80°C.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón STE 5x: 50mM Tris HCl pH 8.0, 5mM EDTA, 1M NaCl; 200 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	1.21 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	11.69 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O) (Serva)	0.37 g

Disolver en 190 ml de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 8.0 con HCl 0.2N y enrasar a 200 ml con agua Milli-Q.

Esterilizar por filtración con filtro de acetato de celulosa 0.22 µm (Millipore, Corning).

Tampón STE 1x tartrato sódico-potásico 50% (p/v); 50 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 25 g tartrato sódico-potásico tetrahidratado (C₄H₄KNaO₆·4H₂O) (Fluka).

Disolver en 35 ml de agua Milli-Q.

Añadir 10 ml de tampón STE 5x.

Comprobar que la solución tenga pH 7-8. Si procede, ajustar el pH.

Enrasar a 50 ml con agua Milli-Q.

Tampón STE 1x tartrato sódico-potásico 10% (p/v) - 40% (p/v); 15 ml de cada uno

En un vial mezclar y homogeneizar las cantidades de tampón STE 1x tartrato sódico-potásico 50% (p/v) y tampón STE 1x que se indican en la Tabla XXXI.

TABLA XXXI. Soluciones y cantidades a utilizar en la formación del gradiente de tartrato potásico

Tampón STE 1x tartrato sódico-potásico resultante	Volumen tampón STE 1x tartrato sódico-potásico 50% (p/v)	Volumen tampón STE 1x	Volumen total
10% (p/v)	3 ml	12 ml	15 ml
20% (p/v)	6 ml	9 ml	15 ml
30% (p/v)	9 ml	6 ml	15 ml
40% (p/v)	12 ml	3 ml	15 ml

VI.C.3.A.4. Conservación de virus

Todas las suspensiones víricas obtenidas, tanto las que se corresponden con un sobrenadante de infección como las purificadas, se han conservado a largo plazo como alícuotas congeladas a -80°C en presencia de glicerol 15% (v/v) estéril. La reconstitución de las suspensiones víricas congeladas ha sido por descongelación en hielo picado durante 15-20 min. Cabe notar que ciclos reiterados de congelación y descongelación conllevan una disminución del título de partículas infectivas. Por consiguiente, siempre se ha procurado congelar alícuotas pequeñas de las diferentes suspensiones víricas.

VI.D. Métodos de manipulación de DNA

Los métodos que se describen a continuación hacen referencia a las técnicas empleadas en la manipulación del DNA. En este apartado se recoge los métodos que han permitido construir clones transformantes, obtener DNA plasmídico y viral, o bien modificar moléculas de DNA. También se describe los métodos utilizados para analizar el resultado de esta manipulación.

VI.D.1. Métodos de clonación

VI.D.1.A.1. Preparación de células competentes

Las células competentes de las cepas de *E. coli* utilizadas en este trabajo se han obtenido según el método del cloruro cálcico. Este método incorpora algunas modificaciones con respecto al descrito inicialmente por S. N. Cohen (Cohen *et al.*, 1972; Sambrook *et al.*, 1989d; Sambrook & Russell, 2001). El método que se describe a continuación es el que se ha utilizado para obtener células competentes XL1-Blue.

Inóculo

1. Sembrar una estría de *E. coli* XL1-Blue sobre una placa de medio LB Miller/Tet (50 $\mu\text{g/ml}$) a partir de un vial del banco de cepas maestro (el vial utilizado es desechado y nunca devuelto al banco de cepas). Incubar a 37°C , 14-16 h.
2. Transferir una colonia aislada a 2.5 ml de medio LB Miller/Tet (50 $\mu\text{g/ml}$). Incubar a 37°C y 300 rpm, 8-10 h.
3. Medir la A_{550} de una dilución 1:10 del inóculo. Comprobar que la A_{550} del inóculo es ≤ 2 .
4. Centrifugar el inóculo a 12000xg, 1 min.
5. Resuspender el sedimento celular en 2.5 ml de medio LB Miller/Tet (50 $\mu\text{g/ml}$) fresco. Mantener las células resuspendidas en hielo picado.

Cultivo

6. Atemperar 80 ml de medio LB Miller en un frasco tipo Erlenmeyer (300-500 ml) a 37°C.
7. Inocular los 80 ml de medio LB Miller con 0.8 ml del inóculo (1:100). Incubar a 37°C y 320 rpm.
8. Medir la A_{550} del cultivo a intervalos de 60 min.
9. Incubar el cultivo en hielo picado 1 h a 4°C cuando la A_{550} es 0.5 (aprox. 3 h de crecimiento). En este punto el cultivo se encuentra en la fase de crecimiento exponencial. A partir de este momento es muy importante no romper la cadena de frío y seguir operando en condiciones de esterilidad.

Elaboración de células competentes

10. Centrifugar el cultivo a 4000xg y a 4°C, 5 min. Decantar el sobrenadante.
11. Resuspender las células suavemente con vórtex en 1/2 del volumen inicial de cultivo de una solución acuosa 50mM CaCl_2 estéril fría/hielo. Incubar en hielo picado 15 min.
12. Centrifugar la suspensión de células a 4000xg y a 4°C, 5 min. Decantar el sobrenadante.
13. Resuspender las células suavemente con vórtex en 1/15 del volumen inicial de cultivo de una solución acuosa 50mM CaCl_2 estéril fría/hielo. Incubar en hielo picado 1-2 h.
14. Incubar la suspensión celular a 4°C 12-24 h. Esta incubación aumenta en 4-6 veces la eficiencia de transformación de las células competentes.
15. Añadir glicerol estéril a una concentración final del 10-12% (v/v). Homogeneizar la suspensión.
16. Repartir la suspensión de células competentes en alícuotas de 100-150 μl en tubos Eppendorf estériles pre-enfriados en hielo picado.
17. Conservar las células competentes a -80°C hasta su utilización.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

CaCl_2 50mM; 200 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 1.47 g cloruro cálcico dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Fluka).
 Disolver en 180 ml de agua Milli-Q.
 Enrasar a 200 ml con agua Milli-Q.
 Esterilizar por filtración con filtro de acetato de celulosa 0.22 μm (Millipore, Corning).
 Conservar a 4°C.

En líneas generales, este método también se ha utilizado para la elaboración de células competentes de las cepas BL21(DE3), BL26 y MC4100 λ HS1 de *E. coli*. Para ello, no obstante, se han tenido presentes también las particularidades de cada cepa:

BL21(DE3) y BL26:

- i) no son portadoras de ningún gen de resistencia por lo que la siembra en estría y el inóculo se han desarrollado en ausencia de antibiótico, y
- ii) tienen genotipo *rec*⁺ por lo que la siembra en estría se ha incubado durante 10-12 h, el inóculo 6-8 h y el cultivo 2 h.

MC4100 λ HS1:

- i) es portadora de la mutación *rpsL150* que confiere resistencia a la Str por lo que la siembra en estría y el inóculo se han desarrollado en presencia de dicho antibiótico,
- ii) tiene genotipo *rec*⁺ de manera que la siembra en estría se ha incubado durante 10-12 h, el inóculo 6-8 h y el cultivo 2 h, y
- iii) son portadoras del promotor heat-shock *rpoD_{hs}* de manera que la temperatura de incubación del cultivo siempre ha sido 30°C.

Las células competentes que se obtienen mediante el método descrito pueden rendir 10^6 - 10^7 células transformantes por cada μg de DNA plasmídico de aprox. 4 kpb aplicado.

VI.D.1.A.2. Transformación de células competentes

La transformación de células competentes con DNA plasmídico se ha llevado a cabo siguiendo el método del choque térmico descrito en (Sambrook *et al.*, 1989d; Sambrook & Russell, 2001). A continuación se describe el método utilizado para transformar células competentes de la cepa XL1-Blue.

1. Descongelar una alícuota de células competentes XL1-Blue en hielo picado durante 10-15 min.
2. Añadir hasta 50 ng del DNA plasmídico que se desea transformar, en un volumen inferior al 5% (v/v) del volumen de células competentes.
3. Incubar el vial en hielo picado 30-45 min.
4. Incubar el vial a 42°C, 2 min (choque térmico).
5. Incubar el vial en hielo picado 3-5 min.
6. Añadir 0.5 ml de medio LB Miller.
7. Incubar el vial a 37°C sin agitación, 25-35 min. En este tiempo las células transformantes expresan el gen *bla* de resistencia a Amp codificado en el DNA plasmídico.
8. Sembrar alícuotas de 100-300 μl en placas de medio LB Miller/Amp. Incubar a 37°C, 14-16 h.

Todos los ensayos de transformación de células competentes han incluido siempre un control positivo (DNA plasmídico conocido) y otro negativo (tampón TE 1x) de transformación.

En líneas generales, este método también se ha utilizado para transformar células competentes de *E. coli* BL21(DE3), BL26 y MC4100 λ HS1. Para ello, no obstante, se han tenido presentes también las siguientes consideraciones:

XL1-Blue y BL21(DE3):

- i) en el caso particular de transformar plásmidos pJX que contienen el promotor termoinducible $\lambda\text{P}_{\text{R}}\text{P}_{\text{L}}\text{c}/857^{\text{ts}}$, el choque térmico ha sido a 35°C durante 5 min.

BL21(DE3) y BL26:

- i) son células con genotipo *rec*⁺ por lo que la siembra de las células transformantes se ha incubado a 37°C durante 10-12 h.

MC4100 λ HS1:

- i) son células que contienen el promotor de respuesta heat-shock *rpoD*_{hs} por lo que el choque térmico se ha realizado a 35°C durante 5 min.
- ii) son células con genotipo *rec*⁺, y porque contienen el promotor *rpoD*_{hs}, la siembra de las células transformantes se ha incubado a 30°C durante 10-12 h.

Cuando el plásmido y la cepa transformada permite la selección por α -complementación, la selección de clones transformantes se ha realizado sobre medio sólido LB Miller/Amp/IPTG/X-Gal. En caso contrario, la selección se ha realizado en ausencia de IPTG y X-Gal. Independientemente de si ha habido o no α -complementación, el cultivo líquido de los clones transformantes seleccionados se ha desarrollado SIEMPRE a partir una siembra sobre medio LB Miller/Amp y en ausencia de IPTG y X-Gal. La selección de los clones transformantes se ha completado con la extracción del DNA plasmídico y la obtención de un mapa de restricción de éste. Por otro lado, el DNA plasmídico de todos los clones transformantes para la expresión de proteína recombinante ha sido convenientemente secuenciado.

VI.D.2. Métodos de obtención de DNA

En este apartado se recoge los métodos utilizados para la extracción de DNA plasmídico de los clones transformantes, la purificación de DNA viral y la recuperación del DNA resuelto en geles de electroforesis.

VI.D.2.A.1. Extracción de DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico se ha llevado a cabo según el método de lisis alcalina descrito por J. Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989c). El método aplicado se ha llevado a cabo a escala pequeña (miniprep) a partir de 2.5 ml de cultivo, y a escala mediana (mediprep) a partir de 12.5-50 ml de cultivo.

Escala miniprep

1. Inocular una colonia transformante en 2.5 ml de medio 2xYT/Amp a partir de una siembra fresca de agotamiento por estría en medio LB Miller/Amp.
2. Incubar el cultivo a 37°C (clones transformantes XL1-Blue, BL21(DE3) y BL26) o 30°C (clones transformantes MC4100λHS1 y todos los transformantes para plásmidos pJX), con agitación a 320 rpm, 12-14 h.
3. Centrifugar 1.5 ml del cultivo en un tubo Eppendorf a 12000xg, 2 min.
4. Aspirar totalmente el sobrenadante.
5. Resuspender el sedimento celular en 100 µl de Solución I pre-enfriada a 4°C. Agitar con vórtex.
6. Solubilizar la suspensión de células con 200 µl de Solución II recién preparada. Agitar suavemente la mezcla invirtiendo varias veces el tubo Eppendorf. No agitar con vórtex.
7. Guardar el lisado celular viscoso 5 min en hielo picado hasta que se vuelva completamente transparente.
8. Precipitar el DNA genómico y las proteínas añadiendo 150 µl de Solución III fría (4°C). Agitar suavemente la mezcla invirtiendo varias veces el tubo Eppendorf. No agitar con vórtex.
9. Incubar 5 min en hielo picado. Observar la formación de un precipitado blanco formado por DNA genómico, proteínas y SDS.
10. Centrifugar a 12000xg, 5 min a 4°C.
11. Recuperar y transferir el sobrenadante de centrifugación a un nuevo tubo Eppendorf.
12. Extraer las proteínas solubles del sobrenadante con 200 µl de la fase fenólica de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v). Emulsionar vigorosamente con vórtex.
13. Centrifugar a 12000xg, 5 min a 4°C para separar las fases de la emulsión.
14. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo Eppendorf.
15. Extraer los restos de fenol de la fase acuosa con 200 µl de una solución cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). Emulsionar vigorosamente con vórtex.
16. Centrifugar a 12000xg, 5 min a 4°C para separar las fases de la emulsión.
17. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo Eppendorf.
18. Precipitar el DNA plasmídico y el RNA con 2 volúmenes de alcohol absoluto (Carlo Erba) a Tª amb. Agitar suavemente con vórtex.
19. Incubar en hielo picado 10 min.
20. Centrifugar a 12000xg, 10 min a 4°C para sedimentar el DNA plasmídico y el RNA.
21. Eliminar el sobrenadante de centrifugación por aspiración.
22. Hidratar el DNA plasmídico y el RNA precipitados con 1 ml de etanol 70% (v/v). Agitar suavemente con vórtex.
23. Centrifugar a 12000xg, 10 min a 4°C para sedimentar el DNA plasmídico y el RNA.
24. Eliminar el sobrenadante de centrifugación por aspiración.

25. Secar completamente el DNA plasmídico y el RNA. Para ello, es conveniente utilizar una campana de secado conectada a una bomba de vacío durante 10 min.
26. Resuspender el DNA plasmídico y el RNA en 50 μ l de tampón TE 1x o agua Milli-Q estéril. Si se desea digerir las moléculas de RNA, añadir RNAasa a una concentración final 20 μ g/ml en el tampón TE 1x o agua Milli-Q.
27. Guardar el DNA plasmídico 1 h a 4°C para su total resuspensión.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Solución I: 25mM Tris HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 50mM glucosa; 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	0.30 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O) (Serva)	0.37 g
D-glucosa monohidratada (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O) (Merck)	1 g

Disolver en 90 ml de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 8.0 con HCl 0.2N y enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.

Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos. Observar que no se caramelice la solución.

Conservar a 4°C.

Solución II: 0.2M NaOH, 1% (p/v) SDS; 10 ml

IMPORTANTE: Esta solución debe prepararse poco antes de ser utilizada.

Transferir a un vial 8 ml de agua Milli-Q estéril.

Añadir 1 ml de solución NaOH 2M y 1 ml solución SDS 10% (p/v).

Conservar a T^a amb (en frío precipita el SDS).

Solución III: 3M potasio, 5M acetato; 100 ml

Transferir a un vaso de precipitados 60 ml de solución acetato potásico 5M.

Añadir 11.5 ml de ácido acético glacial (Carlo Erba).

Enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.

Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.

Conservar a 4°C.

Acetato potásico 5M: 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 49.07 g acetato potásico anhidro (C₂H₃KO₂) (Fluka).

Añadir 80 ml de agua Milli-Q y disolver.

Enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.

Conservar a T^a amb.

Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v); 100 ml

Mezclar en un botella de vidrio:

Fenol equilibrado pH \geq 8.0 (libre de DNAasas) (USB)	50 ml
Cloroformo (CHCl ₃) (Carlo Erba)	48 ml
Alcohol isoamílico (C ₅ H ₁₁ OH) (Fluka)	2 ml

Agitar vigorosamente hasta que aparezca una emulsión.

Dejar reposar para separar bien las fases de fenol y cloroformo.

Conservar a 4°C protegido de la luz.

Tampón TE 1x: 10mM Tris HCl pH 8.0, 1mM EDTA; 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	0.12 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O) (Serva)	0.04 g

Disolver en 90 ml de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 8.0 con HCl 0.2M y enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.

Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.

Conservar a T^a amb.

Escala mediprep

Mediprep 12.5 ml de cultivo

1. Inocular una colonia transformante en 12.5 ml de medio 2xYT/Amp a partir de una siembra fresca de agotamiento por estría en medio LB Miller/Amp.
2. Incubar el cultivo a 37°C (clones transformantes XL1-Blue, BL21(DE3) y BL26) o 30°C (clones transformantes MC4100 λ HS1 y todos los transformantes para plásmidos pJX), con agitación a 320 rpm, 12-14 h.
3. Centrifugar el cultivo a 2500xg, 10 min y aspirar totalmente el sobrenadante.
4. Resuspender el sedimento celular en 500 μ l de Solución I pre-enfriada a 4°C. Agitar con vórtex y transferir la suspensión a un tubo Eppendorf estéril.
5. Centrifugar la suspensión a 12000xg, 2 min y aspirar totalmente el sobrenadante.
6. Resuspender el sedimento celular en 200 μ l de Solución I pre-enfriada a 4°C. Agitar con vórtex.
7. Solubilizar la suspensión de células con 400 μ l de Solución II recién preparada. Agitar suavemente la mezcla invirtiendo varias veces el tubo Eppendorf. No agitar con vórtex.
8. Guardar el lisado celular viscoso 5 min en hielo picado hasta que se vuelva completamente transparente.
9. Precipitar el DNA genómico y las proteínas con 300 μ l de Solución III fría (4°C). Agitar suavemente la mezcla invirtiendo varias veces el tubo Eppendorf. No agitar con vórtex.
10. Incubar 5 min en hielo picado. Observar la formación de un precipitado blanco formado por DNA genómico, proteínas y SDS.
11. Centrifugar a 12000xg, 5 min a 4°C.
12. Recuperar y transferir el sobrenadante de centrifugación a uno (o dos) tubo Eppendorf.
13. Extraer por 2 veces las proteínas solubles del sobrenadante con 400 μ l de la fase fenólica de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v) fría. Emulsionar vigorosamente con vórtex.
14. Centrifugar a 12000xg, 5 min a 4°C para separar las fases de la emulsión.
15. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo Eppendorf.
16. Extraer los restos de fenol de la fase acuosa con 400 μ l de una solución cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v). Emulsionar vigorosamente con vórtex.
17. Centrifugar a 12000xg, 5 min a 4°C para separar las fases de la emulsión.
18. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo Eppendorf.
19. Precipitar el DNA plasmídico y el RNA con 0.6 volúmenes de isopropanol (Carlo Erba) a T^a amb. Agitar suavemente con vórtex.
20. Centrifugar a 12000xg, 10 min a T^a amb para sedimentar el DNA plasmídico y el RNA.
21. Eliminar el sobrenadante de centrifugación por aspiración.
22. Hidratar el DNA plasmídico y el RNA con 1 ml de etanol 70% (v/v). Agitar suavemente con vórtex.
23. Centrifugar a 12000xg, 10 min a 4°C para sedimentar el DNA plasmídico y el RNA.
24. Eliminar el sobrenadante de centrifugación por aspiración.
25. Secar completamente el DNA plasmídico y el RNA. Para ello, es conveniente utilizar una campana de secado conectada a una bomba de vacío durante 10 min.
26. Resuspender el DNA plasmídico y el RNA en 200 μ l de tampón TE 1x o agua Milli-Q estéril. Si se desea digerir las moléculas de RNA, añadir RNAasa a una concentración final 40 μ g/ml en el tampón TE 1x o agua Milli-Q.
27. Guardar el DNA plasmídico 2 h a 4°C para su total resuspensión.

Mediprep 50 ml de cultivo

Para la obtención de DNA plasmídico a partir de 50 ml de cultivo se ha utilizado el kit Flexiprep Kit (Pharmacia Biotech). El método utiliza una lisis alcalina estándar que incluye un tratamiento con RNAasa y la precipitación del DNA con isopropanol. Incluye además un paso de purificación de DNA con resina de vidrio Sephaglas™ FP resuspendida en tampón 50mM Tris HCl pH 7.5, 7M cloruro de guanidina, 10mM EDTA. La utilización de esta resina se adecúa a la

purificación de DNA porque, primero, lo une selectivamente a la vez que permite su elución en tampón TE de baja fuerza iónica, y segundo, porque el agente caotrópico necesario para la unión del DNA desnatura y elimina a su vez las proteínas de la muestra. También, y para eliminar moléculas de RNA, se ha optado por centrifugar la muestra obtenida a 5200xg 2-3 min a través de minicolumnas de resina Sephadex G50 (ó G100) Superfine (Pharmacia) hidratada con tampón TE 0.5x.

El rendimiento del método de lisis alcalina es 1-2 µg de DNA plasmídico por ml de cultivo inicial, indistintamente de la escala de trabajo. El rendimiento también está en función del número de copias del plásmido por célula. Habitualmente el número de copias de los plásmidos de clonación (p.e. serie pUC) es muy elevado (500-700 copias/célula), mientras que el de los plásmidos de expresión (p.e. serie pMAL) es menor (15-20 copias/célula).

El DNA plasmídico obtenido a escala miniprep o mediprep se ha conservado congelado a -20°C ó -80°C . El DNA plasmídico obtenido se ha utilizado en procesos de subclonación (restricción y modificación enzimática) y de análisis (electroforesis, cuantificación y secuenciación). El DNA plasmídico obtenido mediante el Flexiprep Kit se ha utilizado preferentemente para los experimentos de co-transfección de células eucariotas con DNA viral.

VI.D.2.A.2. Extracción del DNA viral

El método utilizado para la obtención del DNA viral es el que se describe a continuación:

1. Purificar las partículas víricas que se obtienen de al menos 6 monocapas celulares infectadas en frascos de cultivo de 175 cm² de superficie. Resuspender el sedimento de partículas víricas en 400 µl de tampón frío STE 1x y transferirlo a un vial de poliestireno.
2. Añadir 40 µl de una solución SDS 10% (p/v). Agitar muy suavemente.
3. Incubar la suspensión 5 min a T^a amb. El SDS a la concentración final 1% (p/v) clarifica inmediatamente la suspensión vírica que adquiere una consistencia mucosa indicadora de la liberación del DNA viral al medio.
4. Añadir 44 µl de una solución 5M NaCl agitando suavemente para evitar que la suspensión se vuelva turbia.
5. Extraer por 2 veces las proteínas de la suspensión con 480 µl de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v). Emulsionar mecido MUY suavemente el vial en posición horizontal y no utilizar NUNCA el vórtex para evitar romper la molécula de DNA viral (el DNA del BoHV-1 tiene 135 kb). Utilizar siempre viales de poliestireno.
6. Recuperar la fase acuosa de la emulsión con una punta de pipeta de 1 ml cortada por el extremo. Las tensiones hidrodinámicas que se generan en el pequeño orificio de una punta de pipeta convencional podrían romper la molécula de DNA viral.
7. Realizar una extracción con 480 µl de una solución cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (v/v).
8. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo de poliestireno.
9. Precipitar el DNA viral de la fase acuosa con 2 volúmenes de etanol absoluto (Carlo Erba) a T^a amb. Mecer MUY suavemente el vial en posición horizontal hasta que se forme un precipitado compacto de DNA viral.
10. Transferir el DNA viral precipitado a un tubo Eppendorf.
11. Hidratar el DNA viral con 0.5 ml de etanol 70% (v/v).
12. Centrifugar el vial a 12000xg, 5 min a T^a amb y aspirar el sobrenadante de centrifugación.
13. Realizar 2 lavados más con etanol 70% (v/v).
14. Secar completamente el DNA viral. Para ello, es conveniente utilizar una campana de secado conectada a una bomba de vacío durante 10 min.
15. Resuspender el DNA viral en 100 µl de tampón TE 1x a 4°C, 12-24 h.

El rendimiento de extracción del DNA del BoHV-1 FM proveniente de 6 monocapas celulares infectadas en frascos de cultivo de 175 cm² de superficie es 60-100µg.

VI.D.2.A.3. Recuperación del DNA plasmídico tratado

El DNA plasmídico extraído de clones transformantes se ha usado en reacciones enzimáticas de restricción o de modificación. Posteriormente, el resultado de estos tratamientos se ha analizado mediante electroforesis en geles de agarosa. El DNA tratado puede ser recuperado para nuevas reacciones enzimáticas y estudios analíticos. En este apartado se recoge los métodos utilizados para recuperar el DNA tratado.

VI.D.2.A.3.a. Recuperación del DNA de geles de agarosa

El DNA tratado y analizado por electroforesis en geles de agarosa se ha recuperado mediante los kits comerciales GeneClean™ (BIO 101, Inc.), MERmaid™ Kit (BIO 101, Inc.) y E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit (Omega Biotek). El principio de recuperación del DNA tratado es similar en los tres kits. A continuación se describe el método correspondiente al kit GeneClean™ (BIO 101, Inc.).

1. Visualizar el gel de electroforesis resuelto sobre un transiluminador de luz UV de longitud de onda larga.
2. Extraer la banda de agarosa que contiene el fragmento de DNA de interés con una hoja de bisturí estéril. Transferir la banda recortada a un tubo Eppendorf estéril.
3. Añadir un volumen (en μl) de solución 6M NaI igual a 3 veces el peso (en mg) de la banda recortada (p.e. si la banda recortada pesa 50 mg entonces añadir 150 μl de solución 6M NaI).
4. Fundir la banda de agarosa mediante incubación en baño termostático a 45-55°C 5 min. Agitar suavemente y comprobar la disolución total de la banda.
5. Añadir 5 μl de suspensión GLASSMILK® por cada 5 μg o menos de DNA. Añadir 1 μl más de suspensión por cada 0.5 μg de DNA en exceso.
6. Incubar en hielo picado 5-10 min. Agitar suavemente cada 2 min para mantener el GLASSMILK® en suspensión.
7. Centrifugar la suspensión a 12000xg, 30 seg a Tª amb. Descartar el sobrenadante por aspiración.
8. Resuspender el sedimento de GLASSMILK® con 0.5 ml de solución alcohólica NEW-Wash® fría y guardada en hielo picado durante todo el proceso.
9. Centrifugar la suspensión a 12000xg, 30 seg a Tª amb. Descartar el sobrenadante por aspiración.
10. Repetir 2 veces más el lavado con solución alcohólica NEW-Wash® fría/hielo.
11. Resuspender el sedimento de GLASSMILK® con 10-15 μl de tampón TE 1x o agua Milli-Q estéril. Agitar suavemente con vórtex.
12. Incubar la suspensión en baño termostático a 45-55°C 2-3 min.
13. Centrifugar la suspensión a 12000xg, 30 seg a Tª amb. Recuperar y transferir el sobrenadante a un tubo Eppendorf estéril.
14. Repetir 1 vez más la elución del DNA de la suspensión de GLASSMILK®.

VI.D.2.A.3.b. Recuperación del DNA tratado de la mezcla de reacción

La recuperación del DNA tratado de la mezcla de reacción se ha llevado a cabo mediante los kits GeneClean™ (BIO 101, Inc.) y MERmaid™ Kit (BIO 101, Inc.), o bien según el método de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico seguido de una precipitación alcohólica. En caso de utilizar los kits GeneClean™ o MERmaid™ se ha seguido el método descrito anteriormente obviando únicamente el paso de fusión de la agarosa. El método de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico seguido de una precipitación alcohólica es el que se describe a continuación:

1. Añadir un volumen igual al de la mezcla de reacción de la fase fenólica de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v). Emulsionar mediante agitación con vórtex.
2. Centrifugar a 12000xg, 4 min a T^a amb.
3. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un tubo Eppendorf estéril.
4. Añadir 0,1 volúmenes de solución 3M acetato sódico pH 5.3 estéril. Homogeneizar suavemente la suspensión.
5. Precipitar el DNA con 2 volúmenes de etanol absoluto (Carlo Erba). Agitar con vórtex e incubar 20-30 min en hielo picado.
6. Centrifugar a 12000xg, 10-15 min a 4°C. Descartar el sobrenadante mediante aspiración.
7. Lavar el DNA precipitado con 0.3-0.5 ml de etanol 70% (v/v). Agitar suavemente con vórtex.
8. Centrifugar a 12000xg, 5-10 min. Descartar el sobrenadante mediante aspiración.
9. Secar el DNA precipitado. Para ello, es conveniente utilizar una campana de secado conectada a una bomba de vacío 5 min.
10. Resuspender el DNA precipitado en tampón TE 1x o agua Milli-Q estéril.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración:

Solución 3M acetato sódico pH 5.3; 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 24.61 g de acetato sódico anhidro (C₂H₃NaO₂)(Fluka).
 Disolver en 90 ml de agua Milli-Q.
 Ajustar a pH 5.3 con ácido acético glacial (Carlo Erba) y enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.
 Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.
 Conservar a 4°C.

VI.D.3. Métodos de modificación de DNA

VI.D.3.A.1. Digestión con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción y las soluciones tampón que se ha utilizado han sido suministradas por Boehringer Mannheim, New England Biolabs y Promega (Tabla XXXII).

TABLA XXXII. Enzimas de restricción utilizados en este trabajo experimental

Fabricante	Enzima de restricción					
Boehringer Mannheim	<i>Aafl</i> (A)	<i>Bam</i> HI (B)	<i>Bss</i> HII (A)	<i>Eco</i> RV (B)	<i>Not</i> I (H)	<i>Sal</i> I (H)
	<i>Acc</i> I (A)	<i>Bgl</i> II (M)	<i>Dra</i> I (M)	<i>Hind</i> III (B)	<i>Pst</i> I (H)	<i>Sma</i> I (A)
	<i>Avr</i> II (H)	<i>Bst</i> XI (H)	<i>Eco</i> RI (H)	<i>Nco</i> I (H)	<i>Sac</i> I (A)	<i>Xba</i> I (H)
New England Biolabs	<i>Msc</i> I (NEBuffer 4)					
Promega	<i>Acc</i> 65I (D)					

La cantidad de DNA plasmídico o viral que se ha usado para digerir oscila entre 0.2-5 µg en un volumen final de digestión de 8-40 µl dependiendo, respectivamente, de si la digestión tenía un carácter analítico o preparativo. Se ha llevado a cabo digestiones totales de DNA con 1-10 unidades de enzima por µg de DNA durante 1-2 h, a la T^a óptima de actividad de la enzima indicada por el fabricante. El DNA ha sido digerido por una o varias enzimas intercalando pasos de recuperación del DNA. En los casos de compatibilidad de las condiciones óptimas de restricción de dos enzimas se ha digerido el DNA utilizando ambas enzimas simultáneamente.

VI.D.3.A.2. Modificación enzimática del DNA

En este apartado se describe los métodos enzimáticos usados para la modificación del DNA, esto es, la defosforilación de extremos 5'-fosfato, la ligación de fragmentos de DNA, la conversión de extremos cohesivos a extremos romos, el marcaje de DNA y la obtención de delecciones anidadas de DNA.

VI.D.3.A.2.a. Defosforilación de extremos 5'-fosfato

La fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIAP) es una glicoproteína dimérica de 140 kDa con actividad serina hidrolasa, que cataliza la eliminación de los grupos 5'-fosfato de los extremos de DNA, RNA y de ribonucleósidos- y desoxiribonucleósidos-trifosfato. La defosforilación de extremos 5'-fosfato se ha llevado a cabo sobre moléculas de DNA lineales con la intención de optimizar los procesos de ligación no direccionales. Se ha defosforilado el DNA plasmídico linearizado para evitar que éste recirculice en ausencia de un fragmento de DNA a insertar. Alternativamente, también se ha defosforilado el DNA a insertar para evitar que se encadenen varios fragmentos del mismo. La defosforilación de extremos 5'-fosfato asegura por tanto que el clon transformante seleccionado sea portador de un plásmido que ha incorporado un fragmento de DNA. El método utilizado es el que se describe a continuación:

1. Linearizar 0.2-0.5 µg de DNA plasmídico mediante restricción.
2. Recuperar el DNA plasmídico linearizado. Resuspender el DNA recuperado en 18 µl de agua Milli-Q estéril.
3. Añadir 2 µl de tampón de defosforilación 10x (0.5M Tris HCl pH 8.5, 1mM EDTA) (Boehringer Mannheim). Agitar suavemente para homogeneizar la mezcla.
4. Añadir 0.5-1 µl de CIAP (Boehringer Mannheim) preparada a 1 unidad/µl. Agitar suavemente para homogeneizar la mezcla.
5. Incubar en baño termostático a 37°C, 2 h.
6. Inactivar la CIAP con 0.1 volúmenes de una solución 0.5M EDTA pH 8.0 e incubando en un baño termostático a 70°C, 10 min.
7. Recuperar el DNA según el método de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico seguido de precipitación alcohólica.

El DNA defosforilado y recuperado se ha utilizado posteriormente en reacciones de ligación de fragmentos de DNA.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

EDTA 0.5M pH 8.0: 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 18.61 g EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O) (Serva).
 Disolver en 80 ml de agua Milli-Q. El EDTA no se disuelve totalmente hasta que no se ajusta el pH de la mezcla.
 Ajustar a pH 8.0 con NaOH 1M y enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.
 Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.
 Conservar a T° amb.

VI.D.3.A.2.b. Ligación de fragmentos de DNA

La T4 DNA ligasa es una proteína de 68 kDa del bacteriófago T4 que cataliza la formación del enlace fosfodiéster entre extremos yuxtapuestos 3'-hidroxilo y 5'-fosfato de DNA doble hebra. El método utilizado es el que se describe a continuación:

1. Digerir 0.2-0.5 µg de DNA plasmídico con 1 ó 2 enzimas de restricción. Recuperar el DNA plasmídico linearizado.
2. Digerir y recuperar el fragmento de DNA a insertar.
3. Mezclar el DNA plasmídico y el fragmento de DNA a insertar en una proporción molar 1:2. En un caso particular de ligación direccional con extremos *Bam*HI (GATC) y *Acc*65I (GTAC) no compatibles, ha resultado decisivo incubar dicha mezcla 5 min a 45°C y 5 min en hielo picado para evitar la religación del plásmido.
4. Añadir 0.1 volúmenes de tampón de ligación 10x (0.66M Tris HCl pH 7.5, 50mM MgCl₂, 10mM ditioeritritol (DTE), 10mM ATP) (Boehringer Mannheim).
5. Añadir 0.5-2 µl de T4 DNA ligasa (Boehringer Mannheim) preparada a 1 unidad/µl.
6. Incubar en baño termostático a 16°C, 14-16 h (ligación de extremos cohesivos) ó 4°C, 14-16 h (ligación de extremos romos).

En este trabajo experimental, la ligación de fragmentos de DNA ha sido generalmente direccional, es decir, que han participado extremos preferentemente cohesivos y no compatibles de como mínimo 2 enzimas de restricción distintas. De esta manera, la inserción del fragmento de DNA sólo ha podido ocurrir en una dirección. Cuando en la reacción de ligación ha intervenido tan sólo 1 diana de restricción, ó 2 con extremos compatibles entre sí, la inserción se ha podido dar en los dos sentidos. En este caso, además, el plásmido puede cerrarse incorporando ninguna, una o varias copias del fragmento. Para evitar estos fenómenos de religación o de inserción múltiple, se ha defosforilado los extremos 5' del plásmido o del fragmento a insertar, respectivamente. Por otro lado, cuando en la reacción de ligación han mediado extremos romos se ha duplicado las cantidades de los fragmentos de DNA a unir. El producto de una reacción de ligación se ha utilizado directamente para la transformación de células competentes.

Un caso particular de ligación de fragmentos de DNA ha sido la inserción de adaptadores de DNA. Los adaptadores utilizados tienen un tamaño de 14-51 pb y cada uno está formado por dos oligonucleótidos complementarios en su secuencia. La relevancia de la inserción de estos fragmentos ha llevado a establecer un método que rentabilice el proceso de selección de los clones transformantes de interés. El método utilizado es el que se describe a continuación:

1. Transferir 0.2 µg de DNA plasmídico linearizado a un tubo Eppendorf estéril en un volumen de 1-4 µl (0.2-0.05 µg/µl).
2. Añadir 0.8 µl de tampón TE 10x.
3. Diluir 5 µl de solución de adaptador preparada a 43.74 pmol/µl en 20 µl de agua Milli-Q. Se obtienen 25 µl de solución de adaptador a 8.75 pmol/µl.
4. Añadir 1-3 µl de solución de adaptador (8.75 pmol/µl) a la mezcla de reacción de manera que la relación molar adaptador:plásmido sea 250:1. En la Tabla XXXIII se indica el volumen de adaptador a añadir para cumplir con un exceso molar 250x y según sea el tamaño del plásmido linearizado.
5. Ajustar el volumen total de la mezcla de reacción a 8 µl con agua Milli-Q estéril. Homogeneizar suavemente con agitación.
6. Incubar en un baño termostático a 42°C, 5 min.
7. Incubar en hielo picado 10 min.
8. Añadir 5.5 µl de agua Milli-Q estéril a la mezcla de reacción.
9. Añadir 1.5 µl de tampón de ligación 10x (Boehringer Mannheim). Homogeneizar suavemente con agitación.
10. Añadir 1 µl de T4 DNA ligasa (Boehringer Mannheim) preparada a 1 unidad/µl.
11. Incubar en baño termostático a 16°C, 14-16 h (ligación de extremos cohesivos) ó 4°C, 14-16 h (ligación de extremos romos).

