

**UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA**

**DESARROLLO DE UNA VACUNA PREVENTIVA
CONTRA EL VIH, BASADA EN BCG
RECOMBINANTE**

**TESIS DOCTORAL: ELIAS B. PEZZAT SAID
21 DE JUNIO DE 2005**

VII ANEXOS
TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

VII-1 CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO

Escherichia.coli **JM 109** (Innogenetics) células competentes para transformación

Utilidad: por su fácil y rápido crecimiento, se emplea como cepa receptora de ADN transformante, para confirmar que el diseño y la construcción de un vector de expresión recombinante, es el adecuado, además de amplificarle sin que se exprese la proteína que codifica el ADN insertado. Una vez que se confirma la correcta presencia de ambos, se extrae para transformar las diferentes cepas de BCG.

BCGwt (Bacilo de Calmette Guérin), cepa de *M. bovis* atenuada, que por sus características será empleada para transformarse con un vector de expresión episomal, en las que además de amplificar el vector construido, se expresa la proteína heteróloga, codificada por el o los genes insertados.

BCG_{lisA}- (Bacilo de Calmette Guérin), *M. bovis* atenuada y además mutada en su capacidad para sintetizar el aminoácido lisina, cepa auxotrófica, empleada para transformarse con vectores de expresión episomales e integrativos, que le hacen más estable, reteniendo el vector de expresión que le proporciona el gen para sintetizar el aminoácido vital lisina.

Medios de cultivo

Para *E. coli* recombinante:

Placas de Agar LB con antibiótico:

LB Agar, Miller DIFCO (cat.244520 USA) 40 g

Agua destilada 1 L

ANEXOS

Esterilizar en autoclave 15 minutos, 121-124°C

Enfriar aprox. 54°C y agregar el antibiótico a una concentración final para Kanamicina de 40 ug/ml .

Medio líquido LB con antibiótico:

LB Broth, Miller DIFCO (cat.244620 USA) 25 gr.

Agua destilada 1L

Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121-124 ° C.

Enfriar aprox. 54 ° C y agregar el antibiótico a una concentración final para kanamicina de 40 ug/ml .

Para *E. coli* no recombinante, no adicionar Kanamicina.

*Antibiótico, que permite seleccionar las bacterias recombinantes, gracias a la presencia del gen de resistencia a la Kanamicina, en el vector de expresión.

Para BCG recombinante:

Placas de agar 7H10GATK (con antibiótico)

Middlebrook 7H10 Agar DIFCO (cat. 262710 USA) 19 grs

900 ml de agua destilada

2 ml de glicerol

Esterilizar con autoclave a 121-124 ° C/15 min.

Enfriar a 54 ° C y Adicionar 100 ml de ADC

2,5 ml de Tween-80 (20%)

0,5 ml de Kanamicina 50 mg/ml

Medio líquido 7H9GATK

Middlebrook 7H9 Broth DIFCO (cat.271310 USA) 2,35 gr

500 ml de agua destilada

1 ml de glicerol

Esterilizar con autoclave a 121-124 °C/15 min.

Enfriar a 54 ° C, medir 45 ml y complementar con lo siguiente:

Adicionar 5 ml ADC

125 ul de Tween 80 al 20%

25 ul de kanamicina 50 mg/ml

Para BCG wt, no adicionar kanamicina *

VII-2. Construcción de los vectores de expresión

VI-2.1. Vectores de expresión micobacteriano

Vector Shuttle	Promotor	Secuencia Señal	Gen Resistencia	Antígeno Marcador	Tamaño
pMV261	Hsp 60	-----	Kanamicina	HA / VI	4480 pb
pJH222*	α-antígeno	Lipoproteína 19KDa	Kanamicina	HA / VI	6423 pb
pJH223*	α-antígeno	Lipoproteína 19KDa	Kanamicina	HA / VI	6313 pb

* gen complementario para lisina, todos contienen un origen para *E.coli* (oriE), y otro micobacteriano (oriM), el gen para resistencia a la kanamicina, además de un cassette de ADN, con el promotor micobacteriano, un sitio multiclonaje y un terminador transcripcional (figura 9).

VII-2.2 Inserto: FLHIV-1gp120HXBC2+flu+his

Originalmente este fragmento de 1578 pb, lo recibimos en el vector parental pJH95, donado por **N. Letvin**. El mismo representa el gen env de VIH-1 cepa (HXBc2), que codifica para la proteína responsable del tropismo específico de este virus por los linfocitos CD4. Su precursor es la proteína gp160 que está glicosilada y de cuya escisión resultan las proteínas gp120 y gp41, permaneciendo asociadas de forma no covalente. Realizamos PCR tomando como templado al vector pJH95 con los siguientes primers:

Primer	Construcción	Sentido	Secuencia del primer
Pezz3	BCGr:261.HIV1gp120	Delantero	5' CGGAAGCTTGGGAA AAATTGTGG-3'
Pezz5	BCGr:261.HIV1gp120	Reversa	5'- CAGAAGCTTCTAGT GGTGGTGGTG-3'
Pezz14	BCGr:261.HIV1gp120	Delantero	5'- CAAGGATCCGAAAT TGTGGGGTACAGT C-3'
Pezz17	BCGr:261.HIV1gp120	Reversa	5'- CAGAAGCTTCTAGT GGTGGTGGTGGT-3'
Pezz21	BCGr:222.HIV1gp120	Delantero	5'- CAGAAGCTTGGGCC CGAAAAA-3'
Pezz22	BCGr:222.HIV1gp120	Reversa	5'- CAACTGCAGCTAGT GGTGGT-3'
Pezz21	BCGr:223HIV1gp120	Delantero	5'- CAGAAGCTTGGGCC CGAAAAA-3'
Pezz23	BCGr:223HIV1gp120	Reversa	5'- CAAAAGCTTCTGCA GCTAGTGGTGG-3'

El fragmento de DNA resultante se clonó en cada uno de los vectores mencionados anteriormente en las siguientes sitios/dianas de restricción:

pMV261 (4480 pb): HindIII(4346) / BamHI(4326)

pJH222 (6423 pb): HindIII(335) / PstI(341)

pJH223 (6313 pb): HindIII / HindIII(2134)

VII-2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Amplificación del inserto por PCR.

