



Programa de estudios de posgrado

**DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR DE dsRNA  
ESPECÍFICO TIPO HAIRPIN EXPRESADO EN LA CEPA  
DE *Escherichia coli* HT115 (DE3) CONTRA WSSV EN  
CAMARÓN *Litopenaeus vannamei***

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

Uso, manejo y preservación de los recursos naturales

(Orientación acuicultura)

Presenta:

**CARLOS ROSENDO ROMO QUIÑONEZ**

La Paz, Baja California Sur, Agosto de 2014

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 27 del Mes de Mayo del 2014, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Diseño y construcción de un vector de dsRNA específico tipo *hairpin* expresado en la cepa de *Escherichia coli* HT115 (DE3) contra WSSV en camarón *Litopenaeus vannamei* "**

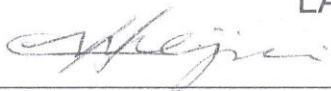
Presentada por el alumno:

**Carlos Rosendo Romo Quiñonez**

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **ACUICULTURA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

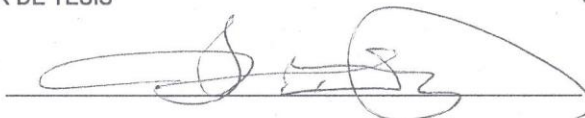
LA COMISION REVISORA



Dr. Claudio Humberto Mejia Ruiz  
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Pedro Cruz Hernández  
CO-TUTOR



Dr. Francisco Javier Magallón Barajas  
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **Director de Tesis**

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

### **Co-Tutor**

Dr. Pedro Cruz Hernández

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

### **Co-Tutor**

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

## **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

## **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Francisco Javier Magallón Barajas

## **SUPLENTE**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez

## RESUMEN

La tecnología del RNA de interferencia ha sido considerada como una posible solución para frenar la Enfermedad del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV) en el cultivo de camarón, debido a su efectividad para reducir significativamente la mortalidad en organismos infectados. Sin embargo, una limitante para la aplicación de esta tecnología es la producción de dsRNA, ya que tradicionalmente su síntesis se genera mediante técnicas de transcripción *in vitro* en kits comerciales, los cuales suelen ser laboriosos, consumen mucho tiempo, resultan costosas, la producción que se genera es limitada, entre otros. Por lo tanto, considerando la enorme cantidad de organismos que se requieren tratar, esta vía de producción de dsRNA no resulta viable. En este contexto, el presente trabajo se enfocó en construir el vector de expresión denominado pJC410 que se basa en el gen *wsv151* del virus WSSV. Usando la cepa de *Escherichia coli* HT115 (DE3), la cual es deficiente en actividad ribonucleasa III, se desarrolló un sistema de expresión bacteriano para producir dsRNA *in vivo* de manera estable. Este método involucra un cultivo de *E. coli* conjugada con la construcción pJC410, extracción de RNA total mediante Trizol, y tratamientos enzimáticos con RNasa A y DNasa I. De esta manera resulta más fácil y menos costoso que las técnicas tradicionales de transcripción *in vitro*, proporcionando una alternativa para preparar grandes cantidades de dsRNA para una aplicación práctica a gran escala en el cultivo de camarón para controlar el virus WSSV.

Palabras claves: camarón, dsRNA, *E. coli* HT115 (DE3), WSSV.

## ABSTRACT

The RNA interference technology has been considered as a possible solution to the White Spot Disease in shrimp farming, because of its efficacy to significantly reduce mortality in infected organisms. However, a limiting factor for the application of this technology is the production of dsRNA that traditionally is generated by techniques of transcription *in vitro* by commercial kits, nevertheless, are often laborious, consuming a lot time, are costly, production of dsRNA is limited for studies of RNAi, and considering the huge amount of organisms that are required to treat, this way of dsRNA production is not feasible. In this context, this present work focuses on building of the expression vector named pJC410 that is based in wsv151 gene of the WSSV virus. Using the *E. coli* strain HT115 (DE3) which is deficient in ribonuclease III activity. We have developed a bacterial expression system to produce dsRNA stably *in vivo*. This method involves a culture of *E. coli* HT115 (DE3) with construction pJC410 by conjugation, total RNA extraction using Trizol, and enzymatic treatments with RNase A and DNase I. This method provides an alternative to prepare large amounts of dsRNA it easier and less expensive than the traditional techniques of *in vitro* transcription, for a practical application in large-scale shrimp farming to combat the WSSV virus.

Key words: shrimp, dsRNA, *E. coli* HT115 (DE3), WSSV

## DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a mi linda esposa y compañera en el camino de la vida, Blanca Maldonado y a mi hijo Carlitos, porque han sido fuente de inspiración para poder lograr mis metas y no sucumbir ante las adversidades. Gracias mi amor por apoyarme en todo momento.

*“Un hombre sabio no es que sabe mucho, sino el que sabe cómo aplicar lo que ya sabe, el otro es un erudito”*

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. De registro 260986), y al proyecto FORDECYT-143117 (Responsable técnico: Dr. Ricardo Pérez Enríquez) por el financiamiento del proyecto.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por las facilidades otorgadas durante mi trabajo en sus instalaciones.

Al Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz, por su paciencia y apoyo en cada uno de sus comentarios, y por facilitarme los medios para la realización de este trabajo.

Igualmente a mis Co-tutores, el Dr. Francisco Javier Magallón Barajas por la dedicación de su tiempo para la revisión de esta tesis, agradezco sus comentarios y recomendaciones. Al Dr. Pedro Cruz Hernández le agradezco también todos sus comentarios, recomendaciones y su tiempo otorgado.

Al Dr. Rodolfo Garza, por sus consejos y apoyo técnico en cada momento.

De manera personal le agradezco a mí compañera y amiga: Ana Ruth Álvarez Sánchez quien además de su amistad me brindó toda su ayuda en los protocolos moleculares y compartió sus conocimientos y experiencia, por toda su paciencia y tiempo que me fueron muy útiles durante toda la maestría.

Al laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos por su ayuda brindada en el uso de los equipos, apoyo técnico y material utilizado en la realización de este trabajo.

Al laboratorio de Microbiología Ambiental por los reactivos donados para este trabajo y su apoyo brindado en el uso de varios equipos.

Al laboratorio de Microbiología Molecular del IBT-UNAM por el gran apoyo técnico incondicional, en especial a la M.C. Josefina Guzmán, gracias Jose.

A mis compañeros de posgrado el vatio, Edgar, Ángel, Gladis, Pilar, Jimmy, Ivonne, Emmanuel, Bob, y Lilian.

A Susy y Ana María por el apoyo incondicional del material bibliográfico, y también de manera personal a Horacio y Manuel por sus facilidades otorgadas en el centro de cómputo y a todos los que apoyaron directamente e indirectamente la realización de este trabajo.

