

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MAYOR DE CÁPSIDE VP1 DE SAPOVIRUS

GII MEDIANTE EL SISTEMA DE *Escherichia coli*

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. CLAUDINA SANCHO QUEQUE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MAYOR DE CÁPSIDE VP1 DE SAPOVIRUS GII
MEDIANTE EL SISTEMA DE *Escherichia coli*

TESIS PRESENTADA POR:

Bach. CLAUDINA SANCHO QUEQUE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

FECHA DE SUSTENTACIÓN: 27 DE DICIEMBRE DEL 2017

APROBADA POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE:

Dra. YOURI TERESA DEL CARPIO CONDORI

PRIMER MIEMBRO:

M.Sc. RICARDO DARIO NEYRA MENENDEZ

SEGUNDO MIEMBRO:

M.Sc. VICKY CRISTINA GONZALES ALCOS

DIRECTOR:

M.Sc. DANTE JONI CHOQUEHUANCA PANCLAS

ASESOR:

PhD. HOLGER MAYTA MALPARTIDA

ÁREA : Ciencias Biomédicas

LÍNEA: Biotecnología

SUB LINEA: Biotecnología Vegetal Ambiental y Humana

TEMA: Biología Molecular

DEDICATORIA

A mis padres Valerio y Juana, quienes siempre me apoyan incondicionalmente y respetan mis sueños y la decisión de dedicar mi vida hacia el maravilloso mundo de la ciencia.

A mis hermanos Mariela y Giancarlo, que siempre me dieron su apoyo, sobre todo compartiendo teorías e ideas en este mundo fascinante de la ciencia.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor, PhD. Holger Mayta Malpartida, quien me dio la oportunidad de ser parte de su Laboratorio y así poder realizar este trabajo de investigación, me guio en cada paso de mi tesis. Además de ser un asesor, fue un amigo quien me apoyo con consejos en lo académico y en lo personal.

A mi directora de tesis, la Dra. Roxana Medina Rojas, por todo su apoyo tanto en lo académico como en lo personal; de igual modo a la Dra. Manuela Verastegui Pimetel, por su confianza y apoyo. Además de ser quienes me dieron la oportunidad de ser parte del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Al Dr. Robert Gilman, por darme la oportunidad de poder realizar este trabajo.

A Lic. Jorge Fernández, quien me instruyo en las técnicas necesarias para mi tesis, quien aparte de ser mí guía, fue un amigo que me apoyo emocionalmente.

A la Mg. Edith Málaga, quien me apoyo académicamente y emocionalmente.

Al Dr. Dante Choquehuanca, por todo su apoyo durante la sustentación de mi tesis.

Finalmente, a todos mis amigos y a los chicos de los laboratorios Nanotecnología y Virología Molecular, Inmunología, Biología Molecular y Bioinformática que de alguna manera me apoyaron.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	5
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN	13
1.1. OBJETIVO GENERAL	14
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
1.3. HIPÓTESIS	14
II. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1. ANTECEDENTES	15
2.2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.2.1. <i>Historia</i>	17
2.2.2. <i>Epidemiología de Sapovirus</i>	17
2.2.3. <i>Características generales</i>	18
2.2.4. <i>Taxonomía de Sapovirus</i>	19
2.2.5. <i>Estructura de Sapovirus</i>	19
2.2.6. <i>Organización génica de Sapovirus</i>	19
2.2.7. <i>Obtención de la proteína recombinante</i>	20
2.3. MARCO CONCEPTUAL	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. ÁREA DE ESTUDIO	30
3.2. ÁREA DE INVESTIGACIÓN	30
3.3. METODOLOGÍA	30
3.4.1. <i>Diseñar los primers para el clonamiento del gen que codifica la proteína mayor (Vp1) de Sapovirus, basado en secuencias obtenidas del genbank</i>	30
3.4.1.1. Análisis bioinformático: Diseño de cebadores, elección de enzimas de restricción y análisis <i>in silico</i> para la amplificación del gen VP1.....	30
3.4.1.2. Extracción de RNA viral	31
3.4.1.3. Síntesis de cDNA	31

3.4.2.	<i>Amplificación del gen de interés mediante PCR convencional.</i>	32
3.4.2.1.	Amplificación del gen VP1 mediante PCR	32
3.4.2.2.	Purificación y cuantificación del producto de PCR	33
3.4.3.	<i>Clonar el gen de interés mayor de cápside VP1</i>	33
3.4.3.1.	Digestión enzimática por endonucleasas (enzimas de restricción)	34
3.4.3.2.	Ligación del gen Vp1 con el vector pET28	34
3.4.3.3.	Preparación de células competentes	34
3.4.3.4.	Transformación Bacteriana de <i>E. coli</i> cepa DH5α	35
3.4.3.5.	Selección de colonias y PCR colony	35
3.4.3.6.	Amplificación y purificación del plásmido recombinante	36
3.4.4.	<i>Expresión de la proteína mayor de cápside VP1</i>	36
3.4.4.1.	Transformación Bacteriana de <i>E. coli</i> cepa Rossetta DE3	36
3.4.4.2.	Inducción y expresión de la proteína mayor de cápside VP1	37
3.4.4.3.	Detección de la expresión de la proteína recombinante mayor de cápside VP1 mediante SDS-PAGE	37
3.4.4.4.	Tratamiento de lisis celular	37
3.4.5.	<i>Purificación la proteína mayor de cápside VP1</i>	38
3.4.5.1.	Análisis de la purificación de la proteína recombinante mayor de cápside VP1 mediante SDS-PAGE y Western Blot	38
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1.	DISEÑO DE <i>PRIMERS</i> PARA EL CLONAMIENTO DEL GEN QUE CODIFICA LA PROTEÍNA MAYOR VP1 DE SAPOVIRUS, BASADO EN SECUENCIAS OBTENIDAS DEL GENBANK.	40
4.2.	AMPLIFICACIÓN DEL GEN DE INTERÉS MEDIANTE PCR CONVENCIONAL.	41
4.3.	CLONACIÓN DEL GEN DE INTERÉS MAYOR DE CÁPSIDE VP1	43
4.4.	EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MAYOR DE CÁPSIDE VP1	46
4.5.	PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MAYOR DE CÁPSIDE VP1	48
V.	CONCLUSIONES	51
VI.	RECOMENDACIONES	52
VII.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	53

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Estructura molecular de la cápside de Sapovirus.</i>	<i>19</i>
<i>Figura 2. Organización génica de Sapovirus.</i>	<i>20</i>
<i>Figura 3. El ARN es copiado a múltiples copias de cDNA con la enzima transcriptasa inversa mediante PCR.</i>	<i>21</i>
<i>Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa.</i>	<i>23</i>
<i>Figura 5. Sitio de reconocimiento y corte de EcoRI y HindIII.</i>	<i>25</i>
<i>Figura 6. Mapa general del vector plasmídico pET28a.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 7. Condiciones de PCR para amplificar el gen VP1.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 8. Análisis de la amplificación del Gen VP1 realizado por PCR convencional.</i>	<i>42</i>
<i>Figura 9. Purificación del producto de PCR del gen VP1.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 10. Análisis del Gen VP1 mediante PCR colony.</i>	<i>44</i>
<i>Figura 11. Análisis de secuenciamiento del gen VP1 insertado en el vector pET28a.</i>	<i>45</i>
<i>Figura 12. Análisis de la presencia de la proteína mayor de cápside VP1 mediante SDS-PAGE.</i>	<i>46</i>
<i>Figura 13. Análisis de la localización de la proteína recombinante mayor de cápside VP1.</i>	<i>47</i>
<i>Figura 14. Análisis de la purificación de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE.</i>	<i>48</i>
<i>Figura 15. Análisis de la purificación de la proteína recombinante mediante Western blot.</i>	<i>49</i>
<i>Figura 16. Secuencia de la metodología aplicada.</i>	<i>58</i>

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Secuencias de bases de Sapovirus del genogrupo GII.</i>	31
<i>Tabla 2. Primers diseñados para la clonación del gen VP1.</i>	40
<i>Tabla 3. Enzimas de restricción EcoRI y HindIII.</i>	40

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

Ab: Anticuerpo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

cADN: ADN complementario

DAB: Diaminobenzidina

DH5 α : Cepa E. coli, DH5 α

DNTPs: Desoxinucleótidos trifosfatados

DTT: Dithiothreitol

GC: Guanina citosina

GII: Genogrupo II

ICTV: Comité internacional de taxonomía de virus

IgG: Inmunoglobulina G

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Kb: Kilo bases

KDa: Kilo Dalton

LB: Luria Bertani

M: Molar

mA: Mili Amperio

ml: Mililitros

mM: mili molar

ORF: marco de lectura abierto (Open Reading Frame)

pb: pares de bases

PBS: Buffer Fosfato Salino (Phosphate Buffered Saline)

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

pET28: Vector de clonación pET 28

qPCR: PCR cuantitativo o PCR de tiempo real

RdRp: RNA polimerasa dependiente de RNA (RNA-Dependent RNA Polymerase)

Rpm: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SaV: Sapovirus

μ M: micro molar

ng: Nanogramos

μ l: Microlitros

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio Virología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia de Lima, durante los meses de mayo a octubre del 2017. El objetivo principal del estudio fue expresar la proteína mayor de cápside VP1 del genotipo II.4 de sapovirus, uno de los genogrupos más predominantes, en un sistema de expresión procariótico como es *Escherichia coli*. La metodología empleada fue como sigue: el diseño de primers se realizó a través de programas bioinformáticos; la extracción del RNA se realizó empleando el kit de extracción viral QiAgen. El RNA fue convertido a cDNA y amplificado empleando los primer diseñados empleando la técnica de PCR convencional. Para el clonamiento del producto de amplificación se utilizó el vector pET28, la expresión de la proteína recombinante se realizó en un sistema procariota y la purificación de la proteína se efectuó mediante la cromatografía de afinidad, el cual se confirmó mediante la técnica de SDS-PAGE y Western blot empleado anticuerpos Anti-His. Se diseñaron los primers forward 5'CCGGAATTCATGGAGGGCAATGCTCGC3' y el primer reverso 5'CCCAAGCTTTTATTCAAGAAACCTGACGGC3'. La amplificación mediante PCR resulto en una sola banda de 1680 pares de bases. Se consiguió clonar el gen VP1 en el vector pET28 sin la alteración del marco de lectura, y se logró expresar la proteína recombinante VP1 en *E. coli* cepa Rossetta. La proteína recombinante tuvo un tamaño aproximado de 60KDa mediante SDS-PAGE y western blot. En conclusión, se logró expresar la proteína recombinante mayor de cápside de sapovirus del genotipo GII.4 de sapovirus en el sistema de expresión procariótico de *E. coli* cepa Rossetta.

Palabras claves: Sapovirus, proteína recombinante, clonación, expresión.

ABSTRACT

The research work was carried out in the Laboratory of Molecular Virology of the Research and Development Laboratories of the Peruvian University Cayetano Heredia of Lima, during the months of May to October 2017. The main objective of the study was to express the major protein of VP1 capsid of sapovirus genotype II.4, one of the most predominant genotypes. Protein expression was performed *Escherichia coli*, a prokaryotic expression system. The methodology used was as follows: primers were designed using bioinformatics tools; viral Runaways extracted using the QiAgen extraction kit; cDNA was prepared from extracted RNA and VP1 gene was amplified by conventional PCR technique using the designed primers. PCR product was cloned in a pET28 cloning vector. Recombinant protein expression was carried out using *E. coli* Rosetta cells, and the purification of the recombinant protein was carried out using affinity chromatography. Protein expression was confirmed by the SDS-PAGE technique and Western blot used with Anti-His antibody. The designed primers were forward primers 5' CCGGAATTCATGGAGGGCAATGCTCGC 3' and reverse primer 5' CCCAAGCTTTTATTCAAGAAACCTGACGGC 3'. Amplification of the VP1 gene of sapovirus, using those primers, resulted in a single amplification band of 1680 base pairs. The amplification product of the VP1 gene was successfully cloned into the pET28 vector without the alteration of the reading frame. After expression and purification size of the recombinant protein VP1 was approximately 60KDa. In conclusion, the sapovirus major capsid protein VP1 of the GII.4 genotype was expressed in a prokaryotic expression system of *E. coli* \ Rosetta strain.

Keywords: Sapovirus, recombinant protein, cloning, expression.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas a nivel mundial son la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años. A nivel mundial ocurren 1700 millones de casos de enfermedades diarreicas y 525 000 muertes en niños (Organización Mundial de la Salud, 2017), provocadas por bacterias, virus y parásitos (Freeman et al., 2017; Organización Mundial de la Salud, 2017). Estas enfermedades son transmitidas por manipulación inadecuada de agua y alimentos los cuales son contaminados con materia fecal. Las enfermedades diarreicas conllevan a la malnutrición o viceversa (la mal nutrición hace que los niños sean más vulnerables a las enfermedades diarreicas). A su vez, cada episodio de diarrea empeora el estado nutricional, siendo así la diarrea, la segunda mayor causa de malnutrición en niños menores de cinco años (OMS, 2017). Las enfermedades diarreicas son consideradas un problema de salud pública, que requiere de un método diagnóstico apropiado, para un tratamiento adecuado.

Después de la introducción de la vacuna contra rotavirus, (Bucardo, Reyes, Svensson, & Nordgren, 2014) norovirus, sapovirus y otros virus han surgido como las causas más importantes de gastroenteritis aguda en niños menores de 5 años (X. Liu et al., 2016), sobre todo en pacientes pediátricos y también en individuos inmunocomprometidos (King, Adams, Cartens, & Lefkowitz, 2012; X. Liu et al., 2016; Oka et al., 2016). Sapovirus humano es un virus no cultivable (King et al., 2012), lo que dificulta el desarrollo de métodos de diagnósticos sobre todo de tipo inmunológico. Por ende, a falta de métodos apropiados de diagnóstico, no se conoce con exactitud la incidencia y prevalencia de Sapovirus, sobre todo en el Perú.

Se conoce que sapovirus humano pertenece a la familia Caliciviridae. Un virus sin envoltura, icosaédrica, con ARN monocatenario de sentido positivo y lineal (King et al., 2012; T Oka, Wang, Katayama, & Saif, 2015). Se clasifica en cuatro genogrupos (GI, GII, GIV y GV)(King et al., 2012) de acuerdo a la secuencia génica de cápside (Oka et al., 2012), siendo el genogrupo GII con mayor brote en los últimos años. En la actualidad, la identificación de este virus se realiza mediante la técnica de PCR en tiempo real, lo que requiere de laboratorios especializados con equipamiento adecuado, en consecuencia, los análisis son costosos y no asequibles a la población, lo que conlleva a la urgencia del desarrollo de métodos de diagnósticos económicos y accesibles.

La proteína mayor de cápside VP1 de sapovirus, debido a su antigenicidad y variabilidad es estudiada como una posible fuente de diagnóstico (Farkas, Deng, Ruiz-Palacios, Morrow, & Jiang, 2006; G. Hansman et al., 2005) directo o indirecto, mediante la producción de antígenos virales recombinantes. El sistema de expresión procariótico de *Escherichia coli* es económico además permite obtener mayor cantidad de proteínas recombinantes a diferencia de otros sistemas de expresión (Farkas et al., 2006). Expresar la proteína recombinante mayor de cápside VP1 de sapovirus permitirá estudiar su antigenicidad y posteriormente una posible producción de anticuerpos policlonales, dicho de otro modo, permitirá desarrollar métodos de diagnósticos inmunológicos económicos, a fin de detectar gastroenteritis causada por sapovirus en el Perú.

1.1. Objetivo General

Expresar la proteína mayor de cápside VP1 del genogrupo II de Sapovirus en el sistema de expresión de *E. coli*.