TABLA XXXIII. Cantidad de adaptador en la mezcla de reacción

Plásmido linearizado (0.2 µg)		Adaptador de DNA	
pb	pmol/reacción	pmol/reacción (exceso molar 250x)	Volumen (µl) de solución 8.75 pmol/µl
3000	0.1026	25.65	2.93
3500	0.0879	21.97	2.51
4000	0.0769	19.22	2.19
4500	0.0684	17.10	1.95
5000	0.0615	15.37	1.75
5500	0.0559	13.97	1.59
6000	0.0513	12.82	1.46
6500	0.0473	11.82	1.35
7000	0.0439	10.97	1.25
7500	0.0410	10.25	1.17
8000	0.0385	9.62	1.10

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón TE 10x: 100mM Tris HCl pH 8.0, 10mM EDTA; 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva) 1.2 g
 EDTA (C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈·2H₂O) (Serva) 0.4 g

Disolver en 90 ml de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 8.0 con HCl 0.2M y enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.

Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.

Conservar a T° amb.

En este trabajo experimental se ha observado que, al transformar células competentes con el DNA plasmídico que incorpora adaptadores, un 5-25% de los clones transformantes obtenidos son portadores del plásmido religado. Los porcentajes extrañamente elevados de religación se pueden deber a digestiones incompletas del plásmido.

VI.D.3.A.2.c. Conversión de extremos 5' protruyentes a extremos romos (Klenow)

Para convertir extremos 5'-fosfato protruyentes en extremos romos se ha utilizado el fragmento Klenow de 76 kDa de la DNA polimerasa I de *E. coli*. Este fragmento constituye la subunidad grande (aminoácidos 326-928) de la holoenzima y conserva las actividades polimerasa 5'→3' DNA dependiente y exonucleasa 3'→5' de la enzima nativa. En presencia de Mg⁺² y de los mononucleótidos (dNTPs) necesarios, Klenow cataliza la adición de éstos al extremo 3'-hidroxilo de una cadena de DNA doble hebra hasta convertir el extremo 5' protruyente en romo. El método utilizado es el que se describe a continuación:

1. Linearizar 0.2-0.5 µg de DNA con un enzima de digestión que genera extremos cohesivos 5' protruyentes. Recuperar el DNA plasmídico linearizado en 20 µl de agua Milli-Q estéril.
2. Añadir 1.5 µl de una solución de dNTPs preparada a una concentración 2.5mM.
3. Añadir 2.5 µl de tampón Klenow 10x. Agitar suavemente para homogeneizar la mezcla.
4. Añadir 1 µl de Klenow (Boehringer Mannheim) preparada a 2 unidades/µl. Agitar suavemente para homogeneizar la mezcla.
5. Incubar la reacción en baño termostático a 37°C, 2 h.

El DNA con extremos romos obtenido se ha utilizado directamente en las reacciones de ligación de fragmentos. Esto ha sido posible porque el tampón Klenow es compatible con el tampón de la reacción de ligación. En ocasiones, el DNA modificado con Klenow ha sido digerido con enzimas de restricción. En tal caso, primero se ha recuperado el DNA modificado mediante el método de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico seguido de precipitación alcohólica.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón Klenow 10x: 0.5M Tris HCl pH 7.6, 0.1M MgCl₂; 10 ml

Pesar y poner en un vial 0.6 g Tris base (Serva).
 Disolver en 8 ml de agua Milli-Q.
 Añadir 1 ml de MgCl₂ 1M
 Ajustar a pH 7.6 con HCl 1M y enrasar a 10 ml con agua Milli-Q.
 Esterilizar por filtración con filtro de acetato de celulosa 0.22 µm (Millipore, Corning).
 Preparar alícuotas y conservar congelado a -20°C.

MgCl₂ 1M; 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 20.33 g cloruro magnésico hexahidratado (MgCl₂·6H₂O) (Fluka).
 Disolver en 80 ml de agua Milli-Q.
 Enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.
 Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.
 Conservar a T^a amb.

VI.D.3.A.2.d. Conversión de extremos 5' protruyentes a extremos romos (Mung Bean)

Para convertir extremos 5'-fosfato protruyentes en extremos romos también se ha utilizado la enzima nucleasa Mung Bean, extraída de brotes de *Phaseolus aureus*. La nucleasa Mung Bean es una glicoproteína pequeña de 35-39 kDa formada por dos subunidades que degrada preferentemente DNA monohebra y RNA con una combinación de actividades 5' exonucleasa y endonucleasa. No obstante, la nucleasa Mung Bean también tiene actividad 5' exonucleasa sobre extremos 5' protruyentes de moléculas de DNA doble hebra. Mung Bean genera extremos romos si el par de bases terminal del DNA tratado va a ser GC. Por el contrario, cuando el par de bases terminal en la molécula de DNA va a ser AT, Mung Bean genera con mayor frecuencia extremos desiguales no romos. El método utilizado es el que se describe a continuación:

1. Linearizar 0.5-1 µg de DNA con una enzima de digestión que genere extremos cohesivos 5' protruyentes. Recuperar el DNA plasmídico linearizado en 50 µl de agua Milli-Q estéril.
2. Añadir 10 µl de tampón de nucleasa Mung Bean 10x (0.3M acetato sódico pH 4.6, 0.5M NaCl, 10mM acetato de zinc, 0.01% Triton X-100) (Boehringer Mannheim).
3. Añadir 30 µl de agua Milli-Q. Agitar suavemente para homogeneizar la mezcla.
4. Añadir 10 µl de una suspensión de nucleasa Mung Bean (Boehringer Mannheim) preparada a 0.1-0.25 unidades/µl en tampón de nucleasa Mung Bean 1x.
5. Incubar la reacción en baño termostático a 25°C.
6. Extraer alícuotas de 33 µl cada 20 min. Añadir en cada alícuota 1 µl 0.5M EDTA pH 8.0, homogeneizar suavemente la mezcla e incubar en hielo picado. Estas alícuotas son muestras progresivas de la reacción de conversión de extremos cohesivos a extremos romos.
7. Añadir 3.4 µl (0.1 volúmenes) de 5M NaCl. Agitar suavemente para homogeneizar la mezcla.
8. Añadir 38 µl (1 volumen) de la fase fenólica de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v/v). Emulsionar mediante agitación con vórtex.
9. Centrifugar a 12000xg, 4 min a T^a amb.
10. Recuperar la fase acuosa y transferirla a un tubo Eppendorf estéril.
11. Precipitar el DNA con 3 volúmenes de etanol absoluto. Agitar con vórtex e incubar 20-30 min en hielo picado.
12. Centrifugar a 12000xg, 10-15 min a 4°C. Descartar el sobrenadante mediante aspiración.

13. Hidratar el DNA precipitado con 0.5 ml de etanol 70% (v/v). Agitar suavemente con vórtex.
14. Centrifugar a 12000xg, 5-10 min. Descartar el sobrenadante mediante aspiración.
15. Secar el DNA precipitado. Para ello, es conveniente utilizar una campana de secado conectada a una bomba de vacío 5 min.
16. Resuspender el DNA precipitado en 10 μ l de tampón TE 1x o agua Milli-Q estéril.

El DNA tratado con nucleasa Mung Bean y posteriormente recuperado se ha usado en reacciones de restricción de DNA y en reacciones de ligación de fragmentos.

VI.D.3.A.2.e. Marcaje no radiactivo de DNA

Durante el desarrollo de este trabajo experimental se ha utilizado técnicas de hibridación del DNA como método analítico para confirmar la presencia o ausencia de una determinada secuencia de DNA en el genoma de un virus recombinante. La hibridación del DNA se ha llevado a cabo sobre transferencia Southern o directamente sobre placas de cultivo (hibridación *in situ*). El principio de detección es el mismo en ambos métodos: un fragmento de DNA desnaturalizado, marcado no radiactivamente y con idéntica secuencia a aquélla que se quiere localizar, rastrea el genoma viral en busca de su secuencia complementaria. En caso de hallarla se une a ella, y al estar marcado se puede localizar a ambos. Este fragmento de DNA recibe el nombre de DNA sonda. En este apartado se describe el método utilizado para obtener un DNA sonda.

El marcaje de los DNA sonda utilizados se ha realizado según el método descrito en el "DIG DNA Labelling and Detection Kit" (Boehringer Mannheim). Este método se basa en la técnica de cebadores al azar. Se trata de utilizar una mezcla de oligonucleótidos (en el kit son hexanucleótidos) sintetizados al azar que actúan de cebadores para la actividad polimerasa 5'→3' del fragmento Klenow. Los hexanucleótidos que hallan su secuencia complementaria sobre la secuencia de DNA que se pretende marcar hibridarán con ella y servirán de iniciadores para la síntesis de la cadena de DNA complementaria. En la mezcla de reacción también hay análogos de nucleótidos que se incorporan a la cadena en síntesis a la vez que la marcan de manera específica. Los análogos utilizados en este trabajo han sido DIG-11-dUTP y BIO-16-dUTP, ambos análogos del dTTP. Estos análogos son una molécula de dUTP que lleva ligada una molécula de digoxigenina (DIG) o biotina (BIO) a la base nitrogenada. El producto final de la reacción es un cóctel de cadenas de DNA complementarias a ambas cadenas del fragmento a marcar, que llevan incorporadas moléculas DIG (o BIO). Estos fragmentos de DNA marcados se denominan DNA sonda. La utilización de anticuerpos anti-DIG (o anti-BIO) conjugados a fosfatasa alcalina (anti-DIG/AP o anti-BIO/AP, respectivamente) permitirá localizar mediante la reacción cromogénica de la fosfatasa alcalina el lugar de apareamiento del cóctel de sondas.

El método utilizado para el marcaje no radiactivo de DNA es el que se describe a continuación:

1. Transferir 0.5-1 μ g de DNA lineal puro, con secuencia nucleotídica idéntica a la que se quiere localizar en el genoma viral, a un tubo Eppendorf en un volumen \leq 15 μ l.
2. Desnaturalizar el DNA a 95°C durante 10 min.
3. Enfriar rápidamente el tubo en un baño de agua/hielo. Incubar 3 min.
4. Añadir 2 μ l de mezcla de hexanucleótidos en tampón de reacción 10x (Boehringer Mannheim) y 2 μ l de mezcla de dNTP 10x (1mM de dATP, dCTP y dGTP, 0.65mM dTTP, 0.35mM dUTP*DIG, pH 6.5) (Boehringer Mannheim).
5. Enrasar, si procede, a 19 μ l con agua Milli-Q estéril.
6. Añadir 1 μ l de Klenow (Boehringer Mannheim) preparada a 2 unidades/ μ l.
7. Homogeneizar e incubar en baño termostático a 37°C, durante 1-8 h.
8. Parar la reacción con 2 μ l de 0.2M EDTA pH 8.0.
9. Precipitar el DNA con 2 μ l de 5M NaCl y 75 μ l de etanol absoluto (Carlo Erba) frío (-20°C).

10. Homogeneizar la suspensión. Incubar durante 2h a -80°C .
11. Centrifugar a 12000xg, 30 min 4°C . Descartar el sobrenadante de centrifugación mediante aspiración.
12. Lavar el DNA precipitado con 40 μl de etanol 70% (v/v) frío (-20°C).
13. Centrifugar a 12000xg, 5-10 min. Descartar el sobrenadante de centrifugación mediante aspiración.
14. Secar el DNA precipitado. Para ello, es conveniente utilizar una campana de secado conectada a una bomba de vacío 5 min.
15. Resuspender el DNA sonda precipitado en 50 μl de tampón TE 1x.

El DNA sonda, antes de aplicarlo a la solución de hibridación, se deberá desnaturalizar a 95°C durante 10-15 min, y enfriar rápidamente en un baño de agua/hielo durante 5-10 min.

VI.D.3.A.2.f. Deleciones anidadas de DNA

Para la obtención de deleciones anidadas de DNA se ha utilizado la nucleasa BAL-31 de *Alteromonas espejiana*. BAL-31 es una enzima dependiente de calcio y magnesio, con actividad exonucleolítica $3' \rightarrow 5'$, que elimina mononucleótidos de moléculas de DNA doble hebra. BAL-31 también tiene actividad exonucleolítica $5' \rightarrow 3'$ y endonucleolítica sobre DNA monohebra. La combinación de las dos actividades exonucleolíticas conlleva que la molécula de DNA doble hebra lineal pierda mononucleótidos en ambos extremos. Por otro lado, en toda preparación comercial de BAL-31 existen dos formas cinéticamente distintas de la nucleasa: una forma F ('fast') de 105 kDa y una forma S ('slow') de 85 kDa, más lenta, que es un producto de degradación proteolítica de la primera. La velocidad con la que BAL-31 digiere el DNA está en función de la proporción de formas F y S en la preparación utilizada. El producto de digestión de DNA doble hebra con BAL-31 es, por consiguiente, un conjunto de deleciones muy heterogéneo en cuanto a tamaño.

En este trabajo se ha utilizado BAL-31 para digerir DNA doble hebra linearizado. Se obtiene así un conjunto de deleciones unidireccionales desde el punto de linearización del DNA. El resultado final es que en el DNA remanente de la digestión quedan representadas dichas deleciones de manera que, a modo de 'матрёшка' (muñeca rusa), una deleción mayor comprende a su vez una deleción menor. Se habla entonces de deleciones anidadas.

El método utilizado para la obtención de deleciones anidadas es el que se describe a continuación:

1. Transferir 2-2.5 μg de un plásmido doble hebra linearizado y recuperado en 38 μl de tampón TE 1x, o agua Milli-Q estéril, a un tubo Eppendorf estéril.
2. Añadir 10 μl de tampón BAL-31 5x. Agitar suavemente con vórtex.
3. Extraer una alícuota de 8 μl de la mezcla de reacción. Añadir a ésta 1 μl 0.5M EDTA pH 8.0, incubarla en hielo picado 2 min y guardarla a -20°C . Esta alícuota constituye el control de no-deleción.
4. Incubar la mezcla de reacción en un baño termostático a 30°C .
5. Añadir 1 μl de BAL-31 (Boehringer Mannheim) preparada a 0.5 unidades/ μl en tampón BAL-31 1x.
6. Extraer alícuotas de 8 μl cada 2 min. Para cada alícuota, añadir 1 μl 0.5M EDTA pH 8.0, incubarla en hielo picado 2 min y guardarla a -20°C . Estas alícuotas son las muestras de deleción progresiva.
7. Añadir a cada alícuota obtenida 9 μl de agua Milli-Q estéril y 2 μl de solución 3 M acetato sódico pH 5.3. Agitar suavemente con vórtex.
8. Recuperar el DNA tratado de cada alícuota según el método de extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y precipitación alcohólica.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración:

Tampón BAL-31 5x: 0.1M Tris HCl pH 7.2, 3M NaCl, 62.5mM MgCl_2 , 62.5mM CaCl_2 , 5mM EDTA; 50 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	0.60 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	8.77 g
Cloruro magnésico hexahidratado (MgCl ₂ ·6H ₂ O) (Fluka)	0.63 g
Cloruro cálcico dihidratado (CaCl ₂ ·2H ₂ O) (Fluka)	0.46 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O) (Serva)	0.09 g

Disolver en 45ml de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 7.2 con HCl 1M y enrasar a 50 ml con agua Milli-Q.

Esterilizar por filtración con filtro de acetato de celulosa 0.22 µm (Millipore, Corning).

Inactivar DNAasas mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.

Preparar alícuotas y conservar congelado a -20°C.

VI.D.3.A.3. Síntesis de adaptadores de DNA

Los adaptadores de DNA son pequeños fragmentos de DNA doble hebra utilizados tradicionalmente para introducir nuevas dianas de restricción en una secuencia dada. En este trabajo se ha utilizado pequeños fragmentos de DNA doble hebra para insertar o substituir secuencias de aminoácidos en la MBP y en la β-galactosidasa, sin que por ello se haya introducido necesariamente nuevas dianas de restricción. Aún así, se ha preferido mantener el término adaptadores de DNA para designar al conjunto de todos ellos.

Los adaptadores se han formado por hibridación de dos oligonucleótidos complementarios en su secuencia. Estos oligonucleótidos han sido sintetizados químicamente a pequeña escala (0.01-0.05 µmolar) y sin fosforilar su extremo 5', purificados por un procedimiento estándar y servidos liofilizados (Boehringer Mannheim). Los oligonucleótidos han sido diseñados para, habiendo formado el adaptador, generar extremos compatibles con dianas de restricción de los genes *malE* y *lacZ*. Los oligonucleótidos que se consideran codificantes (aquellos cuya secuencia coincide con el mRNA) han sido diseñados, en su mayoría, en el uso de codón óptimo de *E. coli*.

El método utilizado para la síntesis de los adaptadores de DNA es el que se describe a continuación:

1. Rehidratar cada oligonucleótido en un volumen de agua Milli-Q estéril tal que su concentración final sea 100 pmoles/µl.
2. Transferir 2.86 µl de 'Annealing Buffer' (suministrado en el kit de secuenciación de DNA ^{T7}Sequencing™ Kit de Pharmacia) a un tubo Eppendorf estéril. Este tampón contiene MgCl₂ y DTT.
3. Añadir 10 µl de ambas suspensiones de oligonucleótido preparadas a 100 pmol/µl. Homogeneizar suavemente la mezcla.
4. (Opcional) Incubar en baño termostático a 80°C, 1 min.
5. Incubar en baño termostático a 65°C, 5 min.
6. Incubar en baño termostático a 37°C, 10 min.
7. Incubar a T^a amb 10 min.
8. Conservar la solución de adaptador en hielo picado si se va a utilizar de inmediato. De lo contrario, guardar a -20°C.

La solución preparada constituye la solución madre del adaptador y su concentración es de 43.74 pmol/µl. La composición (%G+C) y la longitud de los oligonucleótidos han condicionado las temperaturas de incubación durante la síntesis de los adaptadores. A pesar de que la incubación a 80°C se señala como opcional, en la síntesis de más del 70% de los adaptadores se ha incluido este paso ya que la temperatura de fusión termodinámica (T_m, de 'melting temperature') de los distintos oligonucleótidos supera, a veces ampliamente, los 75°C.

VI.D.4. Métodos de análisis de DNA

VI.D.4.A.1. Electroforesis horizontal en geles de agarosa

La electroforesis horizontal en geles de agarosa se basa en la migración diferencial que tienen los fragmentos de DNA de diferente tamaño cuando, embebidos en un gel de agarosa, son sometidos a un campo eléctrico. De esta manera se puede analizar el número y la distribución de tamaños de los fragmentos de DNA en una muestra. Esta técnica se convierte en una metodología analítica y preparativa muy útil si se combina con un sistema de recuperación de DNA tratado a partir de geles de agarosa.

En este trabajo se ha utilizado la electroforesis horizontal en geles de agarosa para analizar el patrón de fragmentos que se obtienen tras digerir DNA plasmídico o viral con enzimas de restricción. En la preparación de los geles de agarosa se ha utilizado siempre agarosa de baja electroendósmosis (FMC, Ecogen) a una concentración 0.5-2 % (p/v) en función del tamaño de los fragmentos que interesaba resolver: 0.5% (p/v) para resolver fragmentos ≥ 8 kb y 2% (p/v) para resolver fragmentos ≤ 400 pb. Todas las electroforesis se han desarrollado en tampón Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE 1x).

El método utilizado para llevar a cabo electroforesis horizontal en geles de agarosa es el que se describe a continuación:

Preparación del gel de agarosa

1. Pesar y poner en un frasco Erlenmeyer la cantidad de agarosa (FMC, Ecogen) necesaria en función del volumen de gel y del porcentaje de agarosa final deseado.
2. Añadir un volumen de TAE 1x equivalente al volumen final de gel a preparar. Los geles de mayor tamaño se han utilizado para analizar el patrón de restricción del DNA genómico viral.
3. Fundir la agarosa en un microondas llevando la mezcla repetidamente al punto de ebullición. Agitar suavemente para homogeneizar la mezcla.
4. Atemperar la solución a T^a amb hasta aprox. 45-50°C.
5. Colocar el molde que da forma al gel sobre una superficie horizontal. Colocar el "peine" que da forma a los pocillos de aplicación de muestra escorado a un extremo del molde. Verter la agarosa en el molde y dejar solidificar el gel a T^a amb.
6. Retirar el "peine" y colocar el gel en la cubeta de electroforesis. Llenar la cubeta de tampón TAE 1x hasta cubrir en 1-2 mm la superficie del gel.

Carga de muestra y electroforesis

7. Añadir 0.33 volúmenes de tampón de aplicación de DNA 4x a las muestras que se desea analizar. Agitar suavemente para homogeneizar la mezcla. El tampón de aplicación de DNA, a la vez que secuestra iones Mg⁺² necesarios en una actividad enzimática, confiere una mayor densidad a la muestra haciendo más fácil su aplicación en el gel de electroforesis.
8. Aplicar un volumen de cada muestra preparada en un pocillo. Aplicar también los marcadores de pesos moleculares.
9. Aplicar un campo eléctrico en la cubeta de electroforesis. El DNA, cargado negativamente, migra hacia el polo positivo (ánodo). La electroforesis horizontal de DNA se ha desarrollado siempre a voltage constante (40-80 V) y a T^a amb. Para analizar el patrón de restricción de un genoma viral, y para conseguir una mejor resolución de los diferentes fragmentos, se ha aplicado un voltage de 25-30 V durante 14-16 h a 4°C.
10. Parar el campo eléctrico cuando el marcador (azul de bromofenol) del tampón de aplicación de DNA alcanza las 3/4 partes del recorrido total del gel.

Tinción del gel

11. Extraer el gel de la cubeta de electroforesis.

12. Sumergir el gel en una bandeja con tampón TAE 1x y 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Agitar suavemente a T^a amb durante 15-20 min.
13. Visualizar el DNA en el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta. El bromuro de etidio es un agente intercalante que emite fluorescencia cuando se aplica luz ultravioleta.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón TAE 50x; 1 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	242.0 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O) (Serva)	18.6 g

Disolver en 800ml de agua Milli-Q.

Añadir 57.1 ml de ácido acético glacial (Carlo Erba).

Comprobar que la solución tiene pH 8.0 y enrasar a 1 L con agua Milli-Q.

Conservar a T^a amb.

Tampón de aplicación de DNA 4x: 8% (v/v) Glicerol, 8% (v/v) 0.5 M EDTA pH 8.0, 1.6% (p/v) SDS, 0.08% (p/v) azul de bromofenol; 5 ml

Pesar y poner en un tubo Eppendorf estéril:

SDS (Fluka)	80 mg
Azul de bromofenol (Merck)	4 mg

Disolver en 4.14 ml de agua Milli-Q estéril.

Añadir 0.4 ml de 0.5M EDTA pH 8.0 estéril.

Añadir 0.46 ml de glicerol 87% (p/v) (Fluka) estéril.

Agitar el tubo con vórtex suavemente para homogeneizar la mezcla.

Conservar a T^a amb.

En una electroforesis en gel de agarosa los fragmentos de DNA se separan de manera directamente proporcional al logaritmo de su tamaño. Se puede determinar el tamaño de un fragmento de DNA comparando su migración con el patrón de migración de los marcadores de peso molecular, que son fragmentos de tamaño conocido. Los marcadores de peso molecular de DNA más utilizados han sido λ /BstEII (Sigma, New England Biolabs), λ /HindIII (Sigma, Boehringer Mannheim), λ /EcoRI HindIII (Sigma, Boehringer Mannheim) y pBR328/BglI + pBR328/HinfI (Boehringer Mannheim).

VI.D.4.A.2. Cuantificación del DNA

La cuantificación del DNA consiste en valorar numéricamente la concentración de DNA de la muestra. La cuantificación puede ser espectrofotométrica o bien por fluorescencia a partir de geles de agarosa.

VI.D.4.A.2.a. Cuantificación espectrofotométrica

La cuantificación espectrofotométrica permite cuantificar el DNA de la muestra y determinar el grado de contaminación por RNA. Este método se ha utilizado para cuantificar muestras puras de DNA viral y de DNA plasmídico obtenidos por métodos semipreparativos. La cuantificación ha permitido ajustar las cantidades requeridas de ambos DNA en los experimentos de co-transfección de células eucariotas. El método utilizado es el que se describe a continuación:

1. Preparar una dilución 1:200 - 1:500 de las muestras de DNA en tampón TE 1x.
2. Transferir 1 ml de tampón TE 1x a una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Medir al espectrofotómetro la A entre λ 320nm y λ 220nm (realizar una lectura de barrido). Se configura así el blanco de absorbancia del tampón TE 1x.
3. Transferir 1 ml de muestra diluida a la misma cubeta. Medir al espectrofotómetro la A entre λ 320nm y λ 220nm (realizar una lectura de barrido).

Si se aplica una solución homogénea de ácidos nucleicos, la lectura presenta un perfil característico con un máximo de absorbancia a aprox. λ 260nm, un mínimo a aprox. λ 230nm y un ligero repunte de absorbancia a λ 220nm. Teniendo en cuenta que un valor $A_{260} = 1$ corresponde aprox. a 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA doble hebra o a 40 $\mu\text{g/ml}$ de DNA monohebra, el valor de absorbancia a λ 260nm nos permite calcular la concentración de DNA en la muestra aplicada. Si consideramos, además, la dilución realizada para la lectura, hallaremos la concentración de DNA en la muestra inicial. La relación entre los valores de absorbancia a λ 260nm y λ 280nm (A_{260}/A_{280}) nos da una estimación de la pureza del DNA. Preparaciones puras de DNA y RNA tienen unos valores de relación A_{260}/A_{280} de 1.8 y 2.0, respectivamente. Si la relación A_{260}/A_{280} de la muestra aplicada es superior a 1.8 deduciremos que la muestra presenta contaminación por RNA.

VI.D.4.A.2.b. Cuantificación en geles de agarosa

La cuantificación en geles de agarosa consiste en estimar la concentración de DNA a partir de la intensidad de fluorescencia, inducida por luz ultravioleta, que emiten las moléculas de bromuro de etidio intercaladas en el DNA. Dado que la intensidad de fluorescencia es directamente proporcional a la masa de DNA, se puede estimar la cantidad de DNA de la muestra comparando su fluorescencia con la que emite un patrón conocido. Este método es el que se ha utilizado con mayor frecuencia, siempre que se disponía de poca cantidad de DNA, o cuando las muestras contenían contaminantes que absorbían luz ultravioleta que invalidaban el análisis espectrofotométrico. El método utilizado es el que se describe a continuación:

1. Preparar un gel de agarosa a un porcentaje acorde al tamaño del fragmento de DNA que se quiere cuantificar.
2. Aplicar la muestra y un volumen de marcador de peso molecular de concentración conocida. Correr la electroforesis.
3. Teñir el gel y visualizar el patrón de bandas sobre un transiluminador de luz ultravioleta.
4. Estimar la cantidad aplicada de DNA muestra comparando la fluorescencia que emite con la que emite un fragmento de tamaño similar del marcador molecular. Conocida la dilución realizada durante la preparación de la muestra aplicada, se puede calcular la concentración de DNA en la muestra inicial.

En la Tabla XXXIV se ilustran tres ejemplos de diferentes marcadores de peso molecular para los que se ha calculado la cantidad de masa correspondiente a cada fragmento, de tamaño conocido, en función de la cantidad total de marcador aplicada.

TABLA XXXIV. Equivalencia en masa de los fragmentos del marcador de peso molecular de DNA

Marcador: λ /EcoRI HindIII Concentración: 203 ng/ μl Volumen aplicado: 2 μl		Marcador: λ /BstEII Concentración: 200 ng/ μl Volumen aplicado: 2 μl		Marcador: λ /HindIII Concentración: 180 ng/ μl Volumen aplicado: 2.25 μl	
pb fragmento	ng DNA	pb fragmento	ng DNA	pb fragmento	ng DNA
21226	177.68	8454	69.72	23130	192.13
5184	43.39	7242	59.72	9416	78.62
4973	41.62	6369	52.52	6557	54.75
4277	35.80	5686	46.89	4361	36.41
3530	29.55	4822	39.77	2322	19.39
2027	16.97	4324	35.66	2027	16.92
1904	15.93	3675	30.31	564	4.71
1584	13.26	2323	19.16	125	1.04
1330	11.13	1929	15.91		
983	8.23	1371	11.31		
831	6.96	1264	10.42		
564	4.72	702	5.79		
125	1.05	224	1.85		
		117	0.96		
<i>total</i>	48502	406	48502	400	48502
					405

VI.D.4.A.3. Transferencia Southern

La transferencia Southern (Southern, 1975) es un método analítico que permite responder a la pregunta... ¿en cuál de los diferentes fragmentos de un patrón de restricción conocido se halla la secuencia de DNA complementaria a un fragmento de DNA sonda?. En el contexto de este trabajo experimental, mediante la transferencia Southern se ha pretendido confirmar la incorporación y localización de una determinada secuencia de DNA en el genoma del BoHV-1.

El análisis de transferencia Southern realizado ha consistido en:

- a) separar los fragmentos de DNA del genoma del virus según un patrón de restricción conocido,
- b) transferir y fijar los fragmentos resueltos en su patrón de migración sobre un filtro de nitrocelulosa,
- c) desnaturalizar los fragmentos de DNA sobre el filtro de nitrocelulosa, y
- d) hibridar y detectar el fragmento de DNA portador de la secuencia de interés con un DNA sonda.

El método utilizado es el que se describe a continuación:

Electroforesis y transferencia del DNA

1. Digerir aprox. 1 µg de DNA viral. Utilizar enzimas de restricción cuyas dianas de corte estén mínimamente mapadas en el genoma del virus.
2. Resolver el patrón de digestión del DNA viral mediante electroforesis en un gel de agarosa.
3. Teñir el gel con bromuro de etidio.
4. Visualizar el gel sobre un transiluminador de luz ultravioleta de longitud de onda corta. Fotografiar el gel junto a una regla fluorescente que permita medir la distancia entre los pocillos de aplicación de muestra y cada una de las bandas resueltas.
5. Dejar el gel 2 min sobre el transiluminador de luz ultravioleta para romper parcialmente el DNA. Así se facilita la posterior transferencia del DNA al filtro de nitrocelulosa.
6. Sumergir el gel boca abajo en la solución de desnaturalización. Incubar con agitación suave durante 1 h a T^a amb.
7. Sumergir el gel en la solución de neutralización. Incubar con agitación suave durante 1h a T^a amb. Cambiar la solución al cabo de 30 min.
8. Cortar un filtro de nitrocelulosa que exceda en 1-2 mm las dimensiones del gel.
9. Sumergir la nitrocelulosa cortada en tampón SSC 2x. Humedecer sin agitación.
10. Cortar 1 trozo de papel Whatman 3MM (Schleicher & Schuell) que sea 2 cm más largo que el gel y tenga hasta 2 veces la anchura del gel. Cortar también 2 trozos del mismo papel que exceda en 1-2 mm las dimensiones del gel.
11. Colocar una plancha de metacrilato o vidrio sobre una cubeta. Cubrir la plancha con el papel Whatman 3MM de mayores dimensiones, doblando los extremos para que haga contacto con el fondo de la cubeta.
12. Verter tampón SSC 10x sobre el papel Whatman 3MM colocado sobre la plancha, llenando a su vez la cubeta con un poco de tampón. Humedecer uniformemente el papel Whatman 3MM.
13. Colocar el gel boca abajo sobre el papel Whatman 3MM humedecido. Asegurarse de que no quedan burbujas de aire entre el gel y el papel Whatmann 3MM.
14. Colocar la nitrocelulosa sobre el gel situando la cara mate en contacto directo con el gel. La colocación de la nitrocelulosa debe acertarse a la primera para evitar "smears" o corrimientos de bandas. Asegurarse de que no quedan burbujas de aire entre la nitrocelulosa y el gel.
15. Colocar los 2 trozos de papel Whatman 3MM de dimensiones menores sobre el filtro de nitrocelulosa.
16. Cortar 2 tiras de Parafilm[®] 5 cm más largas que el gel, y 2 tiras de Parafilm[®] 5 cm más anchas que el gel. Insertar las tiras de Parafilm[®] 2-3 mm entre el gel y el papel Whatmann 3MM que cubre la plancha, cubriendo los 4 flancos del gel. Esta disposición conlleva que el tampón SSC 10x de la cubeta sólo pueda ascender por capilaridad atravesando el grueso del gel.

17. Colocar el contenido de un paquete servilletas de papel (aprox. 100 servilletas) sobre los 2 trozos de papel Whatman 3MM. Las servilletas deben tener un tamaño similar al del gel. Colocar una segunda plancha de metacrilato o vidrio sobre las servilletas, y sobre ésta un peso (aprox. 1 kg).
18. Verter en la cubeta 400 ml de tampón SSC 10x. En este punto se inicia la transferencia, que tiene lugar a T^a amb.
19. Dejar transferir 14-16 h. Cambiar las primeras servilletas húmedas pasadas 1-2 h de transferencia.
20. Desmontar la estructura de transferencia. Con el filtro de nitrocelulosa todavía sobre el gel, marcar con una aguja la posición de los pocillos de aplicación de muestra del gel.
21. Sumergir el filtro de nitrocelulosa boca arriba en tampón SSC 2x sin agitación durante 10 min a T^a amb.
22. Secar el filtro entre dos hojas de papel Whatman 3MM a T^a amb.
23. Fijar el DNA al filtro de nitrocelulosa cociendo el filtro durante 2 h a 80°C en un horno de vacío.
24. Guardar el filtro cocido entre hojas de papel Whatman 3MM hasta su utilización.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Solución de desnaturalización: 0.5M NaOH, 1.5M NaCl; 0.5 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	43.8 g
Hidróxido sódico (NaOH) (Fluka)	10.0 g

Disolver en 0.4 L de agua Milli-Q.
Enrasar a 0.5 L con agua Milli-Q.

Solución de neutralización: 1M Tris HCl pH 8.0, 1.5M NaCl; 0.5 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	60.6 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	43.8 g

Disolver en 0.4 L de agua Milli-Q.
Ajustar a pH 8.0 con HCl 1M y enrasar a 0.5 L con agua Milli-Q.

Tampón SSC 20x: 3M NaCl, 0.3M Citrato sódico pH 7.0; 1 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	175.3 g
Trisodio citrato dihidratado (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O) (Panreac)	88.2 g

Disolver en 0.8 L de agua Milli-Q.
Ajustar a pH 7.0 con NaOH 10M y enrasar a 1 L con agua Milli-Q.
Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.
Conservar a T^a amb.

Pre-hibridación o bloqueo del filtro de nitrocelulosa

25. Colocar el filtro en una bolsa de hibridación sellada por todos los lados excepto por uno.
26. Añadir la solución de hibridación a razón de 0.2 ml/cm² de filtro en la bolsa. Sellar completamente la bolsa de hibridación.
27. Pre-hibridar durante 2-4 h a 42°C.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Solución de hibridación: SSC 5x, 50% (v/v) formamida, 0.1% (p/v) Sodio-N-laurylsarcosina, 0.02% (p/v) SDS, 5% (p/v) Reactivo de bloqueo; 100 ml

Transferir a un frasco tipo Erlenmeyer:

Agua Milli-Q	25 ml
Tampón SSC 20x	25 ml

Formamida (CH₃NO) (Fluka) 50 ml
 Agente de bloqueo ('Blocking Reagent') (Boehringer Mannheim) 5 g

Disolver el agente de bloqueo calentando al microondas con MUCHO CUIDADO DE NO HERVIR LA MEZCLA Y SIN FORMAR GRUMOS. Si aparecen grumos se deberá volver a preparar la mezcla.

Añadir:

Sodio-N-laurylsarcosina (C₁₅H₂₈NNaO₃) (Fluka) 0.10 g
 SDS (Fluka) 0.02 g

Homogeneizar la mezcla.