<b>CONTENIDO</b>	<b>pag.</b>
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT .....	v
DEDICATORIAS .....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABLAS .....	xii
GLOSARIO .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	4
2.1 Generalidades del virus WSSV en la camaronicultura .....	4
2.2 Descubrimiento y caracterización del gen <i>wsv151</i> .....	8
2.3 RNAi .....	10
2.3.1 Cascada enzimática del RNAi .....	11
2.3.2 Estudios de RNAi en camarón.....	12
2.3.3 Estudios de silenciamiento con el gen <i>wsv151</i> .....	13
2.3.4 Limitaciones de la tecnología del RNAi.....	15
2.5 Bacterias productoras de dsRNA .....	15
3. JUSTIFICACIÓN .....	17
4. HIPÓTESIS .....	18
5. OBJETIVOS .....	18
5.1 Objetivo general: .....	18
5.2 Objetivos particulares.....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
6.1 Obtención, clonación y confirmación de fragmentos específicos del gen <i>wsv151</i> .....	19
6.1.1 Bacterias de <i>E.coli</i> y Oligonucleótidos utilizados .....	19
6.1.2 Muestras biológicas de camarón.....	20
6.1.3 Extracción de DNA.....	20
6.1.4 Amplificación con Oligonucleótidos modificados con sitio de restricción .....	20



6.1.5 Preparación de células químicamente competentes.....	21
6.1.6 Clonación de los fragmentos de interés en pJET1.2/blunt.....	22
6.1.7 Transformación y determinación de su eficiencia .....	23
6.1.8 Confirmación de clonas positivas mediante PCR de colonia .....	23
6.1.9 Obtención de DNA plasmídico puro .....	24
6.1.10 Secuenciación .....	25
6.2 Diseño y construcción del vector pJC410.....	25
6.2.1 Extracción de DNA plasmídico (pJET1.2::0.6Kb).....	25
6.2.2 Determinación de la orientación del inserto .....	25
6.2.3 Linearización del vector pJET1.2::0.6Kb.....	26
6.2.4 Digestión con <i>NcoI</i> .....	27
6.2.5 Liberación del fragmento de 0.4Kb .....	27
6.2.6 Ligación .....	28
6.2.7 Transformación en <i>E.coli</i> TOP10 .....	28
6.2.8 Confirmación del ensamble .....	29
6.3 Conjugación. ....	29
6.3.1 Preparación de la cepa donadora. ....	30
6.3.2 Conjugación biparental. ....	30
6.3.3 Selección de candidatas y extracción de DNA plasmídico.....	31
6.3.4 Confirmación de la conjugación mediante PCR.....	31
6.4 Inducción de dsRNA .....	32
6.4.1 Extracción de dsRNA por TRIZOL.....	32
7. RESULTADOS .....	33
7.1 Extracción de DNA .....	33
7.2 Amplificación por PCR y clonación en pJET1.2/blunt.....	34
7.3 Transformación y confirmación mediante PCR de colonia .....	36
7.4 Purificación de DNA plasmídico y envío de muestras a secuenciación .....	39
7.5 Análisis bioinformático en <i>BLASTn</i> .....	40
7.6 Estimación <i>in silico</i> de la orientación del inserto viral 0.6 Kb .....	42
7.7 Determinación de la orientación del inserto viral 0.6Kb .....	45

7.8 Linearización del vector mediante la digestión parcial con <i>PstI</i> .....	46
7.9 Digestión con <i>NcoI</i> y ensamble sitio-específico con el fragmento viral de 0.4 Kb ...	47
7.10 Extracción de DNA plasmídico a partir de clonas candidatas .....	50
7.11 Confirmación por análisis de restricción.....	51
7.12 Análisis de la secuencia .....	52
7.13 Confirmación de la conjugación por PCR de colonia .....	53
7.14 Obtención de dsRNA .....	55
8. DISCUSIÓN .....	57
8.1 Uso del gen <i>wsv151</i> para la síntesis de dsRNA <i>in vivo</i> .....	57
8.2 Obtención, clonación y confirmación de las regiones específicas del gen <i>wsv151</i> ....	58
8.3 Construcción del plásmido recombinante pJC410.....	62
8.4 Conjugación biparental y expresión de dsRNA .....	63
9. CONCLUSIONES .....	66
10. PERSPECTIVAS .....	67
11. BIBLIOGRAFÍA .....	68
12. APÉNDICES .....	83

**LISTA DE FIGURAS**

pag.

Figura 1. Serie histórica de producción acuícola de camarón en México .....	1
Figura 2. Estanques cosechados después de una infección viral con WSSV .....	5
Figura 3. Micrografía electrónica de contraste negativa que muestra viriones intactos de WSSV con extensión tipo cola (flechas negras) .....	6
Figura 4. Diagrama que muestra las principales proteínas virales y las estructuras que constituyen un virión de WSSV, tales como envoltura, tegumento, y nucleocápside.....	7
Figura 5. Mecanismo de acción del RNA de interferencia.....	11
Figura 6. Primer estudio de silenciamiento del gen <i>wsv151</i> .....	14
Figura 7. Segundo estudio de silenciamiento del gen <i>wsv151</i> .....	15
Figura 8. Extracción de DNA de camarón <i>L. vannamei</i> positivo al virus WSSV .....	33
Figura 9. Estandarización de las condiciones de PCR.....	34
Figura 10. Amplificación de los fragmentos específicos del gen <i>wsv151</i> .....	35
Figura 11. Confirmación de la transformación mediante PCR de colonia (1) .....	36
Figura 12. Conformación de la transformación mediante de PCR de colonia (2).....	37
Figura 13. Purificación de DNA plasmídico .....	39
Figura 14. Resultados de la secuenciación (1).....	40
Figura 15. Alineamiento de la secuencia del fragmento viral de 0.4 Kb en <i>BLASTn</i> .....	40
Figura 16. Resultados de secuenciación (2). El recuadro muestra los resultados de la secuenciación del fragmento viral de 0.4 Kb.....	41
Figura 17. Alineamiento de la secuencia del fragmento viral de 0.6 Kb en <i>BLASTn</i> .....	41
Figura 18. Mapa de restricción del inserto viral de 0.6Kb mediante el programa <i>NEBcutter V2.0</i> .....	42
Figura 19. Mapa de restricción del vector pJET1.2/blunt (1).....	43
Figura 20. Modelación de patrón de restricción en direccion sentido mediante el programa <i>Serial Cloner 3.1</i> .....	43
Figura 21. Modelación del patrón de restricción en direccion antisentido mediante el programa <i>Serial Cloner 3.1</i> .....	44
Figura 22. Determinación de la orientación del inserto viral de 0.6 Kb .....	45

Figura 23. Linearización de la construcción pJET1.2::0.6Kb .....	46
Figura 24. Mapa de restricción del vector pJET1.2/blunt (2).....	47
Figura 25. Digestión con <i>NcoI</i> a partir de la construcción linearizada.....	48
Figura 26. Liberación del inserto viral de 0.4Kb .....	48
Figura 27. Construcción del vector pJC410.....	49
Figura 28. Extracción de DNA plasmídico a partir de transconjugantes.....	50
Figura 29. Confirmación de la transformación por análisis de restricción .....	51
Figura 30. Secuencia de DNA del constructo pJC410.....	52
Figura 31. Alineamiento de la secuencia del ensamble de la construcción pJC410 en <i>BLASTn</i> .....	52
Figura 32. Confirmación de la conjugación mediante PCR de colonia (1).....	53
Figura 33. Confirmación de la conjugación mediante PCR de colonia (2).....	54
Figura 34. Electroforesis que muestra la producción de dsRNA a partir del sistema microbiano .....	55
Figura 35. Producción de dsRNA a partir del sistema propuesto .....	56
Figura 36. Ubicación de las 2 regiones de interés en el gen <i>wsv151</i> .....	59
Figura 37. Figura que muestra el ensamble sitio-especifico que dio origen a la construcción pJC410. ....	63
Figura 38. Esquema de la expresión y síntesis de dsRNA bajo el sistema microbiano.....	65

## LISTA DE TABLAS

pag.