Termociclador: Applied Biosystems (Gene Amp PCR System 2700 USA)

Utilidad: Amplificación del ADN de interés, usando el mismo como templado, por reacción en cadena de polimerasa a partir de los primers diseñados, que permiten una elongación de producción de entre 0,2 a 2 Kb. El templado puede ser ADN o sobrenadante de cultivos líquidos de células bacterianas transformadas.

Para un volumen de reacción de 25 ul

Marca del kit: Promega (cat. M7502 USA)

- 12,5 ul PCR Master mix, 2X. (Taq DNA Polimerasa, dNTPs, MgCl₂, Buffers)
- Primer delantero y reverso de cada uno 1ul (50 pmol/ul)
- Templado de ADN 1 ul (0,25-0,1 ug)
- Agua suficiente hasta 25 ul

Programa empleado para FLVIH-1gp120HXBc2+flu+his:

94°C	5' desnaturalización inicial
94°C	1' desnaturalización
64°C	1' anillado-amplificación x 30 ciclos
72°C	2' extensión
72°C	15' extensión final
4° C	α refrigeración

VII-2.4 Electroforesis

Utilidad: identificación y separación de fragmentos de ADN, en bandas cuya localización en el gel depende del número de pares de bases/peso molecular, al desplazarse en el mismo gracias a su carga negativa a pH neutro, cuando se somete a un campo eléctrico con voltaje de 50-100 volts, que condiciona su migración al polo positivo, la visualización del ADN se logra por la adición de un agente intercalante (Bromuro de Etidio), que se fija entre las bases del ADN y emite fluorescencia al aplicarle luz ultravioleta en el transluminador.

Preparación de gel de agarosa al 1 % : la concentración depende del número de pares de bases del ADN a resolver (0.3% para fragmentos grandes y 2% para fragmentos de aproximadamente 100 pb)

Marca: Conda Lab (cat.8014)

Agarosa 0.5 gr.

Adicionar 50 ml de TAE 1X, mezclar y calentar hasta su ebullición

Adicionar 3.5 - 5 ul de Bromuro de etidio al 1 %

Cargar el ADN de la PCR adicionado de Blue juice al 10% y correr el gel de agarosa a 80V por 40 minutos.

Revisar y leer el gel en el transluminador de luz ultravioleta

Composición del Buffer TAE X 50

Marca: BioRad (cat. USA)

Tris 242 gr

EDTA 0.5 M(pH 8.0) 100 ml

Acido Acético glacial 57.1 ml

Agua suficiente para 1000 ml

VII-2.5 Extracción de ADN procedente de electroforesis.

Utilidad: Separar el ADN del gel de agarosa, después de la identificación y clasificación de este por electroforesis, de esta manera el ADN tiene suficiente pureza para su uso en otros estudios.

Marca: Qiagen, Quiaquick Gel extration (cat. 50928704 Germany)

- Cortar las bandas a elección procedentes de la electroforesis y manténgalas en tubos eppendorf de 1,5 ml
- Adicione 3 volúmenes del buffer QG a 1 volumen del gel.
- Coloque en baño maría a 50°C por 10 minutos y mezcle con vortex los tubos cada 2-3 minutos durante el baño.
- Después de que el gel se ha fundido completamente, confirme que el color de la mezcla es amarillo.
- Adicione 1 volumen de isopropanol (0,20 de gel: 200 ul de isopropanol al 100%) y mezcle.
- Pasar el producto a la columna QIAquick y centrifugue por 1 minuto.
- Adicione 0,5 ml del buffer QG a la columna y centrifugue por 1 minuto.

- Descarte el sobrenadante y lave adicionando 0,75 ml de buffer PE. Centrifugue por 1 minuto.
- Descarte el sobrenadante y centrifugue nuevamente por 1 minuto.
- Pase la columna de QIAprep en un tubo eppendorf.
- Para obtener el DNA adicione 30 ul del buffer EB en el centro de la membrana, dejar actuar 1 minuto y centrifugar a velocidad máxima por 1 minuto.

VII-2.6 Purificación del ADN amplificado por PCR

Utilidad: Separación de material indeseable en el ADN en estudio (enzimas y minerales principalmente), que son eliminados y filtrados por una membrana que solo retiene el ADN en estudio y que posteriormente es eluído.

Marca: Qiagen, Quiaquick purification (cat. 50928106 Germany)

- Adicionamos 5 volúmenes del buffer PB con relación al volumen de la PCR , mezclamos y pasamos a la columna de QIAquick .
- Centrifugamos 12,000 rpm por 1 minuto .
- Descartamos el filtrado producido y colocamos la columna en el mismo tubo.
- Adicionamos 750 ul de PE buffer en la columna y centrifugamos a 12,000 rpm por 1 minuto.
- Descartamos el sobrenadante y volvemos a centrifugar por 1 minuto.
- Pasamos la columna a un eppendorf de 1,5 ml
- Para obtener el ADN adicione 50 ul de buffer EB en el centro de la membrana dejamos actuar 1 minuto y centrifugamos a velocidad máxima.

VII-2.7 Digestión con enzimas de restricción del ADN inserto**Digestión del producto de la PCR de FLHIV-1GP120HXBc2+flu+his**

Utilidad: Preparar los extremos del ADN amplificado por PCR, por su digestión con enzimas de restricción específicas, para ligarlo en el vector seleccionado.

Marca de las enzimas de restricción y protocolo BioLabs (USA) –Izasa:

PCR producto (ADN)	20 ul (0,25-0,1 ug)
ER 1	1.0 ul
10 X buffer*	2.5 ul
ddH₂O	0.5 ul
<hr/>	
25.0 ul volumen final	

Se incuba normalmente 1 hrs a 37°C (depende de la enzima), digestión con 2 enzimas diferentes por separado, previa purificación del ADN antes de adicionar la segunda enzima o simultanea si los buffers son compatibles para ambas enzimas

*depende de la enzima de restricción usada

(Aplicar protocolo de purificación si se procede a ligar)

VII-2.8 Digestión con enzimas de restricción del ADN plasmídico

Utilidad: linearizar el ADN circular (ADN lineal en gel de electroforesis) para facilitar su ligación con el inserto a clonar, por medio de 1 o 2 enzimas de restricción.

