CLONACION DEL GEN *vp28* DE LA ENVOLTURA DEL VIRUS DE LA MANCHA BLANCA (WSSV), UTILIZANDO EL VECTOR DE EXPRESIÓN TIPO SHUTTLE pYD1 PARA PRODUCIR UN INMUNOESTIMULANTE EN EL CAMARON.

Jorge Massó-Silva y Humberto Mejía-Ruíz, Mar Bermejo #195, Col. Playa Palo de Santa Rita, La CP. 23090, Paz, B.C.S., hmejía04@cibnor.mx.

Palabras clave: WSSV, inmunoestimulante, camarón

Introducción. Dentro de las enfermedades que afectan a la camaronicultura el síndrome del virus de la mancha blanca (del ingles: white spot syndrome virus, WSSV) es la enfermedad viral más seria en los cultivos de este crustáceo. Actualmente esta enfermedad ha causado grandes pérdidas en la industria del camarón alrededor del mundo, ya que puede causar hasta el 100% de mortalidad en 3-7 días después de comenzada la infección (1).
En el camarón existen mecanismos de defensa innatos igual que en otros invertebrados, como la fagocitosis, actividades de encapsulación y mecanismos humorales (2). Otros sistemas importantes conocidos son la "Respuesta Quasi-Immune" y la profenoloxidasa (3).
Algunas de las principales proteínas estructurales del WSSV son el VP28, VP26 y VP664 de la envoltura, tegumento y nucleocápside, respectivamente (4), cada una de ellas ha sido caracterizada a nivel de gen, lo que ha permitido el desarrollo de estrategias para combatir al WSSV. No obstante, ninguna ofrece una protección altamente significativa. Una solución a esto, puede ser el desarrollo de "vacunas recombinantes", que consisten básicamente en la expresión de un gen que codifica para una determinada proteína a manera de antígeno. De esta manera, en este trabajo hemos clonado el gen *vp28* insertado bajo el marco de lectura de la proteína de fusión AGA2 (ver fig. 2) presente en el vector de expresión pYD1 (invitrogen) tipo shuttle, para la producción de la cepa recombinante de *E. coli* con pJM*aga2*::*vp28*. Posteriormente se pretende subclonar en *S. cerevisiae* con el fin de producir la proteína AGA2-VP28 y evaluarla como un inmunoestimulante en el camarón contra WSSV.

Metodología. A Partir de muestras de ADN de camarón infectado con WSSV se amplificó el gen *vp28*, utilizando cebadores con sitios de restricción *Pst*I, para así poder clonarlo en el sitio de clonación múltiple del vector pYD1. Se seleccionaron 12 colonias, a las cuales se les realizó un PCR utilizando los cebadores pYD1 F y el VP28pst R. De las colonias que amplificaron se mandaron secuenciar a partir del plásmido utilizando los cebadores del mismo. Al final se analizaron las secuencias y se contrastaron con la base de nucleótidos de BLAST.

Resultados y Discusión. A partir de las muestras de ADN de camarón con WSSV, se logró amplificar un fragmento de 630 pb. Los sitios de restricción *Pst*I fueron indispensables en el proceso de clonación en el pYD1. El PCR utilizando los cebadores pYD1 F y VP28pst R confirmó la orientación del fragmento clonado, solo 6 de las 12 colonias seleccionadas amplificaron un fragmento esperado de ~ 691pb (colonia 2,3,5,7,11 y 12). Solo a las colonias positivas se les extrajo el plásmido pJM*aga2*::*vp28* y se les mandó secuenciar. De las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento de "contig" y como se observa en la figura 1 se pudo constatar la localización de los sitios *Pst*I (subrayado en rojo), la región del gen *vp28* (minúsculas en azul) y la región del plásmido (mayúsculas). Posteriormente la secuencia se comparó con la base de datos de nucleótidos de BLAST, encontrando similitudes del 100% con secuencias correspondientes al gen *vp28* de la envoltura del virus de la mancha blanca.

AGTAATTGCGGTTCTCACSCCtCWAcGACTaGCaAAGGCAGCCCC
ATAAACACACAGTATGTTTTTAAGCTTCTGCAGATGgatctttctttcac
tctttcggtcgtgtcggccatcctcgccatcactgctgtgattgctgtatttattgtgatttttaggtatca
caacactgtgaccaagaccatcgaaacccacacagacaatatcgagacaaacatggatgaa
aacctccgcattcctgtgactgctgaggttggatcaggctacttcaagatgactgatgtgtcctttga
cagcgacaccttgggcaaaatcaagatccgcaatggaaagtctgatgcacagatgaaggaa
gaagatgcggatcttgtcatcactcccgtggagggccgagcactcgaagtgactgtgggcag
aatctcacctttgagggaacattcaaggtgtggaacaacacatcaagaaagatcaacatcact
ggtatgcagatggtgccaaagattaacccatcaaaggcctttgtcggtagctccaacacctcctc
cttcacccccgtctctattgatgaggatgaagttggcacctttgtgtgtggtaccacctttggcgcac
caattgcagctaccgccggtggaaatctttcgacatgtacgtgcacgtcacctactctggcactg
agaccgagTAACTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCTCGA
GTCTAGAGGGCCCTTCGAAG

Fig. 1. Secuencia del pJMaga2::vp28

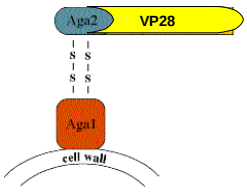

Fig. 2. Diagrama de expresión y despliegue del vp28

Conclusiones. Utilizando cebadores adaptadores con el sitio de restricción *Pst*I hemos logrado clonar el gen *vp28* fusionado a un fragmento del gen *aga2* de *S. cereviseae*, ambos están en función del promotor GAL1 que se expresa en la levadura. Nuestro siguiente trabajo será el subclonar el plásmido pJM*aga2*::*vp28* en la células de levadura para inducir la síntesis de la proteína que nos servirá de inmunoestimulante contra el virus de la mancha blanca en el camarón (Estos últimos resultados serán presentados e el cartel).

Agradecimientos. Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) y al Dr. Humberto Mejía Ruíz por su apoyo.

Bibliografia

1. Lightner, D y Redman, R. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aqua*. Vol (164): 201-220 pp.
2. Maldonado, M, Rodríguez, J y de Blas, I. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. Rev AquaTIC. Vol (21): 78-91 pp.
3. Venegas, C, Nonaka, L, Mushiake, K, Nishizawa, T y Muroga, K. 2000. Quasi-Immune response of *Penaeus japonicus* to penaeid rod-shaped DNA virus (PRDV). *Dis. of Aqua*. Org. Vol (42): 83-89 pp.
4. Tsai, J, Wang, H, Leu, J, Wang, A, Zhuang, Y, Walker, P, Kou, G, y Lo, C. 2005. Identification of the Nucleocapsid, Tegument, and Envelope Proteins of the Shrimp White Spot Syndrome Virus Virion. *J. Virol.* Vol (80): 3021-3029 pp.