Tabla 1. Cepas de <i>E.coli</i> utilizadas en este trabajo .....	19
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo .....	19
Tabla 3. Condiciones de PCR utilizando los oligonucleótidos EcoRI-F1 y PstI-Rin151.....	21
Tabla 4. Condiciones de PCR utilizando el set de oligonucleótidos para pJET1.2.....	24
Tabla 5. Condiciones de la digestión parcial con <i>PstI</i> .....	26
Tabla 6. Condiciones de PCR utilizando los oligonucleótidos EcoRI-F1 y PstI-Rin151.....	31
Tabla 7. Lecturas de los productos purificados de PCR mediante espectrofotometría .....	35
Tabla 8. Lecturas de las purificación de DNA plasmídico mediante espectrofotometría ....	39
Tabla 9. Cuantificación de dsRNA obtenido del sistema bacteriano .....	56

## GLOSARIO

- **Agente patógeno.** Es un organismo o virus que provoca el desarrollo de un padecimiento que se conoce como enfermedad infecciosa.
- **Alineamiento en la PCR.** Segunda etapa de la PCR, en la cual se baja la temperatura para permitir que los oligonucleótidos se unan a la región flanqueante del DNA.
- **Bioacumulación.** Proceso de acumulación de ciertos productos dentro de los organismos.
- **Camaronicultura.** Cultivo de camarones.
- **Cepa en bacterias.** Variedad dentro de una misma especie debido a diferencias genéticas. Aunque las cepas varían genéticamente todavía pueden reproducirse. Equivale al término raza en plantas y animales. Colonia de microorganismos mono-específica la cual se utiliza para iniciar un cultivo bajo condiciones controladas.
- **Clonación.** se refiere básicamente al inserto de DNA amplificado mediante PCR (DNA pasajero o inserto) en un plásmido apropiado (DNA vector o vehículo) mediante un proceso denominado ligación, previa linearización (digestión o restricción). Para que esta construcción (DNA recombinante o manipulado) persista en el tiempo *in vivo* es necesario introducirla en un hospedero (del inglés “host”) apropiado, como *E. coli* (que previamente se ha hecho “competente” para favorecer la entrada del DNA recombinante) y finalmente poder seleccionar aquellas células portadoras del DNA recombinante utilizado en el proceso.
- **DNA.** Ácido desoxirribonucleico comúnmente abreviado como DNA (por sus siglas en inglés), es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.
- **Desnaturalización en la PCR.** Primera etapa en la PCR, en la cual se separan las dos hebras que constituye el DNA por rompimiento de los puentes de hidrógeno entre bases complementarias. El DNA se desnaturaliza a temperaturas superiores a 90°C.
- **dNTPs (desoxinucleótidos).** Nucleótidos cuya pentosa es una desoxirribosa y por ende son los monómeros del ácido desoxirribonucleico (DNA).

- **Electroforesis:** Técnica de separación de sustancias, basada en su desplazamiento en un campo eléctrico debido a su carga neta. Se utiliza con frecuencia para separar mezclas de iones, proteínas o ácidos nucleicos.
- **Enfermedad infecciosa.** Es una desviación negativa del estado de equilibrio fisiológico de un organismo causado por otro organismo o virus; ésta puede ser transitoria o puede llevar a la muerte.
- **Enzimas de restricción.** Endonucleasas que hidrolizan en una forma específica puentes fosfodiéster 3' - 5' entre pares de bases adyacentes en la doble cadena de DNA.
- **Extensión en la PCR.** Tercera etapa en la PCR, en la cual la temperatura es elevada a 72°C para permitir que una DNA polimerasa inicie la síntesis a partir de oligonucleótidos agregando dNTPs libre sobre la hebra que sirve de templado.
- **Gen.** Secuencia en el DNA que codifica un producto determinado, RNA o proteínas.
- **GenBank (Banco génico o genómico).** Base de datos de libre acceso de secuencias nucleotídicas y polipeptídicas, administradas por el National Center for Biotechnology Information (NCBI).
- **Genoma (De la raíz griega *gen*, origen).** Es el total de la información genética, en particular que posee en cuerpo u organismo.
- **Genotipo.** Es la información contenida en los genes.
- **Hospedero.** Es aquel organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí, ya sea un parásito, un comensal o un mutualista.
- **In silico.** Resultados obtenidos por el análisis de datos realizado mediante un software especializado (utilizando algoritmos).
- **In vitro.** Se refiere a una técnica para realizar un determinado experimento en un recipiente inerte de ensayo o bajo condiciones artificiales.
- **Infección.** se refiere a la presencia de un agente patógeno que se multiplica, desarrolla o está latente en un huésped.
- **Inserto.** DNA de interés, el cual es incorporado al plásmido utilizado como vector.
- **Kit.** Anglicismo para referirse a un juego o caja de accesorios con reactivos y ciertos materiales que se venden en conjunto y sirven para desarrollar técnicas específicas.

- **Mapa de restricción.** localización, en una secuencia de DNA, de los sitios de corte de diversas endonucleasas.
- **Nucleótido.** Es el componente estructural básico del DNA. Químicamente es una molécula compuesta por una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y un grupo fosfato.
- **Oligonucleótido.** Es una cadena de ácido nucleico corto de entre 17 a 24 pares de bases que se utilizan para sintetizar *in vitro* regiones específicas de DNA.
- **ORF.** Por sus siglas en inglés *Open Reading frame*. Marco de lectura abierta. Segmento de una molécula de DNA que comienza con un codón de inicio (ATG, TAG) y acaba con un codón de terminación (TAA, TAG, TGA), y tiene el potencial de codificación para sintetizar a una proteína.
- **Patógeno.** Es toda aquella entidad biológica capaz de producir enfermedad o daño en la biología de un hospedero (humano, animal, vegetal, entre otros) sensiblemente predispuesto.
- **Penaeido.** Nombre común para los miembros de la familia de crustáceos Penaeidae, comúnmente denominados camarones o gambas. Un cultivo económicamente importante originario de aguas marinas y salobres de áreas tropicales o subtropicales. Ciclo vital caracterizado por varias etapas iniciales del desarrollo entre las cuales se encuentran; nauplios (5 etapas sucesivas), zoea (3), mysis (3) y postlarva (hasta 22).
- **Promotor.** Es una región en el DNA que señala el inicio de la secuencia codificadora y a las que se le unen los factores de transcripción y la polimerasa.
- **PCR.** Por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en Cadena de la Polimerasa. Es un método enzimático de amplificación de secuencias específicas de DNA, que permite la síntesis *in vitro* de un fragmento de DNA de forma tal que, en cada ciclo del proceso, se duplica el número de moléculas.
- **Plásmido.** Moléculas circulares de DNA extracromosómicas capaces de replicarse de manera independiente del genoma bacteriano dentro de una bacteria. Son portadores de genes de resistencia a antibióticos. Se convierten en vectores de clonación, pues son reestructurados para contener un origen de replicación, un gen marcador (por lo general el de resistencia a un antibiótico), así como sitios de restricción únicos para poder