Marca y protocolo: BioLabs (USA) -Izasa (cat.)

DNA plasmídico	20.0 ul (0,25-0,1 ug)
ER 1	1.0 ul
10 X buffer	2.5 ul
ddH₂O	0.5 ul
<hr/>	
25.0 ul volumen final	

Incubar normalmente 1-2 hrs a 37 °C (depende de las enzimas), digestión con 2 enzimas diferentes por separado, previa purificación del ADN antes de adicionar la segunda enzima o simultanea si los buffers son compatibles para ambas enzima

*depende de la enzima de restricción usada

Aplicar defosforilación, si la digestión es con una sola enzima, para evitar el reanillado del plasmido.

VII-2.9 Defosforilación del vector digerido

Utilidad: Cuando el vector es digerido con una sola enzima, se generan extremos compatibles y por tanto es posible la religación espontanea, que se evita eliminando los grupos fosfato 5' terminales de los extremos libres con la enzima fosfatasa alcalina. BioLabs -Izasa (cat. 174M02905 USA).

Adicionar 2 ul de fosfatasa alcalina (por c/20 ul de producto de la digestión).

Incubar a 37°C por 30 minutos (solo para el vector).

VII-2.10 Inactivación de la fosfatasa alcalina mediante calor

Utilidad: bloquear la actividad enzimática y detener la reacción.

Incubar a 65°C por 15 minutos.

Aplicar protocolo de purificación antes de proceder a ligar (solo vector)

VII-2.11 Control electroforético de los ADN del inserto y vector digeridos y purificados, para su posterior ligación

Utilidad: control cualitativo y cuantitativo del inserto y vector digeridos para determinar las cantidades en volumen , que se usarán en la ligación.

- 5,0 ul de inserto digerido + 2 ul de blue juice
- 5,0 ul de vector digerido + 1 ul blue juice

- Cargar gel y correr 40-60 minutos a 80 voltios
- 10 ul de marcador lambda-HindIII cuantificado

Revisar y leer el gel en el transiluminador.

VII-2.12 Ligación

Utilidad: unir el inserto al vector, para clonarlo y su posterior uso en la transformación de *E. Coli*

	A	B
Vector (digerido)	1 ul	2 ul
Inserto (digerido)	2 ul	3 ul
10 X buffer de ligación	1 ul	1 ul
Ligasa	1 ul	1 ul
ddH2O	5 ul	3 ul
	<hr/> 10 ul	<hr/> 10 ul

Ligasa marca Biolabs (USA)

Incubar por 1 hora a temperatura ambiente.

*DNA listo para transformar *E. coli* JM109

Realizar electroforesis de control, antes de la transformación, corriendo simultáneamente, volúmenes iguales de inserto digerido, vector digerido y DNA ligado.

VII-2.13 Transformación de *E. coli* y selección de clonas

Utilidad: Esta bacteria es el receptor universal de ADN a transformar, por su fácil y rápido crecimiento. Este procedimiento se efectúa de rutina en todos los laboratorios siguiendo el método original descrito por **Hannahan 1983**, adaptado a los diferentes protocolos comerciales existentes.

Marca y protocolo: Promega (L2001 USA)

- Pasar las células de *E. coli*, congeladas a -80°C a un recipiente con hielo -4°C y mantener 10-15 minutos
- Mezclar las células generosamente y pasar 100 μl a un tubo eppendorf, también a 4°C
- Adicionamos 50 ng (Plásmido con inserto, lígados).
- Retornar el tubo con la mezcla a hielo por 10 minutos.
- Generar el shock térmico por 45 segundos a 42°C en baño maría, sin agitar.
- Pasar inmediatamente los tubos a hielo por 2 minutos.
- Adicionar 900 μl de medio LB, sin kanamicina mezclar a temperatura ambiente y colocar los tubos en el agitador a 37°C por 60 minutos.
- Centrifugamos a 1000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente.
- Se retira sobrenadante (800 μl) y el resto se pone en placa sobre LB+ Kanamicina, difundiendo con las asas de Digrafsky incubar a 37°C (toda la noche).

Selección de colonias

Revisión de las placas de cultivo con las *E. coli* transformadas, seleccionar las colonias-clonas, para posteriormente picarlas por separado en tubos falcon de 15 ml conteniendo 2 ml de medio LB líquido + kanamicina, en número suficiente e incubar a 37 ° C (toda la noche).

VII-2.14 Extracción de ADN plasmídico en pequeñas cantidades

VII-2.14.1 Miniprep

Marca del kit: Qiagen (cat.50927106 Germany)

Utilidad: diseñado para obtener, pequeñas cantidades de ADN (20-30 ug) eluído en 50 ul suficientemente puro, para posteriores estudios, como digestiones por enzimas de restricción y electroforesis. Este material genético procede de 2 ml de cultivo de *E. coli*, transformada y clonada en medio LB+K, líquido de aproximadamente 12-16 horas de incubación, en base a la lisis alcalina de las células bacterianas

- 2ml de *E. coli* en LB pasar a tubo eppendorf, centrifugar 5 minutos a máxima velocidad, eliminar el sobrenadante.
- Resuspendemos el pellet bacteriano en 250 ul de Buffer P1 .
- Adicionar 250 ul de buffer P2 e invertir suavemente el tubo unas 4-6 veces.
- Adicionar 350 ul de buffer N3 e invertir suavemente el tubo unas 4-6 veces.
- Centrifugar por 10 minutos a máxima velocidad en la micro centrifuga.
- Pasar el sobrenadante del paso anterior a la columna de QIAprep por decantación.
- Centrifugar por 1 minuto y descartar el líquido filtrado
- Lavar con PB 500 ul y centrifugar por 1 minuto (opcional).