Hibridación

28. Cortar una esquina de la bolsa y eliminar la solución de pre-hibridación.
29. Añadir 0.025-0.035 ml/cm² de filtro de solución de hibridación que contenga 50-100 ng de DNA sonda recién desnaturalizada. Procurar que no se seque el filtro en el cambio de soluciones. Sellar de nuevo la bolsa.
30. Hibridar durante 14-16 h a 42°C.

Lavado del filtro

31. Cortar la bolsa por una esquina y recuperar la solución de hibridación. Esta solución se puede reutilizar en un futuro, aunque para ello se deberá calentar a 95°C para desnaturalizar el DNA sonda que contiene.
32. Lavar el filtro 2 veces con 0.5 ml/cm² de filtro de tampón SSC 2x 0.1% SDS durante 5 min a T^a amb. Con estos lavados se elimina el exceso de DNA sonda adsorbido.
33. Lavar el filtro 2 veces con 0.5 ml/cm² de filtro de tampón SSC 0.1x 0.1% SDS durante 15 min a 68°C. En este punto se puede continuar con el revelado del filtro, o bien se puede secar el filtro a T^a amb y revelar cuando se estime necesario.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón SSC 2x 0.1% (p/v) SDS; 0.5 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados 0.5 g SDS (Fluka).
 Disolver en 0.45 L de agua Milli-Q.
 Añadir 50 ml de tampón SSC 20x y homogeneizar.

Tampón SSC 0.1x 0.1% (p/v) SDS; 0.5 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados 0.5 g SDS (Fluka).
 Disolver en 0.5 L de agua Milli-Q.
 Añadir 2.5 ml de tampón SSC 20x y homogeneizar.

Revelado del filtro

34. Lavar el filtro con 1 ml/cm² de filtro de Tampón 1 durante 1 min, a T^a amb con agitación suave.
35. Incubar el filtro con 1 ml/cm² de filtro de Tampón 2 durante 30 min, a T^a amb con agitación suave. Tener el Tampón 2 preparado 1 h antes de usarlo pues debe atemperarse a T^a amb.
36. Repetir el paso 34.
37. Preparar una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (anti-DIG/AP) en Tampón 1. Las diluciones de anticuerpo sólo son estables durante 12 h a 4°C. Se utiliza anti-DIG/AP únicamente si la sonda utilizada en la hibridación ha sido marcada con DIG.
38. Incubar el filtro con 0.2 ml/cm² de filtro de la suspensión de anticuerpo diluído durante 30 min, a T^a amb con agitación suave.
39. Descartar la solución de anticuerpo. Lavar 2 veces el filtro con 1 ml/cm² de filtro de Tampón 1 durante 15 min a T^a amb con agitación suave.
40. Equilibrar el filtro con 0.2 ml/cm² de filtro de Tampón 3 durante 2 min, a T^a amb con agitación suave.

41. Introducir el filtro en una bolsa de hibridación. Añadir 0.1 ml/cm² de filtro de la solución de revelado de fosfatasa alcalina (marrón) recién preparada. Incubar a oscuras durante 3-4 h (o hasta que se vean las bandas deseadas), a T^a amb sin agitación.
42. Sacar el filtro de la bolsa de hibridación. Parar la reacción con 0.5 ml/cm² de filtro de tampón TE 1x durante 5 min, a T^a amb con agitación suave.
43. Secar el filtro a T^a amb y guardarlo.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón 1: 0.1M Tris HCl pH 7.5, 0.15M NaCl; 1.5 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	18.17 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	13.15 g

Disolver en 1.3 L de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 7.5 con HCl 2M y enrasar a 1.5 L con agua Milli-Q.

Tampón 2: 0.1M Tris HCl pH 7.5, 0.15M NaCl, 0.5% (p/v) agente de bloqueo; 300 ml

Pesar y poner en un frasco Erlenmeyer 1.5 g de agente de bloqueo ('Blocking Reagent') (Boehringer Mannheim).

Disolver en 300 ml de Tampón 1 calentando al microondas SIN LLEGAR A HERVIR LA MUESTRA.

Homogeneizar y atemperar a T^a amb. Es conveniente preparar la solución 1 h antes de usarla.

Tampón 3: 0.1M Tris HCl pH 9.5, 0.1M NaCl, 50mM MgCl₂; 200 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	2.42 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	1.17 g

Disolver en 170 ml de agua Milli-Q.

Añadir 10 ml de MgCl₂ 1M.

Ajustar a pH 9.5 con HCl 0.2M y enrasar a 200 ml con agua Milli-Q.

Solución de revelado de fosfatasa alcalina (marrón); 10 ml

IMPORTANTE: Esta solución se debe preparar pocos minutos antes de ser utilizada.

Transferir 10 ml de Tampón 3 a un vial estéril.

Añadir 45 µl de solución NBT 75 mg/ml y 35 µl de solución BCIP 50 mg/ml.

Homogeneizar la mezcla y proteger de la luz.

Solución NBT 75 mg/ml; 0.5 ml

Mezclar en un tubo Eppendorf estéril 0.7 ml de N,N-dimetil formamida (C₃H₇NO) (Fluka) y 0.3 ml de agua Milli-Q estéril.

La solución resultante es 70% (v/v) N,N-dimetil formamida.

Pesar y poner en un tubo Eppendorf estéril 37.5 mg de NBT (cloruro de azul de p-nitrotetrazolio) (BioRad).

Añadir 0.5 ml de 70% (v/v) N,N-dimetil formamida y disolver el NBT con agitación.

Conservar a -20°C.

Solución BCIP 50 mg/ml; 0.5 ml

Pesar y poner en un tubo Eppendorf estéril 25 mg de BCIP (sal de toluidina 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (BioRad).

Disolver en 0.5 ml de N,N-dimetil formamida (C₃H₇NO) (Fluka).

Conservar a -20°C.

VI.D.4.A.4. Secuenciación del DNA

El método empleado para la secuenciación de DNA se basa en el método enzimático descrito por F. Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Sanger & Coulson, 1978), y consiste en sintetizar *in vitro* la cadena de DNA complementaria a aquella cuya secuencia se pretende conocer (DNA molde). La nueva cadena se sintetiza a partir de un oligonucleótido iniciador o cebador que hibrida sobre el DNA molde y marca así el inicio para la actividad polimerasa 5'→3'. La síntesis se da en presencia de nucleótidos convencionales (dNTPs) y nucleótidos modificados (2'-3'-dideoxynucleósidos 5'-trifosfatos o ddNTPs). Los ddNTPs difieren de los dNTPs en que carecen del grupo 3'-hidroxilo de la ribosa (contienen por tanto desoxiribosa). Los ddNTPs actúan como terminadores de la síntesis de DNA pues en ausencia del grupo 3'-hidroxilo no

se forma el enlace fosfodiéster con el extremo 5'-fosfato del siguiente dNTP. Cuando en una reacción de síntesis hay, además de los cuatro dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), una pequeña cantidad de un ddNTP en particular (ddATP, ddGTP, ddCTP o ddTTP), se establecerá una competencia entre la elongación de la cadena mediada por los dNTPs y la terminación infrecuente pero específica inducida por el ddNTP. El producto de la reacción es un cóctel de oligonucleótidos de diferente longitud. Cuando los cuatro ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) son usados en cuatro reacciones enzimáticas diferentes, se obtiene un conjunto de oligonucleótidos que terminan en cada A, G, C y T del DNA molde. Estos oligonucleótidos obtenidos se pueden resolver por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida capaz de resolver oligonucleótidos que difieren en un solo nucleótido.

En este trabajo experimental se ha utilizado tres kits de secuenciación diferentes: ⁷⁷Sequencing™ Kit (Pharmacia), *fmoI*™ DNA Sequencing System (Promega) y ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems). Los tres kits están basados en la metodología de la secuenciación enzimática descrita anteriormente. La diferencia principal entre uno u otro kit es el origen de la polimerasa que utiliza, y la presencia de otros nucleótidos modificados, a parte de los ddNTPs, en las mezclas de reacción.

El ⁷⁷Sequencing™ Kit es un kit manual de secuenciación. En él se ha utilizado la polimerasa del bacteriófago T7 (T7 DNA polimerasa), un análogo del dATP marcado con el isótopo radiactivo ³⁵S ([α -³⁵S]dATP) y, ocasionalmente, las Deaza G/A™ Sequencing Mixes que contienen los análogos 7-deaza-dNTPs. Los 7-deaza-dNTPs se han utilizado para resolver el fenómeno de las compresiones, muy frecuentes en la secuenciación de moléculas de DNA con un alto %G+C. Las compresiones se deben al apareamiento de bases dentro de una misma cadena, que genera estructuras difíciles de resolver por electroforesis y que conllevan una interpretación incorrecta de la secuencia. Los 7-deaza-dNTPs son buenos sustratos para la T7 DNA polimerasa, y se aparean débilmente con los nucleótidos convencionales evitando así la formación de estructuras en una misma cadena. La incorporación de [α -³⁵S]dATP en el oligonucleótido en síntesis permite su detección posterior mediante autoradiografía sobre el gel de poliacrilamida.

El kit *fmoI*™ DNA Sequencing System también es un kit manual de secuenciación. En él se ha utilizado la Sequencing Grade *Taq* DNA Polymerase y los análogos [α -³⁵S]dATP y 7-deaza-dNTPs. La Sequencing Grade *Taq* DNA Polymerase es una variante de la *Taq* DNA Polymerase aislada de *Thermus aquaticus*. Las propiedades intrínsecas de esta enzima permiten desarrollar la reacción de secuenciación a una temperatura elevada, y acoplarla a un sistema de termociclación. La utilización de esta metodología ofrece una serie de ventajas: a) un requerimiento menor de DNA molde, b) la desnaturalización del DNA molde integrada en el programa termocíclico, c) una mayor restringencia en la unión del cebador, y d) la secuenciación a través de regiones muy estructuradas de DNA ya sean palindrómicas o con un alto %G+C.

En el kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit se ha utilizado la AmpliTaq® DNA Polymerase, el análogo dITP y algunos análogos fluoróforos a los ddNTPs convencionales. La mayor ventaja que se deriva de utilizar este sistema de secuenciación es que se prescinde de usar radioactividad. El análogo dITP se utiliza en sustitución del dGTP convencional para minimizar la compresión de bandas. Los análogos de los ddNTPs van marcados con una molécula de fluoresceína unida a una molécula de rodamina. La absorción de un láser de argón por parte de la molécula de fluoresceína induce a la molécula de rodamina a emitir fluorescencia. La molécula de fluoresceína (6-FAM) es común para los cuatro terminadores. Por el contrario, la molécula de rodamina difiere en cada uno de ellos, y por consiguiente también la longitud de onda a la que emiten. Las moléculas de rodamina para los terminadores A, C, G y T son, respectivamente, dR6G (λ 568nm), dROX (λ 621nm), dR110 (λ 543nm) y dTAMRA (λ 596nm). En este sistema de secuenciación, exceptuando la reacción de secuenciación propiamente dicha, la electroforesis capilar y la lectura de la secuencia son procesos completamente automatizados.

En el desarrollo de este trabajo experimental se ha secuenciado el DNA doble hebra de plásmidos construidos de la serie pUC y pMAL, y en particular de aquellas secuencias de DNA que han sido objeto de expresión para la obtención de proteína recombinante. El método de secuenciación utilizado con el ⁷⁷Sequencing™ Kit es el que describe a continuación:

Preparación del DNA. Reacción de hibridación

1. Transferir 16 μl de una preparación de DNA plasmídico (aprox. 1-1.3 μg) a un tubo Eppendorf estéril.
2. Añadir 4 μl de solución 2M NaOH (se obtienen así 20 μl de solución de DNA desnaturalizado). Agitar suavemente con vórtex e incubar a Tª amb, 10-12 min.
3. Transferir resina Sephadex G50 Superfine (Farmacia) hidratada con tampón TE 0.5x estéril al interior de una minicolumna del tipo Wizard™ Minicolumns o Magic™ Minicolumns (Promega).
4. Centrifugar la minicolumna a 5200xg, 1 min. Rellenar y centrifugar la minicolumna hasta que toda ella esté ocupada por resina.
5. Añadir 20 μl de tampón TE 0.5x estéril a la minicolumna. Centrifugar a 5200xg, 1 min. Repetir esta operación otras 3 veces.
6. Centrifugar la minicolumna a 5200xg durante 30 seg para eliminar el exceso de tampón TE 0.5x.
7. Transferir los 20 μl de solución de DNA desnaturalizado a la minicolumna.
8. Centrifugar a 5200xg, 60-90 seg. Recoger la solución de DNA desnaturalizado en un tubo Eppendorf estéril.
9. Preparar 14 μl de reacción de hibridación o 'Annealing Reaction'. Mezclar en un tubo Eppendorf estéril:

Solución de DNA desnaturalizado	10 μl
Cebador 17-mer pUC/M13 Forward o Reverse (Promega)	2 μl (aprox. 10-20 ng)
'Annealing Buffer' (suministrado en el kit)	2 μl

10. Agitar suavemente con vórtex. Incubar a 65°C, 5 min.
11. Incubar a 37°C, 10-15 min.
12. Incubar a Tª amb, mínimo 10 min.
13. Consevar la 'Annealing Reaction' en hielo picado si se prevee utilizarla de inmediato. De lo contrario, conservar a -20°C.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

NaOH 2M; 100 ml

Pesar y poner 8 g de hidróxido sódico (NaOH) (Fluka) en un vaso de precipitados.
 Disolver en 80 ml de agua Milli-Q.
 Enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.

Reacciones de secuenciación

14. Preparar 7 μl de reacción de marcaje o 'Labelling Reaction' por cada DNA molde. Mezclar en un tubo Eppendorf estéril, y en el siguiente orden:

Agua Milli-Q estéril	1.5 μl
Mezcla de marcaje o 'Labelling Mix-dATP' (suministrado en el kit)	3.0 μl
T7 DNA polimerasa diluída en 'Enzyme Dilution Buffer' (1.5 unidades/ μl) (suministrado en el kit) .	2.0 μl
[α - ³⁵ S]dATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) (Amersham)	0.5 μl

15. Añadir 6 μl de 'Labelling Reaction' a los 14 μl de 'Annealing Reaction'. Agitar suavemente con vórtex.
16. Incubar a Tª amb, mínimo 5 min. Se obtienen 20 μl de solución de DNA marcado.

Reacciones de terminación

17. Por cada DNA molde, preparar 4 tubos Eppendorf con 2.5 μl de 'A mix', 'C mix', 'G mix' y 'T mix', respectivamente. Si procede, utilizar 'deazaA mix', 'deazaC mix', 'deazaG mix' y 'deazaT mix', respectivamente. Estas mezclas de nucleótidos y análogos correspondientes vienen suministradas en el kit de secuenciación.
18. Incubar en baño termostático a 37°C, mínimo 1 min.
19. Transferir 4.5 μl de solución de DNA marcado a cada tubo atemperado a 37°C.

20. Incubar en baño termostático a 37°C, 5 min.
21. Añadir 5 µl de 'Stop Solution' (suministrado en el kit) a cada tubo para parar la reacción de terminación.
22. Agitar suavemente con vórtex. Conservar la reacción a -20°C hasta aplicarla en la electroforesis de secuenciación.

Preparación del gel de secuenciación

Los geles de secuenciación utilizados han sido geles desnaturalizantes ultrafinos (0.2 mm de espesor) de poliacrilamida al 7.6%. La utilización de estos geles comporta una mejor resolución de los oligonucleótidos así como un mejor control de la temperatura durante la electroforesis.

23. Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Urea (Sigma, Serva)	22.0 g
Acrilamida 2X (Serva)	3.8 g
N,N'-metilenbisacrilamida (Fluka)	0.2 g

24. Añadir 10 ml de tampón Tris-Borato-EDTA 5x (TBE 5x).
25. Añadir agua Milli-Q hasta que el volumen de la mezcla sea 40-45 ml. Disolver con agitación a 65-70°C, durante 20-25 min.
26. Enrasar a 50 ml con agua Milli-Q.
27. Filtrar con filtro de acetato de celulosa de 0.22 µm (Millipore, Corning).
28. Desgasificar en bomba de vacío, 7-8 min.
29. Tratar el vidrio mellado de electroforesis con 'Bind-Silane', y la camisa termostatizadora con 'Repel-Silane' según se describe en el manual "Macrophor Sequencing System. Users Manual" (Farmacia LKB Biotechnology AB, 1991).
30. Colocar los espaciadores de 0.2 mm sobre la camisa termostatizadora.
31. Iniciar la polimerización del gel con 0.4 ml de solución persulfato amónico 10% (p/v) recién preparada y 40 µl de N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) (BioRad).
32. Verter el gel sobre la camisa termostatizadora a la vez que se desliza el vidrio mellado sobre la camisa termostatizadora. Las caras tratadas de la camisa termostatizadora y del vidrio mellado son las que deben quedar en contacto con el gel de poliacrilamida.
33. Dejar polimerizar el gel mínimo 2 h. Es conveniente preparar el gel de poliacrilamida el día antes a la electroforesis de secuenciación.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón TBE 5x: 0.5M Tris pH 8.3, 0.43M ácido bórico, 10mM EDTA; 2 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	121.0 g
Ácido bórico (H ₃ BO ₃) (Serva, Merck)	53.4 g
EDTA (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ·2H ₂ O) (Serva)	7.4 g

Disolver en 1.8 L de agua Milli-Q.
Comprobar que la solución tiene aprox. pH 8.3
Enrasar a 2 L con agua Milli-Q.
Conservar a T° amb.

Persulfato amónico 10% (p/v); 1 ml

Pesar y poner 100 mg de persulfato amónico (Promega, BioRad) en un tubo Eppendorf estéril.
Disolver en 1 ml de agua Milli-Q estéril.
Conservar en hielo picado hasta su uso. Se puede conservar a 4°C durante 1 semana.

Electroforesis, autoradiografía y revelado

La electroforesis de secuenciación se ha llevado a cabo en una unidad de secuenciación Macrophor (Pharmacia LKB) y con una fuente de alimentación LKB Bromma modelo 2297 Macrodrive 5.

34. Montar las cubetas inferior y superior, gomas, electrodos y el gel de secuenciación polimerizado en la unidad de secuenciación.
35. Llenar las cubetas superior e inferior con 1 L de tampón TBE 1x (es conveniente utilizar la misma solución de tampón TBE 5x utilizada para la preparación del gel de secuenciación).
36. Conectar la camisa termostaticadora a un baño termostático a 55-60°C.
37. Realizar una pre-electroforesis a 3000 V, 60 min.
38. Limpiar la urea que difunde del gel inyectando tampón TBE 1x con una jeringa.
39. Insertar el peine de teflón que permite la aplicación de muestra. Durante este trabajo se ha utilizado los peines denominados “diente de tiburón” o “toothshark”.
40. Desnaturalizar las muestras de secuenciación a 80-85°C, 5 min. Incubar en hielo picado.
41. Aplicar 2.5-3 μ l de cada muestra (A, C, G o T) en bolsillos contiguos para un mismo DNA molde. Enjuagar la jeringa de secuenciación (Macrophor Sequencing Syringe, Pharmacia Biotech) con agua Milli-Q después de cada aplicación.
42. Programar la electroforesis a 2750 V. La duración depende de la longitud de la secuencia que se quiera leer y del punto de hibridación del cebador con respecto a la secuencia de interés.
43. Finalizada la electroforesis, desmontar la unidad de secuenciación y fijar el gel adherido al vidrio en una solución de ácido acético 10% (v/v), 15-20 min. Este tratamiento también elimina la urea del gel de secuenciación.
44. Secar el gel de secuenciación durante 2 h, a 75°C. En este tiempo limpiar y ordenar TODO el material y espacio utilizado para la electroforesis de secuenciación.
45. En una cámara oscura, colocar una película de autoradiografía Hyperfilm™- β max (Amersham) sobre el gel de secuenciación. Envolver en papel de aluminio y pinzar. Dejar como mínimo 20 h de exposición.
46. En una cámara oscura, revelar la película de autoradiografía con baños de revelador (Kodak, Agfa), agua destilada y fijador (Kodak). Dejar secar la película revelada.
47. Sumergir el gel de secuenciación todavía adherido al vidrio mellado en una solución 2M NaOH, durante 1-2 días. Retirar y desecar el gel de secuenciación. Lavar el vidrio mellado de electroforesis.

VI.E. Métodos analíticos de proteínas

En este apartado se describe las técnicas analíticas aplicadas en los experimentos de expresión de proteína recombinante. Los métodos utilizados han sido la electroforesis desnaturizante de proteínas en gel de poli(acrilamida)-SDS (SDS-PAGE), la transferencia ‘Western’ y la medida de la actividad β -galactosidasa.

VI.E.1.A.1. SDS-PAGE

La SDS-PAGE es una técnica analítica que permite resolver los polipéptidos de una muestra según su tamaño. Esta técnica se desarrolla en unas condiciones que aseguran la disociación de las proteínas en sus diferentes polipéptidos, y que minimizan los fenómenos de agregación (Sambrook *et al.*, 1989b). Las proteínas son disociadas por la acción combinada del SDS (potente detergente aniónico), un agente reductor y calor, antes de ser aplicadas al gel de poli(acrilamida). Los polipéptidos desnaturizados unen el SDS y adquieren carga negativa. La unión del SDS es casi siempre proporcional a la masa del polipéptido e independiente de su secuencia. Por ello, el complejo polipéptido-SDS migra a través del gel de poli(acrilamida) únicamente en función de su tamaño. La aplicación de marcadores de peso molecular conocido permite estimar el tamaño del polipéptido problema. Aunque en el desarrollo de este trabajo no se ha

dado en ningún momento el caso, bien es cierto que las modificaciones post-traduccionales sobre la estructura de los polipéptidos, como por ejemplo las glicosilaciones, alteran el patrón de migración del polipéptido. En estos casos sólo cabe eliminar dichos azúcares antes de aplicar la muestra en el gel de poliacrilamida.

Las electroforesis de proteínas realizadas han sido del tipo de tamponación discontinua. En ellas, el tampón de cubeta con el que ocurre la electroforesis tiene un pH y una fuerza iónica diferente al tampón utilizado en la elaboración del gel. Cuando se aplica un campo eléctrico, se crea un frente cuyo avance barre los complejos polipéptido-SDS a través del gel. Según el sistema de tamponación discontinua, las muestras atraviesan primero un gel muy poroso hasta quedar concentradas en una superficie muy pequeña sobre un gel separador, de porosidad menor. Esta capacidad de concentrar la muestra sobre una superficie pequeña juega a favor de una mejor resolución de los geles de poliacrilamida-SDS.

Los geles de poliacrilamida están formados por cadenas polimerizadas de acrilamida que se entrelazan con cadenas de bisacrilamida, formando poros. La resolución o rango efectivo de separación de los geles de poliacrilamida-SDS depende de la concentración de acrilamida y del grado de entrelazamiento. Este grado de entrelazamiento es el que genera poros mayores o menores: a mayor porcentaje de acrilamida:bisacrilamida menor es el tamaño del poro a través del cual deberá pasar el complejo polipéptido-SDS. La capacidad de resolución del gel está pues condicionada al tamaño del poro, esto es, a la concentración de acrilamida:bisacrilamida utilizada para la elaboración del gel.

El método utilizado para llevar a cabo la SDS-PAGE es el que se describe a continuación:

Preparación del gel de SDS-PAGE

Los geles de SDS-PAGE han sido preparados con el material del equipo Mini-Protean II (BioRad). El gel de electroforesis polimeriza entre dos vidrios y consta, a su vez, de un gel superior o de apilamiento y de un gel inferior o de separación.

1. Colocar los vidrios del equipo Mini-Protean II (BioRad) según las instrucciones del fabricante. Utilizar espaciadores de 0.8 mm ó 1.5 mm según vaya a ser el grosor del gel.
2. Preparar el volumen de gel separador deseado. En la Tabla XXXV se indica el orden a seguir en la mezcla de los reactivos así como el volumen requerido de cada uno de ellos para la elaboración de 1 gel en función de su porcentaje y su grosor. La polimerización del gel empieza en cuanto se añade el TEMED. Homogeneizar la mezcla con agitación suave.

TABLA XXXV. Preparación del gel separador en la SDS-PAGE

Reactivos		0.8 mm de grosor			1.5 mm de grosor		
		% de acrilamida			% de acrilamida		
		10	12	15	10	12	15
1°. Agua Milli-Q	(ml)	2.5	2.1	1.5	4.0	3.4	2.4
2°. Solución acrilamida 30% (p/v):bisacrilamida 0.8% (p/v)	(ml)	2.0	2.4	3.0	3.2	3.8	4.8
3°. Tampón de gel separador 4x	(ml)	1.5	1.5	1.5	2.4	2.4	2.4
4°. Persulfato amónico 10% (p/v)	(μ l)	24.0	24.0	24.0	38.4	38.4	38.4
5°. N,N,N,N'-tetrametiletildiamina (TEMED)	(μ l)	3.0	3.0	3.0	4.8	4.8	4.8

3. Verter 3.8 ml (0.8 mm de grosor) ó 7.1 ml (1.5 mm de grosor) de gel separador recién preparado entre los dos vidrios.
4. Añadir, con cuidado, un frente de 0.1% (p/v) SDS sobre el gel separador. Dejar polimerizar durante 25-30 min a T^a amb.
5. Decantar el frente de 0.1% (p/v) SDS. Eliminar los restos de acrilamida no polimerizada de la parte superior del gel con agua Milli-Q. Secar el agua remanente.

6. Preparar el volumen de gel apilador deseado. En la Tabla XXXVI se indica el orden a seguir en la mezcla de los reactivos así como el volumen requerido de cada uno de ellos para la elaboración del gel en función de su porcentaje y su grosor. La polimerización del gel empieza en cuanto se añade el TEMED. Homogeneizar la mezcla con agitación suave.

TABLA XXXVI. Preparación del gel apilador en la SDS-PAGE

Reactivos		0.8 mm de grosor	1.5 mm de grosor
1º. Agua Milli-Q	(ml)	1.3	2.6
2º. Solución acrilamida 30% (p/v):bisacrilamida 0.8% (p/v)	(ml)	0.2	0.4
3º. Tampón de gel apilador 4x	(ml)	0.5	1.0
4º. Persulfato amónico 10% (p/v)	(µl)	20.0	40.0
5º. N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)	(µl)	2.0	4.0

7. Verter 2 ml (0.8 mm de grosor) ó 4 ml (1.5 mm de grosor) de gel apilador recién preparado sobre el gel separador polimerizado. Insertar el peine formador de pocillos sin atrapar burbujas de aire. Dejar polimerizar durante 25-30 min a Tª amb.
8. Preparar las muestras a aplicar (ver VI.C.1.C.1.).
9. Retirar el peine formador de pocillos y lavar los restos de poli(acrilamida no polimerizada con agua Milli-Q.
10. Colocar el gel de poli(acrilamida en la cubeta de electroforesis. Añadir 0.5-0.8 L de tampón de cubeta 10x diluído 1:10 en agua Milli-Q a los reservorios cátodo y ánodo del tampón.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Solución acrilamida 30% (p/v):bisacrilamida 0.8% (p/v); 200 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Acrilamida 2X (Serva)	60.0 g
N,N'-metilbisacrilamida (Fluka)	1.6 g

Disolver en 190 ml de agua Milli-Q sobre agitador magnético con calor.

Comprobar que la solución tiene pH <7.0.

Enrasar a 200 ml con agua Milli-Q.

Añadir 4 g de resina de intercambio iónico AG® 501-X8(D) (BioRad) para desionizar la solución.

Agitar durante 1 h.

Filtrar con filtro de acetato de celulosa 0.22 µm (Millipore, Corning).

Conservar a 4°C, protegida de la luz.

Tampón de gel separador 4x: 1.5M Tris HCl pH 8.8, 0.4% (p/v) SDS; 0.5 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva) (NO USAR Tris-Cl ni Trizma)	91 g
SDS (Fluka)	2 g

Disolver en 400 ml de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 8.8 con HCl 1M y enrasar a 0.5 L con agua Milli-Q.

Conservar a Tª amb.

Tampón de gel apilador 4x: 0.5M Tris HCl pH 6.8, 0.4% (p/v) SDS; 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva) (NO USAR Tris-Cl ni Trizma)	6.06 g
SDS (Fluka)	0.40 g

Disolver en 80 ml de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 6.8 con HCl 2M y enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.

Conservar a Tª amb.

Tampón de cubeta 10x: 0.25M Tris, 1% (p/v) SDS, 1.92M glicina; 1 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	30.3 g
SDS (Fluka)	10.0 g
Glicina (Sigma)	144.1 g

Disolver en 0.95 L de agua Milli-Q.

Comprobar que la solución tiene pH 8,3-8.5. NO SE DEBE AJUSTAR el pH de la solución.

Enrasar a 1 L con agua Milli-Q.

Conservar a T^a amb. Se utiliza diluido 1:10 en agua Milli-Q (concentración final 1x).

Electroforesis y tinción

11. Aplicar 10-15 μ l de muestra por pocillo en el gel de electroforesis. Aplicar también 5-10 μ l de marcador de peso molecular preparado como indica el fabricante (en este trabajo se ha utilizado generalmente Wide Molecular Weight Range Sigma Marker (Sigma)). Si procede, aplicar 10-15 μ l de tampón de aplicación de proteína 4x diluido 1:4 en agua Milli-Q (concentración final 1x) a los pocillos que no contengan muestra.
12. Aplicar un campo eléctrico a 12.5-25 mA de amperaje constante. Se considera acabada la electroforesis cuando el azul de bromofenol del tampón de aplicación de proteína escapa del gel separador.
13. Decantar el tampón de cubeta y desmontar el gel de electroforesis.
14. Fijar el gel separador con 15-20 ml de solución de fijación, 20-25 min a T^a amb.
15. Teñir el gel separador con 10-15 ml de solución azul de Coomassie, 10-15 min a T^a amb.
16. Desteñir el gel en sucesivos lavados con 10-15 ml de 7% (v/v) ácido acético, 2-14 h a T^a amb. La destinción se acelera si se utiliza 30% (v/v) metanol 10% (v/v) ácido acético, si se incrementa la T^a de la solución de lavado a 45°C, o si se sumerge una esponja para absorber el tinte.
17. Fotografiar o conservar el gel. El gel se puede conservar en una bolsa sellada con solución 20% (v/v) glicerol, o bien secado sobre un trozo de papel Whatman 3MM (Schleicher & Schuell).

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Solución de fijación: 50% (v/v) metanol 10% (v/v) ácido acético; 1 L

Transferir a un vaso de precipitados:

Metanol (Fluka)	500 ml
Ácido acético glacial (Carlo Erba)	100 ml

Enrasar a 1 L con agua Milli-Q.

Conservar a T^a amb.

Solución azul de Coomassie: 45% (v/v) metanol, 10% (v/v) ácido acético, 0.1% (p/v) Coomassie Brilliant Blue R250; 250 ml

Poner 112.5 ml de metanol (Fluka) en un vaso de precipitados.

Añadir y disolver 250 mg de Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma).

Añadir 25 ml de ácido acético glacial (Carlo Erba).

Enrasar a 250 ml con agua Milli-Q.

Conservar a T^a amb.

Ácido acético 7% (v/v); 0.5 L

Diluir 35 ml de ácido acético (Carlo Erba) en 465 ml de agua Milli-Q.

Solución 30% (v/v) metanol 10% (v/v) ácido acético; 0.5 L

Transferir a un vaso de precipitados:

Metanol (Fluka)	150 ml
Ácido acético glacial (Carlo Erba)	50 ml

Enrasar a 0.5 L con agua Milli-Q.

Conservar a T^a amb.

Solución 20% (v/v) glicerol; 100 ml

Diluir 23 ml glicerol 87% (Fluka) en 77 ml agua Milli-Q.

VI.E.1.A.2. Transferencia 'Western'

La transferencia 'Western' (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981) es a las proteínas como la transferencia Southern es al DNA. En la transferencia 'Western' primero se separan las proteínas mediante electroforesis, a continuación se transfieren las proteínas a un filtro de nitrocelulosa y, finalmente, se ensaya sobre éste la detección específica de una determinada secuencia de aminoácidos con un antisuero o anticuerpo (inmunodetección). A diferencia de la transferencia Southern donde la hibridación del DNA se da con una especificidad e intensidad predecibles, en la transferencia 'Western' el resultado depende de la idiosincrasia de cada anticuerpo. En la transferencia 'Western', la electroforesis de proteínas se desarrolla en geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE), y por consiguiente sólo los anticuerpos que reconocen epítomos lineales son adecuados para detectar la proteína de interés.

En la transferencia 'Western', la SDS-PAGE se ha realizado como se ha descrito anteriormente. La única diferencia es que se aplican marcadores de peso molecular preteñidos, es decir, unidos a moléculas de colorante que permiten visualizarlos una vez transferidos sobre el filtro de nitrocelulosa. En este trabajo se ha utilizado los marcadores SeeBlue™ Pre-Stained Standards (Novex) y Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range (BioRad). La electrotransferencia de proteínas se ha llevado a cabo con el equipo Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (BioRad). La inmunodetección de proteína recombinante se ha realizado aplicando primero un suero policlonal de conejo dirigido contra la MBP (anti-MBP), disponible en el kit Protein Fusion and Purification System pMAL™-2 (New England Biolabs). A continuación, se ha aplicado un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a la enzima peroxidasa (goat anti-rabbit/PO) (Nordic Immunology, The Binding Site).

El método utilizado para la transferencia 'Western' es el que se describe a continuación:

Electroforesis y transferencia

1. Separar mediante SDS-PAGE los polipéptidos de la muestra a analizar. Generalmente, las muestras aplicadas han sido 'control del cultivo no inducido' (No ind.), 'cultivo inducido 1 h' ó 'cultivo inducido 2 h'. También se ha aplicado marcadores de peso molecular preteñidos.
2. Equilibrar el gel de SDS-PAGE en 40-50 ml de tampón de transferencia, 30-45 min a Tª amb. La manipulación del gel se debe hacer con guantes. En caso de no usar guantes, las secreciones cutáneas pueden interferir en la transferencia de las proteínas a la nitrocelulosa.
3. Recortar 1 trozo de filtro de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) y 4 trozos de papel Whatman 3MM (Schleicher & Schuell) de las dimensiones del gel. La manipulación del filtro y del papel Whatman 3MM también se debe hacer con guantes.
4. Equilibrar el filtro de nitrocelulosa, los 4 trozos de papel y 2 trozos de fibra (suministrados por el fabricante) en 250 ml de tampón de transferencia, 30-45 min a Tª amb.
5. Colocar sobre el ánodo (+) (placa clara) del Gel Holder Cassette, y en este orden, 1 trozo de fibra, 2 trozos de papel Whatman 3MM, el filtro de nitrocelulosa, el gel, 2 trozos de papel Whatman 3MM y 1 trozo de fibra. A medida que se colocan los distintos componentes, humedecerlos con tampón de transferencia procurando que no queden burbujas de aire atrapadas. Es importante no marcar el gel para no originar cortocircuitos. El cátodo (-) (placa oscura) del cassette es el electrodo que debe quedar más próximo al gel.
6. Colocar el Gel Holder Cassette en la cubeta de transferencia de manera que el gel esté situado más próximo al cátodo (-). Las proteínas desnaturizadas y cargadas negativamente por efecto del SDS migrarán hacia el ánodo (+) donde se halla la nitrocelulosa.
7. Aplicar 0.2-0.25 A, 1h. Mantener el tampón de transferencia refrigerado y en agitación.
8. Desmontar el Gel Holder Cassette. Marcar la orientación del gel sobre la nitrocelulosa durante la electrotransferencia.
9. Equilibrar el filtro en 40-50 ml de PBS 1x 0.05% (v/v) Tween®20, 20-30 min a Tª amb con agitación suave.
10. (Opcional) Teñir el gel de poliacrilamida para comprobar que ha habido transferencia.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón de transferencia: 25mM Tris, 192mM Glicina, 20% (v/v) Metanol; 1.5 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Tris base (Serva)	4.53 g
Glicina (Sigma)	21.62 g

Disolver en 1.2 L de agua Milli-Q.
Comprobar que la solución tiene pH 8.3-8.5. NO SE DEBE AJUSTAR el pH de la solución.
Añadir 300 ml metanol (Panreac, Fluka).
Conservar en frío/hielo.