1.2. Objetivos Específicos

- Diseñar los primers para el clonamiento del gen que codifica la proteína mayor de cápside VP1 de sapovirus, basado en secuencias obtenidas del GenBank.
- Amplificar el gen de interés mediante PCR convencional.
- Clonar el gen de interés mayor de cápside VP1
- Expresar la proteína mayor de cápside VP1
- Purificar la proteína mayor de cápside VP1

1.3. Hipótesis

El sistema de expresión de *Escherichia coli* es adecuado para la expresión de la proteína mayor de cápside VP1 de sapovirus.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Pocos estudios han sido realizados sobre la expresión y caracterización de la proteína VP1 de sapovirus. La clasificación de sapovirus humano en base a la secuencia completa de nucleótidos de cápside, evidenciando que la secuencia que codifica el gen VP1 posee 1680 nucleótidos (Oka et al., 2012), situado en la base de datos del GenBank (GenBank, *National Center for Biotechnology Information* - NCBI) con código de acceso AB429084. Otro grupo de estudio, demuestra que la secuencia del gen VP1 de sapovirus GII posee 1682 nucleótidos, además reportan, que se encuentra entre 5174 a 6856 de la secuencia del genoma completo de sapovirus (X. Liu et al., 2015), reportado en el GenBank del NCBI con número de acceso KP067444.

La secuencia del gen VP1 esta codificada por el marco de lectura ORF1 (Choi et al., 2015; Oka et al., 2009). El codón AUG es imprescindible para la lectura de la secuencia del gen VP1, por lo que se encuentra conservada en todas las cepas de sapovirus humano (G. Hansman et al., 2005), el cual debe ser considerado para el diseño de cebadores. Los cebadores deben contener características específicas que pueda permitirles que sean altamente específicos (Capel & Yuste, 2016), señalan que debe contener de 18 a 30 nucleótidos, temperatura de fusión de 65 a 75 °C, diferencia de temperatura entre primers dentro de 5 °C, el contenido de GC de 40 a 60% (Thermo Fisher, 2017).

En un estudio experimental realizado en la ciudad de Cincinnati, Ohio, Estados Unidos, desarrollaron un inmunoensayo enzimático para la detección de anticuerpos (EIA) específicos de sapovirus y su aplicación en un estudio de seroprevalencia en niños. En éste estudio evaluaron los sistemas de expresión baculovirus y procariota (*E. coli*). Empleando el sistema de expresión de *E. coli* obtuvieron mayor cantidad de proteínas recombinantes de VP1 (Farkas et al., 2006). En otro estudio experimental, en el que expresaron la proteína VP1 en un sistema eucariota y procariota para cumplir con su objetivo principal, no lograron observar claramente las bandas, en geles de SDS-PAGE, de la proteína recombinante VP1 expresada en el

sistema procariota, sin embargo indican que la proteína fue capaz de generar hiperinmunidad en conejos (G. Hansman et al., 2005)

Las investigaciones de la proteína mayor de cápside VP1 de sapovirus, tal como el estudio de ensamblaje de partículas recombinantes de cápside de sapovirus, expresaron la proteína de mayor de cápside VP1 en células eucariotas (Oka et al., 2009) (Hansman et al., 2005) (Hansman, Oka, Sakon, & Takeda, 2007) empleando el sistema de expresión de baculovirus, reportaron que la proteína recombinante mayor de cápside VP1 pesa 60KDa. De forma similar la expresión en el sistema de *E. coli* muestra una proteína recombinante de sapovirus que pesa aproximadamente 60 kDa (Farkas et al., 2006). De igual manera, mediante la técnica de inmunoprecipitación encontraron que la proteína VP1 pesa aproximadamente 60 KDa (Chiba et al., 2000).

2.2. Marco Teórico

2.2.1. Historia

Los sapovirus humanos también llamados virus de Sapporo o calicivirus humano Sapporo, fueron detectados por primera vez durante un brote de gastroenteritis en lactantes en Japón, Sapporo en 1977 (Chiba, Nakata, Numata-Kinoshita, & Honma, 2000; D. Liu, 2012). En 1976 después de la introducción del microscopio electrónico directo, Madeley, Cosgrove, Flawett y Davies fueron los primeros en encontrar los calicivirus y evidenciar que son causantes de gastroenteritis (Chiba et al., 2000). La inmunomicroscopía electrónica dio lugar a la identificación de sapovirus. La incapacidad de poder propagar sapovirus y norovirus en cultivo celular o modelos animales dificultó el progreso en la investigación sobre estos virus, y solo el éxito de clonación del genoma dio lugar a la investigación molecular. Como también se piensa que sapovirus ha estado circulando desde hace más de 20 años atrás de su descubrimiento. En estudios seroepidemiológicos se ha demostrado una distribución mundial de sapovirus como Japón, Estados Unidos, Canadá, China, Kenia y Sudeste Asiático (Chiba et al., 2000). Se cree que los hallazgos que se indican hasta la fecha, pueden ser subestimados debida a la falta de métodos de detección adecuado para los sapovirus (Chiba et al., 2000; King et al., 2012).

2.2.2. Epidemiología de Sapovirus

Sapovirus humanos es un agente causante de gastroenteritis aguda, en los últimos años la detección de este virus ha aumentado en todo el mundo. En el Perú, en un estudio en zonas periurbanas del Perú del 2007 al 2010 en niños menores de dos años, utilizaron la técnica de PCR cuantitativo de transcripción en tiempo real (RT-qPCR), se demostró la presencia de sapovirus (GI, GII, GIV y GV), en el 12,4% (37/299) de casos de diarrea y 5,7% (17/300) en heces no diarreicas. La prevalencia de sapovirus se da especialmente en el segundo año de vida de los niños (Liu et al., 2016). El centro de investigación NAMRU, reportó a Sapovirus, en el Perú, como uno de los virus patógenos y con una prevalencia de 2% de los 91 peruanos adultos de la amazonia, 8% de los 156 adultos viajeros y con 3% de los niños residentes estadounidenses (Gregory et al., 2013).

En el Brasil, en la región amazónica se analizaron un total 156 muestras fecales de niños hospitalizados menores de 10 años mediante RT-PCR, obteniendo una positividad de 3,8% (Region et al., 2016).

En Nicaragua, en un estudio de Sapovirus y Norovirus en niños menores de 5 años después de la implementación de la vacuna contra rotavirus se analizaron 330 niños; reportándose norovirus en un 24 %, sapovirus en un 17 % y de Rotavirus en un 8 % (Bucardo et al., 2014).

En la India, de un total de 778 muestras fecales de niños analizadas, se reportó 2.7 % de muestras positivas a Sapovirus, así mismo dichos pacientes positivos a sapovirus se encontraban con gastroenteritis grave, diarrea, vómitos y deshidratación (Lasure & Gopalkrishna, 2017).

En Irán, de las 42 muestras fecales analizadas de pacientes lactantes y adultos, se reportó que 5 muestras fueron positivas a sapovirus (Romani et al., 2012). En Filipinas, en un estudio en niños hospitalizados con gastroenteritis, Sapovirus (GI, GII y GV) estuvo presente en 7% de los 417 muestras fecales (X. Liu et al., 2015). En Kenia, en un análisis de 334 muestras de heces analizadas a pacientes con diarrea de todas las edades, sapovirus se reportó en el 6% de muestras analizadas (Shioda et al., 2016).

2.2.3. Características generales

Los sapovirus, son calicivirus entéricos que se han detectado en diferentes especies de mamíferos, incluyendo humanos, cerdos, visones, perros, leones marinos, chimpancés y ratas (Oka et al., 2016). Los Sapovirus humanos infectan y causan enfermedades en todas las edades (Oka et al., 2015) y con mayor incidencia en pacientes pediátricos (Liu et al., 2016), debido a que; los viriones de sapovirus son estables al medio ambiente y resistentes a la inactivación por el calor y productos químicos (King et al., 2012) por consecuencia los brotes se dan en ambientes semicerrados y por contaminación fecal, por ende; por transmisión alimentaria, aguas (D. Liu, 2010) de consumo y aguas residuales (OMS, 2006; Sano et al., 2011) siendo así un problema de salud pública (Oka et al., 2015).

La sintomatología asociada a la infección por sapovirus es inespecífica en general son vómitos, náuseas, cólicos, fiebre, escalofríos, cefalea (OMS, 2006), diarrea, deshidratación (Lasure & Gopalkrishna, 2017; Liu et al., 2016), en algunos casos reportan diarrea crónica en pacientes inmunocomprometidos (Dargan, Tofani, Dhanekula, & Quirk, 2016) y distensión abdominal severa (Model & Burnweit, 2016).

2.2.4. Taxonomía de Sapovirus

La taxonomía según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, la especie Sapporo, pertenece al género *Sapovirus* dentro de la familia Caliciviridae (King et al., 2012; T Oka et al., 2015).

2.2.5. Estructura de Sapovirus

Sapovirus no posee envoltura, tienen simetría icosaédrica, con un diámetro de 27- 40nm, la cápside está conformada por 90 dímeros de la proteína estructural mayor de cápside VP1 de 58- 60KDa, la que se logra observar con microscopios electrónico con tinción negativa y crio-electrón (fig. 1) (King et al., 2012). VP1 está conformada por dominios S y P (Miyazaki, Taylor, Hansman, & Murata, 2015)

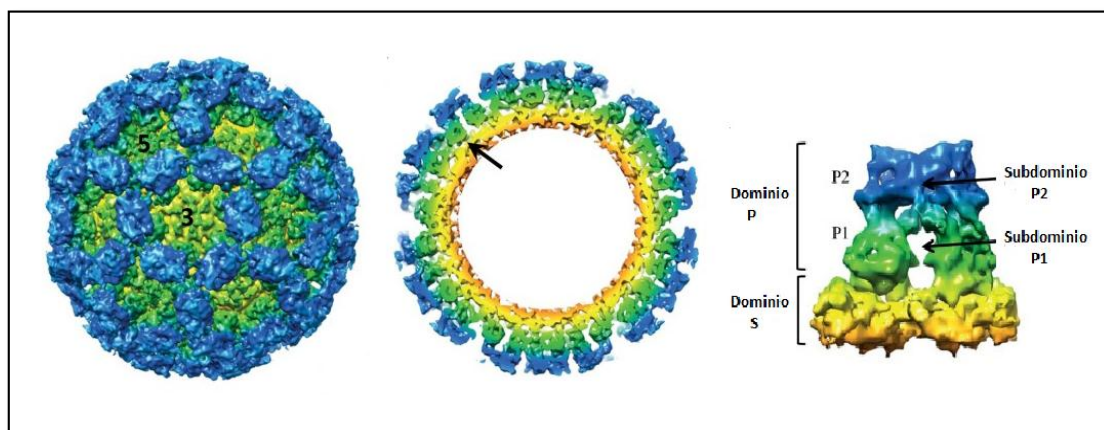


Figura 1. Estructura molecular de la cápside de Sapovirus.
Adaptado de Miyazaki et al., 2015.

2.2.6. Organización génica de Sapovirus

El genoma de *Sapovirus* está conformado de ARN monocatenario de sentido positivo y lineal de 7,1 - 7,7 kb de tamaño con una cola de poli adeninas (poli A) en el extremo 3' (fig. 2) (King et al., 2012; T Oka et al., 2015). Tienen dos o tres marcos de lectura abiertos (ORFs). El genoma de GI, GIV Y GV tienen tres marcos de lecturas (ORFs), mientras que GII tiene dos marcos de lectura (ORFs) (Oka et al., 2005). El ORF1 codifica siete proteínas no estructurales (NS), incluyendo la proteína NS7 que es una ARN polimerasa, la que es seguida de la proteína principal de cápside VP1. El ORF2 codifica la proteína estructural menor VP2 (Oka et al., 2015; Oka et al., 2016). *Sapovirus* humano se clasifica

según la secuencia génica completa de cápside (Oka et al., 2012) en GI, GII, GIV y GV (King et al., 2012), actualmente se reportan 14 genogrupos (Oka et al., 2016)

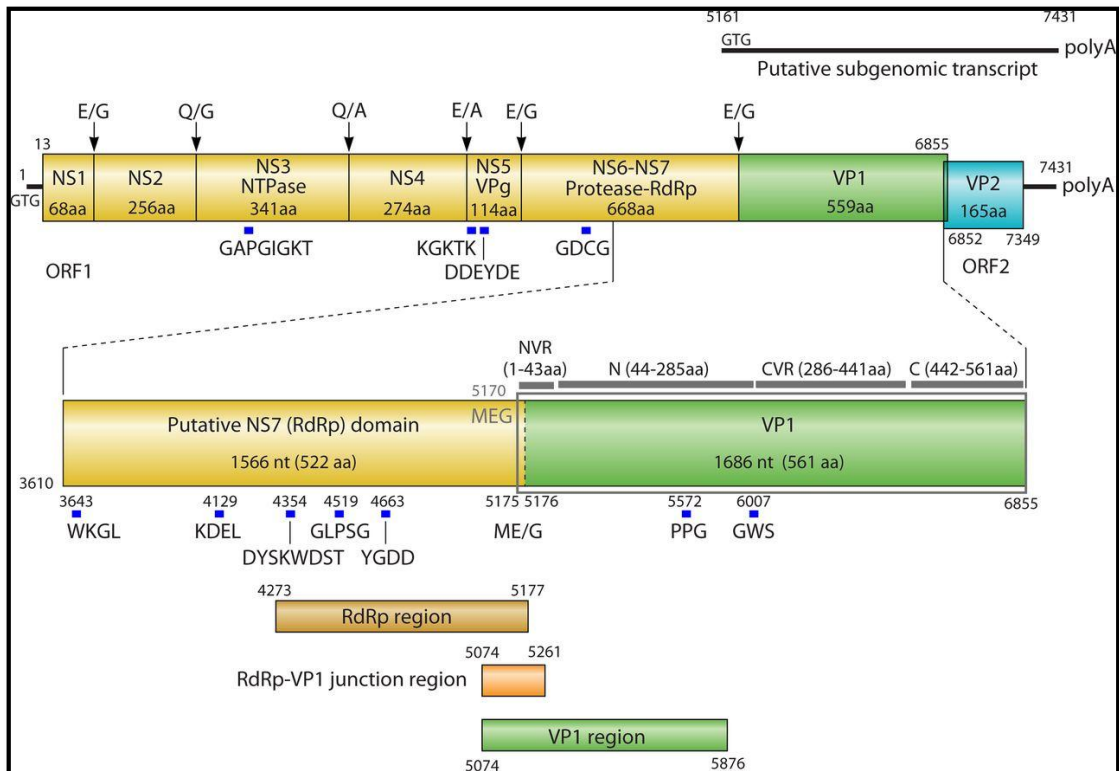


Figura 2. Organización génica de Sapovirus.

Fuente: Oka et al. Clin. Microbiol. Rev. 2015; 28:32-53

2.2.7. Obtención de la proteína recombinante

2.2.7.1. Diseño de cebadores (primers)

El diseño de cebadores o primers es uno de los aspectos más importantes del PCR, el cual permitirá la amplificación del gen diana, asimismo le conferirá especificidad. Por ende, es importante que los cebadores no tengan homología intra-oligonucleotídica en más de 3 pares de bases entre ambos oligonucleótidos, deben tener una temperatura de fusión similar (Capel & Yuste, 2016) con una diferencia dentro de 5 °C, deben contener de 18 a 30 nucleótidos manteniendo un contenido de guanina y citosina de aproximadamente de 40 a 60 % (Thermo Fisher, 2017). Para el diseño de cebadores, la secuencia debe ser obtenida a partir de una base de datos fiable como el GenBank del NCBI, esta secuencia deberá ser analizada con programas bioinformáticos (Moddocks & Jenkins, 2017)

Extracción de ARN y síntesis de cDNA

La extracción del ARN es una técnica similar a la extracción del ADN, con algunas diferencias, por ejemplo en lugar de RNAasas se aplica DNAasas (Karp, 2009). Actualmente existe compañías comerciales que expenden Kits de extracción de ARN con su respectivo protocolo estandarizado, de acuerdo al organismo y tipo de muestra con el cual se quiere trabajar. Para la síntesis del cDNA, utiliza el ARN como material molde, produciéndose múltiples copias de cDNA por PCR (fig. 3) (Passarge, 2010).