- Lavar la columna QIAprep con 750 μ l de PE y centrifugar por 1 minuto.
- Centrifugar por 1 minuto más para retirar totalmente los restos de bufferes y minerales.
- Pasar la columna QIAprep en un tubo eppendorf y adicionar 50 μ l de buffer EB esperar por 1 minuto y luego centrifugar por 1 minuto.
- Con este paso ya finaliza el protocolo y todo el ADN quedara en el tubo eppendorf.

VII-2.14.2 Digestión del ADN miniprep

Utilidad: confirmar la presencia conjunta del inserto y el vector en el ADN, extraído por el protocolo de miniprep a partir de los cultivos líquidos de *E. coli* transformada, por medio de su digestión con diferentes enzimas de restricción, cuya selección depende de los sitios diana para las mismas que existen en dicho ADN (vector+inserto).

AND miniprep	10 ml
ER	1 μl
Buffer	2 μl
BSA	2 μl
H₂O	5 μl

20 μ l incubar a 37 ° C

A dicionar 4 μ l de Blue Juice y cargar en gel, para correr electroforesis, junto al vector y el inserto sin digerir como controles de referencia.

VII-2.15 Extracción de ADN plasmidico en cantidades mayores

VII-2.15.1 Maxiprep

Marca: QIAGEN maxiprep kit (cat.50912262 Germany)

Utilidad: diseñado para obtener 500 ug aproximados. de ADN, eluido en 300 ul procedente de 100 ml de cultivo E. coli en LB líquido de entre 12-16 horas de incubación (previo al proceso alícuotar 500 ul del cultivo de E.coli+500 ul de glicerol al 10% y congelar a -80°C).

- Obtención del pellet de células por centrifugación : 6000 x g 15 minutos a 4°C .
- Resuspendemos el pellet de bacterias con 10 ml de Buffer P1.
- Adicionamos 10ml del Buffer P2 , mezclamos gentilmente de 4 a 6 veces e incubamos a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Durante el tiempo en que dure el paso anterior preparamos el cartucho denominado QIAfilter : adosándolo a un tubo falcon de 50 ml con el fin de colectar todos los sobrantes del proceso.
- Adicionamos 10ml del buffer P3 al lisado y mezclamos gentilmente entre 4 y 6 veces .
- Pasar todo lo colectado (células+P1+P2+P3) en los anteriores pasos en el cartucho QIAfilter con su respectivo tapón y esperaremos 10 minutos sin poner el émbolo.
- Durante los 10 minutos en que tarda el anterior paso, equilibraremos la columna de QUIAGEN-tip 500 anteriormente adosada o fijada en un falcon de 50 ml, agregando 10 ml de buffer QBT.
- Retiramos el tapón del cartucho e insertamos el émbolo para filtrar el contenido y que este caiga en la columna QIAGENTip 500 previamente equilibrada (QBT) con el fin de liberarse del lisado celular .
- Lavamos la columna dos veces una tras de otra con 30ml del buffer QC .

- Después de pasar todo el QC liberamos la columna del tubo y la fijamos a un tubo para centrífuga que no sea de policarbonato y le ponemos 15 ml del buffer QF.
- Retiramos la columna y precipitamos de forma directa el ADN con 10.5 ml de isopropanol, mezclamos y centrifugamos inmediatamente a 15,000 x g por 30 minutos a 4°C para luego decantar cuidadosamente.
- Lavamos el pellet con 5 ml de etanol al 70% y centrifugamos a 15000 x g por 10 minutos. Decantamos con cuidado el sobrenadante sin arrastrar el pellet.
- Dejamos secar el pellet por 10 a 15 minutos y lo resuspendemos en 350 μ l de EB.

VII-2.15.2 Digestion del ADN maxiprep

Utilidad: confirmar la presencia del ADN inserto más el ADN del vector usado en cada caso en el ADN transformante extraído por la técnica maxiprep.

Esto se realiza por medio del diseño de una digestión seriada del ADN maxiprep con diferentes enzimas de restricción seleccionadas en base a la distribución original de los sitios diana y al peso de este ADN, con respecto al peso respectivo del ADN inserto y del vector .

VII-2.16 Caracterización y secuenciación del ADN

VII-2.16.1 PCR para Secuenciación

Marca del kit: Big Dye v3.0 terminator.

Utilidad: Amplificación del ADN de la maxiprep de E.coli, transformada usando el primer delantero, diseñado para cada cepa (tabla primers) y así confirmar que el orden y número de nucleótidos, coincide con el del templado original, respetando el marco de lectura.

DNA maxiprep	1 ul
Mix Big Dye	4 ul
Primer F	1 ul
Buffer Big Dye	2 ul
H2O treated	12 ul
Volumen final	20 ul

Programa de PCR Big Dye (Applied Biosystems) 25 ciclos. 96 °C/10 seg. 50 °C/ 5 seg. 60 °C/ 4 min 4 min.

VII-2.16.2 Precipitación de ADN para secuenciar

- 20 ul de la reacción de PCR Big Dye.
- Adicionar 2 ul acetato de sodio (3M pH 5.0), 1/16 Vc.
- Adicionar 2 ul EDTA.
- Adicionar 50 ul de etanol absoluto refrigerado y pasar a eppendorf .
- Vortex 2-3 segundos.
- Centrifugar en Eppendorf a 14,000 rpm 30 minutos, 4 ° C.
- Eliminar sobrenadante, por pipeteo o decantación.
- Adicionar 500 ul de etanol 70 %.
- Centrifugar 10 minutos. A 14,000 rpm y 4 °C..
- Descartar sobrenadante (pipeta-decantación).
- Evaporar el resto de alcohol al máximo, en estufa a 37 ° C . o bien 30' en el Speed back, evitando exposición a la luz, con papel aluminio.
- Secuenciar (Secuenciador automático ABI Prisma 377, metodo Sanger 1977) y alineamientos con programa CLUSTALW (Thompson 1994).