Tampón PBS 10x: 10mM KH_2PO_4 , 0.1M Na_2HPO_4 , 1.37M NaCl, 27mM KCl, pH 7.0; 1 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Potasio dihidrógeno fosfato anhidro (KH_2PO_4) (Fluka)	1.4 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Fluka)	35.8 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	80.0 g
Cloruro potásico (KCl) (Fluka)	2.0 g

Disolver en 0.8 L de agua Milli-Q.
Ajustar a pH 7.0 con HCl 2M y enrasar a 1 L con agua Milli-Q.
Esterilizar mediante autoclavado a 121°C, 15 min según programa de autoclavado de líquidos.
Conservar a Tª amb.
NOTA: El tampón PBS 1x preparado como dilución 1:10 del tampón PBS 10x tiene pH 7.4.

Tampón PBS 1x 0.05% (v/v) Tween®20; 1 L

Diluir 100 ml de tampón PBS 10x en 0.9 L de agua Milli-Q.
Añadir 0.5 ml de Tween®20 (Fluka).
Homogeneizar con agitación.
Conservar a Tª amb.

Inmunodetección

11. Incubar el filtro en 40-50 ml de solución de bloqueo 12-14 h, a 4°C con agitación suave de balanceo.
12. (Opcional) Incubar el filtro en 40-50 ml de PBS 1x 0.05% (v/v) Tween®20, 10 min a Tª amb con agitación suave.
13. Incubar el filtro en 50 ml de una dilución 1:5000 de suero policlonal de conejo anti-MBP (suministrado en el kit Protein Fusion and Purification System pMAL™-2 (New England Biolabs)) en solución de bloqueo, 3 h a Tª amb con agitación suave de balanceo.
14. Lavar 4 veces el filtro en 50 ml PBS 1x 0.05% (v/v) Tween®20, 15 min a Tª amb con agitación suave.
15. Incubar el filtro en 50 ml de una dilución 1:2000 de anticuerpo secundario goat anti-rabbit/PO en solución de bloqueo, 1 h a Tª amb con agitación suave de balanceo.
16. Repetir el paso 14.
17. Revelar el filtro con una solución de cloronaftol y agua oxigenada suministradas en el kit Horseradish Peroxidase Conjugate Substrate Kit (BioRad). Revelar hasta que las bandas se vean nítidas.
18. Parar la reacción con agua abundante. El filtro se puede fotografiar y conservar seco entre dos trozos de papel Whatman 3MM.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Solución de bloqueo: PBS 1x, 0.05% (v/v) Tween®20, 1% (p/v) Albumin Fraction V; 150 ml

Transferir a un frasco tipo Erlenmeyer 150 ml de tampón PBS 1x 0.05% (v/v) Tween®20.
Añadir, poco a poco, 1.5 g de Albumin Fraction V (Boehringer Mannheim) bajo agitación constante de la solución.
Homogeneizar con agitación.
Conservar a 4°C.

VI.E.1.A.3. Valoración de la actividad β -galactosidasa

En todo experimento de expresión y purificación de proteína recombinante es aconsejable disponer de un método que permita valorar de manera específica la proteína de interés e, indirectamente, la evolución del experimento. La

acumulación visible de un polipéptido de un tamaño acorde al esperado por SDS-PAGE puede ser indicativa de que la proteína de interés se expresa en abundancia. Según el método de extracción seguido, la SDS-PAGE también puede aportar información del grado de solubilidad o de degradación de la proteína acumulada. Cuando la cantidad de proteína expresada o el grado de degradación no conlleva la acumulación visible de la proteína recombinante, generalmente se recurre entonces a los métodos de inmunodetección específica (p.e. la transferencia 'Western'). Sin embargo, ni la SDS-PAGE ni la inmunodetección son métodos inmediatos y no siempre se dispone de los antisueros necesarios. En ocasiones se opta por expresar la proteína recombinante fusionada a otra proteína denominada 'carrier' con la intención de mejorar el nivel de expresión y la solubilidad de la proteína de interés. La β -galactosidasa, la glutatión-S-transferasa (GST) o la proteína verde fluorescente (GFP, 'Green Fluorescent Protein') son ejemplos de proteínas 'carrier' que además desarrollan una actividad propia que se puede utilizar como indicadora de la presencia de la proteína. Las proteínas con actividad propia se denominan proteínas 'reporter'. La valoración de esta actividad constituye un método ágil, específico, más sensible y sobretodo cuantificable que rinde cuentas del grado alcanzado en la expresión o en la purificación de la proteína recombinante.

En este trabajo experimental se ha utilizado la β -galactosidasa como proteína 'carrier' para la expresión de determinados péptidos, y como proteína 'reporter' de la intensidad de transcripción a partir del promotor *PrpoD_{hs}* de respuesta heat-shock. La valoración de la actividad β -galactosidasa ha servido pues para estimar, i) la toxicidad asociada a la expresión de ciertos péptidos integrados en la β -galactosidasa, y ii) la activación de respuesta heat-shock asociada a la expresión de secuencias tóxicas en *E. coli*.

La β -galactosidasa es una enzima que hidroliza β -D-galactósidos como la lactosa. La actividad de esta enzima se puede medir fácilmente mediante el método de J. H. Miller (Platt *et al.*, 1972). Este método utiliza análogos cromogénicos de la lactosa cuya hidrólisis da lugar a subproductos con color que se pueden visualizar *in situ* y cuantificar en un espectrofotómetro. Los substratos más utilizados son el *orto*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), el clorofenol-rojo-galactopiranosido (CPRG) y el X-Gal. El ONPG es un compuesto incoloro que en presencia de la β -galactosidasa se hidroliza a galactosa y *orto*-nitrofenol. Éste último es un compuesto de color amarillo y por consiguiente cuantificable en un espectrofotómetro a λ 420nm. Cuando la concentración de ONPG es alta, la cantidad de *orto*-nitrofenol que se produce es proporcional a la cantidad de enzima y al tiempo de reacción. Para que la valoración sea lineal, el ONPG debe estar en exceso. La reacción se interrumpe tras la adición de una solución concentrada de carbonato sódico que cambia el pH de la mezcla de reacción de 7 a 11-12, y que convella la ralentización de la actividad enzimática.

El método utilizado para valorar la actividad β -galactosidasa es el que se describe a continuación:

1. Tomar 0.1-0.5 ml del cultivo de expresión y transferirlos a un tubo de hemodiálisis de vidrio de 3 ml.
2. Añadir 0.1 ml de cloroformo. Agitar con vórtex vigorosamente durante 30 seg para lisar las células.
3. Añadir 0.5-0.9 ml de tampón Z con β -mercaptoetanol. El volumen final en el tubo de hemodiálisis debe ser 1.1 ml.
4. Guardar las muestras en hielo picado a 4°C. Antes de proceder al ensayo enzimático de la β -galactosidasa es preferible extraer y acumular en este punto todas las muestras a valorar.
5. Incubar las muestras en baño termostático a 28°C, 5 min.
6. Añadir 0.2 ml de solución de ONPG a cada muestra.
7. Incubar las muestras en baño termostático a 28°C hasta que adquieren un color amarillo.
8. Añadir 0.5 ml de solución 1M Na₂CO₃ para parar la reacción. El tiempo transcurrido entre la adición del ONPG y la del Na₂CO₃ constituye el tiempo de reacción, que oscila entre 2 y 360 min según la cantidad de β -galactosidasa de la muestra.
9. Medir la absorbancia de cada muestra a λ 420nm (A_{420}) y λ 550nm (A_{550}).
10. Calcular la actividad β -galactosidasa de cada muestra expresada como unidades/ml según la fórmula

$$\frac{A_{420} - (1.75 \times A_{550})}{V \text{ (ml)} \times t \text{ (min)}} \times 1000$$

donde 'V' representa el volumen de muestra utilizado en el ensayo y 't' el tiempo de reacción. Referir también la actividad β -galactosidasa de cada muestra según la densidad celular del cultivo (A_{550}) en cada punto. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de *orto*-nitrofenol por minuto a 28°C y pH 7.0.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón Z: 60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, 50mM β -Mercaptoetanol, pH 7.0; 0.5 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O) (Fluka)	10.74 g
Sodio dihidrógeno fosfato monohidratado (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) (Merck) 2.75 g
Cloruro potásico (KCl) (Fluka) 0.37 g
Sulfato magnésico heptahidratado (MgSO ₄ ·7H ₂ O) (Fluka) 0.12 g

Disolver en 0.45 L de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 7.0 y enrasar a 0.5 L con agua Milli-Q.

Conservar a 4°C. No autoclavar.

IMPORTANTE: Antes de utilizar añadir 140 μ l de β -Mercaptoetanol (Fluka) por cada 50 ml de Tampón Z.

Solución ONPG 4mg/ml; 5 ml

IMPORTANTE: Esta solución debe prepararse poco antes de ser utilizada.

Pesar y poner en un vial 20 mg de ONPG (Boehringer Mannheim, Fluka).

Disolver en 5 ml de Tampón P.

Mantener a T^a amb protegida de la luz.

Tampón P: 60mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, pH 7.0; 100 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O) (Fluka)	.. 2.15 g
Sodio dihidrógeno fosfato monohidratado (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) (Merck) 0.55 g

Disolver en 90 ml de agua Milli-Q.

Enrasar a 100 ml con agua Milli-Q.

Solución 1M Na₂CO₃; 50 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 5.3 g de carbonato sódico (Na₂CO₃) (Fluka).

Disolver en 40 ml de agua Milli-Q.

Enrasar a 50 ml con agua Milli-Q.

VI.F. Métodos de obtención y caracterización de virus recombinantes

VI.F.1. Métodos de obtención de virus recombinantes

En este apartado se describe el método utilizado para introducir en una célula eucariota las moléculas de DNA viral y DNA plasmídico que deben recombinar para dar lugar al virus recombinante. También se describe los métodos utilizados para aislar y enriquecer la población de virus recombinante con la finalidad de obtener una suspensión viral recombinante homogénea.

VI.F.1.A.1. Co-transfección de líneas celulares

Se habla de transfección cuando una célula es infectada por un ácido nucleico desnudo y la entrada de éste no depende de receptores específicos (Coen, 1990). En este trabajo experimental hablamos de co-transfección para referirnos a la entrada en la célula de un DNA viral desnudo conjuntamente con un DNA plasmídico que contiene un

fragmento de DNA viral. En la co-transfección, el DNA plasmídico actúa de portador o lanzadera del fragmento de DNA viral. Asimismo, entendemos por co-transfectar al hecho concreto de inducir la entrada conjunta de ambas moléculas de DNA. El objetivo de la co-transfección es que el DNA viral incorpore el fragmento viral de la molécula de DNA plasmídico mediante mecanismos de recombinación homóloga. El resultado final es la obtención de un virus recombinante.

Existen diversas técnicas para introducir DNA en una célula eucariota. En la bibliografía se habla de la fusión con liposomas que contienen DNA, de la utilización de precipitados de ortofosfato cálcico/DNA, de la utilización de moléculas tipo lipofectinas o de la electroporación. De entre estas técnicas, para este trabajo experimental se ha escogido la electroporación de células. La electroporación consiste en aplicar pulsos de campo eléctrico de alto voltaje y de corta duración que, de manera temporal, crean poros en las membranas celulares. La membrana celular no es conductora de corriente eléctrica y su exposición a campos eléctricos de alto voltaje genera una diferencia de potencial transmembrana. En estas condiciones, las cargas eléctricas de sentido contrario a uno y otro lado de la membrana se atraen entre sí y comprimen la membrana ('membrane thinning'). A una diferencia de potencial crítica, la membrana se puede llegar a romper localmente (rotura dieléctrica de la membrana celular) formando poros por el que fluyen las cargas. Si estos poros son lo suficientemente grandes también pueden fluir macromoléculas de DNA viral y DNA plasmídico al citoplasma celular. Cuando desaparece el campo eléctrico, y la diferencia de potencial creada no ha sido excesiva o el tiempo de duración del pulso muy prolongado, los poros vuelven a cerrarse sin comprometer la viabilidad de las células electroporadas (Hofmann, 1989?). Se ha observado, no obstante, que para que una co-transfección sea eficiente es necesario trabajar en unas condiciones en las que sí se dé la lisis de una parte de las células electroporadas (Neumann *et al.*, 1982).

Durante la construcción del virus BoHV-1 gE⁻ (Rebordosa, 1996), nuestro grupo de investigación introdujo una serie de cambios en las condiciones de electroporación y en la línea celular descritas en la bibliografía, utilizadas para obtener virus BoHV-1 recombinantes (Liang *et al.*, 1991). El cambio de células MDBK por GBK mejoró notablemente los resultados de la co-transfección, obteniéndose eficiencias medias de transfección de 2.5×10^3 pfu/ μ g de DNA viral, veinte veces mayor que la hasta entonces descrita (Liang *et al.*, 1991). Estos cambios son los mismos que se ha utilizado en este trabajo experimental para construir el virus recombinante BoHV-1 RAPPV. El electroporador utilizado ha sido el BTX Electroporation System[®] (Electro Cell Manipulator[®] 600), y el método es el que se describe a continuación:

1. Disponer de 1 μ g de DNA viral y 0.5 μ g de DNA plasmídico linearizado, por cada 1 co-transfección que se quiera realizar. Ambos deben estar en tampón TE 1x y en un volumen ≤ 5 μ l. La linearización del plásmido minimiza cualquier episodio de recombinación entre ambas moléculas que pudiera incorporar secuencias propias del plásmido a la molécula resultante de DNA viral.
2. Utilizar 1 monocapa de células GBK 70-80% confluyente en frasco de cultivo de 175 cm² de superficie, para cada 1 co-transfección que se quiera realizar.
3. Tripsinizar la/s monocapa/s de células GBK. Resuspender en medio A.
4. Calcular la concentración de células/ml utilizando una cámara de recuento de Neubauer.
5. Centrifugar la suspensión celular a 250xg, 10 min a 4°C. Aspirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril.
6. Resuspender las células de cada monocapa en 2-3 ml de tampón HBS pre-enfriado en hielo picado.
7. Centrifugar la suspensión celular a 250xg, 10 min a 4°C. Aspirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril.
8. Repetir 2 veces más los pasos 6. y 7.
9. Resuspender las células en tampón HBS frío/hielo. La concentración celular final de la suspensión debe ser 3×10^7 células/ml. La fórmula "número de células totales / 3×10^7 =" da como resultado el volumen de resuspensión a utilizar.
10. Para cada transfección, transferir 400 μ l de células resuspendidas a una cubeta de electroporación de 0.2 cm de separación entre electrodos, pre-enfriada en hielo picado. En total se utiliza 1.2×10^7 células por cada 1 transfección.
11. Añadir 1 μ g de DNA viral y 0.5 μ g de DNA plasmídico linearizado. Agitar suavemente.
12. Incubar la suspensión en hielo picado, 10 min.
13. Colocar la cubeta en el electroporador y aplicar 6 pulsos de 140 V, 25x10 μ F y 13 Ω . Incubar la cubeta en hielo picado 30 seg entre pulso y pulso.

14. Incubar la cubeta de electroporación en hielo picado 10 min.
15. Transferir la suspensión de células electroporadas a una placa de cultivo de 90 mm de diámetro con 10 ml de Medio A atemperado a 37°C. Distribuir las células homogéneamente sobre la superficie.
16. Incubar las células a 37°C hasta que estén totalmente adheridas a la superficie de la placa (aprox. 3-4 h). Las células muertas durante la electroporación permanecen en suspensión.
17. Eliminar el Medio A y las células muertas en suspensión mediante aspiración con un pipeta Pasteur estéril.
18. Añadir 15 ml de Medio A atemperado a 37°C.
19. Incubar las células a 37°C, 72 h. En las células electroporadas, el efecto citopático aparece con la misma progresión que durante la infección normal de las monocapas, y es total a aprox. 72 h post-electroporación.
20. Recoger el sobrenadante del cultivo y clarificarlo mediante centrifugación (1000xg, 30 min a 4°C).
21. Añadir glicerol estéril al sobrenadante de centrifugación a una concentración final 15% (v/v).
22. Preparar alícuotas y conservar el sobrenadante del cultivo a -80°C. Es conveniente preparar 2-3 alícuotas pequeñas (aprox. 100 µl) para futuras titulaciones, y alícuotas mayores (aprox. 3 ml) del resto del sobrenadante.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón HBS: 20mM HEPES pH 7.1, 137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM NaH₂PO₄, 5mM glucosa; 0.5 L

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S) (Merck)	2.38 g
Cloruro sódico (NaCl) (Fluka)	4.00 g
Cloruro potásico (KCl) (Fluka)	0.19 g
Sodio dihidrógeno fosfato monohidratado (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) (Merck) ...	0.05 g
D-glucosa monohidratada (C ₆ H ₁₂ O ₆ ·H ₂ O) (Merck)	0.49 g

Disolver en 0.45 L de agua Milli-Q.

Ajustar a pH 7.1 con NaOH 0.5M y enrasar a 0.5 L con agua Milli-Q.

Esterilizar por filtración.

Conservar a 4°C.

VI.F.1.A.2. Infección de cultivos celulares en medio semisólido

La infección de cultivos celulares en medio semisólido consiste en aplicar medio de cultivo semisólido (GMEMs) sobre una monocapa celular recién infectada, de modo que los viriones formados a partir de una célula pueden infectar las células inmediatamente vecinas pero no difundir a un punto más alejado de la monocapa celular. El objetivo de este tipo de cultivo es obtener una monocapa celular que presente núcleos de infección aislados, cada uno fruto de la infección de una partícula vírica distinta.

Cuando se utiliza el sobrenadante de un cultivo de células co-transfectadas para infectar una monocapa celular en medio semisólido, se puede obtener núcleos de infección aislados producto de la infección de virus recombinantes. En tal caso, se puede recuperar las partículas víricas que han difundido localmente y que han quedado atrapadas en el medio semisólido que cubre el núcleo de infección, e iniciar con ellas una nueva ronda de infección, aislamiento y recuperación del virus.

El método utilizado para infectar cultivos celulares en medio semisólido es el que se describe a continuación:

1. Tripsinizar una monocapa de células 95-100% confluyente de un frasco de cultivo de 175 cm² de superficie.
2. Contabilizar al microscopio el número de células/ml utilizando una cámara de Neubauer.
3. Disponer de 3 placas de cultivo de 90 mm de diámetro y sembrar en cada una de ellas 2x10⁶ células en un volumen final de 10 ml de Medio A. Procurar que la suspensión celular sea homogénea.
4. Incubar las placas 24-48 h hasta que se obtenga una monocapa 95-100% confluyente.
5. Aspirar el Medio A con una pipeta Pasteur estéril.

6. Infectar las monocapas celulares con 10, 50 y 250 μ l, respectivamente, del sobrenadante de un cultivo de células co-transfectadas en un volumen final de 2.5 ml de Medio A. Distribuir la suspensión de infección por toda la monocapa celular.
7. Incubar a 37°C, 1.5-2 h. Cada 25-30 min, distribuir la suspensión de infección de forma homogénea sobre la superficie de la monocapa celular.
8. Aspirar la suspensión de infección con una pipeta Pasteur estéril.
9. Cubrir las monocapas celulares con 12 ml de medio GMEMss y dejar solidificar a T^a amb, 15-20 min.
10. Incubar las monocapas celulares a 37°C, 48-72 h. Pasado este tiempo y si ha habido infección, se puede visualizar las calvas formadas a través del medio de cultivo. En este punto las monocapas celulares ya están a punto para ensayar una hibridación *in situ* de detección del virus recombinante.

VI.F.1.A.3. Hibridación *in situ* sobre placa de cultivo

La hibridación *in situ* sobre placa de cultivo es un método analítico que permite saber si el genoma de una partícula vírica infectiva obtenida en un experimento de co-transfección ha incorporado o no el fragmento de DNA deseado. Este método se basa en el reconocimiento específico entre un DNA sonda y el DNA fijado y desnaturalizado de las partículas víricas atrapadas en una calva en particular. Aunque técnicamente son distintas, la hibridación *in situ* sobre placa de cultivo y la α -complementación de clones transformantes bacterianos han sido utilizadas con la misma idea: seleccionar los individuos de una población, llámense virus infectivos o clones transformantes, que son portadores de la modificación deseada en su genoma.

En este trabajo experimental se ha utilizado la hibridación *in situ* como un sistema de selección positivo, es decir, para seleccionar las partículas víricas infectivas que hibridan con el DNA sonda. En concreto, se ha seleccionado las partículas víricas BoHV-1 que han recuperado el gen *gE*.

La metodología de la hibridación *in situ* sobre placa de cultivo no es sencilla. El método utilizado, y que se describe a continuación, es una adaptación de un método de hibridación *in situ* sobre células crecidas en portaobjetos de vidrio (Heiles *et al.*, 1988), desarrollada para obtener el virus defectivo BoHV-1 gE⁻ (Rebordosa, 1996).

Desprendimiento de la agarosa

1. Comprobar visualmente la presencia de calvas en un cultivo de infección en medio semisólido.
2. Disponer de recortes circulares de papel Whatman 3MM (Schleicher & Schuell) de diámetro ligeramente inferior al de la placa de cultivo. Los recortes deben ir marcados con 3 agujeros que ocupen los vértices de un triángulo escaleno imaginario. Los recortes, además, deben haber sido esterilizados mediante autoclavado durante 20 min, a 135°C según un programa de autoclavado de sólidos.
3. Colocar un recorte de papel Whatman 3MM sobre el medio GMEMss de la placa de cultivo. Dejar que el papel se empape de la fracción líquida del medio GMEMss durante mínimo 5 min. El papel Whatman tiene tres funciones: i) dar consistencia a la agarosa para desprenderla mejor de la monocapa celular, ii) empaparse y evitar en lo posible la mezcla de partículas víricas de diferentes calvas, y iii) marcar la posición original de la agarosa sobre la monocapa.
4. Marcar con rotulador indeleble la posición de los tres agujeros del recorte de papel Whatman 3MM en la base de la placa de cultivo.
5. Voltear la placa de cultivo. Desprender el medio GMEMss en una placa de Petri estéril con ayuda de una espátula.
6. Sellar con Parafilm[®] y guardar el medio GMEMss a 4°C. En caso de que la selección resulte positiva, los virus de la calva hibridada serán rescatados a partir de este medio.

Tratamiento de monocapas para la hibridación *in situ*

7. Por 2 veces, lavar con 10 ml de tampón PBS 1x agitando muy suavemente. Aspirar el sobrenadante con pipeta Pasteur estéril.

8. Fijar la monocapa celular a la placa de cultivo con 10 ml de etanol absoluto (Carlo Erba). Incubar a T^a amb, 10 min. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
9. Rehidratar la monocapa celular con 10 ml de etanol 70% (v/v), agitar suavemente e incubar a T^a amb, 5 min. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
10. Repetir 2 veces el paso 9. con etanol 50% (v/v) y etanol 30% (v/v), respectivamente.
11. Por 2 veces, lavar con 10 ml de tampón PBS 1x 5mM MgCl₂, agitando suavemente e incubando a T^a amb, 5 min. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
12. Incubar la monocapa celular con 10 ml de solución 0.2M HCl a T^a amb, 20 min. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
13. Incubar la monocapa celular con 10 ml de tampón SSC 2x 5mM EDTA a 50°C, 30 min. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
14. Incubar la monocapa celular con 5 ml de tampón PBS 1x Proteinasa K 1μg/ml a 37°C, 15 min. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
15. Por 2 veces, lavar con 10 ml de tampón PBS 1x 0.2% (p/v) glicina, agitando suavemente e incubando a T^a amb, 5 min. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
16. Fijar la monocapa celular con 10 ml de tampón PBS 1x 4% (p/v) paraformaldehído a T^a amb, 30min. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
17. Por 2 veces, lavar con 10 ml de tampón PBS 1x 5mM MgCl₂, agitando suavemente e incubando a T^a amb, 10 min. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón PBS 1x 5mM MgCl₂; 100 ml

Diluir 10 ml de tampón PBS 10x con 80 ml de agua Milli-Q.
Añadir 0.5 ml de 1M MgCl₂ y homogeneizar.
Enrasar a 50 ml con agua Milli-Q.

Solución HCl 0.2M; 50 ml

Diluir 0.84 ml de solución 37% (11.94M) HCl (Carlo Erba, Fluka) con 50 ml de agua Milli-Q.

Tampón SSC 2x 5mM EDTA; 50 ml

Diluir 5 ml de tampón SSC 20x con 40 ml de agua Milli-Q.
Añadir 0.5 ml de EDTA 0.5M pH 8.0 y homogeneizar.
Enrasar a 50 ml con agua Milli-Q.

Tampón PBS 1x 1 μg/ml Proteinasa K; 100 ml

Pesar y poner en un tubo Eppendorf 0.1 mg de Proteinasa K (Gibco BRL).
Añadir 1 ml de agua Milli-Q y disolver la Proteinasa K.
Diluir 10 ml de tampón PBS 10x con 89 ml de agua Milli-Q.
Añadir 1 ml de solución de Proteinasa K disuelta al tampón PBS 1x preparado y homogeneizar.

Tampón PBS 1x 0.2% (p/v) glicina; 50 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 0.1 g de glicina (Sigma).
Disolver en 40 ml de agua Milli-Q.
Añadir 5 ml de tampón PBS 10x y homogeneizar.
Enrasar a 50 ml con agua Milli-Q.

Tampón PBS 1x 4% (p/v) paraformaldehído; 50 ml

Pesar y poner en un frasco tipo Erlenmeyer 2 g de paraformaldehído (Merck).
Añadir en 40 ml de agua Milli-Q y 30 μl de 1M NaOH.
Disolver con incubación al baño maría.
Añadir 5 ml de tampón PBS 10x y homogeneizar.
Enrasar a 50 ml con agua Milli-Q.

Prehibridación de la monocapa celular

18. Preparar la solución de prehibridación.

19. Añadir a la placa 10 ml de solución de prehibridación.
20. Incubar la placa a 95-97°C, 3 min.
21. Incubar la placa a 42°C, 20 min con agitación suave (aprox. 40 rpm).
22. Incubar la placa a 95-97°C, 3 min.
23. Enfriar rápidamente la placa sobre un baño de agua/hielo.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Solución de prehibridación: SSC 5x, 50% (v/v) formamida, 5x Denhart's, 100 µg/ml DNA monohebra; 10 ml

Poner en un vial 1.9 ml de agua Milli-Q.

Añadir:

Tampón SSC 20x	2.5 ml
Formamida (Fluka)	5.0 ml
Solución Denhart's 100x	0.5 ml
Solución DNA monohebra 10 mg/ml	0.1 ml

Homogeneizar.

Solución Denhart's 100x: 2% (p/v) Ficoll, 2% (p/v) polivinilpirrolidona, 2% (p/v) Albúmina Sérica Bovina (BSA); 50 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

Ficoll (Sigma)	1 g
Polivinilpirrolidona (Sigma)	1 g
Albúmina Sérica Bovina (BSA) fracción V (Boehringer Mannheim)	1 g

Disolver en 40 ml de agua Milli-Q.

Enrasar a 50 ml con agua Milli-Q.

Filtrar con un filtro de acetato de celulosa 0.45 µm (Millipore, Corning).

Preparar alícuotas de 5 ml y conservar a -20°C.

Solución DNA monohebra 10 mg/ml: 25 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados 0.25 g de DNA de esperma de salmón (Boehringer Mannheim).

Disolver en 25 ml de tampón TE 1x.

Sonicar hasta que disminuye la viscosidad.

Por 2 veces, incubar durante 10 min a 100°C y enfriar en baño de agua/hielo durante 10 min.

Preparar alícuotas y conservar a -20°C.

Hibridación de la monocapa celular

24. Preparar la solución de hibridación *in situ*.
25. Desnaturalizar 50-100 ng de DNA sonda marcado incubándolo a 95°C, 10 min.
26. Enfriar rápidamente el DNA sonda en un baño de agua/hielo durante 10 min.
27. Añadir el DNA sonda desnaturalizado a la solución de hibridación *in situ* precalentada a 42°C.
28. Retirar la solución de prehibridación de la placa mediante aspiración con pipeta Pasteur.
29. Añadir 3 ml de solución de hibridación *in situ* con DNA sonda y sellar la placa con Parafilm®.
30. Incubar la placa a 42°C, 12-14 h sin agitación.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Solución de hibridación *in situ*: SSC 5x, 45% (v/v) formamida, 5x Denhart's, 5-10% (p/v) sulfato dextrano; 10 ml

Poner en un vial 1.2 ml de agua Milli-Q.

Añadir:

Tampón SSC 20x	2.5 ml
Formamida (Fluka)	4.5 ml

Pesar 0.8 g de sal sódica de sulfato dextrano (Sigma).

Añadir el sulfato dextrano poco a poco y agitando con vórtex hasta su disolución.

Añadir 0.5 ml de solución Denhart's 100x y homogeneizar.

IMPORTANTE: falta añadir todavía el DNA sonda desnaturalizado.

Lavado post-hibridación de la monocapa

31. Recuperar la solución de hibridación *in situ* y conservarla a -20°C . Esta solución se puede reutilizar varias veces. En los usos posteriores, esta solución se debe incubar 10 min a 95°C más otros 10 min en un baño de agua/hielo para desnaturalizar el DNA sonda que todavía contiene.
32. Por 2 veces, incubar la placa con 10 ml de tampón SSC 5x 45% (v/v) formamida a 42°C , 15 min. Retirar cada vez el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
33. Por 2 veces, incubar la placa con 10 ml de tampón SSC 2x a T^{a} amb, 5 min. Retirar cada vez el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
34. Por 2 veces, incubar la placa con 10 ml de tampón SSC 0.1x a 60°C , 15 min. Retirar cada vez el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Tampón SSC 5x 45% (v/v) formamida; 50 ml

Diluir 12.5 ml de tampón SSC 20x con 15 ml de agua Milli-Q.
Añadir 22.5 ml de formamida (Fluka) y homogeneizar.

Estabilización del DNA sonda (opcional)

Este paso sólo es necesario si sobre una misma monocapa celular se desea diferenciar híbridos distintos. En este caso el DNA sonda de uno y otro híbrido habrá sido marcado con moléculas distintas, y se utilizará substratos cromogénicos distintos para sendos DNA sonda. En este trabajo experimental se ha hibridado el gen *lacZ* y el gen *gE*, marcados con biotina y digoxigenina respectivamente, sobre una misma monocapa celular. Debido a que en el revelado de ambos DNA sonda participa la misma enzima (fosfatasa alcalina), y para poder diferenciar un híbrido del otro, ambos DNA sonda han sido revelados por separado. Ello conlleva, además, la necesidad de inactivar la fosfatasa alcalina del primer revelado antes de proceder al segundo revelado. Este paso de inactivación es por incubación a alta temperatura, y podría provocar la desnaturalización del segundo DNA sonda antes de ser revelado. Por consiguiente, es necesario estabilizar la hibridación de los DNA sonda. El método utilizado para estabilizar el DNA sonda es el que se describe a continuación:

35. Colocar la placa a 8 cm de una fuente de luz ultravioleta de λ 254nm (Lámpara ATOM, modelo UVATOM-70). Irradiar durante 4 min.
36. Añadir rápidamente a la placa 5 ml de tampón 1 para evitar que se seque en exceso.

Revelado primero

37. Lavar la placa con 10 ml de tampón 1 a T^{a} amb, 2 min con agitación suave. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
38. Incubar la placa con 10 ml de tampón 2 a T^{a} amb, 20 min con agitación suave. El tampón 2 debe estar preparado 1 h antes de usarlo pues debe atemperarse a T^{a} amb. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
39. Preparar una dilución 1:5000 de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (anti-DIG/AP) (Boehringer Mannheim), o una dilución 1:2500 de streptavidina conjugada a fosfatasa alcalina (streptavidina/AP) (Boehringer Mannheim) en tampón 2, según sea el DNA sonda a revelar primero. En este trabajo, primero se ha revelado el DNA sonda marcado con biotina y para ello se ha utilizado streptavidina/AP.
40. Incubar la placa con 5 ml de anticuerpo diluido a T^{a} amb, 30 min con agitación suave. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
41. Por 2 veces, lavar la placa con 15 ml de tampón 1 a T^{a} amb, 15 min con agitación suave. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.

42. Equilibrar la placa con 10 ml de tampón 3 a T^a amb, 2 min con agitación suave. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
43. Incubar la placa con 5 ml de solución de revelado de fosfatasa alcalina recién preparada. Incubar a oscuras a T^a amb, 2-3 h (o hasta que se vean las calvas de color) sin agitación. Si se desea acelerar el revelado se puede incubar a 37°C. También se puede renovar cada 45 min la solución de revelado de fosfatasa alcalina.
44. Retirar la solución de revelado de fosfatasa alcalina mediante aspiración con pipeta Pasteur.
45. Lavar la placa con 10 ml de tampón TE 1x a T^a amb, 5 min con agitación suave.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Solución de revelado de fosfatasa alcalina (rojo); 10 ml

Transferir a un vial 10 ml de tampón 3.

Añadir y disolver 1 pastilla de 'AP substrate tablets red' que contiene 2 mg de naftol-AS-fosfato y 1 mg de Fast Red TR. Este producto viene suministrado en el kit Multicolor Detection Set (Boehringer Mannheim).

Inactivación de la fosfata alcalina (opcional)

46. Incubar la placa con 10 ml de solución 50mM EDTA pH 8.0 a 82°C, 15 min. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

EDTA 50mM pH 8.0; 50 ml

Diluir 5 ml de EDTA 0.5M pH 8.0 con 45 ml de agua Milli-Q.

Revelado segundo (opcional)

47. Por 2 veces, lavar la placa con 15 ml de tampón 1 a T^a amb, 5 min con agitación suave. Retirar el sobrenadante mediante aspiración con pipeta Pasteur.
48. Repetir los pasos 38. a 45. del revelado primero de la placa usando un substrato cromogénico diferente al utilizado en el primer revelado (p.e. NBT / BCIP).
49. Secar la placa a T^a amb y conservar.

VI.F.1.A.4. Rescate del virus recombinante del medio semisólido

Las partículas víricas que, en el conjunto de una monocapa celular infectada, han proliferado y formado una calva considerada de interés por hibridación *in situ*, pueden ser parcialmente recuperadas a partir del medio semisólido que las cubría. Con estas partículas víricas recombinantes se puede infectar nuevos cultivos, sobre éstos hacer nuevas hibridaciones *in situ* y volver a recuperar las partículas víricas recombinantes del medio semisólido. El resultado de este segundo ciclo de infección-detección-recuperación es un enriquecimiento del número de partículas víricas recombinantes con respecto al conjunto de partículas víricas producidas en el cultivo. Si se enlaza 3-4 de estos ciclos de enriquecimiento, el resultado final es la obtención de una suspensión vírica homogénea, es decir, un conjunto de partículas víricas que presentan el patrón de hibridación *in situ* seleccionado. A partir de estas suspensiones víricas se puede infectar cultivos celulares en medio líquido, inicialmente pequeños y más tarde monocapas mayores, para obtener suficientes partículas víricas que permitan realizar las pruebas analíticas necesarias que confirmen o no la realidad de una nueva cepa viral.

El método utilizado para recuperar virus recombinantes del medio semisólido es el que se describe a continuación:

1. Marcar en la base de la placa de la hibridación *in situ* la calva recombinante positiva.
2. Posicionar el medio GMEMs adsorbido al papel Whatmann 3MM (Schleicher & Schuell) sobre la base de la placa hibridada haciendo coincidir los 3 agujeros del papel Whatman con los 3 puntos rotulados en la placa de hibridación *in situ*. Esta posición es exactamente la que ocupaba el medio sobre la monocapa celular.
3. Comprobar que la calva recombinante es visible a través del medio GMEMs.
4. Recuperar la porción de medio semisólido que está sobre la calva recombinante utilizando una pipeta automática de 1 ml con una punta cortada en el extremo.
5. Transferir el trozo de medio seccionado a un tubo Eppendorf con 0.5 ml de Medio A.
6. Incubar el trocito de medio seccionado en Medio A a 4°C, 12-14 h con agitación 'end-over-end'. De esta manera las partículas víricas difunden del medio semisólido al medio líquido. Cabe señalar que tiempos de incubación mayores conllevan la pérdida de título viral.
7. Si procede, infectar nuevas monocapas celulares con una fracción (50-100 µl) del Medio A obtenido, iniciando así un nuevo ciclo de infección-detección-recuperación. Conservar el resto de la suspensión vírica a -80°C, en Medio A y en presencia de glicerol estéril al 15% (v/v).