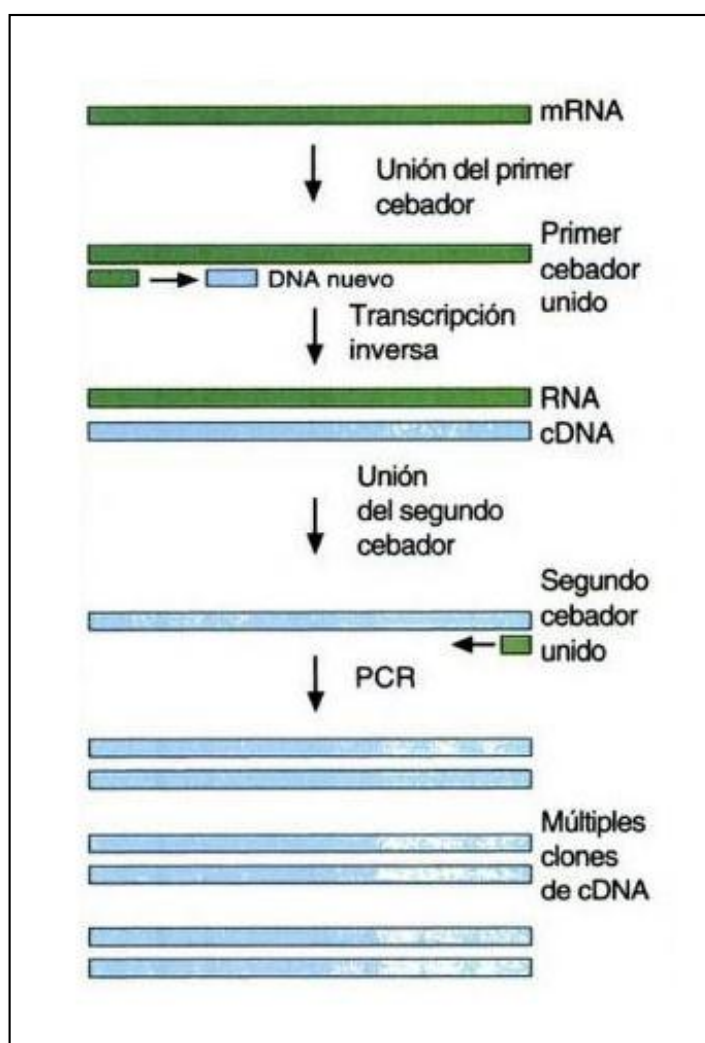


Figura 3. El ARN es copiado a múltiples copias de cDNA con la enzima transcriptasa inversa mediante PCR.

Fuente Passarge, 2010.

2.2.7.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una técnica ideada por Kary Mullis en 1983 (Nelson & Cox, 2014). Es un método que acelero el ritmo de la investigación en el campo de la biología y genética (Klug, Cummings, Spencer, & Palladino, 2012). Es una técnica que permite la amplificación de nucleótidos de secuencias específicas (Alberts et al., 2015), para ello, usa una ADN polimerasa, desoxirribonucleótidos y un molde de ADN. La ADN polimerasa sintetiza la nueva cadena en dirección de 5` a 3` (fig. 4). Además la DNA polimerasas no sintetizan ADN de novo, solo son capaces de añadir nucleótidos a cadenas preexistentes, denominadas cebadores (Nelson & Cox, 2014).

El PCR, para la amplificación tiene tres fases principales:

Desnaturalización; es la fase de calentamiento a 92 – 95 °C (Klug et al., 2012) para que el ADN de doble cadena se *desnaturalice* y así se separe en dos cadenas sencillas (Nelson & Cox, 2014),

Hibridación; es la fase donde la temperatura se reduce un aproximado entre 45 – 65 °C, para la hibridación de los cebadores con el ADN de cadena sencilla desnaturalizada, además la temperatura adecuada para la amplificación dependerá de la longitud del cebador y el porcentaje de GC

Extensión; donde la temperatura de la reacción es entre 65 -75 °C, dando lugar a que la ADN polimerasa pueda añadir nucleótidos.

Para la amplificación se requiere de los siguientes componentes:

- **Enzima ADN polimerasa:** generalmente es una enzima manipulada genéticamente que se activa a temperaturas altas alrededor de 95 °C, esto permite que actúe en ciclos cortos sin inactivarse. La replicación a temperaturas altas impide formación de híbridos y contribuye a la especificidad y rendimiento.
- **Desoxinucleótidos trifosfatados (dNTPs):** Se les denomina a los cuatro nucleótidos trifosfato (dNTP: dATP, dCTP, dGTP y dTTP).
- **Cloruro de Magnesio (MgCl₂):** durante el proceso de la reacción actúa como cofactor.
- **Cebadores o Primers:** Dos oligonucleótidos de secuencias cortas llamados *forward* y *reverse*, diseñados de forma que ambos sean

complementarios en el segmento de ADN molde, así en el PCR puedan dar lugar a la síntesis de la secuencia diana.

- **ADN molde:** Molécula de ADN del organismo de interés.

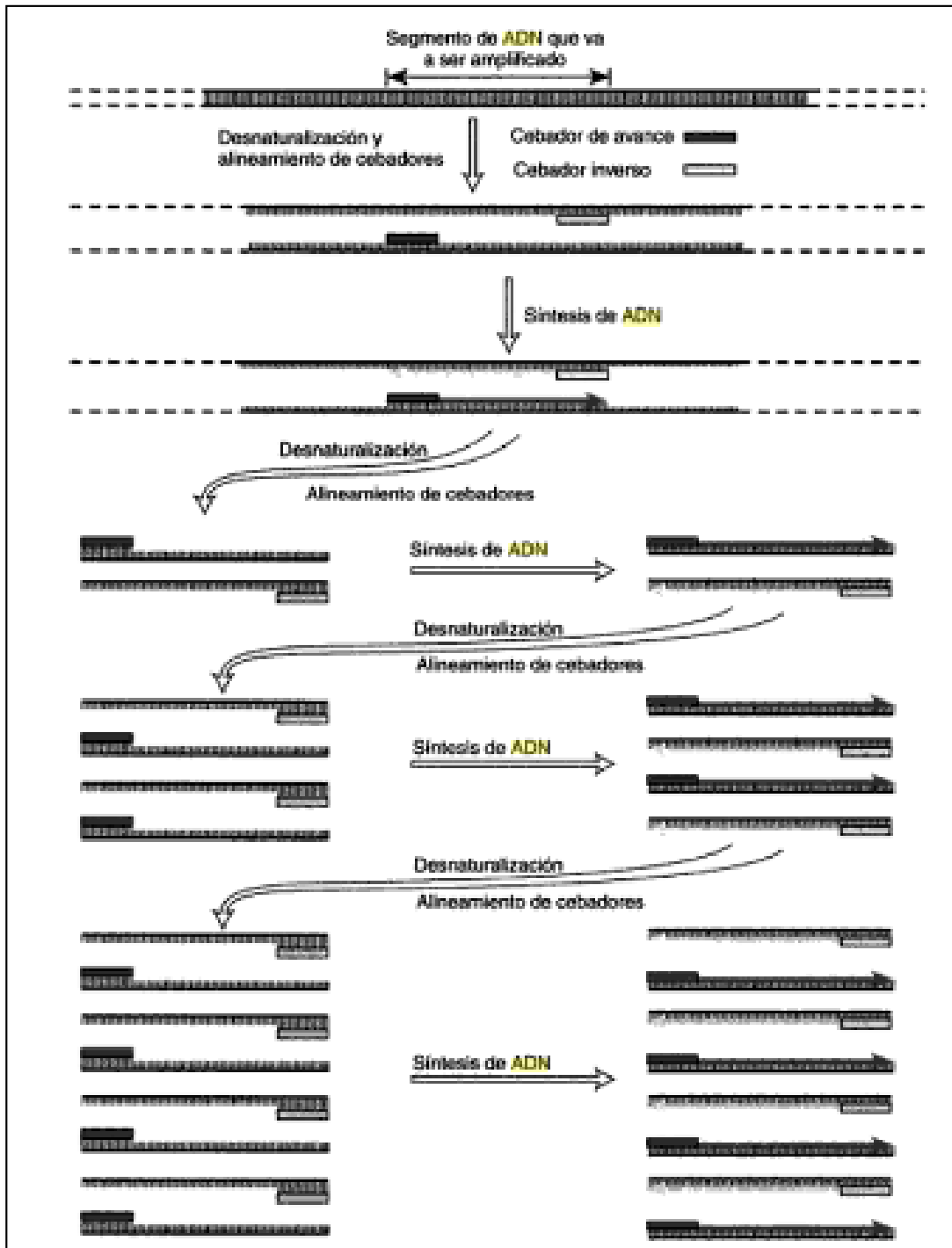


Figura 4. Reacción en cadena de la polimerasa.

La región de ADN específica localizada por los cebadores es amplificada selectivamente de forma exponencial. Obtenido de: (Nussbaum, Macinnes, & Williard, 2005)

2.2.7.3. Tecnología del ADN recombinante.

La tecnología del ADN recombinante o ingeniería genética (Reyes, Hernandez, & Mayek, 2010), inicio con el descubrimiento de las enzimas de restricción (Luque & Herráez, 2006) a finales de la década 1970 permitiendo un gran avance en el campo de la Genética y la Biología Molecular (Klug et al., 2012). La tecnología del ADN recombinante permite aislar y estudiar genes específicos de interés a través de la clonación del ADN y la obtención de copias idénticas, así se puede estudiar la estructura y/o funcionamiento del ADN (Klug et al., 2012; Nelson & Cox, 2014; Snustad & Simmons, 2012).

Para la clonación del ADN la secuencia de ADN de un organismo de interés y el vector (plásmido) son digeridos con enzimas de restricción que deja extremos cohesivos las cuales son unidas por mediante el uso de las enzimas ligasas (Alberts et al., 2015; Krebs, Goldstein, & Kilpatrick, 2012). El plásmido recombinante sirve luego para transformar bacterias las que se encargaran de replicar estos plásmidos y eventualmente producir la proteína derivada de la secuencia del ADN de interés.

Componentes para la clonación del DNA

- **Enzimas de restricción o endonucleasas:** Son enzimas producidas por bacterias como un mecanismo de defensa contra infecciones víricas (Klug et al., 2012). Las cuales típicamente reconocen secuencias dianas entre 4 a 8 pb y otros reconocen más de ocho nucleótidos, cortando la doble hebra del ADN en secuencias específicas de nucleótidos, consiguiendo la hidrólisis de un enlace fosfodiéster de cada hebra (Alberts et al., 2015). Como resultado se obtiene extremos cohesivos de secuencias simétricas palindrómicas o extremos romos, dependiendo del tipo de endonucleasas (fig. 5). Las enzimas empleadas en ingeniería genética, tales como EcoRI y HindIII realizan cortes cohesivos.

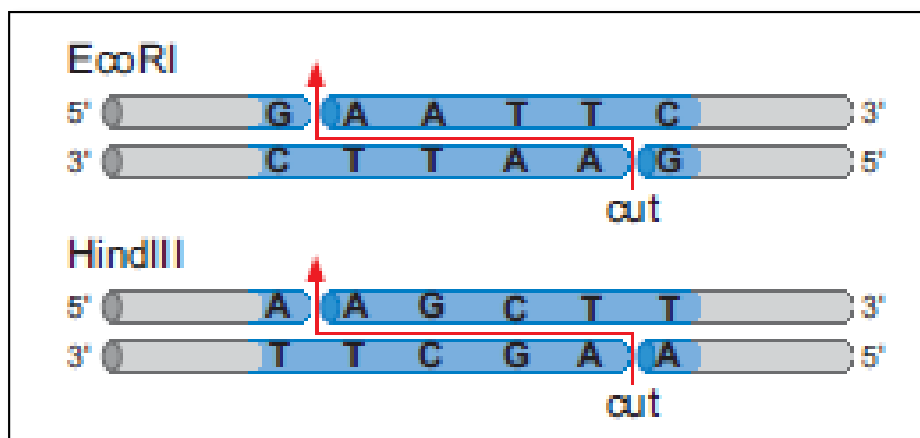


Figura 5. Sitio de reconocimiento y corte de EcoRI y HindIII.

Las enzimas EcoRI y HindIII realizan cortes cohesivos palíndromos. Obtenido de (Watson et al., 2014)

- **Enzima ADN ligasa:** Tiene la función de formar enlaces fosfodiéster del ADN uniéndolos covalentemente (Alberts et al., 2015), así dando lugar al empalme de las moléculas de ADN (Nelson & Cox, 2014).
- **Vector de clonación:** Son plásmidos modificados genéticamente (Klug et al., 2012), son moléculas generalmente circulares de ADN de doble cadena que se encuentran naturalmente en varias especies de bacterias (Krebs et al., 2012), se replican independiente de los cromosomas dentro de las células bacterianas (Klug et al., 2012; Nelson & Cox, 2014), codifican para una gran variedad de enzimas que confieren resistencia a antibióticos y otras propiedades a las células (Nelson & Cox, 2014). Dadas estas características, los plásmidos han sido empleados como vectores de clonación de moléculas de ADN foráneas que permiten el transporte y manipulación del mismo. En la actualidad en la biología molecular se utiliza para la clonación de un fragmento de ADN genómico específico con la finalidad de expresar una proteína (Alberts et al., 2015; Krebs et al., 2012)
- **Vector pET28a:** Es un plásmido modificado genéticamente para la clonación de ADN. Tiene un promotor Lac, lleva His Tag que añade a la proteína recombinante, es resistente a kanamicina (Navogen, 1999), se puede observar algunas características en la (fig. 6).

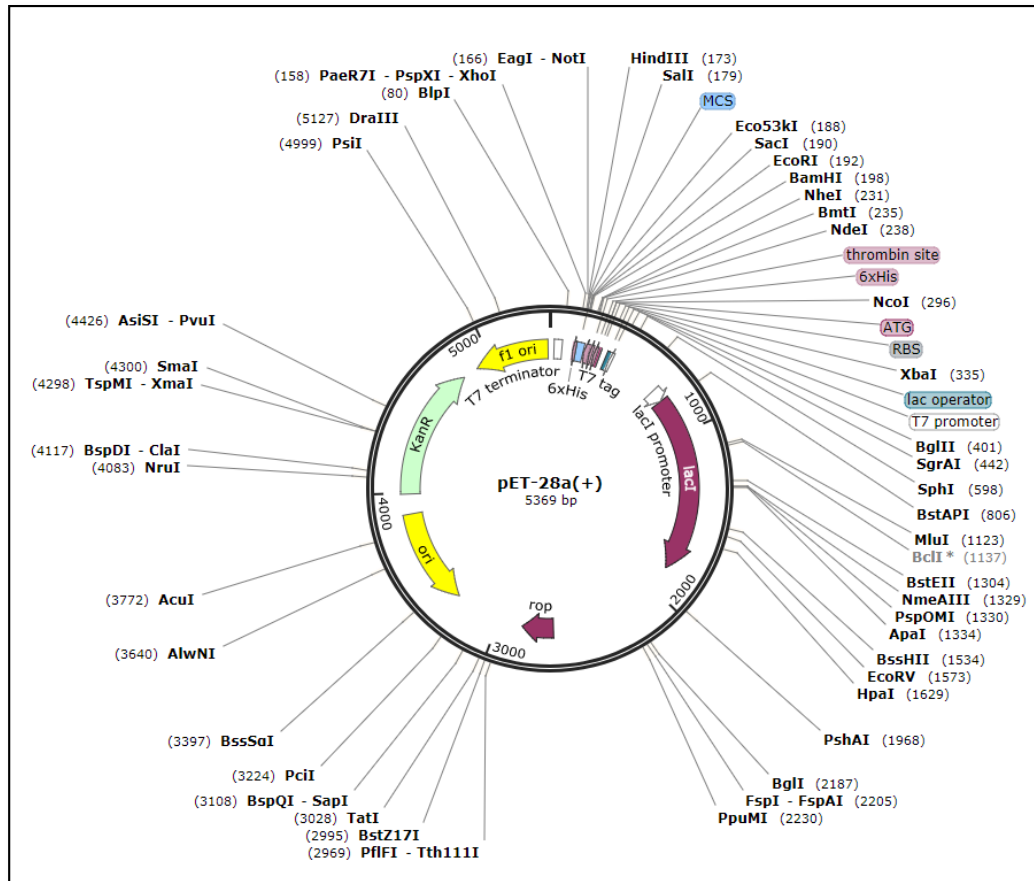


Figura 6. Mapa general del vector plasmídico pET28a.

Obtenido de SnapGen en el 2017.

Células competentes: *E. coli* cepa DH5α

La cepa de *E. coli* DH5α son las más utilizadas para aplicaciones de clonación, es una cepa de células químicamente competentes debido a la eficiencia en transformación de plásmidos de ADN. Está diseñada para la propagación de plásmidos, permitiendo la estabilidad de la inserción y cuidando la integridad del plásmido recombinante (Corporation, 2006; Invitrogen, 2016).