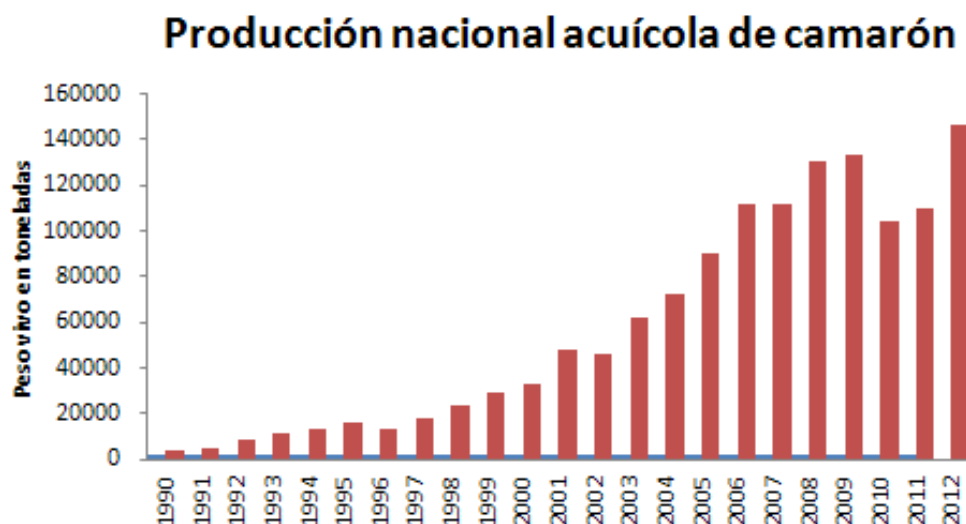
insertar otros fragmentos de DNA. Muchos codifican además para polimerasa de RNA específica, lo que les permite ser utilizados como vectores de transcripción

- **Secuenciación.** Es una técnica que permite conocer el orden de los nucleótidos en una molécula de DNA
- **Sitio de clonación múltiple.** Una secuencia corta de DNA que contiene varios sitios de reconocimiento de enzimas de restricción que está contenida en los vectores de clonación.
- **Transformación:** proceso de intercambio o incorporación genética que ocurre de manera natural, y que permite que porciones de DNA sean transferidas a una célula. Este proceso fue inicialmente observado en *Streptococcus pneumoniae* introducido en un ratón. Por otra parte, se denomina así al mecanismo de introducción del DNA recombinante manipulado *in vitro* en una célula hospedera (sistema bacteriano o eucarionte) para su propagación, identificación y aislamiento. Esto puede realizarse por un procedimiento relativamente simple, en una solución de cloruro de calcio y mediante la aplicación de un choque térmico (a 42°C) durante 90 segundos. El DNA así transformado es capaz de replicarse y expresarse.
- **Vector linearizado:** Vector de DNA circular covalentemente cerrado (normalmente un plásmido) que ha sido abierto por efecto de una digestión con una endonucleasa de restricción, para convertirlo en una molécula lineal. En clonación molecular, el DNA a clonar se mezcla con el vector linearizado y se trata con una ligasa para unir y volver a dar forma circular a la molécula híbrida resultante.
- **Virus.** Es una entidad biológica capaz de autorreplicarse utilizando la maquinaria celular de un hospedero. Es un agente potencialmente patógeno compuesto por una cápside de proteínas que envuelve al ácido nucleico, que puede ser DNA o RNA.



## 1. INTRODUCCIÓN

La creciente demanda en el consumo del camarón, seguida de su drástica declinación de sus recursos naturales y la sobrepesca del mismo, trajeron consigo el surgimiento de la camaronicultura (Morales-Covarrubias, 2010). En México representa la principal actividad acuícola, siendo el camarón *Litopenaeus vannamei* (llamado comúnmente, camarón blanco) la especie más cultivada, debido a su fácil manejo y su buena adaptabilidad al cautiverio, así como su gran demanda y su alto precio en el mercado. Por tal motivo, su cultivo no solamente se ha expandido, sino que también se ha diversificado, intensificado, y avanzado tecnológicamente a pasos agigantados (Martínez-Córdova, 1994; Chaves-Sánchez y Higuera-Ciapara, 2003). Estas características han propiciado que su producción se haya incrementado considerablemente. De acuerdo a cifras oficiales de CONAPESCA, la producción de camarón cultivado ha tenido un aumento significativo de 10 mil hasta más de 100 mil toneladas (1990-2009) (Fig. 1), generando una fuente importante de empleos, alimentación, y participando activamente en la generación de divisas a nuestro país.



**Figura 1. Serie histórica de producción acuícola de camarón en México.** Fuente: Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2013. CONAPESCA.

Desafortunadamente como cualquier otra actividad productiva, esta no está exenta de problemas, ya que en los últimos años, el cultivo de camarón ha tenido serios problemas sobre todo en sanidad (Martínez-Cordero *et al.*, 2011). Siendo las enfermedades virales uno de los mayores impedimentos para la expansión de esta actividad económica. En este panorama, el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (WSSV), ha provocado pérdidas valuadas en miles de millones de dólares debido a mortalidades masivas en la producción de 30% hasta un 100% en la mayoría de la regiones camaroneras, considerándose como el patógeno viral más devastador hasta la fecha.

Continuando con el impacto negativo que este virus ha generado a la camaronicultura se destacan: altas restricciones a la exportación, interrupción de los ciclos productivos, disminución de la confianza de los consumidores para consumir el producto, generando así ganancias reducidas, que por consecuencia han propiciado el cierre de muchos negocios y el aumento de desempleo en esta área productiva (Bondad-Reantaso *et al.*, 2005). Por su parte, los productores apoyados por los comités de sanidad acuícola de cada estado, han buscado soluciones para mitigar esta enfermedad en las granjas de camarón, la cuales se han centrado principalmente en la profilaxis, a través del uso de organismo libre de patógeno específicos, organismos resistentes a enfermedades, y estrictos programas de bioseguridad, que consisten básicamente en la práctica adecuada del manejo del cultivo y la disminución de las condiciones de estrés (Alday, 1999; Chaves-Sánchez y Higuera-Ciapara, 2003; Martínez-Cordero *et al.*, 2011). No obstante, las altas densidades poblacionales que usualmente se utilizan en los cultivos semi-intensivos, propician la rápida propagación de estos agentes infecciosos (Lightner, 2005; Barracco *et al.*, 2008). En este contexto, diversos autores han sugerido que la tecnología del RNAi puede ser una posible solución para frenar la rápida difusión de la enfermedad del Síndrome de la Mancha Blanca (ESMB) en la camaronicultura a nivel mundial, dada su efectividad bajo condiciones experimentales (Robalino *et al.*, 2004, 2005; Kim *et al.*, 2007; Tirasophon *et al.*, 2007; Escobedo-Bonilla, 2011).

La tecnología del RNAi ha permitido abrir un nuevo enfoque en el estudio del camarón, con el fin de entender y descifrar las funciones de los genes asociados a los procesos fisiológicos y biológicos, así como las interacciones patógeno-hospedero (Vaca, 2004, Labreuche y Warr, 2012). Sin embargo, a menudo surgen obstáculos en la aplicación de nuevas tecnologías, siendo la producción de RNA de doble cadena (dsRNA), uno de los principales cuellos de botellas, debido a que convencionalmente la síntesis de estas moléculas son llevadas a cabo mediante Kits comerciales, que dadas las limitantes de producción, tiempo, modo de aplicación, y sobre todo costo, resultan poco viables en campo, por la enorme cantidad de organismos que se requieren proteger en los estanques de producción camaronícola. La razón por la cual se hace tanto énfasis en la producción o síntesis de dsRNA, es debido a que el dsRNA es el sustrato inductor que dirige la inhibición específica de mensajeros homólogos a esté, en el proceso del RNAi (Fire *et al.*, 1998).