Tabla Primers para secuenciar ADN delecionado

Primer	Constructor	Sentido	Secuencia del primer
Del-1	BCGr:261.HIV1gp120	Delantero	5'-TTGGCCTGCACACACGGTAT-3'
Del-2	BCGr:261.HIV1gp120	Delantero	5'-ACTTCGCAATGGCCAAGACA-3'
Del-3	BCGr:261.HIV1gp120	Delantero	5'-CAGTCGATCGTACGCTAGTT-3'
Del-4	BCGr:261.HIV1gp120	Delantero	5'-GGTAGAACAGATGCATGAGG-3'
Del-5	BCGr:261.HIV1gp120	Delantero	5'-CAATAGTAGTAGCGGGAGAA-3'
Del-6	BCGr:261.HIV1gp120	Delantero	5'-GACCAGGGAGAGCATTGTT-3'
Del-7	BCGr:261.HIV1gp120	Delantero	5'-GTATGCCCTCCCATCAGTG-3'
Del-8	BCGr:261.HIV1gp120	Delantero	5'-GGCAGTCTAGCAGAAGAAGAGGT-3'

VII-2.17 Transformación de BCG por electroporación

- Descongelar cepa de BCGwt o BCGlis-, electrocompetentes a temperatura ambiente, resuspender suavemente el pellet.
- Colocar 1 ó 2 ul de DNA maxiprep en la pared marcada de la cubeta bio-rad y adicionar 100 ul de células electrocompetentes de igual forma.
- Insertar en el carril de electroporación del Gene Pulser y aplicar 2.5 kv por 3-4 segundos.
- Inmediatamente adicionar 1 ml de medio 7H9 suplementado con ADC y T-80 en la cubeta, mezclando con las células electroporadas
- Pasar el contenido de la cubeta a un tubo falcon de 50 ml y adicionar 1 ml más de medio 7H9 suplementado, mezclando suavemente incubar ON a 37 °C en el Shacker.

- Pasar 100 ul de la suspensión en una placa de medio 7H10GATK 25 y difundir homogéneamente con las asas de Digralsky e incubar a 37°C 2-3 semanas.
- Centrifugar el tubo falcon con el resto de suspensión a 2,500 rpm t.a., por 10 min. ,eliminar 1,7 ml con los restantes .2 ml resuspender el pellet y pasar a otra placa de medio 7H10GATK 25 y difundir homogéneamente, incubar en paralelo las placas anteriores a 37 °C, por 2-3 semanas .
- Picar 5-10 colonias aisladas en 5 ml de medio líquido. 7H10GATK, e incubar 5-10 días.
- Confirmar la presencia del inserto, por medio de una PCR, en 2 ul del cultivo anterior, usado como templado.
- Expandir el cultivo pasando 100 ul a botellas con 50 ml de medio esteril (extracción de proteínas) y 200 ul en 100 ml de medio nuevo, para producir el stock vacunal a congelar, solo del tubo con PCR positiva del inserto en estudio.

VII-3 Evaluación de la expresión de las proteínas heterologas

VII-3.1 Preparación del pellet.

A partir de 50 ml de cultivo de BCGr en medio líquido 7H9GATK, con densidad optica de 0,8-1,0 con 600 nm de longitud de onda.

1. Pasar a falcon de 50 ml y anotar volumen, centrifugar a 3000 rpm, 10'4°C y decantar sobrenadante
2. Adicionar volumen equivalente de PBS-Tween-80 (0.02%)/4°C y repetir centrifugado y decantar sobrenadante
3. Adicionar volumen equivalente de PBS-T80 (0.02%) y repetir centrifugado
4. Decantar sobrenadante y congelar pellet a –80 °C , si se para el protocolo, de lo contrario continuar.

VII-3.2 Sonicación del pellet de células, recién centrifugadas o descongeladas:

Utilidad: lisar las células bacterianas de las cepas de BCGwt o BCGr, para extracción de proteínas.

- Adicionar al pellet (o descongelar en su caso), 1 ml de PET(4°C)* + 10 ul de PIC (Cocktail de inhibición proteína, -20°C), realizar todo sobre hielo 4° C homogenizar bien.
- Sonicar 1 minuto y detener 1 minuto, 4 ciclos, programa: Duty cycle 80 y Out put control 5,5 (en hielo 4°C)
- Centrifugar a 14000 rpm a 4°C (ependorf refrigerada) durante 30', separar sobrenadante del sedimento, congelar c/u -20°C.

VII-3.3 Cuantificación de la proteína (ensayo de Bradford)

1. Utilidad: Determinar el contenido de proteínas en el extracto, obtenido de las células bacterianas lisadas.
2. Diluir Protein Assay Dye Biorad (cat. 500-0006) 1/5: 2 ml de reactivo.+8 ml H₂O destilada.
3. Preparar BSA 2 ug/ul, si stock está a 10 ug/ul, entonces diluimos 1:5, entonces 10 ul de BSA más 40 ul de H₂O, tenemos 2 ug/ul.
4. Hacer 5 diluciones seriadas para la curva standard, pasando 25 ul del tubo anterior a otro con 25 ul de H₂O (1ug/ul), hasta 0,125 ug/ul, en 5 tubos y pasar 200 ul por duplicado a cada pozo de la microplaca para su lectura de absorbancia a 600 nm.
5. Diluir muestras de proteínas 1:10, para 50 ul, entonces 45 ul de H₂O + 5 ul de cada muestra.
6. Nuevamente diluir las muestras de proteínas ahora en reactivo Biorad diluido, 20 ul de prot. + 1 ml de reactivo. Biorad y pasar 200 ul de cada muestra a un pozo de la microplaca, por duplicado para su lectura a 600 nm.

VII-3.4 Western blot

Utilidad: Protocolo para confirmar la expresión de la proteína heteróloga, codificada por el inserto de DNA clonado, en el sonicado del pellet de células bacterianas de cada cepa de BCGr.

Limpiar los cristales con alcohol etílico 70 % y colocar en el soporte, en la posición correcta.

Preparación de geles:

- 10% Resolving gel:
- 1,25 ml de acrilamida 30%/ bis.acrilamida(4 °C)
- 1,25 ml de 1,5 M tris -HCl, pH 8,8
- 10 µl 10% SDS
- 2,375 ml H₂O destilada
- 10 µl de 10% APS(persulfato de amonio -20 °C)
- 10 µl TEMED, inmediatamente vortex y pasar con pipeta, la mezcla hasta marca del primer gel, completar el volumen disponible con alcohol etílico 70% y esperar 20-30 minutos.