Clasificación Taxonómica de *E. coli*

Reino: Bacteria

Clase: Proteobacteria

Sub clase: Gammaproteobacteria

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Escherichia*

Especie: *Escherichia coli*

Cepa: DH5

2.2.7.4. Sistema de expresión procariota *E. coli* para expresar proteínas recombinantes

La expresión de proteínas recombinantes en un sistema procariota es ampliamente utilizada en la industria biotecnológica con fines diagnósticos y terapéuticos. Se ha favorecido por el uso de *Escherichia coli* debido a su bajo costo, fácil manipulación genética, fácil acceso a las herramientas biotecnológicas (García et al., 2013) y por el corto periodo de expresión a diferencia de otros sistemas de expresión.

***E. coli* cepa rossetta**

Se conoce que la *E. coli* cepa rossetta deriva de la cepa BL21. Son bacterias diseñadas para mejorar la expresión de proteínas eucariotas, compatible con un plásmido resistente a cloranfenicol. Por tanto, las cepas de Rosetta proporcionan una traducción "universal". La Rosetta (DE3) portan el gen de la lisozima T7, DE3 indica que el huésped es un lisógeno de λ DE3, y por lo tanto lleva una copia cromosómica del gen de ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor lacUV5 (Novagen, 2004a). Dichas cepas son adecuadas para la producción de proteínas recombinantes con genes clonados de vectores pET por inducción con IPTG (Novagen, 2004a, 2004b).

2.2.7.5. Purificación de proteína

La purificación de proteínas permite aislar a una proteína específica de una mezcla compleja. La cromatografía de afinidad es uno de los métodos más utilizados y eficientes (Nelson & Cox, 2014). La secuencia etiqueta se añade en la secuencia génica, a manera que las proteínas tengan una etiqueta en un su amino terminal o carboxilo terminal. La etiqueta tiene la propiedad de unirse específicamente a un ligando de tal manera permite la purificación. Uno de los métodos más empleados en la purificación de proteínas recombinantes es la cromatografía de afinidad de metales inmovilizados (IMAC) (Bornhorst & Falke, 2000).

2.3. Marco Conceptual

Cápside VP1: proteína de cápside mayor VP1, una partícula icosaédrica con dos dominios principales S y P que se encuentran conectados a través de una región bisagra flexible (King et al., 2012; Miyazaki et al., 2015).

Cebadores o primers: son dos oligonucleótidos diferentes y complementarios que hibridan a las secuencias del ADN molde, flanqueando la secuencia diana, consecuentemente permitiendo la amplificación correcta por PCR (Katoch, 2011; Wilson & Walker, 2010).

Clonación molecular: es una técnica que permite insertar un fragmento de ADN de interés en un vector que tiene la capacidad de replicación independiente cuando es incorporado en una célula permitiendo así la propagación de la molécula de ADN de interés (Cooper, 2000)

Enzimas de restricción o endonucleasas: Son enzimas bacterianas que sirven como defensa contra el ingreso de ADN extraño, puesto que escinden en el ADN foráneo. Las enzimas de restricción reconocen de cuatro a ocho pares de bases específicos de ADN de cadena doble y cortan ambas cadenas del ADN blanco (Cooper, 2000).

Immobilized metal-affinity chromatography IMAC: la cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados es un método utilizado ampliamente en la purificación de proteínas recombinantes etiquetadas con histidina, para ello utiliza la columna HisTrap (Bio-Sciences, 2016; Bornhorst & Falke, 2000).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Es una técnica *in vitro* que tiene el objetivo de amplificar fragmentos de ADN de interés (Dennis, Chiu, & Allen, 2016; Karp, 2009), generando millones de copias (Karp, 2009).

Sapovirus GII: Virus de la familia Caliciviridae, un agente causante de gastroenteritis aguda en humanos, a diferencia de los demás genogrupos de sapovirus humanos, GII posee dos marcos de lectura (ORFs) (King et al., 2012; Oka et al., 2005).

SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis): Es una técnica que se aplica en la biología molecular a través de la corrida de electroforesis en gel de poliacrilamida que permite la separación de las proteínas de acuerdo al peso molecular (Karp, 2009)

Vector pET28a: Vector bacteriano modificado genéticamente para el uso de clonación de ADN. El vector posee un marcador C-terminal de His y sitios de clonación con enzimas de restricción entre otras cualidades que permiten la clonación y expresión de proteínas recombinantes (Novagen, 2003)

Western blot o Immunoblot: Es una técnica analítica para identificar proteínas después de la corrida de electroforesis y la transferencia a un papel de nitrocelulosa o nylon. Las proteínas es identificada por la interacción antígeno-anticuerpo, mediante el uso de un anticuerpo conjugado a una enzima (Karp, 2009; Wilson & Walker, 2010)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

El estudio de expresión de la proteína mayor de cápside VP1 del genogrupo II.4 de sapovirus en *Escherichia coli* se realizó en el Laboratorio de Virología Molecular, Biología Molecular e Inmunología de los Laboratorios de investigación y desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia de la ciudad de Lima.

3.2. Área de investigación

El estudio de investigación es de tipo experimental.

3.3. Metodología

La metodología experimental que se aplicó para obtener la proteína recombinante mayor de cápside VP1 de Sapovirus del genogrupo II.4 en el sistema de expresión procariota, se efectuó de la siguiente manera:

3.4.1. Diseñar los primers para el clonamiento del gen que codifica la proteína mayor (Vp1) de Sapovirus, basado en secuencias obtenidas del genbank.

El diseño de primers a través de una secuencia consenso, permite obtener primers que sean exclusivos para amplificar el gen VP1 de sapovirus G II.

3.4.1.1. Análisis bioinformático: Diseño de cebadores, elección de enzimas de restricción y análisis *in silico* para la amplificación del gen VP1

Se realizó alineamiento de la secuencia completa correspondiente al gen que codifica la proteína VP1 (reportadas en el NCBI), para ello se utilizó el programa bioinformático Unipro UGENE (UniPro, Rusia)(Okonechnikov et al., 2012), para obtener la secuencia consenso como base para la creación de cebadores que permitan la amplificación del gen VP1 de Sapovirus GII.4.

Tabla 1. Secuencias de bases de Sapovirus del genogrupo GII.

Organismo	Secuencia	Código de acceso al NCBI
Sapovirus Kumamoto6/Mar2003/JPN	VP1 VP2	AB429084
Sapovirus GII	Genoma complete	KP067444

Analizado en el Laboratorio de Nanotecnología y Virología molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo UPCH - LIMA a partir de mayo a octubre del 2017.

Para la expresión protéica se requiere la inserción del gen de interés en un vector de expresión (pET28a), para tal fin se requiere la digestión del inserto y el vector con enzimas de restricción apropiadas. Para ello, se analizó el corte con enzimas de restricción *in silico* empleando el programa bioinformático SnapGene (GLS Biotech, (SnapGene, 2017) con el propósito de seleccionar enzimas que no realicen corte algún dentro del gen o dentro del vector, permitiendo el correcto proceso de inserción, siendo las enzimas seleccionadas EcoRI y HindIII.

3.4.1.2. Extracción de RNA viral

La extracción de RNA viral se realizó a partir de una muestra de heces identificada como positiva para Sapovirus G II.4, empleando el kit QIAmp Viral RNA Mini Kit (QiAgen, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la muestra de heces fue diluida 1/10 en PBS pH=7.4 y centrifugada a 18 000 x g por 10 min. A 140µL del sobrenadante se añadió 560µL de buffer AVL-Carrier. Luego de incubar durante 10 minutos, se agregó 560µL de etanol absoluto, la mezcla fue transferida a una columna de sílica y centrifugada a 21 000 x g durante 1 minuto. La columna fue lavada con los buffers AW1 (500 µl) y AW2 (500 µl) por centrifugación a 6 000 x g y 18 000 x g durante 1 min respectivamente. Finalmente, el RNA viral fue eluido añadiendo 70 µl de buffer AVE y centrifugado a 6 000 x g durante 3 minutos.

3.4.1.3. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó a partir del RNA viral extraído empleando el kit de retro-transcripción SuperScript III Reverse Transcriptase, según protocolo del fabricante (Invitrogen, Estados Unidos). La primera reacción (RNA Primer-mixture) se preparó con las siguientes condiciones: 1ul de agua tratada DEPEC, 1ul de DNTPs (concentración inicial 10mM), 1ul de Random Hexamers (50ng/µl), 7ul de RNA. Esta mezcla se incubo a 65°C por 5 minutos y luego se incubó inmediatamente en hielo por 1minuto. Para la

segunda reacción (Mix de síntesis cDNA) se agregó 2ul RT buffer 10x, 4ul de MgCL₂ (25mM), 2ul de DTT (0.1M), 1ul de RNase OUT (40U/μl), 1ul de SuperScript III RT (200U/μl). De esta mezcla se transfirió 10 μl al “RNA primer-mixture”, el tubo conteniendo la reacción se centrifugo y se incubo en el termociclador a 25°C durante 10 minutos, 50°C por 50 minutos, 85 °C por 5 minutos, seguidamente se colocó en hielo, se centrifugo, se agregó 1ul de RNase H y la mezcla de esta reacción se llevó a incubación a 37°C por 20 minutos.

3.4.2. Amplificación del gen de interés mediante PCR convencional.

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR consiste en reproducir o copiar una secuencia específica de nucleótidos *in vitro* (Duque, 2010). El PCR es una técnica que permite la amplificación a grandes cantidades del segmento de ADN de interés (Nelson & Cox, 2014), en un corto periodo de tiempo (Katoch, 2011; Snustad & Simmons, 2012). Se basa en el uso de la DNA polimerasa que permite la síntesis del ADN en la dirección de 5` a 3` a partir de un molde de ADN (Klug et al., 2012; Nelson & Cox, 2014), usando dos primers diferentes que flanquean el segmento de ADN de interés (Katoch, 2011).

3.4.2.1. Amplificación del gen VP1 mediante PCR

Para la amplificación del gen VP1 se utilizó los primers Fw_SapoV_GII.IV_EcorI_1 y Rv_SapoV_GII.IV_HindIII_1. La mezcla de reacción consistió de 11.2ul de agua libre de nucleasas, 2ul de buffer 10x, 1.6ul de dNTPs (2.5 mM), 2ul de MgCl₂ (50mM), 1ul de RV2.4 (10uM), 1ul de FW 2.4 (10uM), 0.2ul de Taq platinum (5U/μl) y 1ul de cDNA. Para ello se utilizó las siguientes condiciones de amplificación: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación cada ciclo de 95°C por 20 segundos, 58 °C por 40 segundos, y 72°C por 1 minuto con 30 segundos, finalmente se sometió la reacción a 72 grados por 7 minutos. El producto de PCR obtenido se observó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

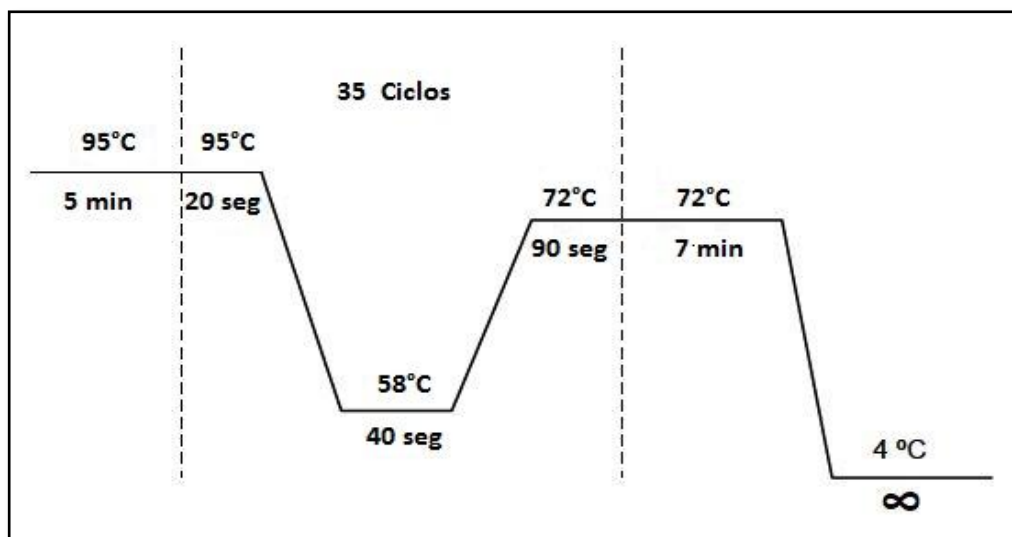


Figura 7. Condiciones de PCR para amplificar el gen VP1. Realizado en el Laboratorio de Nanotecnología y Virología molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo UPCH - LIMA a partir de mayo a octubre del 2017.

3.4.2.2. Purificación y cuantificación del producto de PCR

La purificación del gen VP1 obtenido mediante PCR se realizó empleando el QIAquick PCR purificación Kit (Qiagen). Un total de 100ul del producto de PCR se diluyó en 500 µl de buffer PB, en seguida la mezcla se transfirió a una columna de silica para la capturar del ADN mediante la centrifugación a 18 000 x g durante 1min, descartándose el fluido del colector. La columna se lavó con 750 µl de buffer PE y se centrifugo a 18000 x g durante 1min, después de descartar el fluido del colector la columna se centrifugó nuevamente a la misma velocidad y tiempo. Finalmente, el ADN del gen VP1 fue eluído en 30ul de buffer EB, por centrifugación a 18 000 x g durante 1 min después de un periodo de incubación a temperatura ambiente por 1 min. Obtenido el gen VP1 purificado, se cuantifico la cantidad de ADN presente empleando el equipo Nanodrop-2000 (Thermo scientific, Estados Unidos).

3.4.3. Clonar el gen de interés mayor de cápside VP1

La clonación del ADN, es una técnica donde la secuencia de interés se inserta en un vector que se amplificara independientemente dentro de un sistema celular, dando lugar a la replicación única del vector con el inserto junto al crecimiento celular (una clona),

permitiendo obtener una cantidad considerable para que pueda ser purificada y empleada en procesos posteriores (Beas, Ortuño, & Armendariz, 2009; Klug et al., 2012).

3.4.3.1. Digestión enzimática por endonucleasas (enzimas de restricción)

La digestión enzimática se realizó simultáneamente en el plásmido pET28 y el gen Vp1, obtenido mediante PCR, con la finalidad de generar extremos monocatenarios complementarios. La digestión del ADN y el vector pET28a se realizó con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. La digestión se realizó empleando las siguientes condiciones de reacción: 34.75 µl de agua, 5 µl de buffer3.1 (New England Biolabs, Estados Unidos), 1 µl de EcoRI, 1 µl de HindIII y 8.25 µl de producto de PCR (equivalente a 1 µg). Para la digestión del vector pET28a; 35 µl de agua, 5 µl de buffer 3.1, 1 µl de EcoRI, 1 µl de HindIII y 7.9 µl de pET28. Ambas reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µl los cuales se incubaron a 37°C por 2 horas y luego inactivados a 65°C durante 20 minutos.

3.4.3.2. Ligación del gen Vp1 con el vector pET28

Con el propósito de ligar el gen VP1 en el vector pET28 se preparó la mezcla de reacción que consistió en 5 µl de agua, 9 µl del gen VP1 (digerido), 3 µl del vector pET28 (digerido), 2 µl de 10x buffer T4 (New England Biolab), 1 µl de enzima T4 ligasa (New England Biolab). La mezcla se incubó a 16°C durante toda la noche.