Abordando esta temática, el presente trabajo de investigación consistió en diseñar una construcción plasmídica, denominada pJC410 para producir dsRNA específico de un fragmento gen *wsv151* (también llamado ORF89) bajo un sistema bacteriano. El modelo de producción utiliza la cepa bacteriana *Escherichia coli* HT115 (DE3) apoyándose en los trabajos reportados de Timmon *et al.* (2001), Ongvarrasopone *et al.* (2007), y los estudios descritos por Studier *et al.* (1990) sobre el uso de la RNA polimerasa T7 para la expresión directa de genes clonados, dadas las características de la cepa bacteriana.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del virus WSSV en la camaronicultura

De todos los virus que afectan al camarón de cultivo, el virus WSSV es considerado el patógeno viral más devastador para la camaronicultura a nivel mundial (Lightner, 2011), y se caracteriza por poseer un amplio espectro de vectores y hospederos potenciales que pueden acumular concentraciones elevadas de WSSV viables, entre estos se destacan: rotíferos, bivalvos, gusanos marinos, cangrejos, langostas espinosas, y crustáceos no decápodos, incluyendo *Artemia salina* y copépodos, e incluso artrópodos acuáticos no crustáceos, como *Ligia oceánica* (isópoda) y larvas de insectos *euphydradae* (Lightner, 1999; Sangamaheswaran y Jeyaseelan, 2001; Morales-Covarrubias, 2010). El virus WSSV se transmite de manera horizontal por ingestión directa de tejido infectado, ya sea por depredación, canibalismo, ingestas de mudas, o por exposición directa a altas densidades de partículas virales ( $10^7$ /mL) en el agua (Rodríguez *et al.*, 2001; Leu *et al.*, 2009; Sánchez-Paz, 2010). Por otra parte, Lo *et al.* (1997), basándose únicamente en estudios de hibridación *in situ* y microscopía electrónica de transmisión, asumen que el virus WSSV posiblemente pueda transmitirse verticalmente (reproductores infectados a la progenie), a través de células conectivas presentes en el espermatóforo, ya que la no infección del virus en los huevos maduros, puede implicar que los huevos infectados murieron antes de la eclosión. Aunque, es más probable que esta infección se dé por la contaminación externa de los huevos y no por los ovocitos o espermatozoides que contengan partículas virales (Álvarez-Ruiz, 2012).

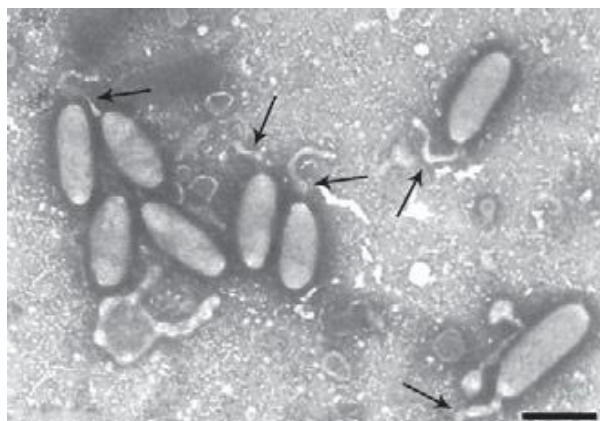
La primera señal de la enfermedad en camarones juveniles tardíos y sub-adultos (en especial durante los 40-60 días de engorda) es una drástica reducción en su alimentación, hasta dejar de comer por completo. Luego se detecta, por una parte, la aparición de camarones moribundos nadando cerca de la superficie y en la orilla de los estanques, y por otra parte, mortalidades masivas de hasta el 100% (Fig. 2) (Lightner, 2005; Morales-Covarrubias, 2010).



**Figura 2. Estanques cosechados después de una infección viral con WSSV.** A la izquierda se observan camarones muertos en la orilla del estanque y a la derecha se observa camarón muerto colectado en costales. Cortesía del Dr. Píndaro Álvarez.

En camarones peneidos americanos en fase aguda de la enfermedad, su coloración normal desaparece y presentan una coloración de acanelada, rozada a rojiza (de ahí el nombre de la “enfermedad roja”); esto se debe a la expansión de los cromatóforos del epitelio cuticular. En su fase crónica, es posible observar algunas manchas blancas (de ahí su nombre) casi visibles o ausentes en el cefalotórax, diferentes a las reportadas en *Penaeus monodon* (0.5-2.0 mm de diámetro), siendo más conspicuas en la parte interna del caparazón (Pantoja y Lightner, 2008; Morales-Covarrubias, 2010). No obstante, la aparición de manchas blancas puede no ser un factor determinante de la enfermedad, ya que factores ambientales de estrés, como altas salinidades o enfermedades bacterianas también pueden generarlas (Jiravanichpaisal *et al.*, 2001; Leu *et al.*, 2009). Algunos autores sugieren que la amplificación de la carga viral y aparición de la enfermedad puede inducirse por estrés ambiental o fisiológico (Lotz *et al.*, 2005; Sánchez-Martínez *et al.*, 2007).

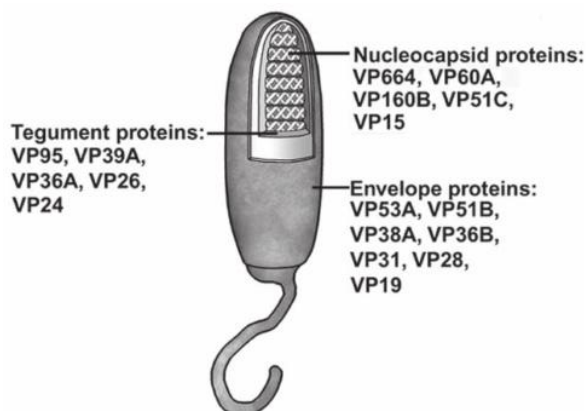
Gracias a su morfología única y genética, el comité internacional de taxonomía de virus (“ICTV”, del inglés: *International Committee on Taxonomy of Viruses*), asignó al virus WSSV como el único miembro del género *Whispovirus* dentro de una nueva familia llamada *Nimaviridae*, que se refiere a la extensión en forma de hilo o tipo cola en un extremo de la partícula viral (Fig. 3) (Leu *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Micrografía electrónica de contraste negativo que muestra viriones intactos de WSSV con extensión tipo cola (flechas negras) (Figura tomada de Escobedo-Bonilla *et al.*, 2008)

Con respecto a la revisión de Bustillo-Ruiz, (2009) el virus WSSV cuenta con genes que codifican para proteínas estructurales y no estructurales o funcionales. Los genes estructurales codifican para las proteínas que forman el virión o cápside, mientras que los no estructurales, codifican para proteínas y enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos y la replicación viral. Las proteínas estructurales (“VP”, del inglés: *viral protein*), son cruciales en la adhesión celular, en la transducción de señales, y en la evasión rápida del hospedero cuando son desplegadas sus defensas antivirales (Li *et al.*, 2007). También son las primeras moléculas que interactúan con las células del hospedero, y pueden ser blancos importantes de su mecanismo de defensa celular (Tsai *et al.*, 2006). Las proteínas virales se designan por su masa molecular en KDa: VP19, VP28, VP15, VP24 y VP26 (Fig. 4). Las dos primeras están asociadas con la envoltura viral y las tres últimas son proteínas de la nucleocápside (van Hulten *et al.*, 2000a; van Hulten *et al.*, 2000b; van Hulten *et al.*, 2002). Recientemente se ha sugerido una nueva clasificación para los genes de WSSV de acuerdo a la función de las proteínas que codifican, siendo un tercer grupo el que comprende a las proteínas de latencia, la cuales son sintetizadas durante las etapas tempranas de la infección y están involucradas en la persistencia del virus dentro de la célula hospedera (Flint *et al.*, 2000). Un cuarto grupo es conformado por los genes reguladores temporales, los cuales intervienen en tiempos específicos durante el curso de la infección. La expresión de estos genes reguladores no requiere de la presencia de proteínas

virales, ya que utilizan la maquinaria molecular del hospedero durante las primeras horas de la infección (Sánchez-Martínez *et al.*, 2007).