5 % stacking gel:

- 0,25 ml de 30% acrilamida/bis-acrilamida
- 0,5 ml 0,5 Tris-HCl, pH 6,8
- 20 µl 10% (w/v) SDS
- 1,2 ml H₂O destilada
- 20 µl de 10% APS
- 10 µl TEMED vortex y pasar al contenedor, sobre el gel anterior esperar 20-30 minutos.

- Diluir las muestras 1:1* (10ul muestra + 10ul indicador) en 2XSDS buffer de carga (1900 ul buffer Laemmli +100 ul de B-mercaptoetanol), mezclar y un pulso muy leve en la centrifuga, en seguida calentar a 95 °C, durante 4 minutos, como máximo, igual y simultaneo tratamiento al MTM (Multi-Tag-Marker), para Western blotting con Anti-HA, Anti-His6, Anti-c-myc, para bandas de proteínas de 10-20-30-45-75-100 kDa.
- Centrifugar las muestras 2 minutos a 3000 rpm, pasar sobrenadante con pipeta a papel parafilm.
- Cargar el sobrenadante del parafilm con puntas de carga especiales para los geles: 20 ul de c/u *, pozos numerados y de marcador MTM
- Correr al inicio a 35 V durante el recorrido del stacking gel y a 65 V, durante la resolución del gel.
- Cortar membranas de nitrocelulosa y mantener en buffer de transferencia durante 30 minutos a temperatura ambiente, para equilibrar químicamente y favorecer la transferencia.
- Montar el sandwich: papel filtro/membrana/gel/papel filtro, correr a 15 V durante 20 minutos (humedecer el filtro con suficiente buffer)
- Bloquear la membrana con 5% de leche sin grasa, en polvo + TTBS (1 grs/20 ml) mantener a 4 °C toda la noche, lavar 4 veces con TTBS (cantidad suficiente para cubrir la membrana aproximadamente 5ml), decantando el líquido resultante.
- Adicionar todo el volumen, del anticuerpo antiflu (COVANCE), obtenido de líquido de ascitis de ratón, es un anticuerpo monoclonal denominado, HA.11, isotipo IgG1 5-7 mg/ml, contra un péptido de 12 aminoácidos, que reconoce el epitopo (**YPYDVPDYA**) de la hemaglutinina del virus de la influenza, usado como marcador en diferentes vectores de expresión, se usa diluido 1/1000, en TTBS (Tween Tris buffer salino), es decir 20 ul de Ac en 20 ml de TTBS

- Incubar la membrana 1 hora a 37 °C (incubador bacteriológico) o a 4 °C nevera toda la noche.
- Lavar 4 veces con TTBS.
- Adicionar el segundo anti-anticuerpo-peroxidasa (de cabra anti-IgG de ratón), 1/2000 (20 ml de TTBS + 10 ul del anticuerpo).
- Lavar las membranas 4 veces con TTBS.
- Adicionar el substrato (5 ml de sol.1+5 ml de sol.2-Amersham), incubar durante un minuto
- Revelar en equipo Imaging-Quimioluminiscencia IDIBAPS, en cuarto oscuro, incrementando tiempo en modo manual con ultrasensibilidad.

VII-4 Preparación Del Stock Vacunal De Bcgr (222:FL y 223:FL)

VII-4.1 Expansión de colonias transformadas y congelación a – 80 ° C.

- Expandir cultivo de BCGr, a partir de tubo 5 ml (clona positiva al inserto), pasando 100-200 ul a 100 ml de medio 7H10 GATK dejar aproximadamente 10 días de incubación y D.O. = 0,6-0,8 a una longitud De onda de 600 nm.
- Dividir el volumen anterior en 2 falcon de 50 ml aprox.c/u, procesar a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 3000 rpm 10 minutos a temperatura ambiente.
- Decantar sobrenadante y eliminar, resuspender pellet en volumen equivalente de aproximadamente 50 ml de PBS-Tween-80 (0.05%).
- Pasar a botella y resuspender suavemente para evitar o eliminar grumos.
- Adicionar 10% glicerol puro (87%), esteril por autoclave, usando la relación $C_0:V_0 = C_1:V_1$, realizar relación para el volumen en particular.
- Mezclar suave y uniformemente, para evitar grumos al máximo.
- Alicuotar en criotubos nuevos estériles y congelar a –80 °C.

VII-4.2 Titulación de stock vacunal

Titulación de las cepas de BCGr y BCGwt , para inmunizar.

Utilidad: Cuantificar las células micobacterianas en los stocks congelados para determinar el número promedio de UFC/ml por medio de diluciones seriadas en placa a partir de uno de los criotubos que contienen las células, que se van a inocular durante, el ensayo experimental *in vivo* .

- Descongelar a temperatura ambiente, la cepa en estudio, que se mantenía a -80°C (1 tubo).
- Diluir 1/10 0,5 ml de células + 4,5 ml de PBS-T80 (0,05%), resuspender.
- Sonicar 3 segundos, 2 veces.
- Realizar una batería de diluciones, a partir de 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 y 1/100000, pasando 0,5 ml de cada suspensión a tubos con 4,5 ml de PBS-Twee-80 (0,05%).
- Plaquear 100 μl de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , en placas de agar
- 7H10GAT (con kanamicina para BCGr, sin kanamicina para BCGwt)
Incubar a 37°C 14-21 días y contar colonias.

VII-5 Evaluación *In Vivo* de la respuesta inmune específica al VIH, empleando vacunas de BCGr en un modelo experimental murino.

VII-51 Diseño del modelo experimental

Animales: ratones Balb/c hembras de 7-8 semanas de edad.

Lugar: Laboratorio P2, del Bioterio de la facultad de medicina de la Universidad de Barcelona, cuyo comité ético de experimentación animal revisó y aprobó nuestros procedimientos.