3.4.3.3. Preparación de células competentes

Con el fin de amplificar plásmidos recombinantes y expresar las proteínas recombinantes, se requiere de células competentes de *E. coli* DH5α y *E. coli* Roseta DE3 respectivamente. Para ello, se empleó el método convencional para preparar las células competentes empleando el cloruro de calcio. Con este fin, se sembró una colonia de la bacteria en 4ml de caldo LB (Luria Bertani broth) incubando a 37°C en agitación constante (Incubator Shaker, New Brunswick) toda la noche. Seguidamente, se inoculó 1ml del cultivo y se adicionó a un medio de 50 ml de caldo LB en un matraz de 250ml. Las bacterias fueron incubadas en agitación (200 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica OD 600nm=0,35 a 0,45. A continuación las bacterias fueron incubadas en hiedro durante 10 minutos, centrifugando a 3 000 x g a 4°C por 10 minutos. Al pellet se agregó 20ml de 0.1M CaCl₂ frío, se homogenizó suavemente empleando un vortex y se incubó por 15 minutos en

hielo, seguidamente se centrifugo a 2 000 x g a 4°C por 10 minutos. El pellet fue resuspendido en 1ml de 0,1M CaCL₂ y Glicerol frio. Finalmente se realizó alícuotas de 100ul en crioviales de 2 ml (sosteniéndolos en gradillas de alcohol absoluto previamente congelado a -80 °C toda la noche). Las alícuotas de las células competentes fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

3.4.3.4. Transformación Bacteriana de *E. coli* cepa DH5α

A fin de proliferar el plásmido recombinante (pET28 con el inserto del gen VP1), para la transformación se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α. Para ello, se descongeló 100 µl las células competentes de *E. coli* DH5α en hielo durante 10 minutos, se agregó 2 µl del plásmido pET28 recombinante incubando. La suspensión se incubó a 4°C durante 45 minutos. En seguida se realizó el shock térmico a 42°C durante 45 segundos (Thermolife) y colocando inmediatamente en hielo por 2 minutos. Luego del shock térmico se agregó 1ml de medio S.O.C. y se llevó a incubar a 37°C en agitación constante a 200 rpm durante 1 hora. La suspensión fue luego centrifugada a 6 000 x g por 5 minutos. Se descartó 800ul del sobrenadante y el pellet se resuspendió en los 200ul restantes. Se agregó 100ul a las placas de agar LB conteniendo 34 µg/ml kanamicina (Invitrogen), en seguida se incubó a 37°C durante 36 horas.

3.4.3.5. Selección de colonias y PCR colony

Para confirmar la presencia del inserto del gen VP1 se realizó un PCR colony, para ello, se seleccionó 12 colonias diluido en 10 µl de agua de PCR. La mezcla de reacción consistió de 37 µl de agua de PCR, 5ul de buffer 10x, 1.5 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl de DNTPs (10Mm), 1 µl de FW2.4 (10mM), 1 µl de RV2.4, 0.5 µl de Taq platinum (5U/µl) y 3 µl de la colonia diluida seguidamente se amplificó (Bio-Rad MyCycler Thermal cycler). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 95°C por 5 minutos, seguido de un ciclo de 35 reacciones de 95°C por 20 segundos, 58°C por 40 segundos, y 72°C por 1 minuto con 30 segundos, finalmente se sometió la reacción a 72 grados por 7 minutos. El producto de PCR obtenido se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Los productos confirmados con el inserto del gen VP1 de las cepas diluidas se sembraron en placas de agar LB con kanamicina 34ug/µl (Invitrogen, Estados Unidos) e incubadas a 37°C por 36 horas.

3.4.3.6. Amplificación y purificación del plásmido recombinante

Para la amplificación del plásmido recombinante se sembró una colonia recombinante (cepa *E. coli* DH5 α con el inserto del gen VP1) en 5ml de caldo LB con kanamicina 34 μ g/ μ l (Invitrogen) incubando a 37°C en agitación constante (200 rpm) durante toda la noche. La purificación del vector pET28 recombinante (pET28 con el inserto del gen VP1) se realizó usando el kit QIAprep spin miniprep (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Se centrifugó 2 ml de caldo LB con bacterias recombinantes a 18 000 x g durante 5 minutos, en seguida se descartó el sobrenadante, el pellet se resuspendió con 250 μ l de buffer P1 (50mM Tris-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA, 100 μ g/ml RNase A), 250 μ l de buffer P2 (200mM NaOH, 1% SDS) y 300 μ l de buffer N3 (0.9 M acetato de potasio, pH 4.8), la mezcla se homogenizo invirtiendo en 6 tiempos y se centrifugó a 18 000 x g durante 10 minutos. Seguidamente, el sobrenadante se agregó a una columna de sílica para la captura y lavado del DNA plasmídico. El lavado se realizó por centrifugación a 18 000 x g por un minuto empleando 500 μ l de buffer PB seguido de 750 μ l de buffer. Finalmente, el plásmido fue eluido en 50 μ l de buffer de elución EB (10mM Tris-Cl, pH 8.5). Una alícuota fue enviada para secuenciamiento a la compañía Macrogen (Maryland, Estados Unidos). El resto de plásmido fue almacenado a -80°C hasta su uso.

3.4.4. Expresión de la proteína mayor de cápside VP1

La expresión del ADN clonado en el sistema bacteriano permitirá la producción de la proteína recombinante (Beas et al., 2009). Para ello, será activado con el inductor IPTG que actuara sobre el promotor lac permitiendo la transcripción de la secuencia insertada (Lodish et al., 2005)

3.4.4.1. Transformación Bacteriana de *E. coli* cepa Rossetta DE3

Con el objetivo de expresar la proteína recombinante mayor de cápside VP1, se utilizó la cepa *E. coli* rossetta DE3. Para ello, se descongeló 100 μ l las células competentes de *E. coli* rossetta DE3 en hielo durante 10 minutos y se agregó 2 μ l del pET28 recombinante. El proceso de transformación fue el mismo descrito líneas arriba para la transformación de *E. coli* DH5 α excepto que el cultivo final se realizó en placas de agar LB conteniendo kanamicina 34 μ g/ml y cloranfenicol 50 μ g/ml (Invitrogen).

3.4.4.2. Inducción y expresión de la proteína mayor de cápside VP1

Con la finalidad de obtener la proteína recombinante VP1, se indujo la expresión en *E. coli* cepa rossetta DE3 conteniendo el plásmido recombinante, esta cepa es deficiente en la expresión de proteasas y disminuye el riesgo de proteólisis de la proteína recombinante. Para ello, inicialmente se sembró una colonia (transformada) en un volumen de 30 ml de medio LB a 200 rpm, 37°C durante toda la noche. Luego, el cultivo fue transferido a un frasco conteniendo 300 ml de medio LB con antibióticos Kanamicina 34 µg/ml y Cloranfenicol 50ug/ml (Invitrogen, Estados Unidos) el que se incubo a 37°C, en agitación a 200 rpm (Incubator Shaker, New Brunswick), hasta alcanzar un OD de 0.600 a 600nm (Spectronic Genesis 5). Cuando se obtuvo la densidad óptica requerida se adiciono el inductor Isopropil β-D-Tiogalactopiranosido (IPTG) (Thermo Fisher, Estados Unidos) a una concentración de 0.5 mM. El cultivo se mantuvo en incubación y agitación por 4 horas. Durante este periodo de incubación se tomaron alícuotas de 1ml por cada hora de incubación. Al finalizar el tiempo de inducción después de 4 horas, el cultivo se centrifugo a 3 500 rpm durante 10 minutos, el pellet se resuspendió en buffer fosfato salino (PBS) (Invitrogen, Estados Unidos).

3.4.4.3. Detección de la expresión de la proteína recombinante mayor de cápside VP1 mediante SDS-PAGE

La expresión de la proteína recombinante se verifico mediante SDS-PAGE. Para tal fin, 200µl de cada muestra recogida de la inducción (T0: sin IPTG, T1: 1h, T2:2h, T3:3h T4:4h de inducción) según el OD se trataron con 53.5 µl, 107.5 µl, 133.3 µl, 143.5 µl y 148.3 µl de 1X Sample Buffer (DTT, Tracking Dye y de SDS) respectivamente, los cuales fueron sometidos a 95°C durante 5 minutos. Seguidamente se cargó 15 µl de cada muestra y 5 µl de marcador Precision Plus Protein Dual Xtra Prestained Protein Standards (Bio-Rad, Estados Unidos) en un carril de un gel de poliacrilamida al 10%. El gel fue sometido a corrida electroforética a 5 mA durante 25 minutos, seguidamente de 25 mA durante 40 minutos. Después de la corrida electroforética el gel se tiño con azul de comassie.

3.4.4.4. Tratamiento de lisis celular

Con la finalidad de purificar las proteínas recombinantes VP1, las células fueron sonicadas a una amplitud de 30% durante 6 ciclos de 30 segundos (Sonicator 3000). Seguidamente, la muestra fue centrifugada a 14 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se separó el sobrenadante (proteínas solubles) del pellet (proteínas insolubles). El pellet fue

tratado con 5ml de buffer de urea 8M (GE Healthcare, Reino Unido) mediante pipeteo y vórtex durante 15 minutos, con el propósito de exteriorizar las proteínas que se encuentren en cuerpos de inclusión. El pellet resuspendido fue nuevamente centrifugado a 14000 rpm durante 10 minutos.

3.4.5. Purificación la proteína mayor de cápside VP1

Fundamento: la purificación de proteínas permite aislar a una proteína específica del lisado bacteriano. La cromatografía de afinidad por intercambio iónico, donde los residuos de histidina del C – terminal se unen con fuerza a los átomos de níquel que se encuentra en la columna, en cambio las demás proteínas de la bacteria *E. coli* no se unirán (Lodish et al., 2005). Mediante el buffer de elución se desestabiliza la interacción permitiendo la purificación de la proteína recombinante (Bio-Sciences, 2016; Nelson & Cox, 2014).

La purificación se realizó en el equipo de purificación BioloLogic LP (Bio Rad, Estados Unidos). Previamente, se filtró el sobrenadante del lisado bacteriano (tratado con urea) con la finalidad de descartar restos celulares, para ello, se usó un filtro de 0.22um Millex GP (Thermo Fisher, Estados Unidos). La muestra obtenida se diluyo en buffer fosfato conteniendo 20 mM de imidazol. El equipo de purificación se acondiciono lavando con buffer de unión que presenta 20 mM de fosfato de sodio, 0.5 M de NaCl y a un pH de 7.4, seguidamente con buffer de elución que presenta 500 mM de fosfato de sodio, 0.5 M de NaCl y a un pH de 7.4. En la columna HisTrap 1 ml (GE Healthare, Reino Unido) se cargó 5 ml del buffer de unión. Luego se pasó la muestra acondicionada, seguido de lavado con 10 ml de buffer de elución (GE Healthare, Reino Unido) con diferentes concentraciones de imidazol 40 mM, 60 mM, 100 mM, 300 mM y 500Mm. Las fracciones eluidas se recolectaron en fracciones de 2 ml. La columna fue lavada con 5 volúmenes de agua miliQ y 5 volúmenes de etanol al 20%.

3.4.5.1. Análisis de la purificación de la proteína recombinante mayor de cápside VP1 mediante SDS-PAGE y Western Blot

Para observar la purificación, Se cogió 20µl de cada muestra colectada de la purificación, a los cuales se les agrego 20 µl de Sample Buffer 1X (conteniendo DTT, Tracking Dye y

de SDS). Las muestras fueron sometidos a 95°C durante 5 minutos. Seguidamente se cargó 15 µl de cada muestra y 5 µl de Protein Ladder - Prestained (Clever Scientific Ltd. Reino Unido) en dos geles de poliacrilamida al 10%, sometiéndolos a corrida electroforética de 5 mA por 25 minutos y seguidamente de 25 mA durante 40 minutos. A uno de los geles se tiñó con azul de comassie. El siguiente gel fue para detectar la proteína recombinante VP1 mediante la reacción antígeno-anticuerpo o Western blot. El gel se sometió al proceso de electro-transferencia a filtros de papel de nitrocelulosa mediante la cámara húmeda, durante 2 horas a -20°C. Seguidamente, el papel de nitrocelulosa se incubo con 6 ml de PBS-leche al 1% (Carnation Instant Nonfat Dry Milk, Nestle) con 3 µl de Anticuerpo His-Tag Rabbit AB (Cell Signaling Technology, Estados Unidos) en agitación constante durante 16 horas. Posteriormente, se incubo la nitrocelulosa en 6ml de PBS tween con 3 µl de anticuerpo Goat anti-rabbit IgG unido a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos) en agitación constante por 2 horas. A continuación, se lavó la nitrocelulosa con PBS-tween y PBS cada uno por triplicado con intervalos de 5 minutos. Finalmente, para el revelado se añadió DAB 1X (Tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobenzidina) durante un minuto y la reacción se detuvo con agua miliQ.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Diseño de *primers* para el clonamiento del gen que codifica la proteína mayor VP1 de Sapovirus, basado en secuencias obtenidas del GenBank.

Se diseñaron los *primers* sentido (forward) y antisentido (reverse) para la amplificación del gen VP1 de sapovirus, a partir del consenso obtenido empleando el programa bioinformático Unipro UGENE. Por otro lado, se consiguió seleccionar las enzimas de restricción, con el programa bioinformático SnapGene para evitar el corte dentro de la secuencia del gen. Estos sitios de corte fueron adicionados a las secuencias de los *primers* (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Primers diseñados para la clonación del gen VP1.

Nombre	Secuencia (5' 3')	DIANA
Fw_SapoV_GII.IV_EcoRI_1	CCGGAATTCATGGAGGGCAATGCTCGC	VP1
Rv_SapoV_GII.IV_HindIII_1	CCCAAGCTTTTATTCAAGAAACCTGACGGC	VP1

El diseño se realizó en el Laboratorio de Virología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) UPCH - LIMA a partir de mayo a octubre del 2017.

Tabla 3. Enzimas de restricción EcoRI y HindIII.

Enzimas de restricción	Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
EcoRI (<i>Escherichia coli</i>)	5' GAATTC 3' CTTAAG	5'---G AATTC--- 3' 3'---CTTAA G--- 5'
HindIII (<i>Haemophilus influenzae</i>)	5' AAGCTT 3' TTCGAA	5'---A AGCTT--- 3' 3'---TTCGA A--- 5'

Las enzimas de restricción poseen sitios de corte único en el vector pET28 y sin diana en el gen VP1. El diseño y análisis se realizó en el Laboratorio de Virología Molecular LID - UPCH de Lima, a partir de mayo a octubre del 2017.

El análisis de los primers o cebadores mediante el software BLAST nucleótido (Basic Local Alignment Search Tool <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) *in silico* para la amplificación del gen VP1, mostró que estos cebadores son altamente específicos ya que reconocen únicamente las secuencias VP1 de Sapovirus. El primer *forward* mostro 59,3% de guanina y citosina con una temperatura de fusión de 65,4 °C y el primer *reverse* mostro 46,7% de guanina y citosina con una temperatura de fusión de 61,5 °C. Así mismo, la diferencia en la temperatura de fusión entre los primers *forward* y *reverse* fue menor a 5 °C, por ende, permitió lo unión a la secuencia del gen VP1 en una misma temperatura durante la amplificación en PCR, lo cual es acorde con la referencia (Thermo Fisher, 2017). Por otra parte, se seleccionó las enzimas de restricción EcoRI y HindIII puesto que carecen de sitios de corte en la secuencia del gen VP1 y poseen sitios de corte único en el vector pET28a, según el análisis empleando el programa bioinformático SnapGene (SnapGene, 2017).

4.2. Amplificación del gen de interés mediante PCR convencional.

La amplificación del gen VP1 de Sapovirus del genogrupo GII.4 mediante PCR convencional resulto en una sola banda de amplificación como se evidencia en la corrida de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Este resultado corrobora el análisis mediante BLAST mostrando que los primers eran específicos para sapovirus, puesto que no se observa bandas inespecíficas. El producto de amplificación se observó entre las bandas de 1 500 pb y 2 000 pb (**Figura 8**) el cual es comparable al tamaño, en pares de bases, estimado mediante el análisis *in silico*. Así mismo se observa que después de la purificación, la banda se conserva (**Figura 9**).