**Figura 4.** Diagrama que muestra las principales proteínas virales y las estructuras que constituyen un virión de WSSV, tales como envoltura, tegumento, y nucleocápside. (Figura tomada de Leu *et al.*, 2009).

Por último, como dato interesante, estudios conducidos por el Dr. Francisco Magallón y colegas, seguidos de observaciones en campo sobre las fluctuaciones de temperatura y los brotes de WSSV en México, sugieren que la infección de WSSV en el noroeste del país, ocurre cuando la temperatura del agua presenta oscilaciones de 26-30°C (Proyecto CONACYT: I0004-2006-02-60030, Moser *et al.*, 2012), lo que coincide con los reportes de Wang *et al.* (1999) y Rahman *et al.* (2006) que la temperatura óptima para la replicación del virus es de 26-27°C. Por otra parte, cuando la temperatura de la región bajó alrededor de 20°C, el mismo grupo de investigadores no pudo detectar la presencia del virus mediante métodos de PCR. Esta situación también ha sido observada en otros estudios (Esparza-Leal *et al.*, 2010).

En este sentido Moser *et al.* (2012) en su experimentos, observaron que en algunos organismos (silvestres y post-larvas) positivos al virus, expuestos a 18°C mantuvieron un estado negativo a la detección del WSSV, pero cuando estos se expusieron a 29°C durante un periodo de 2 días resultaron positivos al virus por PCR. Quizás a temperaturas inferiores a 20°C, el virus pudiera entrar a un estado de latencia viral o persistencia silenciosa del

virus en el cuerpo, el cual no es detectable mediante procedimientos de virología convencional. En este contexto, la habilidad de este virus para mantener suprimida su replicación viral parcial o completa en un organismo huésped por periodos cortos o largos y transferencia de la enfermedad a otro huésped, así como la reactivación de este cuando las condiciones son las óptimas debe ser estudiada a más detalle.

## **2.2 Descubrimiento y caracterización del gen *wsv151***

El gen *wsv151* fue identificado por Khadijah *et al.* (2003) en camarones (*P. monodon*) libres de patógenos específicos (SPF, del inglés: *Specific-Pathogen Free*). El objetivo de su investigación fue determinar si algunos de estos organismos SPF, fueron portadores asintomáticos de la enfermedad de WSSV en algún momento de su vida. Cuando fueron sometidos a estrés, observaron una serie de signos semejantes de la enfermedad en algunos organismos. Sugiriendo que se pudo deber a una reactivación latente de la infección del virus WSSV, desencadenada por el estrés del ambiente a la que estaban sujetos. Para comprobar tal afirmación, realizaron un microarreglo de DNA, el cual mostró intensas señales de algunos elementos en la matriz (correspondientes a los genes *wsv151*, *wsv366*, y *wsv427*), indicando que efectivamente estos camarones habían sido portadores de la enfermedad. El análisis de la estructura proteica deducida de la secuencia de estos genes reveló que cada uno posee un dominio de dimerización hélice-asa-hélice tipo *Myc*, un motivo zipper de leucina, un dominio de unión  $\text{Ca}^{+2}$  tipo mano EF, un dominio homeobox y un dominio *Nt-ADnj* comunes entre los tres genes. Se ha reportado que ciertos motivos tipo zipper de leucina y hélice-asa-hélice están involucrados en la latencia del virus del herpes simple (Leib *et al.*, 1991; Groves *et al.*, 2001). Quizás estos mismos motivos putativos pudieran contribuir de alguna manera a la modulación del hospedero, influyendo en la transcripción de genes virales mediante la interacción DNA-proteína entre estas proteínas durante la latencia del virus WSSV, pero esto requiere una investigación más rigurosa.

Un año después del descubrimiento de estos genes de latencia, se inició la caracterización del gen *wsv151*, pero con el nombre de ORF89 (Hossain *et al.*, 2004), encontrando en torno



a la secuencia de cDNA deducida, que este gen se transcribe a partir de un solo mRNA sin sufrir edición o maduración, ya que la secuencia que rodea el codón de inicio del transcrito ORF89 (AAAATGG), fue consistente con la regla de Kozak para el inicio eficiente de la traducción eucariótica (PuNNATGPu) (Kozak, 1989). Los resultados revelaron que el transcrito completo de ORF89 consiste en 4,436 pares de bases, los cuales codifican para una proteína putativa de 1437 aminoácidos de un peso aproximado de 165 KDa (Kilo Dalton). Los ensayos de co-transfección sugieren que la proteína ORF89 reprime su propio promotor, así como los promotores de los genes para la proteína kinasa (ORF61) y la timidin-timidilato kinasa (ORF171) de WSSV. Las proteínas kinasa juegan una función clave en la regulación de procesos celulares (Shugar, 1999). La fosforilación de proteínas en células infectadas por virus puede depender de proteínas kinasa celulares o proteínas kinasa serina / treonina codificadas por genes del virus (ORF2, y ORF61) (van Hulten *et al.*, 2001).

Hasta la fecha, no hay ninguna información sobre las funciones de las proteínas kinasas virales durante la latencia, pero se ha reportado su papel en el ciclo de replicación, por ejemplo, que la proteína kinasa UL97 del citomegalovirus humano tiene un papel crítico en la replicación viral (Prichard *et al.*, 1999; Wolf *et al.*, 2001), y también hay evidencia de que la fosforilación de proteínas es esencial para la replicación del DNA del virus *Vaccinia* (Rampel *et al.*, 1990). Los virus usualmente utilizan timidin-kinasa celular (TK) para la síntesis de DNA, y algunos reportes sugieren que la TK tiene un rol esencial en la replicación viral y la reactivación del Virus Herpes Simple latente a la infección lítica (Coen *et al.*, 1989; Coleman *et al.*, 2003). Con base en lo antes mencionado, probablemente la proteína ORF89 pudiera contribuir al establecimiento del periodo de latencia mediante represión de las proteínas kinasa (PK) y timidilato kinasa (TK), pero esto todavía debe ser demostrado. Por otra parte, el análisis de la secuencia de aminoácidos reveló características interesantes, tales como: dos regiones ricas de ácido glutámico, un motivo tipo zipper de leucinas, y una señal de localización nuclear (NLS) situada cerca del centro del polipéptido, entre los aminoácidos <sup>678</sup>KMKRKR<sup>683</sup>, que son responsables para la localización de la proteína en el núcleo celular (Shahadat-Hossain *et al.*, 2004). La

localización nuclear es esencial para las proteínas reguladoras de la transcripción (Schwoebel y Moore, 2000).