VI.F.2. Métodos de caracterización de virus recombinantes

En este apartado se describe las técnicas analíticas utilizadas para la caracterización *in vitro* del virus recombinante obtenido. Se ha estudiado la cinética de infección del virus recombinante en un cultivo en medio líquido y en medio semisólido. También se ha determinado el área de las calvas que forma el virus recombinante en un cultivo en medio semisólido.

VI.F.2.A.1. Cinética de crecimiento

En este trabajo experimental se ha comparado la tasa de producción de las cepas FM, gE⁻ y RAPPR⁻ del BoHV-1 en medio semisólido. También se ha comparado la tasa de producción en medio líquido de las cepas FM y RAPPR⁻. En uno y otro caso se ha utilizado cultivos confluentes de células MDBK.

Para la obtención de la curva de crecimiento en medio líquido se ha utilizado el método que se describe a continuación:

1. Disponer para cada virus de 1-2 monocapas celulares confluentes en un frasco de cultivo de 175 cm² de superficie.
2. Infectar las monocapas a una m.o.i. de 0.001, en un volumen de infección de 10 ml de Medio A.
3. Incubar las monocapas infectadas a 37°C, 1 h.
4. Retirar el sobrenadante de la infección mediante aspiración con pipeta Pasteur estéril.
5. Añadir 35 ml de Medio A e incubar a 37°C. Éste se ha escogido como el momento de infección tiempo 0.
6. Tomar fracciones de 0.9 ml y añadir glicerol estéril a una concentración final 15% (v/v). Homogeneizar y conservar a -80°C.
7. Tomar fracciones del cultivo hasta las 50 h de incubación.
8. Titular el sobrenadante de infección de cada fracción obtenida en placas de cultivo de células MDBK.

Para la obtención de la curva de crecimiento en medio semisólido se ha utilizado el método que se describe a continuación.

1. Disponer de 5 monocapas celulares confluentes en placas de cultivo de 60 mm de diámetro para cada virus con el que se prevee infectar.
2. Infectar cada placa a una m.o.i. de 0.001, en un volumen de infección de 2.5 ml de Medio A.
3. Incubar las monocapas infectadas a 37°C, 1 h.
4. Retirar el sobrenadante de la infección mediante aspiración con pipeta Pasteur estéril.
5. Añadir 12 ml de medio GMEMss y dejar solidificar a T^a amb, 30 min.
6. Incubar a 37°C. Extraer una placa cada 24 h.
7. Desprender el medio semisólido y trocearlo con una gillette sobre una placa de cultivo. Transferir el medio troceado a un vial y añadir 12.5 ml de Medio A.
8. Incubar a 4°C, 12-14 h con agitación 'end-over-end'.
9. Centrifugar la suspensión a 1000xg, 5 min a 4°C para sedimentar los restos del medio semisólido.
10. Tomar una fracción de 0.9 ml y añadir glicerol estéril a una concentración final 15% (v/v). Homogeneizar y conservar a -80°C.
11. Titular el sobrenadante de infección de cada fracción obtenida en placas de cultivo de células MDBK.

VI.F.2.A.2. Determinación del área de calva

El área de la calva que forma un virión de alphaherpesvirus cuando infecta un cultivo celular es un parámetro que caracteriza al virus en cuestión. En presencia de medio semisólido, el área de la calva ayuda a determinar la capacidad del virus para transmitirse de célula a célula y propagar la infección sin necesidad de acceder al medio extracelular. De hecho, así fue cómo se estimó el papel que juega la gE en la transmisión directa célula a célula del BoHV-1 (Rebordosa *et al.*, 1996).

En este trabajo se ha medido y comparado estadísticamente el área de las calvas que forman las cepas FM, gE⁻ y RAPPR⁻ del BoHV-1 tras infectar un cultivo celular en medio semisólido. Las calvas medidas corresponden a 2 monocapas celulares infectadas conjuntamente con viriones FM y gE⁻, o RAPPR⁻ y gE⁻, respectivamente. Ambas infecciones se han ensayado a una m.o.i. de 0.0001. Tras 72 horas de infección, se ha aplicado la técnica de la hibridación *in situ* sobre placa de cultivo para detectar los tres tipos de calvas formados. Primero, se ha utilizado la sonda *lacZ**BIO (rojo) para detectar las calvas formadas por los viriones gE⁻. A continuación, se ha utilizado la sonda *gE**DIG (marrón) para detectar las calvas formadas por los viriones FM y RAPPR⁻. El área de las calvas se ha hallado mediante el programa de dibujo asistido por ordenador AutoCAD 14 (Autodesk) sobre una imagen digital de cada una de las placas. Para ello, se ha trazado manualmente una línea poligonal que resigue el perímetro del área hibridada de cada calva.

VI.F.2.A.2.a. Análisis descriptivo de valores

La distribución del área de calva de las tres cepas del BoHV-1 ha sido descrita con índices basados en ordenaciones (p.e. mediana, amplitud intercuartil, etc.) y en momentos (p.e. media, desviación estándar, etc.) (Doménech Massons & Granero, 1998b). Para representar gráficamente estas distribuciones se ha utilizado el diagrama de caja o "boxplot" (Fig. 72). Este diagrama utiliza los índices basados en ordenaciones. Estos índices se caracterizan porque no consideran todos los valores de una distribución, de manera que los valores más extremos o anormalmente alejados pierden peso y no afectan el valor del índice. El "boxplot" ofrece una representación sintética de la distribución a la vez que permite,

- i) localizar la tendencia central de la distribución,
- ii) comprobar la dispersión del 50% central de los valores de la distribución (longitud de la caja),
- iii) observar la posible asimetría en el centro de la distribución (posición de la mediana dentro de la caja),
- iv) observar la posible asimetría de las colas de la distribución (patillas de diferente longitud), y
- v) detectar los valores más extremos de la distribución (valores exteriores y alejados).

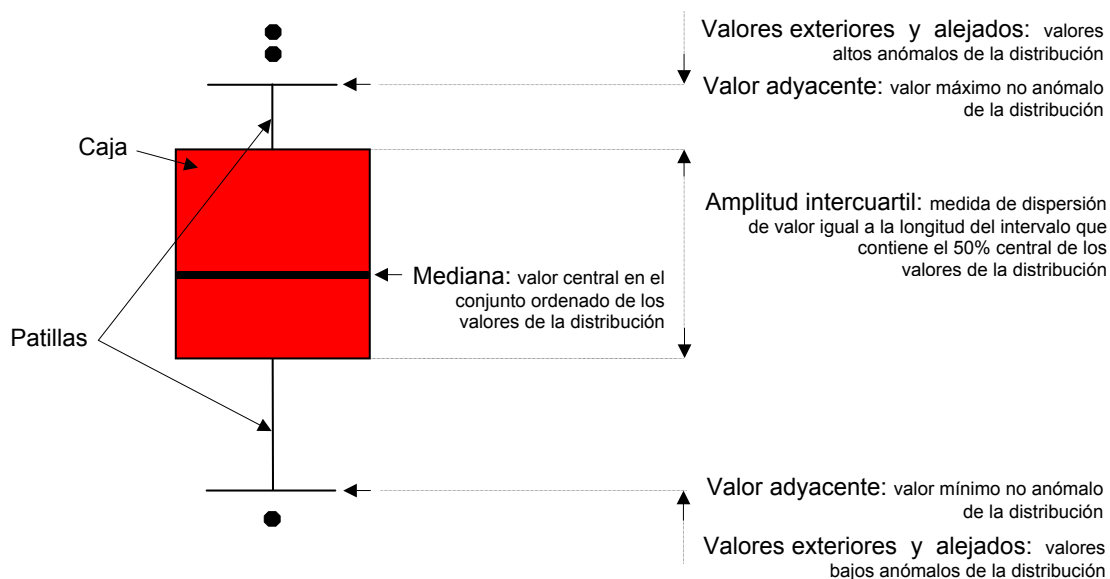


Figura 72. Interpretación de un diagrama de caja o 'boxplot'

VI.F.2.A.2.b. Análisis estadístico

Para comparar entre sí el área de calva de las cepas FM, gE⁻ y RAPPR⁻ del BoHV-1, se ha aplicado análisis estadísticos mediante el programa SPSS 10.0 (SPSS, Inc.).

La primera prueba realizada ha servido para determinar si las condiciones de cultivo en ambas placas han sido las mismas, esto es, que no ha habido un grado de confluencia celular distinto en ambas monocapas que haya condicionado el tamaño de unas u otras calvas. Para ello se ha comparado el área de las calvas gE⁻ de ambas placas. La prueba estadística aplicada ha sido la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Cabe señalar que en este caso particular no es aplicable la prueba paramétrica *t* de Student-Fisher porque ambas distribuciones, aunque siguen una distribución Normal y tienen igual variabilidad, presentan una asimetría que supera 2 veces su error estándar (Doménech Massons & Granero, 1998a).

Para comparar entre sí el área de calva de las tres cepas del BoHV-1 se ha aplicado un análisis de la variancia (ANOVA). El resultado de esta prueba determina que la diferencia entre el área media de las calvas FM, gE⁻ y RAPPR⁻ es, en conjunto, significativa ($P < 0.05$). El ANOVA, no obstante, no determina entre qué tipos de calva es significativa la diferencia de área. Para ello, ha sido necesario aplicar un análisis complementario de contrastes. Los contrastes definidos han sido FM vs gE⁻, RAPPR⁻ vs gE⁻ y RAPPR⁻ vs FM, y el análisis aplicado compara el área media de los dos tipos de calvas definidos en cada uno de ellos. Cabe señalar, que la prueba de Levene para la homogeneidad de variancias detecta diferencias significativas en el conjunto de las distribuciones, y que por ello el estadístico de contraste *t* utilizado es aquél que asume que no hay homogeneidad de variancias. Para cada contraste, el intervalo de confianza del 95% de la diferencia de medias se calcula según la fórmula $IC_{95\%} = d \pm t_{N-C; \alpha/2} \times EE(d)$, donde 'd' es la diferencia de medias, 'N' la suma de calvas que se comparan en cada contraste, 'C' el número total de tipos de calvas, y 'EE(d)' el error estándar de la diferencia de medias.

VI.G. Método de obtención de anticuerpos monoclonales

En este apartado se describe el método utilizado para obtener el anticuerpo monoclonal 3F9 (MAb 3F9) dirigido contra la gE del BoHV-1 FM, y que ha servido para desarrollar un modelo de test ELISA de bloqueo para el diagnóstico diferencial de animales infectados por BoHV-1. El método utilizado fusiona esplenocitos de ratón infectado experimentalmente con BoHV-1 FM, y células de mieloma NSI-D8.

Esplenectomía

El MAb 3F9 pertenece a una colección de MAbs anti-gE obtenida a partir de ratones hembra BalbC infectados experimentalmente con BoHV-1 FM mediante punción intraperitoneal. La pauta de inoculación seguida ha sido de 1 inoculación cada 2-3 semanas, hasta un total de 3-4 inoculaciones.

1. Sacrificar el ratón mediante asfixia en atmósfera de CO₂.
2. Proceder a diseccionar el ratón en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar. Mojar el pelaje del vientre del animal con etanol 70% (v/v). Escurrir el exceso de etanol y colocar el animal sobre una placa de Petri. Recortar un poco el pelaje del vientre del animal.
3. Pinzar y levantar un poco la piel del lado izquierdo del vientre del animal. Cortar la piel en dicho punto y separarla poco a poco de la membrana peritoneal.
4. Cortar la membrana peritoneal y localizar el bazo bajo el páncreas. Extraer el bazo lo más limpio posible de grasa y colocarlo sobre una placa de Petri de 40 mm de diámetro.
5. Pinchar un extremo del bazo con una aguja hipodérmica. Inyectar 1 ml de medio RPMI + 2%FCS con una jeringa tipo tuberculina o insulina por el otro extremo del bazo. Recoger en un tubo aparte los esplenocitos que se eluyen del bazo. En caso necesario, presionar suavemente el bazo para extraer una mayor cantidad de células.
6. Repetir la operación del paso 5 inyectando un segundo ml de medio RPMI + 2%FCS por el otro extremo del bazo.
7. Repetir los pasos 4 y 5 hasta vaciar el bazo de su contenido. El bazo pierde opacidad conforme se vacía de células.
8. Dejar reposar el material extraído durante 5 min para sedimentar los fragmentos del bazo que se hayan podido desprender durante la elución de los esplenocitos. Transferir el sobrenadante que contiene los esplenocitos a un vial estéril de centrifugación.
9. Centrifugar la suspensión celular a 300xg, 5 min a T^{amb}. En este punto empezar a preparar las células parentales de mieloma NSI-D8.
10. Aspirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril.
11. Lavar los esplenocitos sedimentados de nuevo con 10 ml de medio RPMI + 2%FCS, suavemente y con ayuda de una pipeta Pasteur estéril.
12. Resuspender los esplenocitos en 10 ml de medio RPMI + 2%FCS.
13. Contar al microscopio los esplenocitos extraídos mediante una cámara de Neubauer. Para una cámara de Neubauer de 5x5 cuadros y una superficie total de recuento de 1 mm², la concentración de células (n° células/ml) se calcula mediante la fórmula "(media de células en 10 campos) x factor de dilución aplicado x 25 cuadros x 10⁴ =". El factor 10⁴ depende del tipo de cámara de recuento utilizada.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Medio RPMI + 2%FCS: 98% (v/v) RPMI, 2% (v/v) FCS; 50 ml

Dispensar en un vial estéril 49 ml de medio RPMI 1640 glutamax (Gibco BRL).

Añadir 1 ml de FCS inactivado (**VI.C.2.A.1.**) (La función del FCS es evitar que las células se adhieran a las paredes del vial).

Homogeneizar y conservar a 4°C.

NOTA: Si no dispone de medio RPMI 1640 glutamax, se puede utilizar medio RPMI y suplementar entonces con glutamina atemperada a 37°C a una concentración final de 0.5-2mM.

Preparación de las células de mieloma NSI-D8

14. Descongelar un vial de células NSI-D8 cuatro o cinco días antes de fusionarlas con los esplenocitos. Seguir el método descrito en **VI.C.2.B.3.** utilizando medio RPMI completo + 8-Azaguaninax1.
15. Sembrar las células en un frasco de cultivo de 75 cm² con 25 ml de medio RPMI completo + 8-Azaguaninax1.
16. Al día siguiente, aspirar el medio de cultivo de las células NSI-D8 con una pipeta Pasteur estéril y reponer con 25 ml de medio RPMI completo.
17. Cambiar el medio de cultivo de las células NSI-D8 descongeladas cada día. La reposición del medio de cultivo de las células NSI-D8 garantiza unas condiciones óptimas de las células NSI-D8, determinantes de cara a la fusión con los esplenocitos.
18. Desprender las células (no es necesario utilizar tripsina ya que las células no se adhieren fuertemente a la superficie de cultivo) y dividir el cultivo en dos frascos el día antes a la fusión con los esplenocitos. Sembrar las células en frascos de 75 cm² con 25 ml de medio RPMI completo cada uno.
19. Desprender y dispensar las células NSI-D8 en un vial estéril de centrifugación mientras se desarrolla el paso 9 de la esplenectomía.
20. Centrifugar la suspensión celular a 300xg, 5 min a T^aamb.
21. Aspirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril, y resuspender las células suavemente en 10 ml de medio RPMI + 2%FCS.
22. Contar al microscopio las células NSI-D8 mediante una cámara de Neubauer.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.Medio RPMI completo + 8-Azaguaninax; 50 ml

Suplementar 50 ml de medio RPMI completo con 8-Azaguaninax (Sigma) a una concentración final 20µM.

Medio RPMI completo: 90% (v/v) RPMI, 10% (v/v) FCS, 50µg/ml gentamicina; 50 ml

Dispensar en un vial estéril 45 ml de medio RPMI 1640 glutamax (Gibco BRL).

Añadir:

FCS inactivado (VI.C.2.A.1.)	5 ml
Gentamicina 50 mg/ml (Gibco BRL, Biological Industries)	50 µl

Homogeneizar y conservar a 4°C.

NOTA: Si no dispone de medio RPMI 1640 glutamax, se puede utilizar medio RPMI y suplementar entonces con glutamina atemperada a 37°C a una concentración final de 0.5-2mM.

Fusión

23. Mezclar esplenocitos y células NSI-D8 a razón de 4 esplenocitos : 1 célula NSI-D8 en un vial estéril de 50 ml. Generalmente se cuenta fusionar $0.75-1.2 \times 10^8$ esplenocitos con $1.9-3.0 \times 10^7$ células NSI-D8, de manera que se dispone de $0.94-1.5 \times 10^8$ células totales (esplenocitos + células NSI-D8). Enrasar a 40 ml con medio RPMI sin suero. Homogeneizar suavemente la suspensión de células.
24. Atemperar la cantidad de solución PEG 1500 a utilizar (v. paso 28) y 50 ml de medio RPMI sin suero, en un baño termostático a 37°C.
25. Centrifugar la suspensión celular a 300xg, 5 min a T^aamb.
26. Aspirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril, dejando el sedimento de células bien seco.
27. Deshacer el botón de células sedimentadas golpeando suavemente la base del vial.
28. Añadir 0.75 ml de solución PEG 1500 atemperada a 37°C por cada 1.0×10^8 células totales. Depositar la solución PEG 1500 sobre las células muy poco a poco, homogeneizando la mezcla con la punta de la pipeta en un tiempo total de 45 seg. **NO SUCCIONAR LAS CÉLULAS.**
29. Agitar muy suavemente o hacer rodar el vial sobre sí mismo durante 30-45 seg.
30. Añadir medio RPMI (sin suero) atemperado a 37°C sobre la mezcla de células mientras se agita el vial muy suavemente, gota a gota y a razón de: 3x1 ml en 3x30 seg, 10 ml en 2 min y 27 ml en 2 min.
31. Incubar la suspensión celular 12 min a T^aamb.

32. Incubar la suspensión celular 5 min a 37°C.
33. Centrifugar la suspensión celular a 300xg, 5 min a T^aamb.
34. Aspirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril.
35. Resuspender el botón de células sedimentadas en 80 ml de medio HAT completo.
36. Repartir la suspensión de células en placas de ELISA de 96 pocillos a razón de 135 µl/pocillo.
37. Incubar las placas sembradas durante 10-14 días, a 37°C. Durante este tiempo conviene no sacar las placas del incubador para evitar que los hibridomas en crecimiento sufran cambios de T^a que puedan afectar su viabilidad.
38. Comprobar que la mayoría de pocillos contienen uno o más hibridomas en crecimiento, y que el medio haya virado (de violeta a naranja-amarillo). Aspirar el sobrenadante de cada pocillo. Reponer con 135 µl/pocillo de medio HAT completo fresco.
39. Incubar 2-3 días, a 37°C. Cuando el medio de los pocillos vuelven a virar de color, seleccionar mediante ELISA indirecto qué sobrenadantes contienen anticuerpos anti-BoHV-1.

Soluciones y tampones utilizados. Método de elaboración.

Solución PEG 1500: 75mM HEPES, 50% (p/v) PEG 1500; 5 ml

Pesar y poner en un vaso de precipitados:

HEPES (C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S) (Merck)	0.09 g
PEG 1500 (Boehringer Mannheim)	2.5 g

Disolver en 2.4 ml de agua Milli-Q.

Enrasar a 5 ml con agua Milli-Q.

Medio HAT completo: 90% (v/v) RPMI completo, 10% (v/v) Condimed, HAT 1x, 25µM β-Mercaptoetanol; 40 ml

Dispensar en un vial estéril 36 ml de medio RPMI completo.

Añadir:

Condimed (Boehringer Mannheim)	4 ml
HAT 50x (Boehringer Mannheim)	0.8 ml
β-Mercaptoetanol 50mM	20 µl

Homogeneizar y conservar a 4°C.

β-Mercaptoetanol 50mM: 5 ml

Dispensar en un vial 5 ml de agua Milli-Q.

Añadir 17.4 µl de β-Mercaptoetanol 14.4M (Fluka).

Esterilizar por filtración con filtro de acetato de celulosa 0.22 µm (Millipore, Corning).

Preparar alícuotas y conservar congelado a -20°C.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelmagid O. Y., Minocha H. C., Collins J. K. & Chowdhury S. I. (1995).** Fine mapping of bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D (gD) neutralizing epitopes by type-specific monoclonal antibodies and sequence comparison with BHV-5 gD. *Virology* **206** (1), pp. 242-253.
- Ahmed M. & Fraser N. W. (2001).** Herpes simplex virus type 1 2-kilobase latency-associated transcript intron associates with ribosomal proteins and splicing factors. *Journal of Virology* **75** (24), pp. 12070-12080.
- Al-Hillawi E., Minchin S. D. & Trayer I. P. (1994).** Overexpression of human cardiac troponin-I and troponin-C in *Escherichia coli* and their purification and characterization. Two point mutations allow high-level expression of troponin-I. *European Journal of Biochemistry* **225** (3), pp. 1195-1201.
- Alconada A., Bauer U., Baudoux L., Piette J. & Hoflack B. (1998).** Intracellular transport of the glycoproteins gE and gI of the varicella-zoster virus. gE accelerates the maturation of gI and determines its accumulation in the trans-Golgi network. *Journal of Biological Chemistry* **273** (22), pp. 13430-13436.
- Alconada A., Bauer U. & Hoflack B. (1996).** A tyrosine-based motif and a casein kinase II phosphorylation site regulate the intracellular trafficking of the varicella-zoster virus glycoprotein I, a protein localized in the trans-Golgi network. *EMBO Journal* **15** (22), pp. 6096-6110.
- Alconada A., Bauer U., Sodeik B. & Hoflack B. (1999).** Intracellular traffic of herpes simplex virus glycoprotein gE: characterization of the sorting signals required for its trans-Golgi network localization. *Journal of Virology* **73** (1), pp. 377-387.
- Amann E. & Brosius J. (1985).** 'ATG vectors' for regulated high-level expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **40** (2-3), pp. 183-190.
- Amann E., Brosius J. & Ptashne M. (1983).** Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* **25** (2-3), pp. 167-178.
- Andersen D. C. & Krummen L. (2002).** Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology* **13** (2), pp. 117-123.
- Arvin A. M., Prober C. G., Hodinka R. L., Gershon A. A., Larussa P., Steinberg S. P., Lennette E. T., Stewart J. A., Patton J. L. & Lennette E. T. (1999).** Herpes simplex viruses. Human cytomegalovirus. Varicella-zoster virus. Epstein-Barr virus. Human herpesviruses 6, 7, and 8 and herpes B virus. pp. 878-927. *En: Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. & Tenover, R. H. (Ed.), Manual of Clinical Microbiology, (7^a ed).* ASM Press. Washington D.C., USA.
- Avitabile E., Lombardi G. & Campadelli-Fiume G. (2003).** Herpes simplex virus glycoprotein K, but not its syncytial allele, inhibits cell-cell fusion mediated by the four fusogenic glycoproteins, gD, gB, gH, and gL. *Journal of Virology* **77** (12), pp. 6836-6844.
- Babiuk L. A. (1999).** Broadening the approaches to developing more effective vaccines. *Vaccine* **17** (13-14), pp. 1587-1595.
- Baines J. D. & Roizman B. (1991).** The open reading frames UL3, UL4, UL10, and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *Journal of Virology* **65** (2), pp. 938-944.
- Baines J. D. & Roizman B. (1992).** The UL11 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function that facilitates nucleocapsid envelopment and egress from cells. *Journal of Virology* **66** (8), pp. 5168-5174.
- Baneyx F. (1999).** Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **10** (5), pp. 411-421.
- Baranowski E., Dubuisson J., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk A. L., Michel A., Pastoret P-P. & Thiry E. (1995).** Synthesis and processing of bovine herpesvirus-1 glycoprotein H. *Virology* **206** (1), pp. 651-654.
- Baranowski E., Keil G., Lyaku J., Rijsewijk F. A. M., van Oirschot J. T., Pastoret P-P. & Thiry E. (1996).** Structural and functional analysis of bovine herpesvirus 1 minor glycoproteins. *Veterinary Microbiology* **53** (1-2), pp. 91-101.
- Barnett B. C., Dolan A., Telford E. A. R., Davison A. J. & McGeoch D. J. (1992).** A novel herpes simplex virus gene (UL49A) encodes a putative membrane protein with counterparts in other herpesviruses. *Journal of General Virology* **73** (8), pp. 2167-2171.
- Basu S., Dubin G., Basu M., Nguyen V. & Friedman H. M. (1995).** Characterization of regions of herpes simplex virus type 1 glycoprotein E involved in binding the Fc domain of monomeric IgG and in forming a complex with glycoprotein I. *Journal of Immunology* **154** (1), pp. 260-267.
- Batterson W., Furlong D. & Roizman B. (1983).** Molecular genetics of herpes simplex virus. VIII. Further characterization of a temperature-sensitive mutant defective in release of viral DNA and in other stages of the viral reproductive cycle. *Journal of Virology* **45** (1), pp. 397-407.
- Batterson W. & Roizman B. (1983).** Characterization of the herpes simplex virion-associated factor responsible for the induction of alpha genes. *Journal of Virology* **46** (2), pp. 371-377.
- Baucke R. B. & Spear P. G. (1979).** Membrane proteins specified by herpes simplex viruses. V. Identification of an Fc-binding glycoprotein. *Journal of Virology* **32** (3), pp. 779-789.
- Bechtel J. T. & Shenk T. (2002).** Human cytomegalovirus UL47 tegument protein functions after entry and before immediate-early gene expression. *Journal of Virology* **76** (3), pp. 1043-1050.
- Belknap E. B., Collins J. K., Ayers V. K. & Schultheiss P. C. (1994).** Experimental infection of neonatal calves with neurovirulent bovine herpesvirus type 1.3. *Veterinary Pathology* **31** (3), pp. 358-365.
- Benito A., Feliu J. X. & Villaverde A. (1996).** β -galactosidase enzymatic activity as a molecular probe to detect specific antibodies. *Journal of Biological Chemistry* **271** (35), pp. 21251-21256.
- Betton J.-M., Martineau P., Saurin W. & Hofnung M. (1993).** Location of tolerated insertions/deletions in the structure of the maltose binding protein. *FEBS Letters* **325** (1-2), pp. 34-38.

- Boman H. G., Agerberth B. & Boman A. (1993).** Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infection and Immunity* **61** (7), pp. 2978-2984.
- Bonifacino J. S. & Dell' Angelica E. C. (1999).** Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *Journal of Cell Biology* **145** (5), pp. 923-926.
- Booy F. P., Newcomb W. W., Trus B. L., Brown J. C., Baker T. S. & Steven A. C. (1991).** Liquid-crystalline, phage-like packing of encapsidated DNA in herpes simplex virus. *Cell* **64** (5), pp. 1007-1015.
- Bosch J. C., de Jong M. C. M., Franken P., Frankena K., Hage J. J., Kaashoek M. J., Maris-Veldhuis M. A., Noordhuizen J. P. T. M., van der Poel W. H. M., Verhoeff J., Weerdmeester K., Zimmer G. M. & van Oirschot J. T. (1998).** An inactivated gE-negative marker vaccine and an experimental gD-subunit vaccine reduce the incidence of bovine herpesvirus 1 infections in the field. *Vaccine* **16** (2-3), pp. 265-271.
- Bowland S. L. & Shewen P. E. (2000).** Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Canadian Veterinary Journal* **41** (1), pp. 33-48.
- Bowman B. R., Baker M. L., Rixon F. J., Chiu W. & Quioccho F. A. (2003).** Structure of the herpesvirus major capsid protein. *EMBO Journal* **22** (4), pp. 757-765.
- Brack A. R., Dijkstra J. M., Granzow H., Klupp B. G. & Mettenleiter T. C. (1999).** Inhibition of virion maturation by simultaneous deletion of glycoproteins E, I, and M of pseudorabies virus. *Journal of Virology* **73** (7), pp. 5364-5372.
- Brack A. R., Klupp B. G., Granzow H., Tirabassi R., Enquist L. W. & Mettenleiter T. C. (2000).** Role of the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein E in virion formation. *Journal of Virology* **74** (9), pp. 4004-4016.
- Browne H., Bell S., Minson T. & Wilson D. W. (1996).** An endoplasmic reticulum-retained herpes simplex virus glycoprotein H is absent from secreted virions: evidence for reenvolvement during egress. *Journal of Virology* **70** (7), pp. 4311-4316.
- Bryant N. A., Davis-Poynter N., Vanderplasschen A. & Alcami A. (2003).** Glycoprotein G isoforms from some alpha herpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *EMBO Journal* **22** (4), pp. 833-846.
- Büchen-Osmond C., Blaine L. & Horzinek M. C. (2000).** ICTVdB. The universal virus database of ICTV (ICTVdB). pp. 19-24. *En: van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. (Ed.), Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. San Diego, USA.*
- Bukau B. (1993).** Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Molecular Microbiology* **9** (4), pp. 671-680.
- Bukau B. & Horwich A. L. (1998).** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92** (3), pp. 351-366.
- Bulach D. M. & Studdert M. J. (1990).** Comparative genome mapping of bovine encephalitis herpesvirus, bovine herpesvirus 1, and buffalo herpesvirus. *Archives of Virology* **113** (1-2), pp. 17-34.
- Bullock W. O., Fernández J. M. & Short J. M. (1987).** XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* **5** (4), pp. 376-378.
- Burnette W. N. (1981).** "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* **112** (2), pp. 195-203.
- Byrne K. M., Horohov D. W. & Kousoulas K. G. (1995).** Glycoprotein B of bovine herpesvirus-1 binds heparin. *Virology* **209** (1), pp. 230-235.
- Card J. P., Whealy M. E., Robbins A. K. & Enquist L. W. (1992).** Pseudorabies virus envelope glycoprotein gI influences both neurotropism and virulence during infection of the rat visual system. *Journal of Virology* **66** (5), pp. 3032-3041.
- Carrió-Llach, M. M. (2002).** Agregació i desagregació proteica en *Escherichia coli*: biologia dels cossos d'inclusió. *Memoria de tesis doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain.
- Carrió M. M. & Villaverde A. (2003).** Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Letters* **537** (1-3), pp. 215-221.
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M. & Tempst P. (1989).** Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO Journal* **8** (8), pp. 2387-2391.
- Casteels P. & Tempst P. (1994).** Apidaecin-type peptide antibiotics function through a non-poreforming mechanism involving stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199** (1), pp. 339-345.
- Castle M., Nazarian A., Yi S. S. & Tempst P. (1999).** Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *Journal of Biological Chemistry* **274** (46), pp. 32555-32564.
- Catalano C. E., Cue D. & Feiss M. (1995).** Virus DNA packaging: the strategy used by phage λ . *Molecular Microbiology* **16** (6), pp. 1075-1086.
- Cerritelli M. E., Cheng N., Rosenberg A. H., McPherson C. E., Booy F. P. & Steven A. C. (1997).** Encapsidated conformation of bacteriophage T7 DNA. *Cell* **91** (2), pp. 271-280.
- Chan A. C., Desai D. M. & Weiss A. (1994).** The role of protein tyrosine kinases and protein tyrosine phosphatases in T cell antigen receptor signal transduction. *Annual Review of Immunology* **12**, pp. 555-592.

- Chang Y. E. & Roizman B. (1993).** The product of the UL31 gene of herpes simplex virus 1 is a nuclear phosphoprotein which partitions with the nuclear matrix. *Journal of Virology* **67** (11), pp. 6348-6356.
- Chase C. C. L., Carter-Allen K., Lohff C. & Letchworth 3rd G. J. (1990).** Bovine cells expressing bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein IV resist infection by BHV-1, herpes simplex virus, and pseudorabies virus. *Journal of Virology* **64** (10), pp. 4866-4872.
- Chaudhuri T. K., Farr G. W., Fenton W. A., Rospert S. & Horwich A. L. (2001).** GroEL/GroES-mediated folding of a protein too large to be encapsulated. *Cell* **107** (2), pp. 235-246.
- Chou J. & Roizman B. (1989).** Characterization of DNA sequence-common and sequence-specific proteins binding to cis-acting sites for cleavage of the terminal a sequence of the herpes simplex virus 1 genome. *Journal of Virology* **63** (3), pp. 1059-1068.
- Chowdhury S. I. (1995).** Molecular basis of antigenic variation between the glycoproteins C of respiratory bovine herpesvirus 1 (BHV-1) and neurovirulent BHV-5. *Virology* **213** (2), pp. 558-568.
- Chowdhury S. I., Lee B. J., Ozkul A. & Weiss M. L. (2000).** Bovine herpesvirus 5 glycoprotein E is important for neuroinvasiveness and neurovirulence in the olfactory pathway of the rabbit. *Journal of Virology* **74** (5), pp. 2094-2106.
- Ciacchi-Zanella J., Stone M., Henderson G. & Jones C. (1999).** The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits programmed cell death. *Journal of Virology* **73** (12), pp. 9734-9740.
- Clément J-M., Jehanno M., Popescu O., Saurin W. & Hofnung M. (1996).** Expression and biological activity of genetic fusions between MalE, the maltose binding protein from *Escherichia coli* and portions of CD4, the T-Cell receptor of the AIDS virus. *Protein Expression and Purification* **8** (3), pp. 319-331.
- Cocchi F., Menotti L., Mirandola P., Lopez M. & Campadelli-Fiume G. (1998).** The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *Journal of Virology* **72** (12), pp. 9992-10002.
- Coëffier E., Clément J-M. & Cussac V. (2001).** Antigenicity and immunogenicity of the HIV-1 gp41 epitope ELDKWA inserted into permissive sites of the MalE protein. *Vaccine* **19** (7-8), pp. 684-693.
- Coen D. M. (1990).** Molecular genetics of animal viruses. Expression of viral genes in mammalian cells. pp. 130-135. *En: Fields, B. N., Knipe, D. M., Chanock, R. M., Hirsch, M. S., Melnick, J. L., Monath, T. P. & Roizman B. (Ed.), Fields Virology, (2^a ed).* Raven Press. New York, USA.
- Cohen S. N., Chang A. C. Y. & Hsu L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69** (8), pp. 2110-2114.
- Collins J. K., Ayers V. K., Whetstone C. A. & van Drunen Littel-van den Hurk S. (1993).** Antigenic differences between the major glycoproteins of bovine herpesvirus type 1.1 and bovine encephalitis herpesvirus type 1.3. *Journal of General Virology* **74** (8), pp. 1509-1517.
- Condit R. C. (2001).** Principles of virology. pp. 19-51. *En: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Martin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B. & Straus, S. E. (Ed.), Fields' Virology, (4^a ed).* Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
- Corchero J. L., Viaplana E., Benito A. & Villaverde A. (1996).** The position of the heterologous domain can influence the solubility and proteolysis of β -galactosidase fusion proteins in *E. coli*. *Journal of Biotechnology* **48** (3), pp. 191-200.
- Cox M. M. J. (2004).** Commercial production in insect cells: one company's perspective. *BioProcess International* **2** (suppl 2), pp. 34-38.
- Crabb B. S., Nagesha H. S. & Studdert M. J. (1992).** Identification of equine herpesvirus 4 glycoprotein G: a type-specific, secreted glycoprotein. *Virology* **190** (1), pp. 143-154.
- Crabb B. S. & Studdert M. J. (1995).** Expression of small regions of equine herpesvirus 1 glycoprotein C in *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* **46** (1-3), pp. 181-191.
- Cudic M. & Otvos Jr. L. (2002).** Intracellular targets of antibacterial peptides. *Current Drug Targets* **3** (2), pp. 101-106.
- Cunningham C., Davison A. J., MacLean A. R., Taus N. S. & Baines J. D. (2000).** Herpes simplex virus type 1 gene UL14: phenotype of a null mutant and identification of the encoded protein. *Journal of Virology* **74** (1), pp. 33-41.
- Damiani A. M., Matsumura T., Jang H. K., Izumiya Y., Mikami T. & Takahashi E. (2000a).** Identification of the products of the equine herpesvirus type 4 gl and gE genes. *Archives of Virology* **145** (7), pp. 1489-1496.
- Damiani A. M., Matsumura T., Yokoyama N., Mikami T. & Takahashi E. (2000b).** A deletion in the gl and gE genes of equine herpesvirus type 4 reduces viral virulence in the natural host and affects virus transmission during cell-to-cell spread. *Virus Research* **67** (2), pp. 189-202.
- Darlington R. W. & Moss L. H. 3rd (1968).** Herpesvirus envelopment. *Journal of Virology* **2** (1), pp. 48-55.
- Dasika G. K. & Letchworth G. J. (2000).** Homologous and heterologous interference requires bovine herpesvirus-1 glycoprotein D at the cell surface during virus entry. *Journal of General Virology* **81** (4), pp. 1041-1049.
- Davison A. J. & Scott J. E. (1986).** The complete DNA sequence of varicella-zoster virus. *Journal of General Virology* **67** (9), pp. 1759-1816.
- de Gee A. L., Wagter L. H. & Hage J. J. (1996).** The use of a polymerase chain reaction assay for the detection of bovine herpesvirus 1 in semen during a natural outbreak of infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Microbiology* **53** (1-2), pp. 163-168.