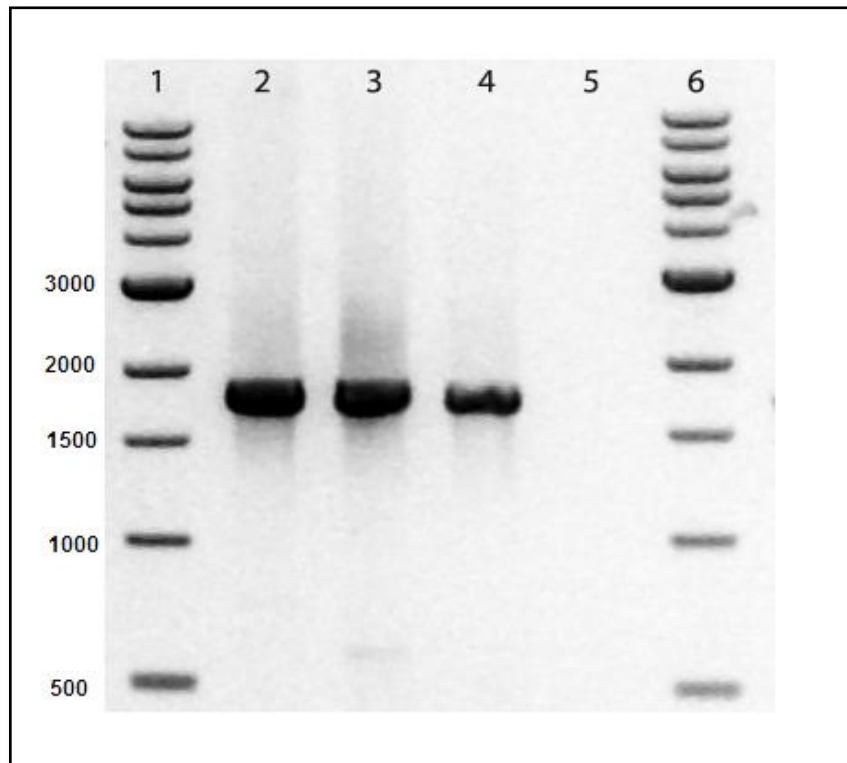


Figura 8. Análisis de la amplificación del Gen VP1 realizado por PCR convencional.

Carril 1 y 6: Ladder 1kb (New England Biolabs, USA). Carril 2, 3 y 4: se observa las bandas de amplificación del gen VP1, así mismo, se observa que no existe la presencia de bandas inespecíficas. Realizado en el Laboratorio de Virología Molecular LID - UPCH de Lima, a partir de mayo a octubre del 2017.

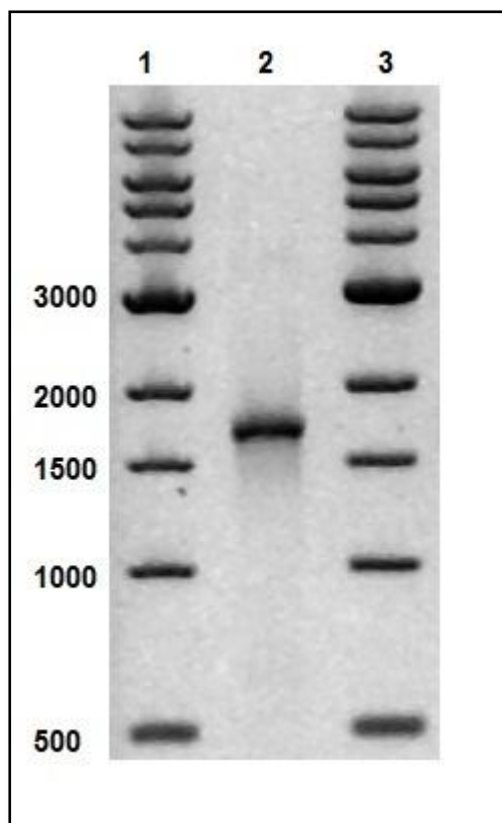


Figura 9. Purificación del producto de PCR del gen VP1.

Carril 1 y 3: ladder 1kb (New England Biolabs). En el carril 2 se observa la banda de aproximadamente 1700pb que mantiene su integridad después del proceso de purificación. Realizado en el Laboratorio de Virología Molecular LID - UPCH de Lima, a partir de mayo a octubre del 2017.

El tamaño del producto amplificado del gen VP1 que codifica la proteína mayor de cápside de sapovirus tiene aproximadamente 1700pb, lo cual es similar al tamaño de la secuencia de referencia del gen VP1 reportada por Oka et al. (Oka et al., 2012) que indica que posee 1680 pares de bases, o lo reportado por Liu et al. (Liu et al., 2015) que indica un tamaño de 1682 pares de bases, con códigos de acceso AB429084 y KP067444 del GenBank del NCBI respectivamente.

4.3. Clonación del gen de interés mayor de cápside VP1

El gen VP1 que codifica la proteína mayor de cápside VP1 de sapovirus se insertó en el vector pET28 utilizando las enzimas de restricción EcoRI y HindIII que realizaron cortes cohesivos específicos. Así mismo se logró una transformación exitosa de las bacterias de *E. coli* cepa DH5 α con el vector conteniendo el gen VP1, para la propagación de dichos

plásmidos. La clonación del gen VP1 fue comprobado a través de 11 colonias que fueron examinadas mediante *PCR colony*, de las cuales 6 colonias mostraron un producto de amplificación compatible con el tamaño del gen VP1, indicando así la presencia del gen VP1 en el vector pET28 (**Figura 10**).

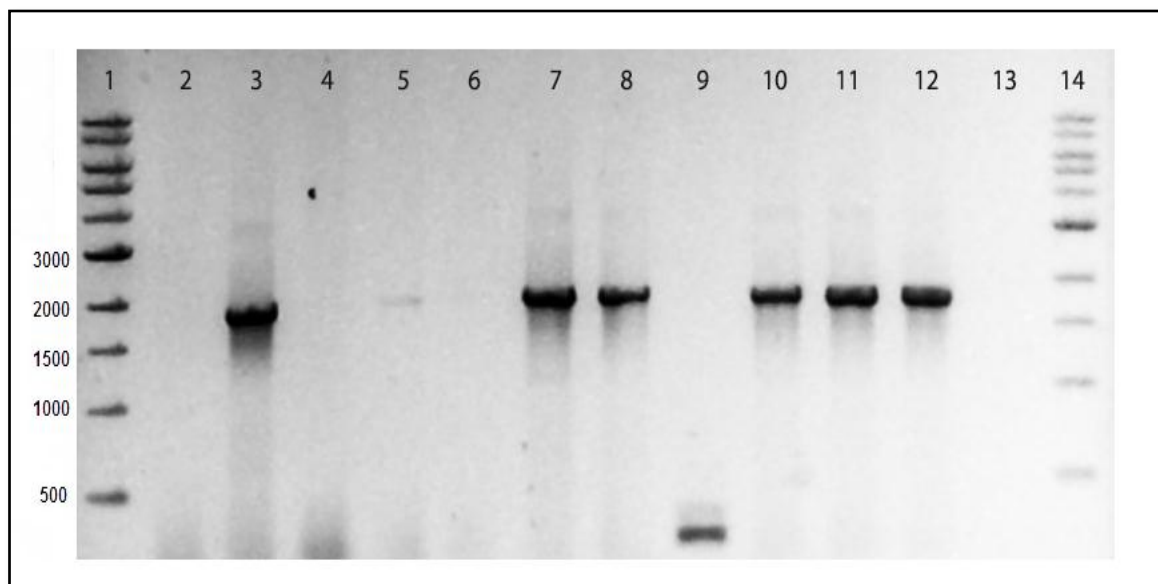


Figura 10. Análisis del Gen VP1 mediante PCR colony.

Carril 1 y 14: Ladder 1kb (New England Biolabs). En los carriles 3, 7, 8, 10, 11 y 12: se observa las bandas de la secuencia del gen VP1 con 1621pb. Realizado en el Laboratorio de Virología Molecular LID – UPOCH de Lima, a partir de mayo a octubre del 2017.

En el proceso de clonación del ADN se muestra que la digestión y ligación del gen VP1 y del vector pET28a se logró adecuadamente, lo que indica que las enzimas de restricción y la T4 ligasa de ADN fueron específicas y adecuadas para la clonación, como es descrito en (Reyes et al., 2010). Por otro lado, el análisis del secuenciamiento del gen VP1 en la inserción del vector, se encontró que el gen VP1 fue insertado adecuadamente, manteniéndose el codón de inicio ATG de la proteína VP1 manteniéndose además el marco de lectura (Polanski & Kimmel, 2007), igualmente corrobora que la bacteria *E. coli* cepa DH5 α es adecuada para este proceso ya que no se observan modificaciones en el gen VP1.

Dos de los plásmidos que fueron positivos al *PCR colony* fueron amplificados en *E. coli* DH5α para su posterior secuenciamiento. El análisis de secuenciamiento evidenció la presencia del gen VP1 en el vector pET28a, así mismo confirmo la conservación del marco de lectura como se observa (**Figura 11**), importante para una adecuada expresión.

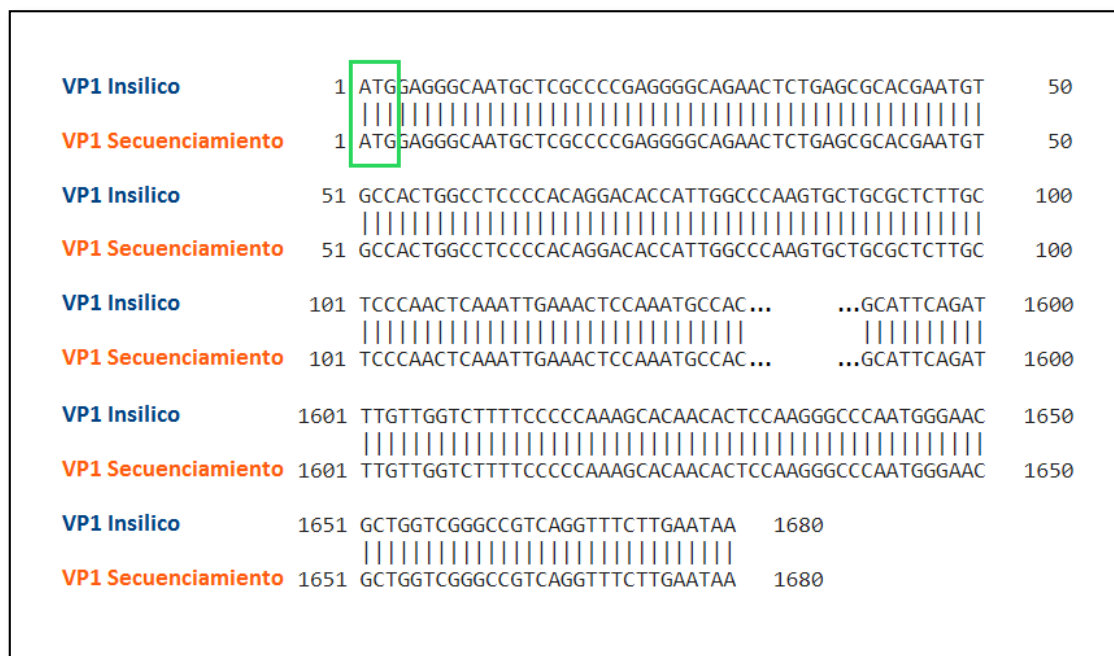


Figura 11. Análisis de secuenciamiento del gen VP1 insertado en el vector pET28a. Se observa que el marco de lectura del gen VP1 se encuentra correctamente. Realizado en el Laboratorio de Virología Molecular LID – UPOCH de Lima, a partir de mayo a octubre del 2017.

El análisis de secuenciamiento indica que la secuencia que codifica el gen VP1 de sapovirus GII.4, tiene 1680 pares de bases el cual es coherente con el estudio reportado por (Oka et al., 2012) donde reporta que el gen VP1 posee 1680 nucleótidos, así mismo (Liu et al., 2015) y su grupo de estudio evidencian que el gen VP1 de sapovirus GII posee 1682 nucleótidos. La diferencia de 2 pares de bases, entre el presente estudio y el estudio de (Liu et al., 2015), podría deberse al genotipo y variabilidad entre cepas de sapovirus, ya que en ambos estudios se clono el gen de sapovirus del genotipo GII.4. El análisis de secuenciamiento muestra igualmente que el codón de inicio ATG se conserva ya que este es imprescindible para la lectura del gen VP1 como es mencionado por (Hansman et al., 2005).

4.4. Expresión de la proteína mayor de cápside VP1

Se logró expresar la proteína recombinante mayor de cápside VP1 de Sapovirus mediante el sistema de expresión procariótico, utilizando las bacterias *E. coli* cepa rossetta DE3 y mediante el inductor de IPTG. En el análisis por medio de SDS-PAGE se observa la presencia de la proteína recombinante de aproximadamente de 60KD, además el control negativo (Sin IPTG) no mostro la presencia de la proteína de 60KDa como se observa en la **Figura 12**.

Después de la expresión, el tratamiento celular con urea y un análisis por medio de SDS-PAGE permitió evidenciar la localización de la proteína recombinante VP1 expresada, indicando que se encuentra en la fracción insoluble de la bacteria como se observa (**Figura 13**).

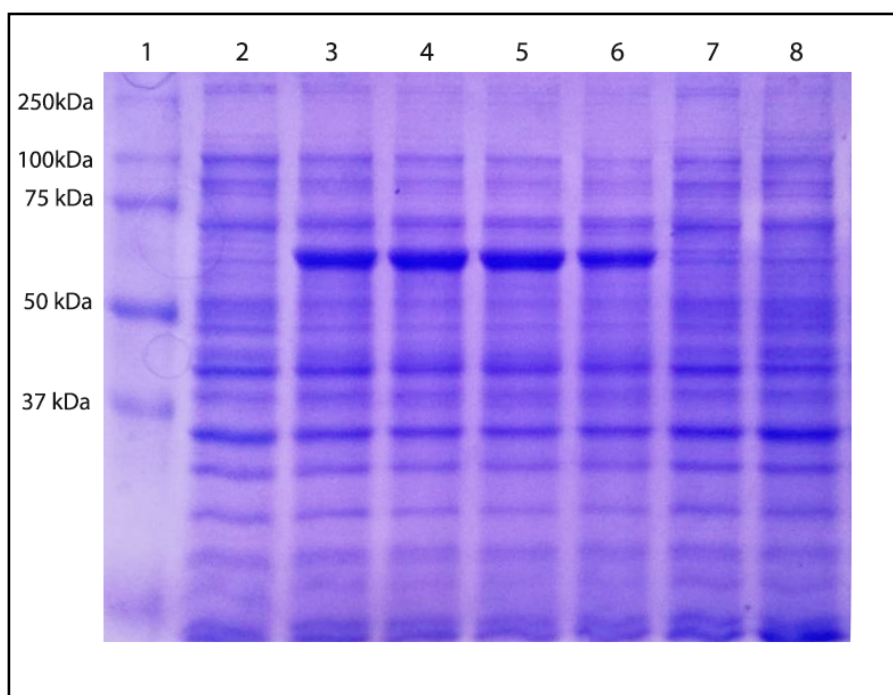


Figura 12. Análisis de la presencia de la proteína mayor de cápside VP1 mediante SDS-PAGE

Se observa la presencia de la banda de proteína de aproximadamente de 60kDA (Carriles 3-6). Carril 1: Marcador de 10 - 250 KDa (Bio-Rad. Estados Unidos). Carril 2: control negativo (sin IPTG). Carril 3, 4, 5 y 6: expresión en 1 hora, en 2 horas, en 3 horas y en 4 horas respectivamente. Realizado en el Laboratorio de Virología Molecular e Inmunología LID - UPCH de Lima, a partir de mayo a octubre del 2017.