Dosis: 1×10^7 ufc de BCGr suspendidas en 100 μl de PBS

Via de administración: Subcutánea (BCGwt y BCGr), intramuscular (MVA)

Calendario: Día 1 inoculación y evaluación a los 15 días.

Grupo I:	2 ratones sin inmunizar-naive o controles negativos
Grupo II:	3 ratones que reciben 1×10^7 ufc / BCGwt
Grupo III:	4 ratones que reciben 1×10^7 ufc / BCGLis-222:HIVA
Grupo IV:	4 ratones que reciben 1×10^7 ufc / BCGLis-223:HIVA
Grupo V:	3 ratones que reciben 1×10^6 ufp / MVA:HIVA
Total:	16 ratones

VII-5.1 Preparación de inóculo vacunal de BCGr y BCGwt, para inmunizar ratones.

Utilidad: homogenizar la suspensión celular y eliminar grumos, de las diferentes cepas de BCGr y wt, recién descongeladas para inocular un número constante de células bacterianas en ufc/ml a cada ratón.

- Mantener el sonicador en luz UV, previo al día de inmunización.
- Extraer criotubos con las cepas vacunales de BCGr, del congelador – 80° y descongelar a temperatura ambiente.
- Limpiar el sonicador con lejía, alcohol etílico y suficiente agua estéril a presión, eliminando exceso al máximo.
- Juntar el contenido de cada grupo de criotubos en falcon de 50 ml estéril
- Programar sonicador : output control 5.5, % duty cycle 80, 3 ciclos de 1 segundo cada uno 2 veces (rodear con gasa estéril, la sonda y la boca del tubo para evitar exposición a los aerosoles).
- Listo el inóculo para inmunizar, cada ratón con 2×10^7 ufc por vía subcutánea

VII-5.2 Obtención y cultivo de esplenocitos

- Sacrificar a los animales del ensayo por (dislocación cervical).
- Disecar abdomen para extraer bazo.
- Fragmentar el bazo para la obtención de esplenocitos, triturándolo sobre un filtro (cell stainer), con ayuda de un émbolo en placa de Petri, adicionada con 3 ml de medio RPMI 1640 (Ro).
- Pasar la suspensión a un falcon de 15 ml y adicionar medio Ro hasta 10 ml y centrifugar 5 minutos a 1500 rpm temperatura ambiente eliminando el sobrenadante, repetir 2 veces.
- Adicionar 1 ml de RBC (buffer de lisis de eritrocitos), mezclando suavemente, durante un minuto y medio y rellenar nuevamente con medio Ro hasta 10 ml, mezclar suavemente y reposar 3 minutos.
- Recoger sobrenadante por decantación y centrifugar 5 minutos 1500 rpm eliminar sobrenadante.
- Adicionar 10 ml medio Ro y centrifugar 5 minutos 1500 rpm, eliminar sobrenadante, lavado opcional.
- Repetir
- Resuspender el pellet en medio RPMI complementado R10, BLOWEST (con SFB 10% inactivado a 56 °C 30', HEPES, B-mercaptoetanol para cultivo y gentamicina, ajustando el pH con solución de NaOH), refiltrar 3 veces., por este método se obtienen en promedio $7-8 \times 10^7$ cel/por cada bazo, si se adiciona 8 ml del medio complementado, a la suspensión entonces tenemos 10^7 cel/ml.

VII-5.3 Inducción de IFN-gamma en esplenocitos

Utilidad: Estimular la producción de IFN-gamma en los esplenocitos cultivados, de los diferentes grupos de ratones para facilitar la evaluación de la respuesta inmune CD4 y CD8 contra la proteína, codificada por el inserto en estudio.

- Preparar suspensión 1×10^6 cel/ml en medio complementado y colocar 0,5 ml en cada pozo de la placa por duplicado, para cada muestra.
- Adicionar 0,5 ml de medio RPMI complementado, más lo siguiente:
 - a) 0,5 ml de cel.+ 0,5 ml de medio (control negativo)
 - b) 0,5 ml de cel.+ 0,5 ml de medio + y Concanavalina A, 10 ug/ml (control positivo)
 - c) 0,5 ml de cel.+ 0,5 ml de medio + y p18, 10 ug/ml (péptido)
- Incubar a 37 °C CO₂ 72 horas contar nuevamente células, tomando 10 ul de la suspensión + 10 ul de PBS 1x + 10 ul tripan blue, mezclar suavemente y pasar 10 ul a la cámara, de contar células graduada. Resultados optimos (para extracción de ARN total y RT-PCR IFN-gamma) entre 5×10^6 y 1×10^7 cel, recoger las mismas resuspendiendo con pipeta pasteur.

VII-5.4 Cuantificación del IFN-gamma por la técnica ELISPOT (enzyme-linked immunospot).

Equipo: Lector de ELISPOT (AID-Diagnostika), resultados en unidades formadoras de manchas (s.f.u.), $\times 10^6$ células

- Coatar las placas (millipore) del ELISPOT con 100 ul de anticuerpo de rata anti IFN- γ de ratón (15 ug/ul Mabtech), incubar a 4° C toda la noche
- Lavar y agregar 1×10^5 esplenocitos y estimular con peptido p18 (dilución 1:50) a 37 ° C toda la noche.

- Lavar e incubar 3 horas con anticuerpo de detección (anticuerpo monoclonal biotinilado Mabtech dilución 1:1000), a temperatura ambiente.
- Lavar 6 veces y adicionar 100 ul de conjugado fosfatasa alcalina-estreptavidina (Mabtech dilución 1:1000) e incubar 1 hora a temperatura ambiente
- Revelar la placas con el susbtrato cromogénico para fosfatasa alcalina (Biorad), considerando los pozos de control con medio solo y negativo con esplenocitos naive
- Para el ELISPOT estimulado, incrementar el tiempo de incubación con el peptido a 5 dias
- Pasar las placas por el lector

VII-5.5 Tetrámeros

Para este protocolo se empleo el complejo tetramérico de HLA-p18 donado a este laboratorio por el Dr. Thomas Hanke, preparados como se describe por (Altman J.D. 1998) y contienen una estructura HLA con 4 peptidos p18, incrementando por esto la sensibilidad de su detección.