- Dean H. J. & Cheung A. K. (1993). A 3' coterminal gene cluster in pseudorabies virus contains herpes simplex virus UL1, UL2, and UL3 gene homologs and a unique UL3.5 open reading frame. *Journal of Virology* **67** (10), pp. 5955-5961.
- Debroy C., Pederson N. & Person S. (1985). Nucleotide sequence of a herpes simplex virus type 1 gene that causes cell fusion. *Virology* **145** (1), pp. 36-48.
- Demmin G. L., Clase A. C., Randall J. A., Enquist L. W. & Banfield B. W. (2001). Insertions in the gG gene of pseudorabies virus reduce expression of the upstream Us3 protein and inhibit cell-to-cell spread of virus infection. *Journal of Virology* **75** (22), pp. 10856-10869.
- Denis M., Hanon E., Rijsewijk F. A., Kaashoek M. J., van Oirschot J. T., Thiry E. & Pastoret P. P. (1996). The role of glycoproteins gC, gE, gI, and gG in the induction of cell-mediated immune responses to bovine herpesvirus 1. *Veterinary Microbiology* **53** (1-2), pp. 121-132.
- Desai P. J. (2000). A null mutation in the UL36 gene of herpes simplex virus type 1 results in accumulation of unenveloped DNA-filled capsids in the cytoplasm of infected cells. *Journal of Virology* **74** (24), pp. 11608-11618.
- Desai P. J., Sexton G. L., McCaffery J. M. & Person S. (2001). A null mutation in the gene encoding the herpes simplex virus type 1 UL37 polypeptide abrogates virus maturation. *Journal of Virology* **75** (21), pp. 10259-10271.
- di Guan C., Li P., Riggs P. D. & Inouye H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* **67** (1), pp. 21-30.
- Dietz P., Klupp B. G., Fuchs W., Kollner B., Weiland E. & Mettenleiter T. C. (2000). Pseudorabies virus glycoprotein K requires the UL20 gene product for processing. *Journal of Virology* **74** (11), pp. 5083-5090.
- Dijkstra J. M., Gerdts V., Klupp B. G. & Mettenleiter T. C. (1997). Deletion of glycoprotein gM of pseudorabies virus results in attenuation for the natural host. *Journal of General Virology* **78** (9), pp. 2147-2151.
- Dijkstra J. M., Visser N., Mettenleiter T. C. & Klupp B. G. (1996). Identification and characterization of pseudorabies virus glycoprotein gM as a nonessential virion component. *Journal of Virology* **70** (8), pp. 5684-5688.
- Dingwell K. S., Brunetti C. R., Hendricks R. L., Tang Q., Tang M., Rainbow A. J. & Johnson D. C. (1994). Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *Journal of Virology* **68** (2), pp. 834-845.
- Dingwell K. S., Doering L. C. & Johnson D. C. (1995). Glycoproteins E and I facilitate neuron-to-neuron spread of herpes simplex virus. *Journal of Virology* **69** (11), pp. 7087-7098.
- Dingwell K. S. & Johnson D. C. (1998). The herpes simplex virus gE-gI complex facilitates cell-to-cell spread and binds to components of cell junctions. *Journal of Virology* **72** (11), pp. 8933-8942.
- Dispas M., Schynts F., Lemaire M., Letellier C., Vanopdenbosch E., Thiry E. & Kerkhofs P. (2003). Isolation of a glycoprotein E-deleted bovine herpesvirus type 1 strain in the field. *Veterinary Record* **153** (7), pp. 209-212.
- Doménech Massons, J. M. & Granero, R. (1998a). Comparación de dos medias. pp. 7-48. En: Doménech Massons, J. M. & Granero, R. (Ed.), *Métodos estadísticos en Ciencias de la Salud*, (Serie: *Diseño y Estadística en Ciencias de la Salud*, vol. 11). Editorial Gráficas SIGNO S.A. Barcelona, Catalunya (España).
- Doménech Massons, J. M. & Granero, R. (1998b). Descripción de datos cuantitativos. pp. 7-60. En: Doménech Massons, J. M. & Granero, R. (Ed.), *Métodos estadísticos en Ciencias de la Salud*, (Serie: *Diseño y Estadística en Ciencias de la Salud*, vol. 1). Editorial Gráficas SIGNO S.A. Barcelona, Catalunya (España).
- Doménech Massons, J. M. & Granero, R. (1998c). Relación entre dos variables categóricas: Pruebas de χ^2 . Ley de χ^2 : Comparación de una distribución observada a una teórica. pp. 7-18. En: Doménech Massons, J. M. & Granero, R. (Ed.), *Métodos estadísticos en Ciencias de la Salud*, (Serie: *Diseño y Estadística en Ciencias de la Salud*, vol. 10). Editorial Gráficas SIGNO S.A. Barcelona, Catalunya (España).
- Dong H., Nilsson L. & Kurland C. G. (1995). Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of Bacteriology* **177** (6), pp. 1497-1504.
- Drummer H. E., Studdert M. J. & Crabb B. S. (1998). Equine herpesvirus-4 glycoprotein G is secreted as a disulphide-linked homodimer and is present as two homodimeric species in the virion. *Journal of General Virology* **79** (5), pp. 1205-1213.
- Dubin G., Basu S., Mallory D. L. P., Basu M., Tal-Singer R. & Friedman H. M. (1994). Characterization of domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein E involved in Fc binding activity for immunoglobulin G aggregates. *Journal of Virology* **68** (4), pp. 2478-2486.
- Dubin G., Socolof E., Frank I. & Friedman H. M. (1991). Herpes simplex virus type 1 Fc receptor protects infected cells from antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Journal of Virology* **65** (12), pp. 7046-7050.
- Duplay P., Bedouelle H., Fowler A., Zabin I., Saurin W. & Hofnung M. (1984). Sequences of the *malE* gene and of its product, the maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. *Journal of Biological Chemistry* **259** (16), pp. 10606-10613.
- Duplay P. & Szmelcman S. (1987). Silent and functional changes in the periplasmic maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. (II.) Chemotaxis towards maltose. *Journal of Molecular Biology* **194** (4), pp. 675-678.
- Duplay P., Szmelcman S., Bedouelle H. & Hofnung M. (1987). Silent and functional changes in the periplasmic maltose-binding protein of *Escherichia coli* K12. (I.) Transport of maltose. *Journal of Molecular Biology* **194** (4), pp. 663-673.
- Earnshaw W. C. & Harrison S. C. (1977). DNA arrangement in isometric phage heads. *Nature* **268** (5621), pp. 598-602.

- Earnshaw W. C., King J., Harrison S. C. & Eiserling F. A. (1978). The structural organization of DNA packaged within the heads of T4 wild-type, isometric and giant bacteriophages. *Cell* **14** (3), pp. 559-568.
- Eckert B. & Beck C. F. (1989). Topology of the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein within the inner membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **264** (20), pp. 11663-11670.
- Egyed L., Ros C. & Belák S. (2000). Genomic and pathogenic studies on a glycoprotein E variant field isolate of bovine herpesvirus 1. *Veterinary Research Communications* **24** (6), pp. 423-431.
- Elliott G., Mouzakitou G. & O'Hare P. (1995). VP16 interacts via its activation domain with VP22, a tegument protein of herpes simplex virus, and is relocated to a novel macromolecular assembly in coexpressing cells. *Journal of Virology* **69** (12), pp. 7932-7941.
- Ellis R. W. (1999). New technologies for making vaccines. *Vaccine* **17** (13-14), pp. 1596-1604.
- Engelhardt T. & Keil G. M. (1996). Identification and characterization of the bovine herpesvirus 5 US4 gene and gene products. *Virology* **225** (1), pp. 126-135.
- Engels M. & Ackermann M. (1996). Pathogenesis of ruminant herpesvirus infections. *Veterinary Microbiology* **53** (1-2), pp. 3-15.
- Engels M., Giuliani C., Wild P., Beck T. M., Loepfe E. & Wyler R. (1986). The genome of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) strains exhibiting a neuropathogenic potential compared to known BHV-1 strains by restriction site mapping and cross-hybridization. *Virus Research* **6** (1), pp. 57-73.
- Engels M., Steck F. & Wyler R. (1981). Comparison of the genomes of infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis virus strains by restriction endonuclease analysis. *Archives of Virology* **67** (2), pp. 169-174.
- Enquist L. W., Husak P. J., Banfield B. W. & Smith G. A. (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Advances in Virus Research* **51**, pp. 237-347.
- Enquist L. W., Tomishima M. J., Gross S. & Smith G. A. (2002). Directional spread of an alpha-herpesvirus in the nervous system. *Veterinary Microbiology* **86** (1-2), pp. 5-16.
- Ewalt K. L., Hendrick J. P., Houry W. A. & Hartl F. U. (1997). *In vivo* observation of polypeptide flux through the bacterial chaperonin system. *Cell* **90** (3), pp. 491-500.
- Favoreel H. W., Nauwynck H. J., Halewyck H. M., Van Oostveldt P., Mettenleiter T. C. & Pensaert M. B. (1999a). Antibody-induced endocytosis of viral glycoproteins and major histocompatibility complex class I on pseudorabies virus-infected monocytes. *Journal of General Virology* **80** (5), pp. 1283-1291.
- Favoreel H. W., Nauwynck H. J. & Pensaert M. B. (1999b). Role of the cytoplasmic tail of gE in antibody-induced redistribution of viral glycoproteins expressed on pseudorabies-virus-infected cells. *Virology* **259** (1), pp. 141-147.
- Favoreel H. W., Nauwynck H. J., Van Oostveldt P., Mettenleiter T. C. & Pensaert M. B. (1997). Antibody-induced and cytoskeleton-mediated redistribution and shedding of viral glycoproteins, expressed on pseudorabies virus-infected cells. *Journal of Virology* **71** (11), pp. 8254-61.
- Favoreel H. W., Van de Walle G. R., Nauwynck H. J. & Pensaert M. B. (2003). Virus complement evasion strategies. *Journal of General Virology* **84** (1), pp. 1-15.
- Favoreel H. W., Van Minnebruggen G., Nauwynck H. J., Enquist L. W. & Pensaert M. B. (2002). A tyrosine-based motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus glycoprotein B is important for both antibody-induced internalization of viral glycoproteins and efficient cell-to-cell spread. *Journal of Virology* **76** (13), pp. 6845-6851.
- Fayet O., Ziegelhoffer T. & Georgopoulos C. (1989). The groES and groEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *Journal of Bacteriology* **171** (3), pp. 1379-1385.
- Fehler F., Herrmann J. M., Saalmüller A., Mettenleiter T. C. & Keil G. M. (1992). Glycoprotein IV of bovine herpesvirus 1-expressing cell line complements and rescues a conditionally lethal viral mutant. *Journal of Virology* **66** (2), pp. 831-839.
- Feliu J. X. & Villaverde A. (1998). Engineering of solvent-exposed loops in *Escherichia coli* β -galactosidase. *FEBS Letters* **434** (1-2), pp. 23-27.
- Fenner F., Bachmann P. A., Gibbs E. P. J., Murphy F. A., Studdert M. J. & White D. O. (1992). *Herpesviridae*. pp. 349-385. *En: Fenner, F., Bachmann, P. A., Gibbs, E. P. J., Murphy, F. A., Studdert, M. J. & White, D. O. (Ed.), Virologia Veterinaria*. Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España.
- Ferrer-Miralles N., Feliu J. X., Vandevuer S., Müller A., Cabrera-Crespo J., Ortman I., Hoffmann F., Cazoria D., Rinas U., Prévost M. & Villaverde A. (2001). Engineering regulable *Escherichia coli* β -galactosidases as biosensors for anti-HIV antibody detection in human sera. *Journal of Biological Chemistry* **276** (43), pp. 40087-40095.
- Fitzpatrick D. R., Babiuk L. A. & Zamb T. J. (1989). Nucleotide sequence of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gIII, a structural model for gIII as a new member of the immunoglobulin superfamily, and implications for the homologous glycoproteins of other herpesviruses. *Virology* **173** (1), pp. 46-57.
- Fitzpatrick D. R., Zamb T. J. & Babiuk L. A. (1990). Expression of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein gI in transfected bovine cells induces spontaneous cell fusion. *Journal of General Virology* **71** (5), pp. 1215-1219.
- Flynn S. J. & Ryan P. (1996). The receptor-binding domain of pseudorabies virus glycoprotein gC is composed of multiple discrete units that are functionally redundant. *Journal of Virology* **70** (3), pp. 1355-1364.

- Folsch H., Ohno H., Bonifacino J. S. & Mellman I. (1999). A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **99** (2), pp. 189-198.
- Forrester A., Farrell H., Wilkinson G., Kaye J., Davis-Poynter N. & Minson T. (1992). Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *Journal of Virology* **66** (1), pp. 341-348.
- Foster T. P., Alvarez X. & Kousoulas K. G. (2003). Plasma membrane topology of syncytial domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K (gK): the UL20 protein enables cell surface localization of gK but not gK-mediated cell-to-cell fusion. *Journal of Virology* **77** (1), pp. 499-510.
- Foster T. P. & Kousoulas K. G. (1999). Genetic analysis of the role of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K in infectious virus production and egress. *Journal of Virology* **73** (10), pp. 8457-8468.
- Foster T. P., Rybachuk G. V. & Kousoulas K. G. (2001). Glycoprotein K specified by herpes simplex virus type 1 is expressed on virions as a Golgi complex-dependent glycosylated species and functions in virion entry. *Journal of Virology* **75** (24), pp. 12431-12438.
- Frank I. & Friedman H. M. (1989). A novel function of the herpes simplex virus type 1 Fc receptor: participation in bipolar bridging of antiviral immunoglobulin G. *Journal of Virology* **63** (11), pp. 4479-4488.
- Frank R. W., Gennaro R., Schneider K., Przybylski M. & Romeo D. (1990). Amino acid sequences of two proline-rich bactericins. Antimicrobial peptides of bovine neutrophils. *Journal of Biological Chemistry* **265** (31), pp. 18871-18874.
- Freshney R. I. (1983). Maintenance of the culture-cell lines. pp. 119-128. *En: Freshney, R. I. (Ed.), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, (1st ed). Alan R. Liss, Inc. New York, USA.
- Friedman H. M., Cohen G. H., Eisenberg R. J., Seidel C. A. & Cines D. B. (1984). Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 acts as a receptor for the C3b complement component on infected cells. *Nature* **309** (5969), pp. 633-635.
- Friedman H. M., Wang L., Fishman N. O., Lambris J. D., Eisenberg R. J., Cohen G. H. & Lubinski J. (1996). Immune evasion properties of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *Journal of Virology* **70** (7), pp. 4253-4260.
- Friedrich C. L., Moyles D., Beveridge T. J. & Hancock R. E. W. (2000). Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44** (8), pp. 2086-2092.
- Fries L. F., Friedman H. M., Cohen G. H., Eisenberg R. J., Hammer C. H. & Frank M. M. (1986). Glycoprotein C of herpes simplex virus 1 is an inhibitor of the complement cascade. *Journal of Immunology* **137** (5), pp. 1636-1641.
- Fuchs M., Hübert P., Dettlerer J. & Rziha H. J. (1999). Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *Journal of Clinical Microbiology* **37** (8), pp. 2498-2507.
- Fuchs W., Granzow H., Klupp B. G., Kopp M. & Mettenleiter T. C. (2002a). The UL48 tegument protein of pseudorabies virus is critical for intracytoplasmic assembly of infectious virions. *Journal of Virology* **76** (13), pp. 6729-6742.
- Fuchs W., Klupp B. G., Granzow H., Hengartner C., Brack A. R., Mundt A., Enquist L. W. & Mettenleiter T. C. (2002b). Physical interaction between envelope glycoproteins E and M of pseudorabies virus and the major tegument protein UL49. *Journal of Virology* **76** (16), pp. 8208-8217.
- Fuchs W., Klupp B. G., Granzow H., Osterrieder N. & Mettenleiter T. C. (2002c). The interacting UL31 and UL34 gene products of pseudorabies virus are involved in egress from the host-cell nucleus and represent components of primary enveloped but not mature virions. *Journal of Virology* **76** (1), pp. 364-378.
- Fuchs W., Klupp B. G., Granzow H., Rziha H.-J. & Mettenleiter T. C. (1996). Identification and characterization of the pseudorabies virus UL3.5 protein, which is involved in virus egress. *Journal of Virology* **70** (6), pp. 3517-3527.
- Fuchs W. & Mettenleiter T. C. (1996). DNA sequence and transcriptional analysis of the UL1 to UL5 gene cluster of infectious laryngotracheitis virus. *Journal of General Virology* **77** (9), pp. 2221-2229.
- Fuchs W., Rziha H.-J., Lukács N., Braunschweiger I., Visser N., Lütticken D., Schreurs C. S., Thiel H.-J. & Mettenleiter T. C. (1990). Pseudorabies virus glycoprotein gI: *in vitro* and *in vivo* analysis of immunorelevant epitopes. *Journal of General Virology* **71** (5), pp. 1141-1151.
- Fuller A. O., Santos R. E. & Spear P. G. (1989). Neutralizing antibodies specific for glycoprotein H of herpes simplex virus permit viral attachment to cells but prevent penetration. *Journal of Virology* **63** (8), pp. 3435-3443.
- Furlong D., Swift H. & Roizman B. (1972). Arrangement of herpesvirus deoxyribonucleic acid in the core. *Journal of Virology* **10** (5), pp. 1071-1074.
- Furtado Flores E., Osorio F. A., Zanella E. L., Kit S. & Kit M. (1993). Efficacy of a deletion mutant bovine herpesvirus-1 (BHV-1) vaccine that allows serologic differentiation of vaccinated from naturally infected animals. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **5** (4), pp. 534-540.
- Gao Y., Wang C. & Splitter G. A. (1999). Mapping T and B lymphocyte epitopes of bovine herpesvirus-1 glycoprotein B. *Journal of General Virology* **80** (10), pp. 2699-2704.
- Geiser V., Inman M., Zhang Y. G. & Jones C. (2002). The latency-related gene of bovine herpesvirus-1 can inhibit the ability of bICPO to activate productive infection. *Journal of General Virology* **83** (12), pp. 2965-2971.
- Geraghty R. J., Krummenacher C., Cohen G. H., Eisenberg R. J. & Spear P. G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **280** (5369), pp. 1618-1620.

- Gerdes S. Y., Scholle M. D., Campbell J. W., Balázsi G., Ravasz E., Daugherty M. D., Somera A. L., Kyrpides N. C., Anderson I., Gelfand M. S., Bhattacharya A., Kapatral V., D'Souza M., Baev M. V., Grechkin Y., Mseeh F., Fonstein M. Y., Overbeek R., Barabási A.-L., Oltvai Z. N. & Osterman A. L. (2003).** Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655. *Journal of Bacteriology* **185** (19), pp. 5673-5684.
- Gershon A. A., Sherman D. L., Zhu Z., Gabel C. A., Ambron R. T. & Gershon M. D. (1994).** Intracellular transport of newly synthesized varicella-zoster virus: final envelopment in the trans-Golgi network. *Journal of Virology* **68** (10), pp. 6372-6390.
- Gibson W. & Roizman B. (1972).** Proteins specified by herpes simplex virus. VIII. Characterization and composition of multiple capsid forms of subtypes 1 and 2. *Journal of Virology* **10** (5), pp. 1044-1052.
- Gill R. T., DeLisa M. P., Valdes J. J. & Bentley W. E. (2001).** Genomic analysis of high-cell-density recombinant *Escherichia coli* fermentation and "cell conditioning" for improved recombinant protein yield. *Biotechnology and Bioengineering* **72** (1), pp. 85-95.
- Goff S. A. & Goldberg A. L. (1985).** Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell* **41** (2), pp. 587-595.
- Gomi Y., Sunamachi H., Mori Y., Nagaike K., Takahashi M. & Yamanishi K. (2002).** Comparison of the complete DNA sequences of the Oka varicella vaccine and its parental virus. *Journal of Virology* **76** (22), pp. 11447-11459.
- Gopinath R. S., Ambagala A. P. N., Hinkley S. & Srikumaran S. (2002).** Effects of virion host shut-off activity of bovine herpesvirus 1 on MHC class I expression. *Viral Immunology* **15** (4), pp. 595-608.
- Gottesman S. (1996).** Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics* **30**, pp. 465-506.
- Graham D. A., Foster J. C., German A., McLaren I. E., Adair B. M. & Merza M. (1999).** Evaluation of an immunofluorescent antibody test to detect bovine herpesvirus 1-specific IgM. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **11** (4), pp. 324-329.
- Granzow H., Klupp B. G., Fuchs W., Veits J., Osterrieder N. & Mettenleiter T. C. (2001).** Egress of alphaherpesviruses: comparative ultrastructural study. *Journal of Virology* **75** (8), pp. 3675-3684.
- Granzow H., Weiland F., Jöns A., Klupp B. G., Karger A. & Mettenleiter T. C. (1997).** Ultrastructural analysis of the replication cycle of pseudorabies virus in cell culture: a reassessment. *Journal of Virology* **71** (3), pp. 2072-2082.
- Gross C. A. (1996).** Function and regulation of the heat shock proteins. pp. 1382-1399. *En: Neidhardt, F. C., Curtiss III, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. & Umberger, H. E. (Ed.), Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology, (2^a ed).* American Society for Microbiology. Washington DC, USA.
- Gut M., Jacobs L., Tyborowska J., Szweczyk B. & Bienkowska-Szweczyk K. (1999).** A highly specific and sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on baculovirus expressed pseudorabies virus glycoprotein gE and gI complex. *Veterinary Microbiology* **69** (4), pp. 239-249.
- Hannenhalli S., Chappey C., Koonin E. V. & Pevzner P. A. (1995).** Genome sequence comparison and scenarios for gene rearrangements: a test case. *Genomics* **30** (2), pp. 299-311.
- Hannig G. & Makrides S. C. (1998).** Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology* **16** (2), pp. 54-60.
- Harlow E. & Lane D. (1988).** Monoclonal antibodies. pp. 139-244. *En: Harlow, E. & Lane, D. (Ed.), Antibodies. A Laboratory Manual, (1^a ed).* Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York, USA.
- Hartl F-U. (1996).** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381** (6583), pp. 571-579.
- Hartl F-U. & Hayer-Hartl M. (2002).** Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295** (5561), pp. 1852-1858.
- Hayes S. A. & Dice J. F. (1996).** Roles of molecular chaperones in protein degradation. *Journal of Cell Biology* **132** (3), pp. 255-258.
- Heiles H. B. J., Genersch E., Kessler C., Neumann R. & Eggers H. J. (1988).** *In situ* hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papillomaviruses (HPV 16/18) in HeLa and SiHa cells. *Biotechniques* **6** (10), pp. 978-981.
- Hesterkamp T. & Bukau B. (1998).** Role of the DnaK and HscA homologs of Hsp70 chaperones in protein folding in *E.coli*. *EMBO Journal* **17** (16), pp. 4818-4828.
- Hidaka Y., Sakai Y., Toh Y. & Mori R. (1991).** Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 is essential for the virus to evade antibody-independent complement-mediated virus inactivation and lysis of virus-infected cells. *Journal of General Virology* **72** (4), pp. 915-921.
- Hinkley S., Hill A. B. & Srikumaran S. (1998).** Bovine herpesvirus-1 infection affects the peptide transport activity in bovine cells. *Virus Research* **53** (1), pp. 91-96.
- Hirst J. & Robinson M. S. (1998).** Clathrin and adaptors. *Biochimica et Biophysica Acta* **1404** (1-2), pp. 173-193.
- Hoffmann F. & Rinas U. (2000).** Kinetics of heat-shock response and inclusion body formation during temperature-induced production of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* **16** (6), pp. 1000-1007.
- Hofmann G. A. (1989?).** Cells in electric fields (physical and practical electronic aspects of electro cell fusion and electroporation). pp. 389-407. *En: Neumann, E., Sowers, A. E. & Jordan, C. A. (Ed.), Electroporation and Electrofusion in Cell Biology.* Plenum Press. New York, USA.

- Holland D. J., Miranda-Saksena M., Boadle R. A., Armati P. & Cunningham A. L. (1999). Anterograde transport of herpes simplex virus proteins in axons of peripheral human fetal neurons: an immunoelectron microscopy study. *Journal of Virology* **73** (10), pp. 8503-8511.
- Huber M. T. & Compton T. (1998). The human cytomegalovirus UL74 gene encodes the third component of the glycoprotein H-glycoprotein L-containing envelope complex. *Journal of Virology* **72** (10), pp. 8191-8197.
- Huemer H. P., Larcher C., van Drunen Littel-van den Hurk S. & Babiuk L. A. (1993). Species selective interaction of Alphaherpesvirinae with the "unspecific" immune system of the host. *Archives of Virology* **130** (3-4), pp. 353-364.
- Hutchinson LI., Browne H., Wargent V., Davis-Poynter N., Primorac S., Goldsmith K., Minson A. C. & Johnson D. C. (1992a). A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *Journal of Virology* **66** (4), pp. 2240-2250.
- Hutchinson LI., Goldsmith K., Snoddy D., Ghosh H., Graham F. L. & Johnson D. C. (1992b). Identification and characterization of a novel herpes simplex virus glycoprotein, gK, involved in cell fusion. *Journal of Virology* **66** (9), pp. 5603-5609.
- Hutchinson LI. & Johnson D. C. (1995). Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. *Journal of Virology* **69** (9), pp. 5401-5413.
- Hutchinson LI., Roop-Beauchamp C. & Johnson D. C. (1995). Herpes simplex virus glycoprotein K is known to influence fusion of infected cells, yet is not on the cell surface. *Journal of Virology* **69** (7), pp. 4556-4563.
- Ito K., Akiyama Y., Yura T. & Shiba K. (1986). Diverse effects of the MalE-LacZ hybrid protein on *Escherichia coli* cell physiology. *Journal of Bacteriology* **167** (1), pp. 201-204.
- Jacobs L. (1994). Glycoprotein E of pseudorabies virus and homologous proteins in other *alphaherpesvirinae*. *Archives of Virology* **137** (3-4), pp. 209-228.
- Jacobs L., Meloen R. H., Gielkens A. L. J. & van Oirschot J. T. (1990). Epitope analysis of glycoprotein I of pseudorabies virus. *Journal of General Virology* **71** (4), pp. 881-887.
- Jacobson R. H., Zhang X-J., DuBose R. F. & Matthews B. W. (1994). Three-dimensional structure of β -galactosidase from *E. coli*. *Nature* **369** (6483), pp. 761-766.
- Jayachandra S., Baghian A. & Kousoulas K. G. (1997). Herpes simplex virus type 1 glycoprotein K is not essential for infectious virus production in actively replicating cells but is required for efficient envelopment and translocation of infectious virions from the cytoplasm to the extracellular space. *Journal of Virology* **71** (7), pp. 5012-5024.
- Jiang Y., Hossain A., Winkler M. T., Holt T., Doster A. & Jones C. (1998). A protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 is expressed in trigeminal ganglionic neurons of latently infected cattle and interacts with cyclin-dependent kinase 2 during productive infection. *Journal of Virology* **72** (10), pp. 8133-8142.
- Johnson D. C. & Feenstra V. (1987). Identification of a novel herpes simplex virus type 1-induced glycoprotein which complexes with gE and binds immunoglobulin. *Journal of Virology* **61** (7), pp. 2208-2216.
- Johnson D. C., Frame M. C., Ligas M. W., Cross A. M. & Stow N. D. (1988). Herpes simplex virus immunoglobulin G Fc receptor activity depends on a complex of two viral glycoproteins, gE and gI. *Journal of Virology* **62** (4), pp. 1347-1354.
- Johnson D. C. & Huber M. T. (2002). Directed egress of animal viruses promotes cell-to-cell spread. *Journal of Virology* **76** (1), pp. 1-8.
- Johnson D. C. & Spear P. G. (1982). Monensin inhibits the processing of herpes simplex virus glycoproteins, their transport to the cell surface, and the egress of virions from infected cells. *Journal of Virology* **43** (3), pp. 1102-1112.
- Johnson D. C., Webb M., Wisner T. W. & Brunetti C. (2001). Herpes simplex virus gE/gI sorts nascent virions to epithelial cell junctions, promoting virus spread. *Journal of Virology* **75** (2), pp. 821-833.
- Jones C. (2003). Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clinical Microbiology Reviews* **16** (1), pp. 79-95.
- Jöns A., Dijkstra J. M. & Mettenleiter T. C. (1998). Glycoproteins M and N of pseudorabies virus form a disulfide-linked complex. *Journal of Virology* **72** (1), pp. 550-557.
- Joseph T., Lyaku J., Fredrickson R. A., Cepica A. & Kibenge F. S. B. (2002). Use of epitope mapping to identify a PCR template for protein amplification and detection by enzyme-linked immunosorbent assay of bovine herpesvirus type 1 glycoprotein D. *Journal of Clinical Microbiology* **40** (11), pp. 4045-4050.
- Kaashoek M. J., Moerman A., Madic J., Rijsewijk F. A., Quak J., Gielkens A. L. & van Oirschot J. T. (1994). A conventionally attenuated glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus type 1 is an efficacious and safe vaccine. *Vaccine* **12** (5), pp. 439-444.
- Kaashoek M. J., Moerman A., Madić J., Weerdmeester K., Maris-Veldhuis M., Rijsewijk F. A. M. & van Oirschot J. T. (1995). An inactivated vaccine based on a glycoprotein E-negative strain of bovine herpesvirus 1 induces protective immunity and allows serological differentiation. *Vaccine* **13** (4), pp. 342-346.
- Kaashoek M. J., Rijsewijk F. A. & Oirschot J. T. (1996). Persistence of antibodies against bovine herpesvirus 1 and virus reactivation two to three years after infection. *Veterinary Microbiology* **53** (1-2), pp. 103-110.
- Kaashoek M. J., Rijsewijk F. A., Ruuls R. C., Keil G. M., Thiry E., Pastoret P. P. & Van Oirschot J. T. (1998). Virulence, immunogenicity and reactivation of bovine herpesvirus 1 mutants with a deletion in the gC, gG, gI, gE, or in both the gI and gE gene. *Vaccine* **16** (8), pp. 802-809.

- Kaashoek M. J. & van Oirschot J. T. (1996).** Early immunity induced by a live gE-negative bovine herpesvirus 1 marker vaccine. *Veterinary Microbiology* **53** (1-2), pp. 191-197.
- Kahrs R. F. (2001a).** Clinical manifestations and differential diagnosis. Bovine respiratory disease (BRD). pp. 53. *En: Kahrs, R. F. (Ed.), Viral Diseases of Cattle, (2^a ed).* Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.
- Kahrs R. F. (2001b).** Concepts for studying viral infections. Multifactorial etiology. pp. 12-13. *En: Kahrs, R. F. (Ed.), Viral Diseases of Cattle, (2^a ed).* Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.
- Kahrs R. F. (2001c).** Infectious bovine rhinotracheitis and infectious pustular vulvovaginitis. pp. 159-170. *En: Kahrs, R. F. (Ed.), Viral Diseases of Cattle, (2^a ed).* Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.
- Kahrs R. F. (2001d).** Vaccines and vaccination. pp. 39-49. *En: Kahrs, R. F. (Ed.), Viral Diseases of Cattle, (2^a ed).* Iowa State University Press. Ames, Iowa, USA.
- Kane J. F. (1995).** Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **6** (5), pp. 494-500.
- Kanemori M., Mori H. & Yura T. (1994).** Induction of heat shock proteins by abnormal proteins results from stabilization and not increased synthesis of σ^{32} in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **176** (18), pp. 5648-5653.
- Kapust R. B. & Waugh D. S. (1999).** *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Science* **8** (8), pp. 1668-1674.
- Karger A. & Mettenleiter T. C. (1993).** Glycoproteins gIII and gp50 play dominant roles in the biphasic attachment of pseudorabies virus. *Virology* **194** (2), pp. 654-664.
- Kaye J. F., Gompels U. A. & Minson A. C. (1992).** Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product. *Journal of General Virology* **73** (10), pp. 2693-2698.
- Keegan K. & Collett M. S. (1986).** Use of bacterial expression cloning to define the amino acids sequences of antigenic determinants on the G2 glycoprotein of Rift Valley fever virus. *Journal of Virology* **58** (2), pp. 263-270.
- Keil G. M., Engelhardt T. & Enz M. (1995).** Characterization of BHV-1 and BHV-5 glycoprotein G, a secreted proteoglycan. *En: Schwyzer, M. & Ackermann, M. (Ed.), Immunobiology of Viral Infections.* Fondation Marcel Mériéux. Lyon, France.
- Keil G. M., Engelhardt T., Karger A. & Enz M. (1996).** Bovine herpesvirus 1 U_s open reading frame 4 encodes a glycoproteoglycan. *Journal of Virology* **70** (5), pp. 3032-3038.
- Kellermann O. K. & Ferenci T. (1982).** Maltose-binding protein from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* **90** (E), pp. 459-463.
- Khadr A., Tikoo S. K., Babiuk L. A. & van Drunen Littel-van den Hurk S. (1996).** Sequence and expression of a bovine herpesvirus-1 gene homologous to the glycoprotein K-encoding gene of herpes simplex virus-1. *Gene* **168** (2), pp. 189-193.
- Khattar S. K., van Drunen Littel-van den Hurk S., Attah-Poku S. K., Babiuk L. A. & Tikoo S. K. (1996).** Identification and characterization of a bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein gL which is required for proper antigenicity, processing, and transport of BHV-1 glycoprotein gH. *Virology* **219** (1), pp. 66-76.
- Khattar S. K., van Drunen Littel-van den Hurk S., Babiuk L. A. & Tikoo S. K. (1995).** Identification and transcriptional analysis of a 3'-coterminal gene cluster containing UL1, UL2, UL3, and UL3.5 open reading frames of bovine herpesvirus-1. *Virology* **213** (1), pp. 28-37.
- Kimura H., Straus S. E. & Williams R. K. (1997).** Varicella-zoster virus glycoproteins E and I expressed in insect cells form a heterodimer that requires the N-terminal domain of glycoprotein I. *Virology* **233** (2), pp. 382-391.
- Klupp B. G., Baumeister J., Dietz P., Granzow H. & Mettenleiter T. C. (1998).** Pseudorabies virus glycoprotein gK is a virion structural component involved in virus release but is not required for entry. *Journal of Virology* **72** (3), pp. 1949-1958.
- Klupp B. G., Fuchs W., Granzow H., Nixdorf R. & Mettenleiter T. C. (2002).** Pseudorabies virus UL36 tegument protein physically interacts with the UL37 protein. *Journal of Virology* **76** (6), pp. 3065-3071.
- Klupp B. G., Granzow H. & Mettenleiter T. C. (2000).** Primary envelopment of pseudorabies virus at the nuclear membrane requires the UL34 gene product. *Journal of Virology* **74** (21), pp. 10063-10073.
- Klupp B. G., Granzow H. & Mettenleiter T. C. (2001a).** Effect of the pseudorabies virus US3 protein on nuclear membrane localization of the UL34 protein and virus egress from the nucleus. *Journal of General Virology* **82** (10), pp. 2363-2371.
- Klupp B. G., Granzow H., Mundt E. & Mettenleiter T. C. (2001b).** Pseudorabies virus UL37 gene product is involved in secondary envelopment. *Journal of Virology* **75** (19), pp. 8927-8936.
- Klupp B. G., Karger A. & Mettenleiter T. C. (1997).** Bovine herpesvirus 1 glycoprotein B does not productively interact with cell surface heparan sulfate in a pseudorabies virion background. *Journal of Virology* **71** (6), pp. 4838-4841.
- Knapp A. C. & Enquist L. W. (1997).** Pseudorabies virus recombinants expressing functional virulence determinants gE and gI from bovine herpesvirus 1.1. *Journal of Virology* **71** (4), pp. 2731-2739.