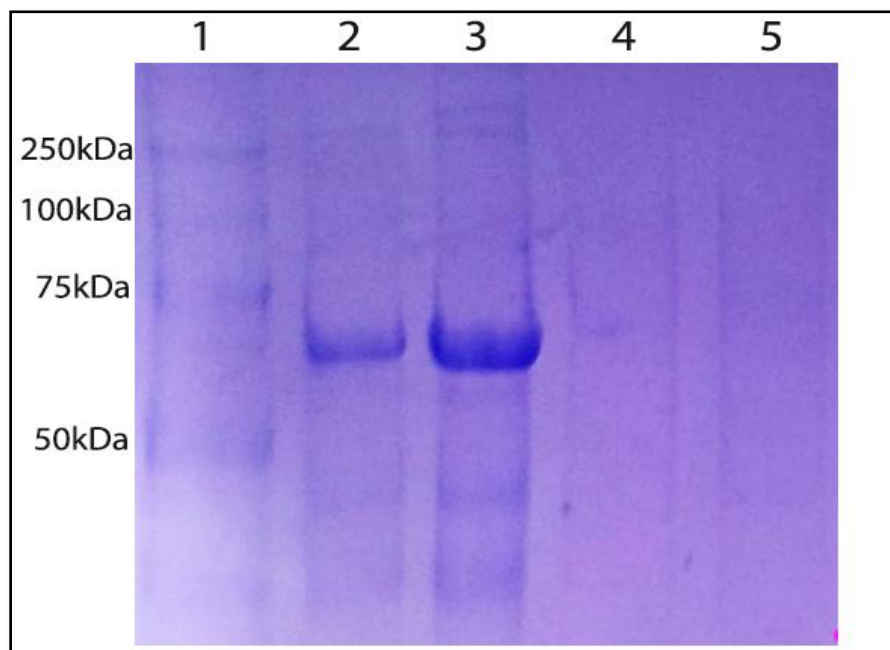


Figura 13. Análisis de la localización de la proteína recombinante mayor de cápside VP1. Se observa la proteína recombinante con aproximadamente de 60 KDa en la fracción insoluble. Carril 1: marcador de 10 - 250 KDa (Bio-Ra1d.). Carril 2 y 3: fracción insoluble además se observa la proteína recombinante VP1. Carril 4 y 5: fracción soluble. Realizado en el Laboratorio de Virología Molecular e Inmunología LID - UPCH de Lima, a partir de mayo a octubre del 2017.

Según los resultados obtenidos de la expresión de la proteína recombinante mayor de cápside VP1 de sapovirus del genogrupo II.4 obtenida en la expresión en *E. coli*, nos indica que el inductor de IPTG activo correctamente el operador lac, que permitió la lectura de la secuencia de interés VP1 y consecuentemente su expresión; lo cual fue evidenciado mediante la técnica de SDS-PAGE. Por otra parte, la proteína VP1 recombinante tuvo un peso molecular de aproximadamente de 60KDa. Este peso concuerda con los resultados reportados para la expresión de esta proteína en sistemas de expresión eucariota y procariota (Farkas et al., 200; Tomoichiro Oka et al., 2009), donde se reporta que la proteína recombinante de cápside mayor VP1 de sapovirus tiene un peso molecular de 60KDa (Hansman et al., 2007). Por otro lado, el tratamiento celular con urea, evidencia que la proteína recombinante se localiza en la fracción insoluble, lo cual es coherente con el reporte de (Hansman et al., 2005). Estos resultados sugieren que la proteína VP1 recombinante se expresó en los cuerpos de inclusión de la bacteria.

4.5. Purificación de la proteína mayor de cápside VP1

Se logró purificar la proteína recombinante mayor de cápside VP1 de aproximadamente 60 KDa, a través del método de cromatografía de afinidad por intercambio iónico, mediante la utilización de la columna His Trap, en el proceso de purificación, la proteína recombinante VP1 se eluyó con una concentración de 300 mM de Imidazol. A fin de confirmar la purificación adecuada de la proteína las fracciones purificadas fueron analizadas mediante la técnica de SDS PAGE, observándose que diversas fracciones presentan la proteína recombinante con un peso de aproximadamente de 60kDa (**Figura 14**). Asimismo, para verificar que la proteína purificada efectivamente corresponde a la proteína VP1 recombinante, las fracciones purificadas, fueron analizadas mediante la técnica de Western blot evidenciándose que el anticuerpo anti-histidina de conejo reconoce las proteínas presentes en las fracciones similares al de gel de acrilamida (**Figura 15**)

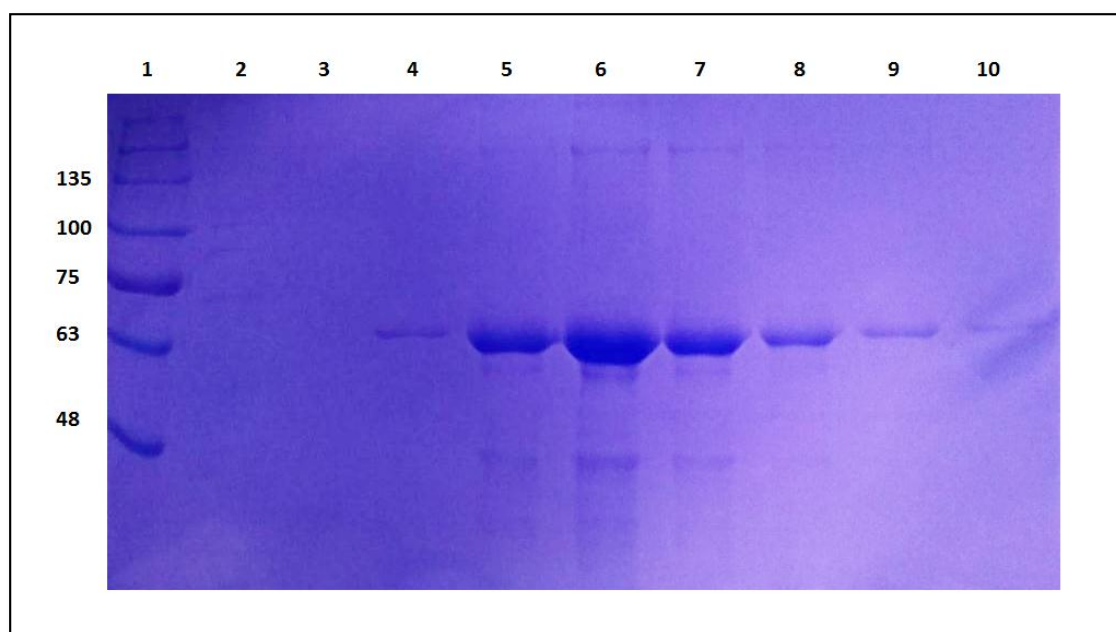


Figura 14. Análisis de la purificación de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE. Carril 1: Ladder 11 – 245kDa (Cleaver Scientific Ltd.). Carril 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 distintas fracciones de purificación donde se observa la proteína VP1 recombinante de aproximadamente 60 KDa. Realizado en el Laboratorio de Virología Molecular e Inmunología LID - UPCH de Lima, a partir de mayo a octubre del 2017.

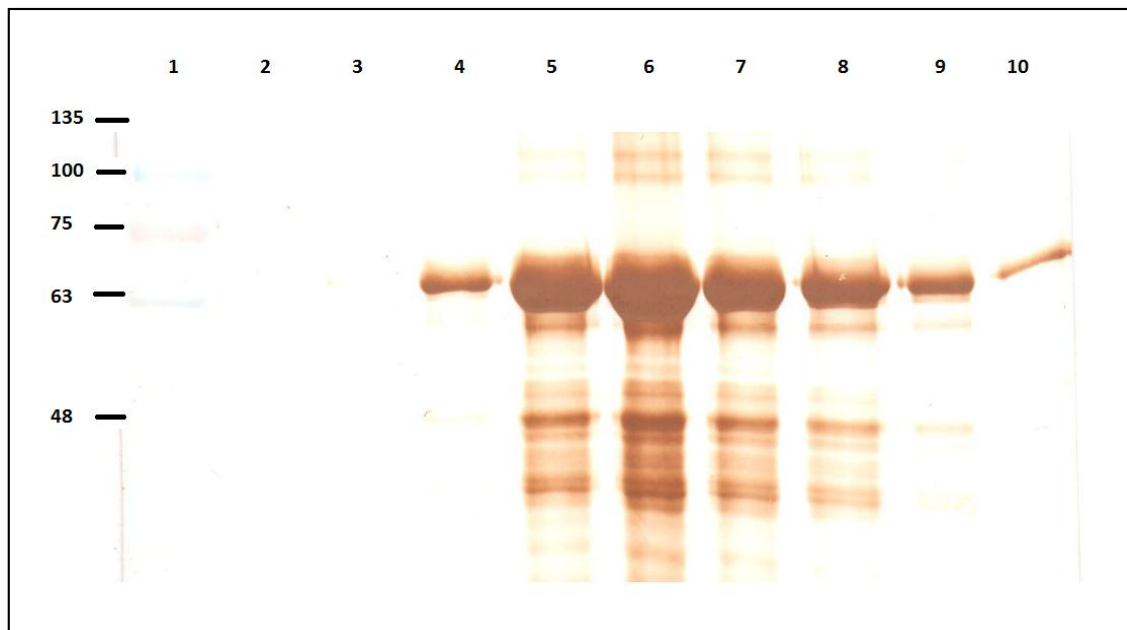


Figura 15. Análisis de la purificación de la proteína recombinante mediante Western blot. Carril 1: Ladder 11 – 245kDa (Cleaver Scientific Ltd. Reino Unido). Carril 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10: fracciones de purificación mostrando la proteína recombinante VP1 con un peso aproximadamente 60 KDa. Realizado en el Laboratorio de Virología Molecular e Inmunología LID – UPCH de Lima, a partir de mayo a octubre del 2017.

La proteína recombinante mayor de cápside VP1 obtenida en este estudio, poseen un peso molecular de aproximadamente 60KDa y se observa un volumen notable, así como fue indicado por (Farkas et al., 2006) , quien empleo también en un sistema de expresión procariota, indicando que la expresión es mayor que en un sistema de expresión eucariota, por lo tanto podemos indicar que este sistema de expresión es adecuado para expresar antígenos virales.

La purificación de la proteína recombinante VP1, fue reconocida gracias a la cola de histidina añadida por el vector de expresión, esta cola es reconocida por anticuerpo anti-histidina mediante el western blot, por lo tanto, podemos indicar que añadir una etiqueta es adecuado para la purificación de las proteínas expresadas y su seguimiento mediante Western blot.

La elución de la proteína recombinante VP1 de la columna de purificación se logró a una concentración de 300 mM de imidazol, una concentración similar a lo reportado anteriormente (Hansman et al., 2005), donde la elución de la proteína recombinante VP1 expresada en *E. coli* se realizó con 250 mM de imidazol.

Por otro lado, el análisis de las distintas fracciones de purificación de la proteína recombinante mayor de cápside VP1 de sapovirus, muestran que solo la fracción inicial de la elución (Figura 15 carril 4) parece contener la proteína pura. Debido a que el anticuerpo empleado reconoce la cola de histidina es posible que la presencia de las proteínas de menor tamaño presentes en las otras fracciones (Figura 15 carriles 5, 6, 7, 8 y 9) sean producto del fraccionamiento de la proteína recombinante. Estas proteínas fraccionadas se producen usualmente como consecuencia de los procesos a los cuales son sometidas las células de *E. coli* para su lisis y principalmente a los procesos de re-solubilización de la proteína expresada en cuerpos de inclusión. El mejorar las condiciones de expresión a fin de que la proteína se exprese como proteína soluble y no en cuerpos de inclusión y un mayor cuidado en el proceso de purificación podrían evitar la presencia de proteínas fraccionadas.

La expresión exitosa de la proteína recombinante mayor de cápside VP1 de sapovirus del genogrupo II.4 de una cepa autóctona del Perú, abre la posibilidad del uso de esta proteína para inmunodiagnóstico. Debido a que el virus no puede ser cultivado el sistema de expresión descrito en el presente estudio sería una buena alternativa para la producción de proteínas antigénicas del virus; sobre todo si se demuestra que esta proteína recombinante muestra una alta sensibilidad y especificidad en la identificación de individuos infectados con el virus.

V. CONCLUSIONES

- Basado en secuencias obtenidas del genbank, se consiguió diseñar los primers *forward* y *reverse* para el clonamiento del gen VP1 que codifica la proteína mayor de cápside VP1 de Sapovirus.
- La reacción en cadena de la polimerasa convencional permitió la amplificación del gen VP1 de sapovirus GII, sin la generación de productos inespecíficos.
- Utilizando las enzimas de restricción EcoRI, HindIII, la enzima ligasa T4, vector pET28 y *E. coli* DH5 α , se logró la clonación del gen VP1 que codifica la proteína mayor de cápside VP1 de sapovirus, sin la alteración del marco de lectura.
- La utilización de las cepas bacterianas *E. coli* rossetta DE3 permitió expresar la proteína recombinante mayor de cápside VP1 de sapovirus con un peso molecular de aproximadamente de 60 KDa.
- Mediante la cromatografía de afinidad se purificó la proteína recombinante a través de la secuencia de 6 histidinas que fueron añadidas al extremo C-terminal por el vector pET28. Estas secuencias sirvieron además para la identificación inmunológica de la proteína recombinante mediante Western blot.

VI. RECOMENDACIONES

- Utilizar otros vectores, para poder obtener con modificaciones post-traduccionales como los puentes de disulfuro.
- Realizar la cuantificación de la proteína (por ejemplo, mediante el método de Bradford) según el tiempo de inducción, para poder conocer el tiempo exacto en el cual se obtiene mayor cantidad de proteínas.
- Estandarizar el método de purificación según a las características de la proteína VP1, como: características bioquímicas, punto isoeléctrico entre otros, así permitirá obtener una proteína más pura que permita su posterior estudio.
- Expresar la proteína en sistemas de expresión más complejos, como el de eucariotas que nos permita obtener proteínas VP1 con modificaciones post-traduccionales.
- Realizar pruebas de ELISA empleando como antígeno la proteína recombinante VP1 para la identificación de individuos infectados con sapovirus.

VII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2015). *Molecular Biology of The Cell*. (S. Lewin & E. Zayatz, Eds.) (Sixth edit). Retrieved from <http://www.loc.gov/catdir/toc/ecip0710/2007005475.html>
- Beas, C., Ortuño, D., & Armendariz, J. (2009). *Biología Molecular (fundamentos y aplicaciones)*. (M.-H. INTERAMERICANA, Ed.) (Primera ed). Mexico.
- Bio-Sciences, G. H. (2016). HisTrap™ HP, 1, 1–28.
- Bornhorst, J., & Falke, J. (2000). Purification of proteins Using Polyhistidine Affinity Tags, *49*(18), 1841–1850. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.01.076>. White
- Bucardo, F., Reyes, Y., Svensson, L., & Nordgren, J. (2014). Predominance of norovirus and sapovirus in nicaragua after implementation of universal rotavirus vaccination. *PLoS ONE*, *9*(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098201>
- Capel, J., & Yuste, F. (2016). *Manual de Practicas de Bioinformatica*. (Universidad de Almeria, Ed.).
- Chiba, S., Nakata, S., Numata-Kinoshita, K., & Honma, S. (2000). Sapporo virus: history and recent findings. *Journal of Infectious Diseases*, *181*(Supple(August)), S303–S308. <https://doi.org/10.1086/315574>
- Choi, H. L., Suh, C. Il, Park, S. W., Jin, J. Y., Cho, H. G., & Paik, S. Y. (2015). Whole-genome sequencing analysis of sapovirus detected in South Korea. *PLoS ONE*, *10*(7), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132328>
- Cooper, G. (2000). *The Cell. A Molecular Approach* (2nd editio). Sunderland: Sinauer Associates. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9950/>
- Corporation, I. (2006). Library Efficiency® DH5α™ Competent Cells. *October*, (18263), 4.
- Dargan, A., Tofani, C., Dhanekula, R. K., & Quirk, D. (2016). Chronic Diarrhea Secondary to Human Sapovirus in a Renal Transplant Recipient, 1–2.
- Dennis, Y., Chiu, R., & Allen, K. (2016). *Clinical Applications of PCR* (Second edi, Vol. 1392). United States of America: Methods in Molecular Biology. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3360-0>
- Duque, J. P. (2010). *Biotecnología panorámica de un sector*.