- Incubar 10^5 celulas con anticuerpos anti CD16/CD32 (fracción constante de las inmunoglobulinas Fc)
- Lavar los esplenocitos y marcar fluorescentemente con los tetrameros anti CD8 y anti CD3
- Fijar las celulas y leer en un FACScan Becton Dickinson que revisa cienmil celulas por evento.
- Este protocolo se puede aplicar expandido, ampliando a 5 dias el periodo de incubación con los tetrameros.

VII-5.6 Extracción del ARN total de los esplenocitos

- Pasar la suspensión celular a un falcon de 15 ml y adicionar PBS 2-3 ml, mezclando suavemente, centrifugar a 1000 rpm 5 minutos, repetir el lavado y eliminar el sobrenadante, al máximo.
- Resuspender el pellet con 750 ul de Trisol , mezclando con vortex 2 veces y pasar el lisado 3 veces por jeringa de insulina.
- Incubar a temperatura ambiente entre, 5 -10 minutos.
- Adicionar 250 ul de cloroformo, para purificar el ARN. Vortex 2 veces 15 segundos c/u y colocar en hielo 15 minutos.
- Centrifugar 20 minutos a 14000 rpm 4 °C, pipetear la fase acuosa superior, lo más puro posible y pasar a tubo eppendorf esteril.
- Adicionar un volumen De isopropanol -20 °C, manteniendo en hielo 30 minutos enseguida centrifugar 25 minutos a 14000 rpm 4 °C, eliminar sobrenadante.
- Lavar con 1 ml de alc. etílico 75% -20°C, centrifugar 14000 rpm 10 min.
- Eliminar sobrenadante , secar al aire 15 minutos y resuspender en agua DEPC, 30-50 ul mantener durante 15 minutos, a 65 °C (termociclador), para mejorar la resuspensión. Cuantificar en el espectrofotómetro, usar 2 ul del ARN resuspendido, mantener en hielo hasta tomar el volumen requerido (dependera de la concentración obtenida en cada muestra) para la RT-PCR y el resto almacenar a -80°C

VII-5.7 Cuantificación del ARN

1. Mezclar 2 ul de ARN en 198 ul de H₂O DEPC (1%)
2. Programar espectrofotometro para cuantificar ARN/ADN y leer absorbancia a:

	260 nm	280 nm	320 nm	Razón	Concentración
T1	0,109	0,101	0,001	1,08	4,3/0,43 ugr/ul
T2	0,125	0,117	0,001	1,07	4,9/0,49 ugr/ul
T3	0,122	0,119	-0,004	1,02	5,0/0,50 ugr/ul
T4	0,182	0,169	-0,004	1,08	7,4/0,74 ugr/ul

Para la RT-PCR se requiere 1 ug del ARN extraído, entonces dividimos este valor entre la concentración real, ejem: $1/0.43 = 2,32$ ul (vol. a adicionar), calcular para cada tubo de RNA.

VII-5.8 RT-PCR

Utilidad: convertir el ARN en ADNc, por retrotranscripción para facilitar la posterior confirmación de la inducción y producción de IFN-gamma en los esplenocitos de ratón inmunizados con las cepas de BCGr, realizar cada ciclo con pausas de acuerdo a programa.

ARN	2,32 ul del ARN extraido (1 ugr de ARN), ejemplo	
H ₂ O	6,68 ul (obtenido al restar 2,32 de 9(vol. final RNA + H ₂ O)	
NTP	2,0 ul	
Oligo	1,0 ul	Programa
Total:	12 ul	65 °C 5'
Adicionar:		

ANEXOS

5x buffer	4,0 ul	
DTT 0,1 M	2,0 ul	
RNAsa	1,0 ul	Programa
Total	19 ul	.42 °C 2'
Adicionar:		
Retrotranscriptasa..1,0 ul		42 °C 50'
		70 °C 15'
		4 °C

marca: KIT Invitrogen Super Scrit II RNase H', transcriptasa inversa

VII-5-9. PCR del ADN IFN- γ

Utilidad: Amplificar la porción de ADN codificante, de INF-gamma con el uso de primers específicos, para facilitar así la detección cualitativa de la banda correspondiente, en un gel de agarosa mediante electroforesis.

Kit PCR mix Promega, con primers diseñados en nuestro laboratorio:

cADN	2 ul
PCR mix	12.5 ul
Primer D	1 ul (50 pmol/ul)
Primer R	1 ul (50pmol/ul)
H ₂ O	8.5 ul
Total	25 ul

Programa PCR 35 ciclos

95 °C / 5' 95 °C / 30" 58 °C / 30" 72 °C / 60" 72 °C / 7' 4 °C

VII-5-10 Ensayo de inmunización en ratones, aplicando la técnica RT-PCR para detectar IFN- γ .

1. Inocular 100 μ l de suspensión viral con MVA al 1 % vía intramuscular a 2 ratones Balb/c hembras(R3 y R4), paralelamente mantener 2 ratones naive (R1 y R2), como control por 72 hrs
2. Sacrificar los 4 ratones y extirpar el bazo para obtener los esplenocitos en suspensión ajustando a 1×10^6 cel/ml
3. Pasar 1 ml de la suspensión a cada pozo, 3 por cada ratón por duplicado, de la siguiente manera:
 - a. 1 ml de cel. + 1 ml de medio RPMI complementado (control negativo)
 - b. 1 ml de cel. + 1 ml de medio complementado, adicionado además de 10 μ g/ml de Concanavalina A (control positivo)
 - c. 1 ml de cel. + 1 ml de medio complementado adicionado de peptido P18 10 μ g/ml
 - d. incubar la placa 72 hrs. (revisar ph de cultivos celulares, adicionar medio complementado si se requiere).
4. Cuenta celular de cada pozo, para iniciar extracción de ARN.
5. Congelar muestras de ARN eluido en 30 μ l a -80 °C
6. Cuantificación de ARN en sol. 1 %, 2 μ l de c/muestra + 198 H₂O DEPC
7. Realizar RT-PCR para ADN de IFN-gamma