- Knapp A. C., Husak P. J. & Enquist L. W. (1997).** The gE and gI homologs from two alphaherpesviruses have conserved and divergent neuroinvasive properties. *Journal of Virology* **71** (8), pp. 5820-5827.
- Koczulla A. R. & Bals R. (2003).** Antimicrobial peptides - Current status and therapeutic potential. *Drugs* **63** (4), pp. 389-406.
- Kongsuwan K., Johnson M. A., Prideaux C. T. & Sheppard M. (1993).** Identification of an infectious laryngotracheitis virus gene encoding an immunogenic protein with a predicted M(r) of 32 kilodaltons. *Virus Research* **29** (2), pp. 125-140.
- Kopp A. & Mettenleiter T. C. (1992).** Stable rescue of a glycoprotein gII deletion mutant of pseudorabies virus by glycoprotein gI of bovine herpesvirus 1. *Journal of Virology* **66** (5), pp. 2754-2762.
- Kopp M., Klupp B. G., Granzow H., Fuchs W. & Mettenleiter T. C. (2002).** Identification and characterization of the pseudorabies virus tegument proteins UL46 and UL47: Role for UL47 in virion morphogenesis in the cytoplasm. *Journal of Virology* **76** (17), pp. 8820-8833.
- Koppers-Lalic D., Rijsewijk F. A. M., Verschuren S. B. E., van Gaans-van den Brink J. A. M., Neisig A., Rensing M. E., Neefjes J. & Wiertz E. J. H. J. (2001).** The UL41-encoded virion host shutoff (Vhs) protein and vhs-independent mechanisms are responsible for down-regulation of MHC class I molecules by bovine herpesvirus 1. *Journal of General Virology* **82** (9), pp. 2071-2081.
- Kostavasili I., Sahu A., Friedman H. M., Eisenberg R. J., Cohen G. H. & Lambris J. D. (1997).** Mechanism of complement inactivation by glycoprotein C of herpes simplex virus. *Journal of Immunology* **158** (4), pp. 1763-1771.
- Kragol G., Hoffmann R., Chattergoon M. A., Lovas S., Cudic M., Bulet P., Condie B. A., Rosengren K. J., Montaner L. J. & Otvos Jr L. (2002).** Identification of crucial residues for the antibacterial activity of the proline-rich peptide, pyrrolicorin. *European Journal of Biochemistry* **269** (17), pp. 4226-4237.
- Kragol G., Lovas S., Varadi G., Condie B. A., Hoffmann R. & Otvos Jr L. (2001).** The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* **40** (10), pp. 3016-3026.
- Kruger J. M., Sussman M. D. & Maes R. K. (1996).** Glycoproteins gI and gE of feline herpesvirus-1 are virulence genes: safety and efficacy of a gI-gE deletion mutant in the natural host. *Virology* **220** (2), pp. 299-308.
- Lehner R., Meyer H. & Mach M. (1989).** Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses. *Journal of Virology* **63** (9), pp. 3792-3800.
- Lemaire M., Schyns F., Meyer G., Georgin J.-P., Baranowski E., Gabriel A., Ros C., Belák S. & Thiry E. (2001).** Latency and reactivation of a glycoprotein E negative bovine herpesvirus type 1 vaccine: influence of virus load and effect of specific maternal antibodies. *Vaccine* **19** (32), pp. 4795-4804.
- Lenardo M. J., Brentano S. T. & Donelson J. E. (1984).** Expression of antigenic regions of a trypanosome variable surface glycoprotein in *E. coli* using Bal-31 nuclease digestion. *Nucleic Acids Research* **12** (11), pp. 4637-4652.
- Leslie J., Rixon F. J. & McLauchlan J. (1996).** Overexpression of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 increases its incorporation into virus particles. *Virology* **220** (1), pp. 60-68.
- Letellier C., Delangre A., De Smet A. & Kerkhofs P. (2001).** Characterization of monoclonal antibodies directed against the bovine herpesvirus-1 glycoprotein E and use for the differentiation between vaccinated and infected animals. *Veterinary Microbiology* **83** (4), pp. 301-315.
- Leung-Tack P., Audonnet J.-C. & Riviere M. (1994).** The complete DNA sequence and the genetic organization of the short unique region (US) of the bovine herpesvirus type 1 (ST strain). *Virology* **199** (2), pp. 409-421.
- Li Q., Turk S. M. & Hutt-Fletcher L. M. (1995).** The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF2 gene product associates with the gH and gL homologs of EBV and carries an epitope critical to infection of B cells but not of epithelial cells. *Journal of Virology* **69** (7), pp. 3987-3994.
- Li Y., Liang X., van Drunen Littel-van den Hurk S., Attah-Poku S. & Babiuk L. A. (1996).** Glycoprotein Bb, the N-terminal subunit of bovine herpesvirus 1 gB, can bind to heparan sulfate on the surfaces of Madin-Darby bovine kidney cells. *Journal of Virology* **70** (3), pp. 2032-2037.
- Liang X., Babiuk L. A., van Drunen Littel-van den Hurk S., Fitzpatrick D. R. & Zamb T. J. (1991).** Bovine herpesvirus 1 attachment to permissive cells is mediated by its major glycoproteins gI, gIII, and gIV. *Journal of Virology* **65** (3), pp. 1124-1132.
- Liang X., Babiuk L. A. & Zamb T. J. (1992).** An *in vivo* study of a glycoprotein gIII-negative bovine herpesvirus 1 (BHV-1) mutant expressing β -galactosidase: evaluation of the role of gIII in virus infectivity and its use as a vector for mucosal immunization. *Virology* **189** (2), pp. 629-639.
- Liang X., Chow B., Raggo C. & Babiuk L. A. (1996).** Bovine herpesvirus 1 UL49.5 homolog gene encodes a novel viral envelope protein that forms a disulfide-linked complex with a second virion structural protein. *Journal of Virology* **70** (3), pp. 1448-1454.
- Liang X., Tang M., Manns B., Babiuk L. A. & Zamb T. J. (1993).** Identification and deletion mutagenesis of the bovine herpesvirus 1 dUTPase gene and a gene homologous to herpes simplex virus UL49.5. *Virology* **195** (1), pp. 42-50.
- Ligas M. W. & Johnson D. C. (1988).** A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *Journal of Virology* **62** (5), pp. 1486-1494.
- Litwin V., Jackson W. & Grose C. (1992).** Receptor properties of two varicella-zoster virus glycoproteins, gpI and gpIV, homologous to herpes simplex virus gE and gI. *Journal of Virology* **66** (6), pp. 3643-3651.
- Liu D. X., Gompels U. A., Nicholas J. & Lelliott C. (1993).** Identification and expression of the human herpesvirus 6 glycoprotein H and interaction with an accessory 40K glycoprotein. *Journal of General Virology* **74** (9), pp. 1847-1857.

- Lomonte P., Filée P., Lyaku J. R., Bublot M., Pastoret P.-P. & Thiry E. (1997). Analysis of the biochemical properties of, and complex formation between, glycoproteins H and L of the γ 2 herpesvirus bovine herpesvirus-4. *Journal of General Virology* **78** (8), pp. 2015-2023.
- Longnecker R., Chatterjee S., Whitley R. J. & Roizman B. (1987). Identification of a herpes simplex virus 1 glycoprotein gene within a gene cluster dispensable for growth in cell culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84** (12), pp. 4303-4307.
- Longnecker R. & Roizman B. (1986). Generation of an inverting herpes simplex virus 1 mutant lacking the L-S junction a sequences, an origin of DNA synthesis, and several genes including those specifying glycoprotein E and the alpha 47 gene. *Journal of Virology* **58** (2), pp. 583-591.
- Love D. N., Bell C. W. & Whalley J. M. (1992). Characterization of the glycoprotein D gene products of equine herpesvirus 1 using a prokaryotic cell expression vector. *Veterinary Microbiology* **30** (4), pp. 387-394.
- Lubinski J., Wang L., Mastellos D., Sahu A., Lambris J. D. & Friedman H. M. (1999). In vivo role of complement-interacting domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC. *Journal of Experimental Medicine* **190** (11), pp. 1637-1646.
- Lubinski J. M., Jiang M., Hook L., Chang Y., Sarver C., Mastellos D., Lambris J. D., Cohen G. H., Eisenberg R. J. & Friedman H. M. (2002). Herpes simplex virus type 1 evades the effects of antibody and complement *in vivo*. *Journal of Virology* **76** (18), pp. 9232-9241.
- Mackintosh J. A., Veal D. A., Beattie A. J. & Gooley A. A. (1998). Isolation from an ant *Myrmecia gulosa* of two inducible O-glycosylated proline-rich antibacterial peptides. *Journal of Biological Chemistry* **273** (11), pp. 6139-6143.
- MacLean C. A., Robertson L. M. & Jamieson F. E. (1993). Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role *in vivo*. *Journal of General Virology* **74** (6), pp. 975-983.
- Madin S. H., Mckercher D. G. & York C. J. (1956). Isolation of the infectious bovine rhinotracheitis virus. *Science* **124** (3225), pp. 721-722.
- Maina C. V., Riggs P. D., Grandea III A. G., Slatko B. E., Moran L. S., Tagliamonte J. A., McReynolds L. A. & di Guan C. (1988). An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* **74** (2), pp. 365-373.
- Makoff A. J., Oxer M. D., Romanos M. A., Fairweather N. F. & Ballantine S. (1989). Expression of tetanus toxin fragment C in *E. coli*: high level expression by removing rare codons. *Nucleic Acids Research* **17** (24), pp. 10191-10202.
- Makrides S. C. (1996). Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* **60** (3), pp. 512-538.
- Mars M. H., de Jong M. C. M., Franken P. & van Oirschot J. T. (2001). Efficacy of a live glycoprotein E-negative bovine herpesvirus 1 vaccine in cattle in the field. *Vaccine* **19** (15-16), pp. 1924-1930.
- Martineau P., Guillet J.-G., Leclerc C. & Hofnung M. (1992). Expression of heterologous peptides at two permissive sites of the MalE protein: antigenicity and immunogenicity of foreign B-cell and T-cell epitopes. *Gene* **113** (1), pp. 35-46.
- Martínez W. M. & Spear P. G. (2002). Amino acid substitutions in the V domain of nectin-1 (HveC) that impair entry activity for herpes simplex virus types 1 and 2 but not for pseudorabies virus or bovine herpesvirus 1. *Journal of Virology* **76** (14), pp. 7255-7262.
- Mason P. W., Dalrymple J. M., Gentry M. K., McCown J. M., Hoke C. H., Burke D. S., Fournier M. J. & Mason T. L. (1989). Molecular characterization of a neutralizing domain of the Japanese encephalitis virus structural glycoprotein. *Journal of General Virology* **70** (8), pp. 2037-2049.
- Matsumura T., Kondo T., Sugita S., Damiani A. M., O'Callaghan D. J. & Imagawa H. (1998). An equine herpesvirus type 1 recombinant with a deletion in the gE and gI genes is avirulent in young horses. *Virology* **242** (1), pp. 68-79.
- Mayfield J. E., Good P. J., van Oort H. J., Campbell A. R. & Reed D. E. (1983). Cloning and cleavage site mapping of dna from bovine herpesvirus 1 (Cooper strain). *Journal of Virology* **47** (1), pp. 259-264.
- McClain D. S. & Fuller A. O. (1994). Cell-specific kinetics and efficiency of herpes simplex virus type 1 entry are determined by two distinct phases of attachment. *Virology* **198** (2), pp. 690-702.
- McGeoch D. J. (1990). Evolutionary relationships of virion glycoprotein genes in the S regions of alphaherpesvirus genomes. *Journal of General Virology* **71** (10), pp. 2361-2367.
- McGeoch D. J., Cook S., Dolan A., Jamieson F. E. & Telford E. A. R. (1995). Molecular phylogeny and evolutionary timescale for the family of mammalian herpesviruses. *Journal of Molecular Biology* **247** (3), pp. 443-458.
- McGeoch D. J., Dalrymple M. A., Davison A. J., Dolan A., Frame M. C., McNab D., Perry L. J., Scott J. E. & Taylor P. (1988). The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *Journal of General Virology* **69** (7), pp. 1531-1574.
- McGeoch D. J. & Davison A. J. (1986). DNA sequence of the herpes simplex virus type 1 gene encoding glycoprotein gH, and identification of homologues in the genomes of varicella-zoster virus and Epstein-Barr virus. *Nucleic Acids Research* **14** (10), pp. 4281-4292.
- McGeoch D. J. & Davison A. J. (1999). The molecular evolutionary history of the herpesvirus. pp. 441-465. *En: Domingo, E., Webster, R. & Holland, J. (Ed.), Origin and Evolution of Viruses*. Academic Press. London, England.
- McGeoch D. J., Dolan A. & Ralph A. C. (2000). Toward a comprehensive phylogeny for mammalian and avian herpesviruses. *Journal of Virology* **74** (22), pp. 10401-10406.
- McMillan T. N. & Johnson D. C. (2001). Cytoplasmic domain of herpes simplex virus gE causes accumulation in the *trans*-Golgi network, a site of virus envelopment and sorting of virions to cell junctions. *Journal of Virology* **75** (4), pp. 1928-1940.

- McNabb D. S. & Courtney R. J. (1992). Characterization of the large tegument protein (ICP1/2) of herpes simplex virus type 1. *Virology* **190** (1), pp. 221-232.
- Mendelsohn C. L., Wimmer E. & Racaniello V. R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **56** (5), pp. 855-865.
- Mettenleiter T. C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *Journal of Virology* **76** (4), pp. 1537-1547.
- Mettenleiter T. C. (2003). Pathogenesis of neurotropic herpesviruses: role of viral glycoproteins in neuroinvasion and transneuronal spread. *Virus Research* **92** (2), pp. 197-206.
- Mettenleiter T. C. & Spear P. G. (1994). Glycoprotein gB (gII) of pseudorabies virus can functionally substitute for glycoprotein gB in herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* **68** (1), pp. 500-504.
- Meyer A. L., Petrovskis E. A., Duffus W. P., Thomsen D. R. & Post L. E. (1991). Cloning and sequence of an infectious bovine rhinotracheitis virus (BHV-1) gene homologous to glycoprotein H of herpes simplex virus. *Biochimica et Biophysica Acta* **1090** (2), pp. 267-269.
- Meyer G., Bare O. & Thiry E. (1999). Identification and characterization of bovine herpesvirus type 5 glycoprotein H gene and gene products. *Journal of General Virology* **80** (11), pp. 2849-2859.
- Meyer G., Hanon E., Georgette D., Pastoret P. P. & Thiry E. (1998). Bovine herpesvirus type 1 glycoprotein H is essential for penetration and propagation in cell culture. *Journal of General Virology* **79** (8), pp. 1983-1987.
- Miethke A., Keil G. M., Weiland F. & Mettenleiter T. C. (1995). Unidirectional complementation between glycoprotein B homologues of pseudorabies virus and bovine herpesvirus 1 is determined by the carboxy-terminal part of the molecule. *Journal of General Virology* **76** (7), pp. 1623-1635.
- Mijnes J. D., van der Horst L. M., van Anken E., Horzinek M. C., Röttier P. J. & de Groot R. J. (1996). Biosynthesis of glycoproteins E and I of feline herpesvirus: gE-gI interaction is required for intracellular transport. *Journal of Virology* **70** (8), pp. 5466-5475.
- Mijnes J. D. F. & de Groot R. J. (1999). Structure-function analysis of the feline herpesvirus virulence factors gE and gI. *Veterinary Microbiology* **69** (1-2), pp. 89-91.
- Minson A. C., Britt W. J., Epstein M. A. & Crawford D. H. (1998). Alphaherpesviruses: herpes simplex and varicella-zoster. Betaherpesviruses: cytomegalovirus, human herpesviruses 6 and 7. Gammaherpesviruses: Epstein-Barr virus. pp. 325-366. *En: Collier, L., Balows, A. & Sussman, M. (Ed.), Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, (9th ed). Arnold (Hodder Headline Group). London, UK.
- Minson A. C., Davison A., Eberle R., Desrosiers R. C., Fleckenstein B., McGeoch D. J., Pellett P. E., Roizman B. & Studdert M. J. (2000). Family *Herpesviridae*. pp. 203-225. *En: van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. (Ed.), Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press. San Diego, USA.
- Misra V., Blumenthal R. M. & Babiuk L. A. (1981). Proteins specified by bovine herpesvirus 1 (infectious bovine rhinotracheitis virus). *Journal of Virology* **40** (2), pp. 367-378.
- Misra V., Nelson R. & Smith M. (1988). Sequence of a bovine herpesvirus type-1 glycoprotein gene that is homologous to the herpes simplex gene for the glycoprotein gB. *Virology* **166** (2), pp. 542-549.
- Mo C. & Holland T. C. (1997). Determination of the transmembrane topology of herpes simplex virus type 1 glycoprotein (gK). *Journal of Biological Chemistry* **272** (52), pp. 33305-33311.
- Mo C., Lee J., Sommer M., Grose C. & Arvin A. M. (2002). The requirement of varicella zoster virus glycoprotein E (gE) for viral replication and effects of glycoprotein I on gE in melanoma cells. *Virology* **304** (2), pp. 176-186.
- Mo C., Schneeberger E. E. & Arvin A. M. (2000). Glycoprotein E of varicella-zoster virus enhances cell-cell contact in polarized epithelial cells. *Journal of Virology* **74** (23), pp. 11377-11387.
- Mo C., Suen J., Sommer M. & Arvin A. (1999). Characterization of Varicella-Zoster virus glycoprotein K (open reading frame 5) and its role in virus growth. *Journal of Virology* **73** (5), pp. 4197-4207.
- Montague M. G. & Hutchison C. A. 3rd (2000). Gene content phylogeny of herpesviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97** (10), pp. 5334-5339.
- Montgomery R. I., Warner M. S., Lum B. J. & Spear P. G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* **87** (3), pp. 427-436.
- Montgomery S. A. (2004). Transgenic animals: walking bioreactors. *BioProcess International* **2** (suppl 2), pp. 40-51.
- Moore S., Gunn M. & Walls D. (2000). A rapid and sensitive PCR-based diagnostic assay to detect bovine herpesvirus 1 in routine diagnostic submissions. *Veterinary Microbiology* **75** (2), pp. 145-153.
- Mori Y., Akkapaiboon P., Yang X. & Yamanishi K. (2003). The human herpesvirus 6 U100 gene product is the third component of the gH-gL glycoprotein complex on the viral envelope. *Journal of Virology* **77** (4), pp. 2452-2458.
- Morrison E. E., Stevenson A. J., Wang Y-F. & Meredith D. M. (1998). Differences in the intracellular localization and fate of herpes simplex virus tegument proteins early in the infection of Vero cells. *Journal of General Virology* **79** (10), pp. 2517-2528.

- Mossman K. L., Sherburne R., Lavery C., Duncan J. & Smiley J. R. (2000). Evidence that herpes simplex virus VP16 is required for viral egress downstream of the initial envelopment event. *Journal of Virology* **74** (14), pp. 6287-6299.
- Mostov K., ter Beest M. B. & Chapin S. J. (1999). Catch the mu1B train to the basolateral surface. *Cell* **99** (2), pp. 121-122.
- Nakamichi K., Matsumoto Y. & Otsuka H. (2002). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is necessary for maintaining cell-to-cell junctional adherence among infected cells. *Virology* **294** (1), pp. 22-30.
- Nakamichi K., Ohara K., Kuroki D. & Otsuka H. (2000). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein G is required for viral growth by cell-to-cell infection. *Virus Research* **68** (2), pp. 175-181.
- Nataraj C., Eidmann S., Hariharan M. J., Sur J. H., Perry G. A. & Srikumaran S. (1997). Bovine herpesvirus 1 downregulates the expression of bovine MHC class I molecules. *Viral Immunology* **10** (1), pp. 21-34.
- Neidhardt H., Schröder C. H. & Kaerner H. C. (1987). Herpes simplex virus type 1 glycoprotein E is not indispensable for viral infectivity. *Journal of Virology* **61** (2), pp. 600-603.
- Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y. & Hofschneider P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO Journal* **1** (7), pp. 841-845.
- Newcomb W. W. & Brown J. C. (1991). Structure of the herpes simplex virus capsid: effects of extraction with guanidine hydrochloride and partial reconstitution of extracted capsids. *Journal of Virology* **65** (2), pp. 613-620.
- Newcomb W. W. & Brown J. C. (1994). Induced extrusion of DNA from the capsid of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* **68** (1), pp. 433-440.
- Newcomb W. W., Juhas R. M., Thomsen D. R., Homa F. L., Burch A. D., Weller S. K. & Brown J. C. (2001). The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid. *Journal of Virology* **75** (22), pp. 10923-10932.
- Newcomb W. W., Trus B. L., Booy F. P., Steven A. C., Wall J. S. & Brown J. C. (1993). Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. *Journal of Molecular Biology* **232** (2), pp. 499-511.
- Nishikawa Y., Xuan X. & Otsuka H. (1999). Biosynthesis and interaction of glycoproteins E and I of canine herpesvirus. *Virus Research* **61** (1), pp. 11-18.
- Ohno H., Tomemori T., Nakatsu F., Okazaki Y., Aguilar R. C., Foelsch H., Mellman I., Saito T., Shirasawa T. & Bonifacio J. S. (1999). μ 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Letters* **449** (2-3), pp. 215-220.
- Ojala P. M., Sodeik B., Ebersold M. W., Kutay U. & Helenius A. (2000). Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro. *Molecular and Cellular Biology* **20** (13), pp. 4922-4931.
- Okazaki K., Matsuzaki T., Sugahara Y., Okada J., Hasebe M., Iwamura Y., Ohnishi M., Kanno T., Shimizu M., Honda E. & et al. (1991). BHV-1 adsorption is mediated by the interaction of glycoprotein gIII with heparinlike moiety on the cell surface. *Virology* **181** (2), pp. 666-670.
- Orange J. S., Fassett M. S., Koopman L. A., Boyson J. E. & Strominger J. L. (2002). Viral evasion of natural killer cells. *Nature Immunology* **3** (11), pp. 1006-1012.
- Osterrieder N., Neubauer A., Brandmüller C., Braun B., Kaaden O-R. & Baines J. D. (1996). The equine herpesvirus 1 glycoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *Journal of Virology* **70** (6), pp. 4110-4115.
- Otto C. M., Niagro F., Su X. & Rawlings C. A. (1995). Expression of recombinant feline tumor necrosis factor is toxic to *Escherichia coli*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **2** (6), pp. 740-746.
- Otvos Jr. L. (2002). The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59** (7), pp. 1138-1150.
- Otvos Jr. L., O I., Rogers M. E., Consolvo P. J., Condie B. A., Lovas S., Bulet P. & Blaszczyk-Thurin M. (2000). Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **39** (46), pp. 14150-14159.
- Parcells M. S., Lin S. F., Dienglewicz R. L., Majerciak V., Robinson D. R., Chen H. C., Wu Z., Dubyak G. R., Brunovskis P., Hunt H. D., Lee L. F. & Kung H. J. (2001). Marek's disease virus (MDV) encodes an interleukin-8 homolog (vIL-8): characterization of the vIL-8 protein and a vIL-8 deletion mutant MDV. *Journal of Virology* **75** (11), pp. 5159-5173.
- Parsell D. A. & Lindquist S. (1993). The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics* **27**, pp. 437-496.
- Parsell D. A. & Sauer R. T. (1989). Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependence on protein level not protein degradation. *Genes & Development* **3** (8), pp. 1226-1232.
- Peeters B., de Wind N., Broer R., Gielkens A. & Moormann R. (1992a). Glycoprotein H of pseudorabies virus is essential for entry and cell-to-cell spread of the virus. *Journal of Virology* **66** (6), pp. 3888-3892.
- Peeters B., de Wind N., Hooisma M., Wagenaar F., Gielkens A. & Moormann R. (1992b). Pseudorabies virus envelope glycoproteins gp50 and gII are essential for virus penetration, but only gII is involved in membrane fusion. *Journal of Virology* **66** (2), pp. 894-905.
- Penfold M. E. T., Armati P. & Cunningham A. L. (1994). Axonal transport of herpes simplex virions to epidermal cells: evidence for a specialized mode of virus transport and assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91** (14), pp. 6529-6533.

- Perdue M. L., Cohen J. C., Randall C. C. & O'Callaghan D. J. (1976).** Biochemical studies of the maturation of herpesvirus nucleocapsid species. *Virology* **74** (1), pp. 194-208.
- Platt T., Müller-Hill B. & Miller J. H. (1972).** Assay of β -galactosidase. pp. 352-355. *En: Miller, J. H. (Ed.), Experiments in Molecular Genetics.* Cold Spring Harbour Laboratory. New York, USA.
- Pomeranz L. E. & Blaho J. A. (2000).** Assembly of infectious Herpes simplex virus type 1 virions in the absence of full-length VP22. *Journal of Virology* **74** (21), pp. 10041-10054.
- Post L. E. & Roizman B. (1981).** A generalized technique for deletion of specific genes in large genomes: α gene 22 of herpes simplex virus 1 is not essential for growth. *Cell* **25** (1), pp. 227-232.
- Prescott L. M., Harley J. P. & Klein D. A. (2004).** Enfermedades causadas por virus. pp. 941-972. *En: Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (Ed.), Microbiología*, (5ª ed). McGraw-Hill-Interamericana de España, S.A.U. Madrid, España.
- Prevelige Jr. P. E. & King J. (1993).** Assembly of bacteriophage P22: a model for ds-DNA virus assembly. *Progress in Medical Virology* **40**, pp. 206-221.
- Prevelige Jr. P. E., Thomas D. & King J. (1993).** Nucleation and growth phases in the polymerization of coat and scaffolding subunits into icosahedral procapsid shells. *Biophysical Journal* **64** (3), pp. 824-835.
- Purves F. C., Longnecker R. M., Leader D. P. & Roizman B. (1987).** Herpes simplex virus 1 protein kinase is encoded by open reading frame US3 which is not essential for virus growth in cell culture. *Journal of Virology* **61** (9), pp. 2896-2901.
- Pyles R. B., Sawtell N. M. & Thompson R. L. (1992).** Herpes simplex virus type 1 dUTPase mutants are attenuated for neurovirulence, neuroinvasiveness, and reactivation from latency. *Journal of Virology* **66** (11), pp. 6706-6713.
- Quinn P. J., Markey B. K., Carter M. E., Donnelly W. J. C. & Leonard F. C. (2002a).** Introductory Virology. pp. 275-312. *En: Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. C. & Leonard, F. C. (Ed.), Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*, (2ª ed). Blackwell Science. Oxford, UK.
- Quinn P. J., Markey B. K., Carter M. E., Donnelly W. J. C. & Leonard F. C. (2002b).** Viruses and Prions. *Herpesviridae*. pp. 315-326. *En: Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. C. & Leonard, F. C. (Ed.), Veterinary Microbiology and Microbial Diseases*, (2ª ed). Blackwell Science. Oxford, UK.
- Rajcáni J. & Kúdelová M. (1999).** Glycoprotein K of herpes simplex virus: a transmembrane protein encoded by the UL53 gene which regulates membrane fusion. *Virus Genes* **18** (1), pp. 81-90.
- Rangwala S. H., Finn R. F., Smith C. E., Berberich S. A., Salsgiver W. J., Stallings W. C., Glover G. I. & Olins P. O. (1992).** High-level production of active HIV-1 protease in *Escherichia coli*. *Gene* **122** (2), pp. 263-269.
- Rauh I. & Mettenleiter T. C. (1991).** Pseudorabies virus glycoproteins gII and gp50 are essential for virus penetration. *Journal of Virology* **65** (10), pp. 5348-5356.
- Rea T. J., Timmins J. G., Long G. W. & Post L. E. (1985).** Mapping and sequence of the gene for the pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells. *Journal of Virology* **54** (1), pp. 21-29.
- Rebordosa, X. (1996).** Caracterización de la glicoproteína E (gE) del herpesvirus bovino tipo 1. Construcción de un virus defectivo y su aplicación como vacuna marcadora. *Memoria de tesis doctoral*, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Bellaterra, Spain.
- Rebordosa X., Piñol J., Pérez-Pons J. A., Lloberas J., Naval J. & Querol E. (1994).** Mapping, cloning and sequencing of a glycoprotein-encoding gene from bovine herpesvirus type 1 homologous to the gE gene from HSV-1. *Gene* **149** (2), pp. 203-209.
- Rebordosa X., Piñol J., Pérez-Pons J. A., Lloberas J., Naval J., Serra-Hartmann X., Espuña E. & Querol E. (1996).** Glycoprotein E of bovine herpesvirus type 1 is involved in virus transmission by direct cell-to-cell spread. *Virus Research* **45** (1), pp. 59-68.
- Rebordosa, X., Piñol, J., Pérez-Pons, J. A., Lloberas, J. & Querol, E. (1995).** Recombinant infectious bovine rhinotracheitis virus mutant, methods for the production of the same, and vaccines containing the same. *Patente 95870007.2*. Europa.
- Ren X., Harms J. S. & Splitter G. A. (2001).** Bovine herpesvirus 1 tegument protein VP22 interacts with histones, and the carboxyl terminus of VP22 is required for nuclear localization. *Journal of Virology* **75** (17), pp. 8251-8258.
- Reynolds A. E., Ryckman B. J., Baines J. D., Zhou Y., Liang L. & Roller R. J. (2001).** U_L31 and U_L34 proteins of herpes simplex virus type 1 form a complex that accumulates at the nuclear rim and is required for envelopment of nucleocapsids. *Journal of Virology* **75** (18), pp. 8803-8817.
- Riggio M. P. & Onions D. E. (1993).** DNA sequence of a gene cluster in the equine herpesvirus-4 genome which contains a newly identified herpesvirus gene encoding a membrane protein. *Archives of Virology* **133** (1-2), pp. 171-178.
- Rijsewijk F. A. M., Kaashoek M. J., Langeveld J. P., Maris-Veldhuis M. A., Magdalena J., Verschuren S. B., Melen R. H. & van Oirschot J. T. (2000).** Epitopes on glycoprotein E and on the glycoprotein E/glycoprotein I complex of bovine herpesvirus 1 are expressed by all of 222 isolates and 11 vaccine strains. *Archives of Virology* **145** (5), pp. 921-936.
- Rinas U. (1996).** Synthesis rates of cellular proteins involved in translation and protein folding are strongly altered in response to overproduction of basic fibroblast growth factor by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress* **12** (2), pp. 196-200.
- Rixon F. J. (1993).** Structure and assembly of herpesvirus. *Seminars in Virology* **4** (3), pp. 135-144.

- Rockabrand D., Livers K., Austin T., Kaiser R., Jensen D., Burgess R. & Blum P. (1998).** Roles of DnaK and RpoS in starvation-induced thermotolerance of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **180** (4), pp. 846-854.
- Rodseth L. E., Martineau P., Duplay P., Hofnung M. & Quijcho F. A. (1990).** Crystallization of genetically engineered active maltose-binding proteins, including an immunogenic viral epitope insertion. *Journal of Molecular Biology* **213** (4), pp. 607-611.
- Roffman E., Albert J. P., Goff J. P. & Frenkel N. (1990).** Putative site for the acquisition of human herpesvirus 6 virion tegument. *Journal of Virology* **64** (12), pp. 6308-6313.
- Roizman B., Desrosiers R. C., Fleckenstein B., Lopez C., Minson A. C. & Studdert M. J. (1992).** The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology* **123** (3-4), pp. 425-449.
- Roizman B. & Furlong D. (1974).** The replication of herpesvirus. pp. 229-403. *En: Fraenkel-Conrat, H. & Wagner, R. R. (Ed.), Comprehensive Virology.* Plenum Press. New York, USA.
- Roizman B. & Knipe D. M. (2001).** Herpes simplex viruses and their replication. pp. 2399-2459. *En: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Martin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B. & Straus, S. E. (Ed.), Fields' Virology, (4^a ed).* Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
- Roizman B. & Pellett P. E. (2001).** The family *Herpesviridae*: a brief introduction. pp. 2381-2397. *En: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E., Martin, M. A., Lamb, R. A., Roizman, B. & Straus, S. E. (Ed.), Fields' Virology, (4^a ed).* Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA.
- Roller R. J. & Roizman B. (1992).** The herpes simplex virus 1 RNA binding protein US11 is a virion component and associates with ribosomal 60S subunits. *Journal of Virology* **66** (6), pp. 3624-3632.
- Rosenberg A. H., Lade B. N., Chui D-S., Lin S-W., Dunn J. J. & Studier F. W. (1987).** Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56** (1), pp. 125-135.
- Rosin L. J. (2004).** Transgenic plants: bio-farming for the future. *BioProcess International* **2** (suppl 2), pp. 52-61.
- Rowe D. T., Hall L., Joab I. & Laux G. (1990).** Identification of the Epstein-Barr virus terminal protein gene products in latently infected lymphocytes. *Journal of Virology* **64** (6), pp. 2866-2875.
- Rue C. A. & Ryan P. (2002).** Characterization of pseudorabies virus glycoprotein C attachment to heparan sulfate proteoglycans. *Journal of General Virology* **83** (2), pp. 301-309.
- Rue C. A. & Ryan P. (2003).** A role for glycoprotein C in pseudorabies virus entry that is independent of virus attachment to heparan sulfate and which involves the actin cytoskeleton. *Virology* **307** (1), pp. 12-21.
- Ruyechan W. T., Morse L. S., Knipe D. M. & Roizman B. (1979).** Molecular genetics of herpes simplex virus. II. Mapping of the major viral glycoproteins and of the genetic loci specifying the social behavior of infected cells. *Journal of Virology* **29** (2), pp. 677-697.
- Salmon B., Cunningham C., Davison A. J., Harris W. J. & Baines J. D. (1998).** The herpes simplex virus type 1 UL17 gene encodes virion tegument proteins that are required for cleavage and packaging of viral DNA. *Journal of Virology* **72** (5), pp. 3779-3788.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989a).** Bacterial media, antibiotics, and bacterial strains (Appendix A). Liquid media. pp. A.1-A.3. *En: Ford, N., Nolan, C. & Ferguson, M. (Ed.), Molecular Cloning. A laboratory Manual, (2^a ed).* Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York, USA.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989b).** Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes. Immunological assays. Immunoprecipitation. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. pp. 18.47-18.59. *En: Ford, N., Nolan, C. & Ferguson, M. (Ed.), Molecular Cloning. A laboratory Manual, (2^a ed).* Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York, USA.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989c).** Plasmid vectors. Extraction and purification of plasmid DNA. Small-scale preparations of plasmid DNA. pp. 1.25-1.28. *En: Ford, N., Nolan, C. & Ferguson, M. (Ed.), Molecular Cloning. A laboratory Manual, (2^a ed).* Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York, USA.
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. (1989d).** Plasmid vectors. Preparation and transformation of competent *E. coli*. Protocol II: Fresh competent *E. coli* prepared using calcium chloride. pp. 1.82-1.84. *En: Ford, N., Nolan, C. & Ferguson, M. (Ed.), Molecular Cloning. A laboratory Manual, (2^a ed).* Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York, USA.
- Sambrook J. & Russell D. W. (2001).** Plasmids and their usefulness in molecular cloning. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride (Protocol 25). pp. 1.116-1.118. *En: Argentine, J., Irwin, N., Janssen, K. A., Curtis, S., Zierler, M., Dickerson, M., Sialiano, I., McInerney, N., Brown, D. & Schaefer, S. (Ed.), Molecular Cloning. A laboratory Manual, (3^a ed).* Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York, USA.
- Sancho Valls J., Baldrís Nacente R. & Sánchez Coll M. (1996).** Medios de cultivo. pp. 9-256. *En: Sancho Valls, J., Baldrís Nacente, R. & Sánchez Coll, M. (Ed.), Medios de Cultivo para Microbiología, (4^a ed).* F.E.R.O.S.A. Barcelona, España.
- Sanger F. & Coulson A. R. (1978).** The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Letters* **87** (1), pp. 107-110.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74** (12), pp. 5463-5467.
- Schaffer C. & Messner P. (2004).** Surface-layer glycoproteins: an example for the diversity of bacterial glycosylation with promising impacts on nanobiotechnology. *Glycobiology* **14** (8), pp. 31R-42R.
- Schikora B., Lu Z., Kutish G. F., Rock D., Magyar G. & Letchworth G. J. (1998).** The bovine herpesvirus type 1 UL3.5 open reading frame encodes a virion structural protein. *Virology* **240** (1), pp. 76-82.