- Farkas, T., Deng, X., Ruiz-Palacios, G., Morrow, A., & Jiang, X. (2006). Development of an enzyme immunoassay for detection of sapovirus-specific antibodies and its application in a study of seroprevalence in children. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(10), 3674–3679. <https://doi.org/10.1128/JCM.01087-06>
- Freeman, K., Mistry, H., Tsertsvadze, A., Royle, P., McCarthy, N., Taylor-Phillips, S., ... Mason, J. (2017). Multiplex tests to identify gastrointestinal bacteria, viruses and parasites in people with suspected infectious gastroenteritis: A systematic review and economic analysis. *Health Technology Assessment*, *21*(23), 221. <https://doi.org/10.3310/hta21230>
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., & Cruz, O. (2013). Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en escherichia coli. *VacciMonitor*, *22*(2), 30–39.
- Hansman, G., Natori, K., Oka, T., Ogawa, S., Tanaka, K., Nagata, N., ... Katayama, K. (2005). Cross-reactivity among sapovirus recombinant capsid proteins. *Archives of Virology*, *150*(1), 21–36. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0406-8>
- Hansman, G., Oka, T., Sakon, N., & Takeda, N. (2007). Antigenic Diversity of Human Sapoviruses, *13*(10), 1519–1525.
- Invitrogen. (2016). Choosing competent cells based on application, 1.
- Karp, G. (2009). *Biología Celular y Molecular. Conceptos y Experimentos*. (S. A. de C. V. MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, Ed.) (Quinta edi). Mexico.
- Katoch, R. (2011). *Analytical Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. New York: Springer Science Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9785-2>
- King, A., Adams, M., Cartens, E., & Lefkowitz, E. (2012). *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. United States of America: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00045-8>
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2012). *Concepts of Genetics William S. Klug, Michael R. Cummings, Charlotte A. Spencer & Michael A. Palladino*.
- Krebs, J., Goldstein, E., & Kilpatrick, S. (2012). *Lewin. Genes. Fundamentos* (Segunda ed).
- Lasure, N., & Gopalkrishna, V. (2017). Epidemiological profile and genetic diversity of sapoviruses (SaVs) identified in children suffering from acute gastroenteritis in Pune, Maharashtra, Western India, 2007-2011. *Epidemiology & Infection*, *145*(1), 106–114. <https://doi.org/10.1017/S0950268816001953>

- Liu, D. (2010). *Molecular Detection of Foodborne Pathogens*. United States of America.
Retrieved from
https://curis.ku.dk/ws/files/17240028/Molecular_Detection_of_Foodborne_Pathogens.pdf
- Liu, D. (2012). *Molecular Detection of Human Viral Pathogens*. United States of America:
CRC Press. Retrieved from <https://www.crcpress.com/Molecular-Detection-of-Human-Viral-Pathogens/Liu/9781439812365>
- Liu, X., Jahuirra, H., Gilman, R. H., Alva, A., Cabrera, L., Okamoto, M., ... Oshitani, H. (2016). Etiological role and repeated infections of sapovirus among children aged less than 2 years in a cohort study in a peri-urban community of Peru. *Journal of Clinical Microbiology*, *54*(6), 1598–1604. <https://doi.org/10.1128/JCM.03133-15>
- Liu, X., Yamamoto, D., Saito, M., Imagawa, T., Ablola, A., Tandoc, A. O., ... Oshitani, H. (2015). Molecular detection and characterization of sapovirus in hospitalized children with acute gastroenteritis in the Philippines. *Journal of Clinical Virology*, *68*, 83–88.
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.05.001>
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, Keiser, C., Krieger, M., Scott, M., ... Darnell. (2005). *Biología Celular y Molecular* (Quinta edi). Argentina. Buenos Aires: United States by W. H. Freeman and Company.
- Luque, J., & Herráez, Á. (2006). *Biología Molecular e Ingeniería Genética* (primera ed). España. Madrid.
- Miyazaki, N., Taylor, D. W., Hansman, G. S., & Murata, K. (2015). Antigenic and cryo-electron microscopy structure analysis of a chimeric sapovirus capsid. *Journal of Virology*, *90*(5), 2664–2675. <https://doi.org/10.1128/JVI.02916-15>
- Moddocks, S., & Jenkins, R. (2017). *Understanding PCR*. (J. Leonard, Ed.). United States: Sara Tenney.
- Model, L., & Burnweit, C. A. (2016). Case Report Sapovirus Gastroenteritis in Young Children Presenting as Distal Small Bowel Obstruction : A Report of 2 Cases and Literature Review, *2016*, 4–7. <https://doi.org/10.1155/2016/6302875>
- Navogen. (1999). pET System Manual. *Novagen*. United States & Canada: 8th Edition.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwq410>
- Nelson, D., & Cox, M. (2014). *Principles of Biochemistry*. *Lehninger: principles of biochemistry*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Novagen. (2003). pET System Manual. *Biosystems*, 1–68. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs015>

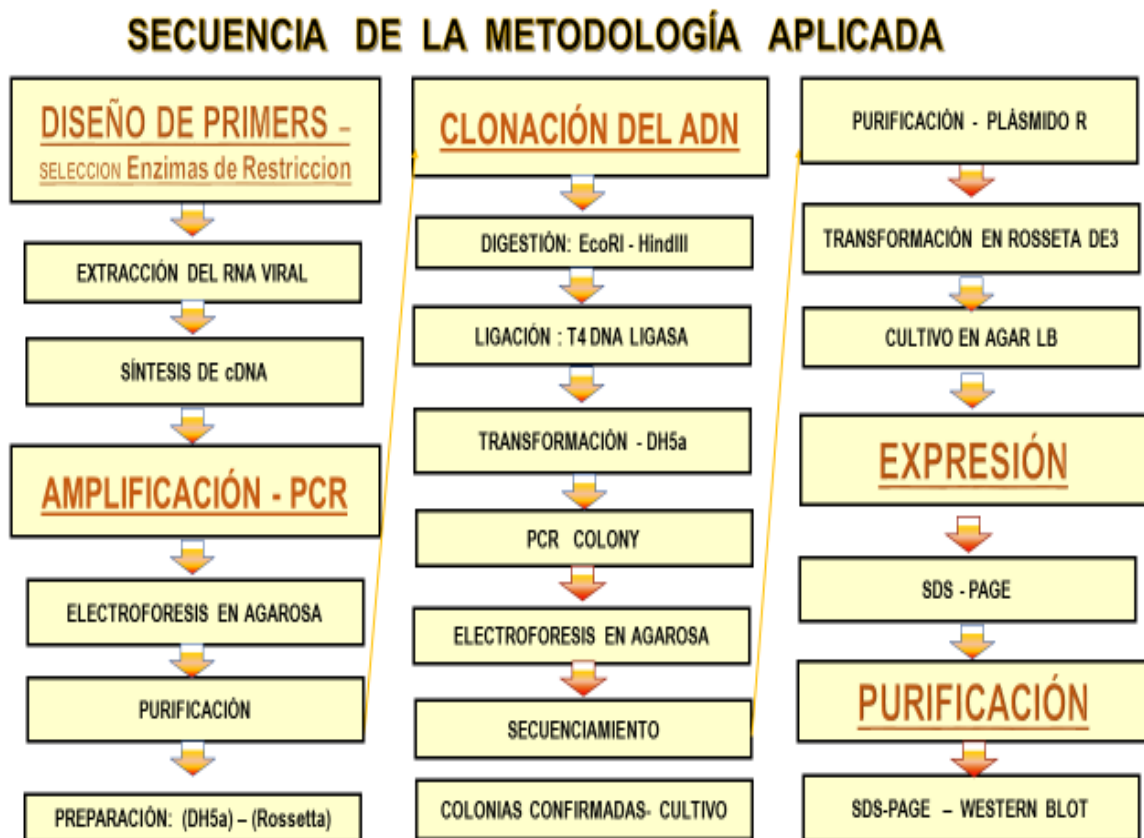
- Novagen. (2004a). Competent Cells. *Components*, 1800, 12.
- Novagen. (2004b). Competent Cells, (User Protocol TB009 Rev. F104), 1–23.
- Nussbaum, R. L., Macinnes, R. R., & Williard, H. F. (2005). *Genética en Medicina* (Quinta edi). España: Elsevier.
- Oka, T., Katayama, K., Ogawa, S., Hansman, G. S., Kageyama, T., Ushijima, H., ... Takeda, N. (2005). Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein. *Journal of Virology*, 79(12), 7283–7290. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7283-7290.2005>
- Oka, T., Lu, Z., Phan, T., Delwart, E. L., Saif, L. J., & Wang, Q. (2016). Genetic characterization and classification of human and animal sapoviruses. *PLoS ONE*, 11(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156373>
- Oka, T., Mori, K., Iritani, N., Harada, S., Ueki, Y., Iizuka, S., ... Katayama, K. (2012). Human sapovirus classification based on complete capsid nucleotide sequences. *Archives of Virology*, 157(2), 349–352. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1161-2>
- Oka, T., Wang, Q., Katayama, K., & Saif, L. J. (2015). Comprehensive review of human sapoviruses. *Clin.Microbiol.Rev.*, 28(1098–6618 (Electronic)), 32–53. <https://doi.org/10.1128/CMR.00011-14>
- Oka, T., Yamamoto, M., Miyashita, K., Ogawa, S., Katayama, K., Wakita, T., & Takeda, N. (2009). Self-assembly of sapovirus recombinant virus-like particles from polyprotein in mammalian cells. *Microbiology and Immunology*, 53(1), 49–52. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00086.x>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., Varlamov, A., Vaskin, Y., Efremov, I., ... Tleukenov, T. (2012). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- OMS. (2006). Guías para la calidad del agua potable, 408.
- Organización Mundial de la Salud. (2017). Enfermedades Diarreicas. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
- Passarge, E. (2010). *Genetica Texto y Atlas*. (Editorial Medica Panamericana, Ed.) (Tercera ed). Madrid España.
- Polanski, A., & Kimmel, M. (2007). *Bioinformatics. Vasa*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-69022-1>
- Region, A., Kathlyn, T., Reymão, A., Hernandez, M., Thalita, S., & Sousa, M. S. De. (2016).

SAPOVIRUSES IN CHILDREN WITH ACUTE GASTROENTERITIS FROM
MANAUS , (1), 2–5.

- Reyes, M., Hernandez, J., & Mayek, N. (2010). *Fundamentos de la Biotecnología Genómica*. (Plaza; & Valdes, Eds.). Mexico.
- Romani, S., Azimzadeh, P., Mohebbi, S. R., Bozorgi, S. M., Zali, N., & Jadali, F. (2012). Prevalence of sapovirus infection among infant and adult patients with acute gastroenteritis in Tehran, Iran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 5(1), 43–48.
- Sano, D., P??rez-Sautu, U., Guix, S., Pint??, R. M., Miura, T., Okabe, S., & Bosch, A. (2011). Quantification and genotyping of human sapoviruses in the Llobregat river catchment, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1111–1114.
<https://doi.org/10.1128/AEM.01721-10>
- Shioda, K., Cosmas, L., Audi, A., Gregoricus, N., Vinj??, J., Parashar, U. D., ... Hall, A. J. (2016). Population-based incidence rates of diarrheal disease associated with norovirus, sapovirus, and astrovirus in Kenya. *PLoS ONE*, 11(4), 1–20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145943>
- SnapGene. (2017). Software for Everyday Molecular Biology. Retrieved from
<http://www.snapgene.com/>
- Snustad, P., & Simmons, M. (2012). *Principles of Genetics* (6th editio). United States of America.
- Thermo Fisher. (2017). Primer Design Tips & Tools. Retrieved from
<https://www.thermofisher.com/pe/en/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos/primer-design-tools.html>
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (2014). *Molecular Biology of the Gene*. (B. Wilbur, Ed.) (Seventh ed). New York: John Inglis.
- Wilson, K., & Walker, J. (2010). *Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology* (Seventh ed). United Kingdom at the University Press: Cambridge University Press.

ANEXOS

Figura 16. Secuencia de la metodología aplicada.



Secuencia de la región codificante de la proteína Vp1 de Sapovirus de GII.4 aislado de una muestra autóctona del Perú, estudiada en el Laboratorio de Virología de la UPCH.

ATGGAGGGCAATGCTCGCCCCGAGGGGCAGAACTCTGAGCGCACGAATGTG
 CCACTGGCCTCCCCACAGGACACCATTGGCCCAAGTGCTGCGCTCTTGCTCC
 CAACTCAAATTGAAACTCCAAATGCCACTGCACAACGTGTTGAACTGGCAG
 CAGCAACTGGAGCAATCACCAGCAATGTTCCCAGTTGCATCAGAGAATGTT
 TCGCCAGTGTCACCACACTCCCCTGGACCACGCGCCAAGCAGCCAACACCT
 TCCTGGGTGCAATCCACCTTGGTCCAAGGATCAATCCTTACACTGCACATAT
 GAGTGCCATGTTTGCAGGATGGGGAGGTAGTTTCCAGGTTTCGCGTCACTC
 TCTGGCTCTGGACTCTATGCAGGGCGTGCTGTTGTGGCTGTCTTGCCACCAG
 GGGTTAATCCAGCAAATGTGCAAAATCCAGGGGTTTTTCCGCACGCGTTTAT
 AGATGCGCGCACCGTGGACCCCATCTTGATCAACCTGCCAGATATCCGGGC
 AGTCGACTACCACCGAGTCGACGGTGACGAACCCACAGCCACCGTTGGCCT
 TTGGGTTGCACAACCGCTCATCAACCCTTTTCAAACCTGGCTCGATATCAACG
 TGTTGGTTGAGTTTTGAGACACGCCCCGGTCCGGACTTTGATTTCTGTCTCT
 TAAGGCCCTGAGCAGGAAATGGACAATGGTGTCTCCCCTGCAAATTTGCT
 CCCGAGACGCCTAGGACGATCTCGAGGCAACCGCCTTGGTGGGCGTATAAC
 AGGTTTGGTGGTGGTGGCCGTTGCAGAACAAGTCAACCATCACTTTGCAGC
 CAACTCAACAACGCTTGGCTGGTCAACGCTCCCAATTGAACCAATTGCGGG
 GGCCGTGTCCTGGTACAAATCCACTGCCTCCAACAGTGTCCGGGGGCTAATT
 GGGGCCGACAGGCAAGGGCATATTTTTCCAAACATTGTCAACCACTGGACA
 GATGTTGCACTCTCTGCCAAGAACTCGGGTCAAACCAACCTGCCTGCCCCA
 ATGCTGACATGAGTGGCTACCCGGGGGCTTCTGGCCCCGTGGTAATGTTCCA
 GAACAATGGTGTGATGTCAATGAGAGCTCAGCTAACCATGGCATACTTACTGC
 AGCCAACCATGATTTTACCACATTGACACAACTTTTGATGCTGCTGGCAGC
 TGGATTTGGATGCCTTGGACTTCAACCAACCTGATGGTACGCAGAACAAAC
 AATGTGTACATCAACCAATTTGGATCAATGGCAACTCTTCCCACCCCATAC
 ACGGTAAGTGTACAAACATGGTTGGCACCAACTTTCAGTTCGGTGGCACTG
 GCACCAACAACATCATGCTATGGCAGGAACAGCATTTCACTTCATGGCCAG
 GAGCAGCAGAGGTCTACTGTTCCAGCTTGAGAGCACCGCAGAGATGTTCC
 AAAACAACATAGTTAACATTCCTGCCAACCAATGGCGGTCTTCAATGTGG
 AAACCTGCTGGGAACACGTTCCAAATTGGCATCTTGCCAAATGGTTACTGTGT
 CACAAACGCTGCCGTTGGCACACCAACTCCTTGACTTTGAACTGCATTC
 AGATTTGTTGGTCTTTTCCCCAAAGCACAACACTCCAAGGGCCCAATGGGA
 ACGCTGGTCCGGCCGTCAGGTTTCTTGAATAA

**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA**

Facultad de Ciencias y Filosofía Alberto Cazorla Talleri

Departamento de Microbiología

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS**CONSTANCIA**

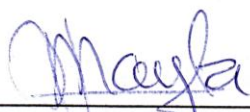
EL COORDINADOR DEL LABORATORIO DE INVESTIGACION EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS

HACE CONSTAR QUE:

La Srta. CLAUDINA SANCHO QUEQUE, Identificado con número de DNI: 70776227, ha realizado el trabajo de investigación, correspondiente a su tesis de para optar el título de Lic. En Biología, intitulado "EXPRESION DE LA PROTEINA MAYOR DE CAPSIDE VP1 DE SAPOVIRUS GII MEDIANTE EL SISTEMA DE *Echerichia coli*" en los ambientes del Laboratorio de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares de la facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Se expide la presente constancia, a solicitud del interesado, para los fines estime por conveniente.

Lima, 27 de abril del 2018



HOLGER MAYTA MALPARTIDA, MSc., PhD.

Profesor Asociado

Coordinador del Lab. Investigación en Enfermedades Infecciosas

Dpto. de Ciencias Celulares y Moleculares

Universidad Peruana Cayetano Heredia