En la actualidad no existe ningún tratamiento efectivo para combatir el virus WSSV en campo, la única estrategia es la prevención a través del manejo, pero aún hay poco éxito. Ante este contexto desalentador, el sector académico ha incursionado en la búsqueda de estrategias que permitan minimizar o controlar la enfermedad. Dentro de estas estrategia de control se pueden destacar el uso de probióticos y algas (Balasubramian *et al.*, 2006), extractos de plantas (Balasubramanian *et al.*, 2008; Peraza-Gómez *et al.*, 2009), inmunoestimulantes (Chang *et al.*, 2003), manipulación de temperaturas (Rahman *et al.*, 2006), vacunas con partículas virales inactivadas (Singh *et al.*, 2005), vacunas de DNA (Krishnan *et al.*, 2009), y vacunas de proteínas recombinantes (Witteveldt *et al.*, 2004). Sin embargo, no han sido infalibles, ya que el camarón carece de un sistema de respuesta inmune específico y de memoria, su sistema de defensa es rudimentario y poco comprendido (Lee y Söderhäll, 2002; Smith *et al.*, 2003; Vaseeharan *et al.*, 2006). En este escenario la tecnología del RNAi ha despertado un gran interés, permitiendo abrir un nuevo enfoque en el campo de estudio en el camarón, como es el entender las funciones de los genes en sus procesos fisiológicos y biológicos para poder descifrar las interacciones patógeno-hospedero (Labreuche y Warr, 2012).

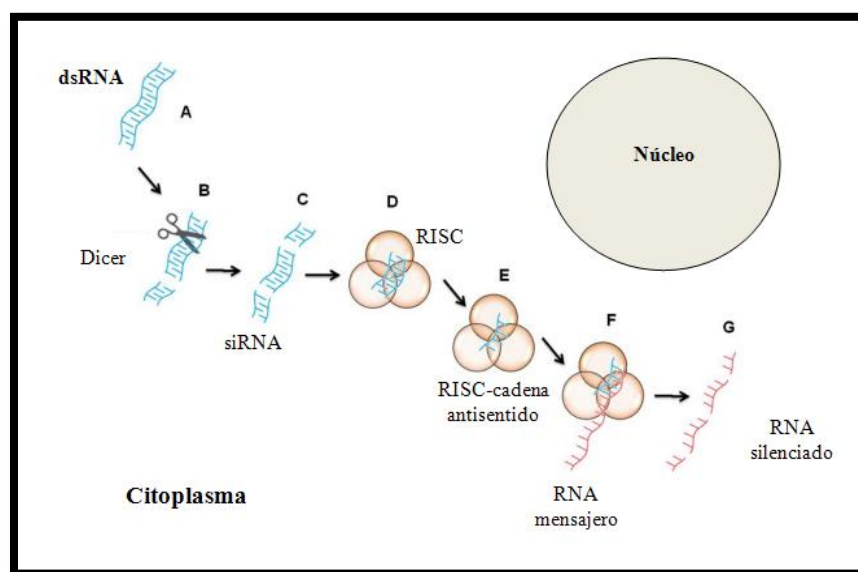
### **2.3 RNAi**

El RNA de interferencia (RNAi del inglés, “*RNA interference*”) es una herramienta muy poderosa para la investigación de genes, y ha reposicionado al RNA como una molécula mucho más versátil de lo que se pensó inicialmente. Tanto así que la revista “*Science*”, lo homenajeo en el 2004 como el descubrimiento más relevante del año, por su enorme contribución a la Biología Celular Moderna (Vaca, 2004). Solo basta con realizar una búsqueda de artículos científicos en cualquier base de datos internacional, para darnos cuenta de los cientos de artículos publicados cada año. Aunado a esto, la Academia Sueca resalta que este mecanismo de regulación genética y la enzimología del mismo juegan un

papel fundamental en muchos de los procesos celulares, desde la función fisiológica de células y tejidos hasta el desarrollo de un organismo.

### 2.3.1 Cascada enzimática del RNAi

El mecanismo enzimático del RNAi, además de ser un proceso endógeno natural de los organismos eucarióticos, puede inducirse experimentalmente mediante la introducción de RNA de doble cadena a un organismo ya sea por inyección, inmersión o vía oral (*per os*), dentro de este, el dsRNA es reconocido por una enzima denominada DICER (una endonucleasa tipo III) la cual, lo reconoce y lo rompe en pequeños fragmento de 20-25 nucleótidos llamados RNA pequeños interferentes (siRNAs, del inglés: *short interfering RNAs*). Los siRNAs son reconocidos por un complejo enzimático de silenciamiento inducido por RNA (RISC, del inglés: *RNA-inducing silencing complex*) compuestas por varias proteínas, las cuales lo separan en moléculas de cadena sencilla. La cadena antisentido permanece unida a RISC, la cual sirve de guía para la degradación específica de secuencias complementarias del RNA mensajero blanco (Fig. 5) (Fire *et al.*, 1998; Dykxhoorn *et al.*, 2003).



**Figura 5. Mecanismo de acción del RNA de interferencia.** Imagen modificada de la revista *Howard Hughes Medical Institute, (2007) annual report*, pp 12.

Las moléculas de RNA de doble cadena largas (>100 nucleótidos) son más efectivas en plantas, invertebrados y algunos hongos, ya que hacen posible producir varias moléculas de siRNA, por lo que aumenta el silenciamiento efectivo del gene blanco (Dykxhoorn *et al.*, 2003). Sin embargo, en mamíferos es todo lo contrario, los dsRNAs cortos (20-29 nucleótidos) son más efectivos que los largos, ya que el mecanismo de acción del interferón se activa en presencia de dsRNAs de más de 30 nucleótidos de longitud, lo que induce la degradación no específica de todos los RNAs mensajeros celulares por medio de la activación de la 2'-5' oligoadenilato sintetasa en RNAsa L. Así mismo, el interferón excita a la proteína quinasa PKR, la cual fosforila e inactiva al factor de iniciación eucariótica (eIF2 $\alpha$ ) inhibiendo la traducción de los RNAs mensajeros y por consiguiente la síntesis de proteínas (Williams, 1997; Stark *et al.*, 1998), lo que genera la muerte celular a través de apoptosis. Fue hasta el año 2001 cuando se logró silenciar genes en células de mamífero sin despertar dicha respuesta, gracias a la utilización de dsRNA de 21 nucleótidos (Elbashir *et al.*, 2001). En la actualidad se ha demostrado que la utilización de dsRNA con una longitud de 27-29 nucleótidos incrementa el silenciamiento genético de manera potencial en mamíferos (Kim *et al.*, 2005; Siolas *et al.*, 2005).

### **2.3.2 Estudios de RNAi en camarón**

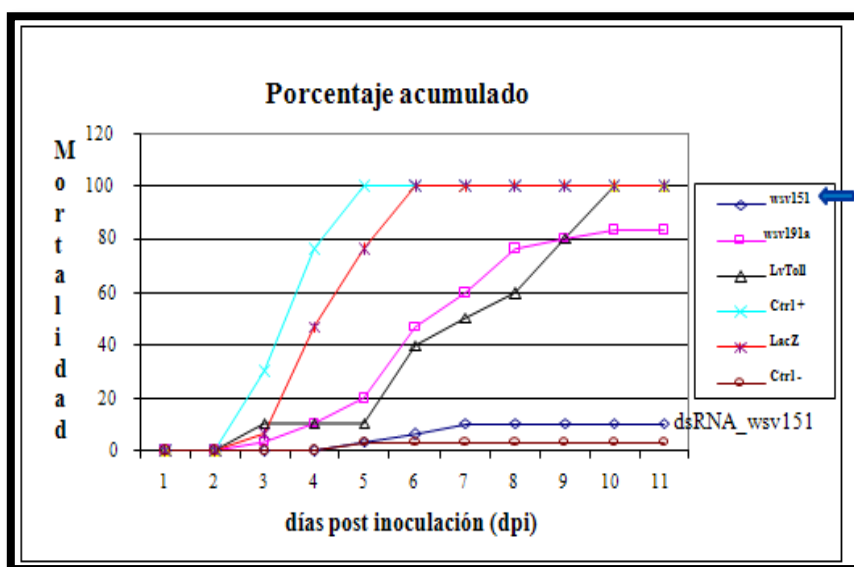
A la fecha varios estudios de RNAi, han demostrado ser eficiente para reducir significativamente la infección del virus en camarón. El primer estudio de silenciamiento en camarón (*L.vannamei*), fue realizado por Robalino *et al.* (2004) sugiriendo que administrando una dosis de 1 $\mu$ g de dsRNA por gramo de peso, es suficiente para inducir un estado antiviral, esta investigación marcó el inicio de una serie de reportes de este tipo. Un año después el mismo grupo de investigación en un trabajo minucioso, demostró que el RNAi, mediado por inyecciones de secuencias de dsRNA específico contra el virus WSSV, brinda una respuesta antiviral altamente específica (Robalino *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando realizaron otro reto mediante infecciones contra virus TSV, ("Virus del Síndrome del Taura", del inglés: Taura Syndrome Virus) con este dsRNA para WSSV en camarones (dos virus no relacionados en torno a su genoma y actividad viral), encontraron que