- Schröder C. & Keil G. M. (1999).** Bovine herpesvirus 1 requires glycoprotein H for infectivity and direct spreading and glycoproteins gH_{w450} and gB for glycoprotein D-independent cell-to-cell spread. *Journal of General Virology* **80** (1), pp. 57-61.
- Schröder H., Langer T., Hartl F-U. & Bukau B. (1993).** DnaK, DnaJ and GrpE form a cellular chaperone machinery capable of repairing heat-induced protein damage. *EMBO Journal* **12** (11), pp. 4137-4144.
- Schumacher D., Tischer B. K., Reddy S. M. & Osterrieder N. (2001).** Glycoproteins E and I of Marek's disease virus serotype 1 are essential for virus growth in cultured cells. *Journal of Virology* **75** (23), pp. 11307-11318.
- Schwzyer M. (1995).** Sequence analysis of the bovine herpesvirus 1 genome: an exercise in international cooperation. pp. 101-113. *En: Schwzyer, M., Ackermann, M., Bertoni, G., Kochrlans, R., McCullough, Engels, M., Wittek, R. & Zanoni, R. (Ed.), Immunobiology of Viral Infections. Proceedings of the 3rd Congress of the European Society in Veterinary Virology,*
- Schwzyer M. & Ackermann M. (1996).** Molecular virology of ruminant herpesviruses. *Veterinary Microbiology* **53** (1-2), pp. 17-29.
- Schynts F., McVoy M. A., Meurens F., Detry B., Epstein A. L. & Thiry E. (2003).** The structures of bovine herpesvirus 1 virion and concatemeric DNA: implications for cleavage and packaging of herpesvirus genomes. *Virology* **314** (1), pp. 326-335.
- Scott C. (2004a).** Animal cell culture: high-maintenance, but worth the trouble. *BioProcess International* **2** (suppl 2), pp. 22-32.
- Scott C. (2004b).** Microbial fermentation: the oldest form of biotechnology. *BioProcess International* **2** (suppl 2), pp. 8-20.
- Serra-Hartmann X., Rebordosa X., Piñol J., Querol E. & Martí-Renom M. A. (2000).** ASAP: analysis of peptide composition. *Bioinformatics* **16** (12), pp. 1153-1154.
- Shai Y. (2002).** Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66** (4), pp. 236-248.
- Shaw A. M., Braun L., Frew T., Hurley D. J., Rowland R. R. & Chase C. C. (2000).** A role for bovine herpesvirus 1 (BHV-1) glycoprotein E (gE) tyrosine phosphorylation in replication of BHV-1 wild-type virus but not BHV-1 gE deletion mutant virus. *Virology* **268** (1), pp. 159-166.
- Shen D. T., Burger D., Li Z. Q. & Gorham J. R. (1991).** Characterization of monoclonal antibodies to bovine herpesvirus type I, Los Angeles strain. *Veterinary Microbiology* **28** (1), pp. 25-37.
- Sherman G. & Bachenheimer S. L. (1988).** Characterization of intranuclear capsids made by ts morphogenic mutants of HSV-1. *Virology* **163** (2), pp. 471-480.
- Shiba C., Daikoku T., Goshima F., Takakuwa H., Yamauchi Y., Koizumi O. & Nishiyama Y. (2000).** The UL34 gene product of herpes simplex virus type 2 is a tail-anchored type II membrane protein that is significant for virus envelopment. *Journal of General Virology* **81** (10), pp. 2397-2405.
- Shukla D., Dal Canto M. C., Rowe C. L. & Spear P. G. (2000).** Striking similarity of murine nectin-1alpha to human nectin-1alpha (HveC) in sequence and activity as a glycoprotein D receptor for alphaherpesvirus entry. *Journal of Virology* **74** (24), pp. 11773-11781.
- Shukla D., Liu J., Blaiklock P., Shworak N. W., Bai X., Esko J. D., Cohen G. H., Eisenberg R. J., Rosenberg R. D. & Spear P. G. (1999).** A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* **99** (1), pp. 13-22.
- Simpson A. A., Tao Y., Leiman P. G., Badasso M. O., He Y., Jardine P. J., Olson N. H., Morais M. C., Grimes S., Anderson D. L., Baker T. S. & Rossmann M. G. (2000).** Structure of the bacteriophage phi29 DNA packaging motor. *Nature* **408** (6813), pp. 745-750.
- Sisk W. P., Bradley J. D., Kingsley D. & Patterson T. A. (1992).** Deletion of hydrophobic domains of viral glycoproteins increases the level of their production in *Escherichia coli*. *Gene* **112** (2), pp. 157-162.
- Skepper J. N., Whiteley A., Browne H. & Minson A. (2001).** Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *Journal of Virology* **75** (12), pp. 5697-5702.
- Skrincosky D., Hocknell P., Whetter L., Secchiero P., Chandran B. & Dewhurst S. (2000).** Identification and analysis of a novel heparin-binding glycoprotein encoded by human herpesvirus 7. *Journal of Virology* **74** (10), pp. 4530-4540.
- Smibert C. A., Popova B., Xiao P., Capone J. P. & Smiley J. R. (1994).** Herpes simplex virus VP16 forms a complex with the virion host shutoff protein vhs. *Journal of Virology* **68** (4), pp. 2339-2346.
- Sodeik B., Ebersold M. W. & Helenius A. (1997).** Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *Journal of Cell Biology* **136** (5), pp. 1007-1021.
- Southern E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98** (3), pp. 503-517.
- Spear P. G. (1993a).** Membrane fusion induced by herpes simplex virus. pp. 201-232. *En: Bentz, J. (Ed.), Viral Fusion Mechanisms.* CRC Press. Boca Ratón, USA.
- Spear P. G. (1993b).** Entry of alphaherpesviruses into cells. *Seminars in Virology* **4** (3), pp. 167-180.
- Spear P. G., Eisenberg R. J. & Cohen G. H. (2000).** Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* **275** (1), pp. 1-8.
- Spencer J. V., Newcomb W. W., Thomsen D. R., Homa F. L. & Brown J. C. (1998).** Assembly of the herpes simplex virus capsid: preformed triplexes bind to the nascent capsid. *Journal of Virology* **72** (5), pp. 3944-3951.

- Stegeman J. A., Tielen M. J. M., Kimman T. G., van Oirschot J. T., Hunneman W. A. & Berndsen F. W. (1994).** Intensive regional vaccination with gI-deleted vaccine markedly reduces pseudorabies virus infections. *Vaccine* **12** (6), pp. 527-531.
- Steinberg D. A., Watson R. J. & Maiese W. M. (1986).** Synthesis of fused glycoprotein D of herpes simplex virus type 1 but not type 2 inhibits *Escherichia coli* hosts. *Gene* **43** (3), pp. 311-317.
- Steven A. C. & Spear P. G. (1997).** Herpesvirus capsid assembly and envelopment. pp. 312-391. *En: Burnett, R., Chiu, W. & Garcea, R. (Ed.), Structural Biology of Viruses.* Oxford University Press. New York, USA.
- Stow N. D., Subak-Sharpe J. H. & Wilkie N. M. (1978).** Physical mapping of herpes simplex virus type 1 mutations by marker rescue. *Journal of Virology* **28** (1), pp. 182-192.
- Strube W., Auer S., Block W., Heinen E., Kretzdorn D., Rodenbach C. & Schmeer N. (1996).** A gE deleted infectious bovine rhinotracheitis marker vaccine for use in improved bovine herpesvirus 1 control programs. *Veterinary Microbiology* **53** (1-2), pp. 181-189.
- Studier F. W. & Moffatt B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology* **189** (1), pp. 113-130.
- Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J. & Dubendorff J. W. (1990).** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology* **185**, pp. 60-89.
- Su H. K., Eberle R. & Courtney R. J. (1987).** Processing of the herpes simplex virus type 2 glycoprotein gG-2 results in secretion of a 34,000-Mr cleavage product. *Journal of Virology* **61** (5), pp. 1735-1737.
- Takei K., Mundigl O., Daniell L. & De Camilli P. (1996).** The synaptic vesicle cycle: a single vesicle budding step involving clathrin and dynamin. *Journal of Cell Biology* **133** (6), pp. 1237-1250.
- Tao Y., Olson N. H., Xu W., Anderson D. L., Rossmann M. G. & Baker T. S. (1998).** Assembly of a tailed bacterial virus and its genome release studied in three dimensions. *Cell* **95** (3), pp. 431-437.
- Telford E. A. R., Watson M. S., McBride K. & Davison A. J. (1992).** The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **189** (1), pp. 304-316.
- Thomma B. P. H. J., Cammue B. P. A. & Thevissen K. (2002).** Plant defensins. *Planta* **216** (2), pp. 193-202.
- Thomsen D. R., Newcomb W. W., Brown J. C. & Homa F. L. (1995).** Assembly of the herpes simplex virus capsid: requirement for the carboxyl-terminal twenty-five amino acids of the proteins encoded by the UL26 and UL26.5 genes. *Journal of Virology* **69** (6), pp. 3690-3703.
- Tikoo S. K., Campos M. & Babiuk L. A. (1995).** Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Advances in Virus Research* **45**, pp. 191-223.
- Tikoo S. K., Fitzpatrick D. R., Babiuk L. A. & Zamb T. J. (1990).** Molecular cloning, sequencing, and expression of functional bovine herpesvirus 1 glycoprotein gIV in transfected bovine cells. *Journal of Virology* **64** (10), pp. 5132-5142.
- Tirabassi R. S. & Enquist L. W. (1999).** Mutation of the YXXL endocytosis motif in the cytoplasmic tail of pseudorabies virus gE. *Journal of Virology* **73** (4), pp. 2717-2728.
- Tirabassi R. S., Townley R. A., Eldridge M. G. & Enquist L. W. (1998).** Molecular mechanisms of neurotropic herpesvirus invasion and spread in the CNS. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **22** (6), pp. 709-720.
- Tomishima M. J. & Enquist L. W. (2001).** A conserved α -herpesvirus protein necessary for axonal localization of viral membrane proteins. *Journal of Cell Biology* **154** (4), pp. 741-752.
- Tomishima M. J. & Enquist L. W. (2002).** *In vivo* egress of an alphaherpesvirus from axons. *Journal of Virology* **76** (16), pp. 8310-8317.
- Torrisi M. R., Di Lazzaro C., Pavan A., Pereira L. & Campadelli-Fiume G. (1992).** Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label. *Journal of Virology* **66** (1), pp. 554-561.
- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76** (9), pp. 4350-4354.
- Trapp S., Osterrieder N., Keill G. M. & Beer M. (2003).** Mutagenesis of a bovine herpesvirus type 1 genome cloned as an infectious bacterial artificial chromosome: analysis of glycoprotein E and G double deletion mutants. *Journal of General Virology* **84** (2), pp. 301-306.
- Trowbridge I. S., Collawn J. F. & Hopkins C. R. (1993).** Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annual Review of Cell Biology* **9**, pp. 129-161.
- Turner A., Bruun B., Minson T. & Browne H. (1998).** Glycoproteins gB, gD, and gHgL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *Journal of Virology* **72** (1), pp. 873-875.
- Tyborowska J., Bienkowska-Szewczyk K., Rychlowski M., Van Oirschot J. T. & Rijsewijk F. A. M. (2000).** The extracellular part of glycoprotein E of bovine herpesvirus 1 is sufficient for complex formation with glycoprotein I but not for cell-to-cell spread. *Archives of Virology* **145** (2), pp. 333-351.
- Ullmann A. (1992).** Complementation in β -galactosidase: from protein structure to genetic engineering. *BioEssays* **14** (3), pp. 201-205.

- Valpuesta J. M. & Carrascosa J. L. (1994).** Structure of viral connectors and their function in bacteriophage assembly and DNA packaging. *Quarterly Reviews of Biophysics* **27** (2), pp. 107-155.
- Van de Walle G. R., Favoreel H. W., Nauwynck H. J., Van Oostveldt P. & Pensaert M. B. (2001).** Involvement of cellular cytoskeleton components in antibody-induced internalization of viral glycoproteins in pseudorabies virus-infected monocytes. *Virology* **288** (1), pp. 129-138.
- van Drunen Littel-van den Hurk S. & Babiuk L. A. (1986).** Synthesis and processing of bovine herpesvirus 1 glycoproteins. *Journal of Virology* **59** (2), pp. 401-410.
- van Drunen Littel-van den Hurk S., Garzon S., van den Hurk J. V., Babiuk L. A. & Tijssen P. (1995).** The role of the major tegument protein VP8 of bovine herpesvirus-1 in infection and immunity. *Virology* **206** (1), pp. 413-425.
- van Drunen Littel-van den Hurk S., Khattar S., Tikoo S. K., Babiuk L. A., Baranowski E., Plainchamp D. & Thiry E. (1996).** Glycoprotein H (gH/gp108) and glycoprotein L form a functional complex which plays a role in penetration, but not in attachment, of bovine herpesvirus 1. *Journal of General Virology* **77** (7), pp. 1515-1520.
- van Engelenburg F. A., Kaashoek M. J., van Oirschot J. T. & Rijsewijk F. A. (1995).** A glycoprotein E deletion mutant of bovine herpesvirus 1 infects the same limited number of tissues in calves as wild-type virus, but for a shorter period. *Journal of General Virology* **76** (9), pp. 2387-2392.
- van Engelenburg, F. A. C., Kaashoek, M. J., Rijsewijk, F. A. M. & van Oirschot, J. T. (1994).** The *in vivo* role of glycoprotein E of bovine herpesvirus 1. *Comunicación en congreso "9th Congress of the European Society of Veterinary Virology"*. Interlaken, Switzerland.
- van Genderen I. L., Brandimarti R., Torrisi M. R., Campadelli G. & van Meer G. (1994).** The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* **200** (2), pp. 831-836.
- van Oirschot J. T., Gielkens A. L., Moormann R. J. & Berns A. J. (1990).** Marker vaccines, virus protein-specific antibody assays and the control of Aujeszky's disease. *Veterinary Microbiology* **23** (1-4), pp. 85-101.
- van Oirschot J. T., Houwers D. J., Rziha H. J. & Moonen P. J. (1988).** Development of an ELISA for detection of antibodies to glycoprotein I of Aujeszky's disease virus: a method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs. *Journal of Virological Methods* **22** (2-3), pp. 191-206.
- van Oirschot J. T., Kaashoek M. J., Maris-Veldhuis M. A., Weerdmeester K. & Rijsewijk F. A. M. (1997).** An enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies against glycoprotein gE of bovine herpesvirus 1 allows differentiation between infected and vaccinated cattle. *Journal of Virological Methods* **67** (1), pp. 23-34.
- van Oirschot J. T., Kaashoek M. J. & Rijsewijk F. A. (1996).** Advances in the development and evaluation of bovine herpesvirus 1 vaccines. *Veterinary Microbiology* **53** (1-2), pp. 43-54.
- van Regenmortel M. H. V. (2000).** The species concept. Introduction to the species concept in virus taxonomy. pp. 3-16. *En: van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. (Ed.), Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press. San Diego, USA.
- Veinger L., Diamant S., Buchner J. & Goloubinoff P. (1998).** The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *Journal of Biological Chemistry* **273** (18), pp. 11032-11037.
- Viaplana E., Feliu J. X., Corchero J. L. & Villaverde A. (1997a).** Reversible activation of a cryptic cleavage site within *E. coli* β -galactosidase in β -galactosidase fusion proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1343** (2), pp. 221-226.
- Viaplana E., Rebordosa X., Piñol J. & Villaverde A. (1997b).** Secretion-dependent proteolysis of recombinant proteins is associated with inhibition of cell growth in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters* **19** (4), pp. 373-377.
- Vicek C, Beneš V., Lu Z., Kutish G. F., Paces V., Rock D., Letchworth G. J. & Schwzyer M. (1995).** Nucleotide sequence analysis of a 30-kb region of the bovine herpesvirus 1 genome which exhibits a colinear gene arrangement with the UL21 to UL4 genes of herpes simplex virus. *Virology* **210** (1), pp. 100-108.
- Wagenaar F., Pol J. M., Peeters B., Gielkens A. L., de Wind N. & Kimman T. G. (1995).** The US3-encoded protein kinase from pseudorabies virus affects egress of virions from the nucleus. *Journal of General Virology* **76** (7), pp. 1851-1859.
- Wang Z-H., Gershon M. D., Lungu O., Zhu Z., Mallory S., Arvin A. M. & Gershon A. A. (2001).** Essential role played by the C-terminal domain of glycoprotein I in envelopment of varicella-zoster virus in the trans-Golgi network: interactions of glycoproteins with tegument. *Journal of Virology* **75** (1), pp. 323-340.
- Ward P. L., Ogle W. O. & Roizman B. (1996).** Assemblons: nuclear structures defined by aggregation of immature capsids and some tegument proteins of herpes simplex virus 1. *Journal of Virology* **70** (7), pp. 4623-4631.
- Warner M. S., Geraghty R. J., Martínez W. M., Montgomery R. I., Whitbeck J. C., Xu R., Eisenberg R. J., Cohen G. H. & Spear P. G. (1998).** A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HvE) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* **246** (1), pp. 179-189.
- Wellenberg G. J., Mars M. H. & Van Oirschot J. T. (2001).** Antibodies against bovine herpesvirus (BHV) 5 may be differentiated from antibodies against BHV1 in a BHV1 glycoprotein E blocking ELISA. *Veterinary Microbiology* **78** (1), pp. 79-84.
- Whealy M. E., Card J. P., Meade R. P., Robbins A. K. & Enquist L. W. (1991).** Effect of brefeldin A on alphaherpesvirus membrane protein glycosylation and virus egress. *Journal of Virology* **65** (3), pp. 1066-1081.

- Whealy M. E., Card J. P., Robbins A. K., Dubin J. R., Rziha H. J. & Enquist L. W. (1993). Specific pseudorabies virus infection of the rat visual system requires both gI and gp63 glycoproteins. *Journal of Virology* **67** (7), pp. 3786-3797.
- Whitbeck J. C., Knapp A. C., Enquist L. W., Lawrence W. C. & Bello L. J. (1996). Synthesis, processing, and oligomerization of bovine herpesvirus 1 gE and gI membrane proteins. *Journal of Virology* **70** (11), pp. 7878-7884.
- Whiteley A., Bruun B., Minson T. & Browne H. (1999). Effects of targeting herpes simplex virus type 1 gD to the endoplasmic reticulum and trans-Golgi network. *Journal of Virology* **73** (11), pp. 9515-9520.
- Wild P., Schraner E. M., Cantieni D., Loepfe E., Walther P., Müller M. & Engels M. (2002). The significance of the Golgi complex in envelopment of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) as revealed by cryobased electron microscopy. *Micron* **33** (4), pp. 327-337.
- Winkler M. T. C., Doster A. & Jones C. (1999). Bovine herpesvirus 1 can infect CD4⁺ T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *Journal of Virology* **73** (10), pp. 8657-8668.
- Wisner T., Brunetti C., Dingwell K. S. & Johnson D. C. (2000). The extracellular domain of herpes simplex virus gE is sufficient for accumulation at cell junctions but not for cell-to-cell spread. *Journal of Virology* **74** (5), pp. 2278-2287.
- Wu M., Maier E., Benz R. & Hancock R. E. W. (1999). Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38** (22), pp. 7235-7242.
- Wu S. X., Zhu X. P. & Letchworth G. J. (1998). Bovine herpesvirus 1 glycoprotein M forms a disulfide-linked heterodimer with the U(L)49.5 protein. *Journal of Virology* **72** (4), pp. 3029-3036.
- Xiong Y.-Q., Yeaman M. R. & Bayer A. S. (1999). *In vitro* antibacterial activities of platelet microbicidal protein and neutrophil defensin against *Staphylococcus aureus* are influenced by antibiotics differing in mechanism of action. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (5), pp. 1111-1117.
- Yamaguchi A., Udagawa T. & Sawai T. (1990). Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. *Journal of Biological Chemistry* **265** (9), pp. 4809-4813.
- Yanagida N., Yoshida S., Nazerian K. & Lee L. F. (1993). Nucleotide and predicted amino acid sequences of Marek's disease virus homologues of herpes simplex virus major tegument proteins. *Journal of General Virology* **74** (9), pp. 1837-1845.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. & Messing J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33** (1), pp. 103-119.
- Yano R., Imai M. & Yura T. (1987). The use of operon fusions in studies of the heat-shock response: effects of altered sigma 32 on heat-shock promoter function in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **207** (1), pp. 24-28.
- Yaswen L. R., Stephens E. B., Davenport L. C. & Hutt-Fletcher L. M. (1993). Epstein-Barr virus glycoprotein gp85 associates with the BKRF2 gene product and is incompletely processed as a recombinant protein. *Virology* **195** (2), pp. 387-396.
- Yates W. D. (1982). A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Canadian Journal of Comparative Medicine* **46** (3), pp. 225-263.
- Yoshitake N., Xuan X. & Otsuka H. (1997). Identification and characterization of bovine herpesvirus-1 glycoproteins E and I. *Journal of General Virology* **78** (6), pp. 1399-1403.
- Yura T., Nagai H. & Mori H. (1993). Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annual Review of Genetics* **47**, pp. 321-350.
- Zahn K. (1996). Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *Journal of Bacteriology* **178** (10), pp. 2926-2933.
- Zasloff M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415** (6870), pp. 389-395.
- Zhang Y. & McKnight J. L. (1993). Herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 deletion mutants lack VP11 and VP12 or VP13 and VP14, respectively, and exhibit altered viral thymidine kinase expression. *Journal of Virology* **67** (3), pp. 1482-1492.
- Zhang Y., Sirko D. A. & McKnight J. L. (1991). Role of herpes simplex virus type 1 UL46 and UL47 in alpha TIF-mediated transcriptional induction: characterization of three viral deletion mutants. *Journal of Virology* **65** (2), pp. 829-841.
- Zhou J., Lyaku J. R. S., Fredrickson R. A. & Kibenge F. S. B. (1999a). Improved detection of bovine herpesvirus 1 in artificially infected bovine semen by protein amplification. *Journal of Virological Methods* **79** (2), pp. 181-189.
- Zhou Z. H., Chen D. H., Jakana J., Rixon F. J. & Chiu W. (1999b). Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions. *Journal of Virology* **73** (4), pp. 3210-3218.
- Zhou Z. H., Dougherty M., Jakana J., He J., Rixon F. J. & Chiu W. (2000). Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å. *Science* **288** (5467), pp. 877-880.
- Zhou Z. H., Prasad B. V. V., Jakana J., Rixon F. J. & Chiu W. (1994). Protein subunit structures in the herpes simplex virus A-capsid determined from 400 kV spot-scan electron cryomicroscopy. *Journal of Molecular Biology* **242** (4), pp. 456-469.
- Zhu Q. & Courtney R. J. (1994). Chemical cross-linking of virion envelope and tegument proteins of herpes simplex virus type 1. *Virology* **204** (2), pp. 590-599.

- Zhu Z., Gershon M. D., Hao Y., Ambron R. T., Gabel C. A. & Gershon A. A. (1995).** Envelopment of varicella-zoster virus: targeting of viral glycoproteins to the trans-Golgi network. *Journal of Virology* **69** (12), pp. 7951-7959.
- Zhu Z., Hao Y., Gershon M. D., Ambron R. T. & Gershon A. A. (1996).** Targeting of glycoprotein I (gE) of varicella-zoster virus to the trans-Golgi network by an AYRV sequence and an acidic amino acid-rich patch in the cytosolic domain of the molecule. *Journal of Virology* **70** (10), pp. 6563-6575.
- Zsak L., Zuckermann F., Sugg N. & Ben-Porat T. (1992).** Glycoprotein gI of pseudorabies virus promotes cell fusion and virus spread via direct cell-to-cell transmission. *Journal of Virology* **66** (4), pp. 2316-2325.
- Zuckermann F. A., Mettenleiter T. C., Schreurs C., Sugg N. & Ben-Porat T. (1988).** Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication. *Journal of Virology* **62** (12), pp. 4622-4626.

AGRAÏMENTS

Ara mateix em trobo davant de la pantalla en blanc amb la voluntat d'escriure uns agraïments i crec que no m'ensortiré... No sé ben bé per on començar, com fer-ho... Llegeixo una i altra vegada el que escric com si encara estigués escrivint la tesi tot buscant que s'entengui el que vull dir... i és que ja no sé fer-ho d'una altra manera. Han estat moltíssimes hores de pensar, escriure i corregir versions d'una introducció, d'uns resultats, d'una discussió i d'unes conclusions, que ara se'm fa difícil simplement dir coses. I això és precisament el que ara mateix voldria fer, només recordar totes les vivències, petites i grans, que he tingut al llarg dels quasi 12 anys que m'he passat a l'IBF (ho sento però per a mí l'IBF serà sempre l'IBF) i donar les gràcies de tot cor a aquells amb les que les vaig conèixer. Ara mateix, moltíssims bons records viscuts se m'apareixen com flashos un darrera l'altre i no m'atreveixo a retenir-los, a explicar-los, a descriure'ls. Fer-ho els desvirtua i els treu la màgia del que és un record. El record s'ha de viure com a tal, i deixar que et posi els pèls de punta. La sensació que tinc és idèntica a aquella que sentia en Totó a la pel·lícula de Cinema Paradiso quan al final, ja de gran, se'l veu a la butaca d'una sala de projecció mirant molt emocionat una cinta que li ha deixat un amic seu d'infància, i que el porten a recordar la relació tan tendre que hi havia amb aquesta altra persona. Així em trobo jo, assegut a la meua butaca fruit d'innombrables moments viscuts i del record de moltíssima gent que m'he trobat a l'IBF. I davant d'aquesta sensació tan complaent només puc dir-vos a tots: gràcies de tot cor!

Vull agrair especialment en Enrique Querol i en Jaume Piñol el fet d'haver-me acollit al grup de 'molecos' on m'han ensenyat de prop el món de la recerca i on m'he pogut formar com a investigador. Gràcies per haver volgut ser els meus directors de tesi i no haver 'passat' de mi fins i tot quan, després de 4 anys de deixar el grup, tornava amb pretensions de voler llegir la tesi i arribar a ser doctor. Dono també les gràcies a totes les altres persones que formen o han format part del grup de Biologia Molecular i amb els que he compartit el dia a dia sempre tant entranayable mentre era a l'IBF: Xavi Rebor, Pepo, Jordi Naval (el meu primer tutor), Quel, Jaume Pons, Montse, Mikell, Andreu, Juan, Carol, Mònica, Rosa, Sergi, Merce, Mario i Raquel. Sincerament, em conmov en nomenar-vos així a tots. Gràcies per tot.

Però recordar l'IBF no és parlar només de la gent de 'molecos'. Tot entrant, a l'esquerra, hi ha la secretaria on encara veig asseguda la Carme i l'Esther. A la dreta, a la biblioteca, la Nati posa ordre a les revistes i uns quants becaris (en Juan o la Marta Tobarra) fan fotocòpies. Entrant una mica més trobo la porta de l'Aula tancada a l'esquerra, serà perquè hi ha lectura de tesina, conferència o passada de vídeos de festa de fondue. Una mica més enllà, a la dreta, casa meua: Biologia Molecular. Just a l'altra banda del passadís, el laboratori d'Enzimologia. Allà em trobo amb en Marc Ribó, l'Esther, en Miquel Àngel, en Quico, la Cris, la Júlia, la Gabi, en Xavi Jorba, la Sílvia Bronsoms, la Sílvia Salamanca, en Pep i en Xavi Avilés (llavors director del centre). Enfilant passadís avall, a mig passadís, la canaletes a la dreta a l'entrada de la cambra fosca. A l'esquerra, d'una habitació plena de plantes, em surt en Vicenç amb caixes de puntes grogues i blaves. Una mica més enllà al passadís, la sala de balances, mentre que a l'esquerra baixen unes escales cap a la planta de baix de l'IBF. Però tot continuant per la planta de dalt, al final del passadís, trobem l'entrada de la sala de màquines on tenim els autoclaus, les centrífugues Sorvall, la ultra, un sonicador, dos liofilitzadors, un univap, un fermentador, els -80°C , i on en Juan Checa té un petit taller amb eines. En un petit passadís trobem les cambres fredes (2), el laboratori d'isòtops radiactius i l'habitació on els de molecos i d'enzimologia sequencien el DNA dels seus respectius clons. Sortint de la sala de màquines puc entrar al laboratori de Neuroquímica on em reben la Tina, en Lluís, la Marian, la Neus, l'Ana, la Teresa, l'Eva Martinet, la Rosa Fibla, la Samira i en Carlos entre d'altres. Al laboratori del costat, el d'Ecologia Microbiana, em trobo amb la Balbi, la Vicky, en Chano y la Yoya, la Bego, la Núria Gaju, en Joan i la Maika (però aquests venen més tard, cap el vespre, per a treballar més tranquils), en Toni Solé, en Xavi i Lo Tronc. I per acabar a la planta de dalt, el darrer laboratori que visito és el de Citogenètica i Genètica Humana on em trobo a la Marta Bernués, aquella noia de Lleida que mai em recordo com es diu, i més recentment la Laura i la nova Marta. Tot baixant les escales internes de l'IBF, cap a l'esquerra trobem la sala de Bioinformàtica. Allà qui manava era en Baldo, i treballant en allà recordo al Xavi Gomis (amb xanquetes i fumant pipa), en Xavi Daura, en Marc Martí, en Xouse, en Patrick, l'Antonio i també una temporada en Mario. Ara, molt més recentment, també em trobo l'Óscar Conchillo. En aquest punt permeteu-me un incís... Marc, t'agraeixo molt especialment el fet que fossis la primera persona que creies una mica en mí amb tot aquest merdè del TRAPP. El teu interès em va motivar a treballar més a fons les possibilitats del TRAPP que com pots comprovar han pogut donar forma, amb més o menys encert, a tota una tesi doctoral, que d'altra banda s'hagués pogut anomenar "El TRAPP y la madre que lo parió". Moltes gràcies, de nou, amic meu. Al costat de la sala de Bioinformàtica trobem el laboratori d'Immunologia Molecular amb l'Aura i la Manuela. Passant de nou per davant de les escales, a l'esquerra trobem la sala de cultius on qui mana és la Paqui, mentre que a la dreta és el laboratori d'Immunologia. Allà em trobo amb la Paz, en Toni Iborra, en Carles Morte, en Pepe Palacios (colirio en La Habana), la Pilar, en Manel, l'Ednita i la Maritza. Ednita, desde estas líneas te mando un fuerte apapacho y te agradezo todo tu apoyo prestado. En aquesta mateixa direcció, al final del passadís,

trobem el laboratori de Microbiologia Aplicada, abans ocupant el mateix espai que el d'Ecologia Microbiana, on qui mana és en Toni Villaverde. Amb ell hi treballen, en el meu record, en Toni Benito, l'Eli, en Pepe Luis, en Jordi Feliu, en Xavi Carbo alias "compi", la Mar, l'Anna i l'Esther. En conjunt, tota una gran família aquesta de l'IBF, de la qual guardo un gratíssim record. Vull agrair especialment l'afecte de dues persones que reconec van donar un gir en la meua vida: la Cris Marino i en Pepe Palacios. Reconec que el seu tracte em va fer ser més sensible, també més espontani, tot evitant sempre la fredor que segons ells em revestia l'ascendència alemanya. A ti Cris y a ti Pepe, dobles gracias. Cris... recuerda... 'guárdame tu sonrisa que yo también te regalaré una rosa'. Una tercera persona que ha sacsejat la meua existència és, sense cap mena de dubte, en Juan Cedano. Gracias Juan por ser como eres, por tratarme como me tratas, muy especialmente por tu generosidad a la hora de ayudarme con la jodida secuencia TRAPP. Reconozco tu ayuda, casi autoría, en el desarrollo de los programas que nos han permitido hallar secuencias poco frecuentes en el proteoma de diversas especies de organismos, así como el hecho de que al haberlos inluído se ha dotado a la tesis y al trabajo realizado de nuevas posibilidades. Por todo ello Juan, muchísimas gracias. Por favor, no cambies nunca.

Els records, però, també em porten fora de l'IBF. Em porten per exemple cap a la unitat de Biofísica de la facultat de Medicina on saludo a l'Anna Andrés, a la Mònica Companyó, a l'Ana Kosoy o l'Emma bomber. Tanmateix, els records em porten tot plegat cap a l'altra banda de Ciències, més concretament al departament de Microbiologia. Allà em trobo en Manolo, en David Carro, l'Eduard Torrents i l'Esther Julián. Precisament a vosaltres dos, Eduard i Esther, us dec moltíssim de la tesi que he escrit. Primer perquè va saber tocar-me la fibra i inculcar-me els remordiments d'haver iniciat una tesi i de no haver-la acabada. Això és una primera cosa a agrair-vos per sempre més; ara també jo puc dir que tinc una tesi feta. I segon, perquè us va oferir a llegir-vos la tesi tot recomanant-me un munt de coses que certament m'han ajudat molt per a la redacció definitiva de la tesi. També per a vosaltres tinc un doble agraïment.

Volant en el temps, els records em porten més cap a l'inici, cap els estudis de col·legi i els de la carrera de Biologia. Primer em trobo el record d'en Manel Castro (EGB) i d'en Xavier Bustins (BUP) i en ells el agraeixo molt el fet d'haver-me inculcat aquest interès ja de petit en la natura i en general en la biologia. A la carrera em trobo, primer, la Gemma, la Judith, en Toni Solé, en Toni Valls (moltíssimes gràcies per assistir-me en la informàtica), la M^a José, la Laura, en Mikell, l'Anna i en Dani. A tots ells els agraeixo les dosis de descans i reflexió tan necessàries quan s'escriu una tesi. Més recentment, i d'ençà ja de manera continuada, em trobo amb els membres del club dels Abnormal Biologists. Moltíssimes gràcies Carles+Glòria (el pdf m'ha anat de conya per poder imprimir la tesi), Alba+Raf=Joanet (el fet de voler-me de padrí de la criatura dóna a la meua vida una nova dimensió fins ara preocupada només en la feina), Marc+Roser=Pol, Francesc+Irene=Marina, Marina+Esteve, Mònica+Miquel i Raquel+Juanjo. A tú Raquel et vull agrair molt especialment l'interès que has tingut sempre per la meua tesi. Ara et diria que per fi l'he acabada i pressenteixo que t'alegres enormement. La teua lluita m'ha donat forces per acabar-la, i és per això que puc dir que en part va dedicada a la teua memòria. Gràcies, de nou, Raquel.

Agraeixo també molt l'interès i el suport dels meus companys de feina a Biokit S.A. pel desenllaç de la tesi. Agraeixo molt especialment els ànims i l'oferiment d'ajuda dels meus companys més directes: en Francesc, la Laura, la Macu, la Mercè i en Roger. Agraeixo també el suport moral de la Inma, la Grego, la Irene, en Jaume, l'Enric i l'Empar al departament de Cultius i Purificacions, així com també la total disponibilitat i ajut prestat per part de l'Andreu, d'en Jordi Feliu, en Xavier Berthet i la Rosa Mendoza (moltíssimes gràcies Rosa per oferir-me l'escàner... un ràpid cop d'ull de la tesi permet valorar el resultat de tan simple gest). Molt especialment agraeixo a l'Esther Villén l'ajut prestat en l'anàlisi estadístic de certes dades així com també en les correccions i recomanacions fetes de la redacció de la tesi. Agraeixo però més especialment els seus ànims continus i constants i clarividència del final feliç que havia de tenir aquesta tesi. Sincerament, gràcies Esther per ser-hi sempre quan ho he necessitat.

Finalment, vull agrair als de casa meua el seu suport perquè aquesta tesi acabés com finalment ha pogut ser acabada. Agraeixo a la mare que ens inculqués una manera de treballar amb rigor i perseverància, al pare el seu suport incondicional i de mitjans per finalment haver pogut imprimir la tesi en condicions òptimes, a la Maus el seu interès per la feina feta i el seu bon ull a l'hora de cercar acrònims i en Carles el seu suport moral incondicional i de mitjans per tenir finalment la tesi escrita, corregida i impresa. Francament ha estat una sort poder comptar amb tots vosaltres, i per això us estic molt agraït. A casa també moltes gràcies als meus petits-peluts-grans amics, en Dustin, en Elvis i en Simbad, per fer-me tantíssima companyia durant les moltes hores assegut davant de l'ordinador. Molt especialment vull agrair la companyia prestada i el record que evoquen en mi en Charly i en Woody, ambdós partíceps directes en la meua aventura particular de tesi a l'IBF, i a qui ara els vull dedicar aquest final feliç de tesi. També a casa, i des del record que evoquen en mi el abuelo i la Omi Mimi els hi dedico en ells molt especialment la tesi que aquí he presentat. En vida heu manifestat sempre molt d'interès per la meua feina, i ara voldria dir-vos que per fi he acabat la tesi. Estic convençut que n'estarieu orgullosos de mí, com jo ho estic de la feina feta. Gràcies per creure en mi, pel vostre recolzament i suport moral.

A tots, gràcies de nou.