también induce una respuesta antiviral inespecífica, independientemente de la secuencia de dsRNA inyectada (Robalino *et al.*, 2004; Robalino *et al.*, 2005). Poco después, Westenberg *et al.* (2005) demostraron que también los siRNAs son capaces de inducir una protección antiviral. De forma semejante Tirasophon *et al.* (2007), asume que la tecnología del RNAi también es capaz de suprimir la replicación del Virus de Cabeza Amarilla (“YHV” del inglés: Yellow-Head Virus) en *P. monodon*. Aunado a esto Kim *et al.* (2007), sugiere que se puede utilizar genes funcionales como estructurales para reducir la infección (*vp281* y *vp28*). Según Xu *et al.* (2007) reporta que es posible la completa inhibición del virus WSSV en camarones tratados mediante tres inyecciones consecutivas de dsRNA dirigido a la proteína estructural VP28 en *Marsupenaeus japonicus*. Por otra parte, Mejía-Ruiz *et al.* (2011), sugieren que la tecnología del RNAi puede generar una protección de hasta 28 dpi (días post infección) contra un inoculo viral de WSSV, implicando una atractiva posibilidad de desarrollar terapias antivirales basadas en dsRNA, de forma compatible con la camaronicultura.

### **2.3.3 Estudios de silenciamiento con el gen *wsv151***

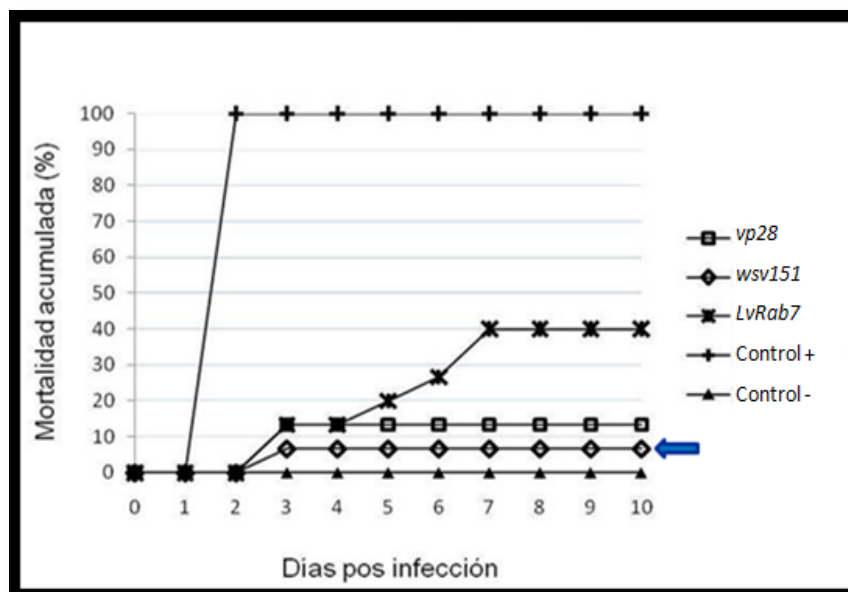
Actualmente no existen estudios de RNAi reportados del gen *wsv151* en la literatura científica. Sin embargo, recientemente el Grupo de Biotecnología Acuícola del CIBNOR, evaluó mediante un experimento de RNAi en camarón *L.vannamei* infectados con WSSV, éste gen funcional relacionado con la latencia junto con otros genes funcionales más (Vega *et al.*, WAS 2009). Como es el caso del gen funcional *wsv191*, el cual codifica para una nucleasa no específica, la cual participa en el metabolismo de nucleótidos, ya sea de DNA o RNA, y el gen endógeno del camarón *LvToll*, que codifica para una proteína receptora de membrana que se encuentran en las células del sistema inmune, que reconoce los PAMP's (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos), y un dsRNA control de un gen bacteriano (*LacZ*; gen que codifica para la proteína  $\beta$ -galactosidasa, la cual cataliza la reacción de hidrólisis de la lactosa en glucosa y galactosa en bacterias).

En resumen, tales resultados mostraron que contra un inoculo activo de WSSV, la mortalidad fue menor del 10% mediante el uso dsRNA específico para el gen *wsv151* comparado con los genes antes mencionados, ver gráfica en la figura 6.



**Figura 6. Primer estudio de silenciamiento del gen *wsv151*.** La figura muestra el primer estudio de silenciamiento del gen *wsv151* (Mejía-Ruiz., 2005; datos no publicados).

Sorprendidos con los resultados obtenidos, el mismo grupo realizó otro experimento de RNAi, poniendo a prueba la efectividad del silenciamiento de este gen. El experimento consistió en desafiar tres genes contra el virus WSSV en camarón *L.vannamei* mediante RNAi. Los genes utilizados fueron, el gen *LvRab7*, el cual es un gen endógeno del camarón que codifica para una proteína que participa en la fagocitosis celular. El gen *vp28*, un gen estructural del virus WSSV, el cual codifica para una proteína predominante en la envoltura de dicho virus, y por último, el gen funcional *wsv151* del virus WSSV. Los resultados mostraron un patrón similar al experimento anterior con un mortalidad mínima del 10% (Fig. 7), los resultados sugieren que este gen es un serio contendiente como estrategia de control en campo ya que reveló mayor efectividad que el gen *vp28*. Estos resultados actualmente se encuentran sometidos a revisión en un artículo científico (Escobedo-Bonilla *et al.*, en revisión)



**Figura 7. Segundo estudio de silenciamiento del gen *wsv151*.** La figura muestra el segundo estudio de silenciamiento del gen *wsv151* (Escobedo-Bonilla *et al.*, en revisión).

### 2.3.4 Limitaciones de la tecnología del RNAi

Desafortunadamente, como en toda nueva tecnología, existen limitaciones o inconvenientes, en este caso es la producción de dsRNA, la cual cotidianamente es llevada a cabo *in vitro* mediante kits comerciales, que en la mayoría de los casos resultan bastante caros, tediosos y la producción que se genera es mínima. Por lo que considerando la enorme cantidad de organismos que se requieren proteger en estanques de producción, resulta poco factible esta vía (Bustillos-Ruiz *et al.*, 2009).

### 2.5 Bacterias productoras de dsRNA

Actualmente hay pocos trabajos que describen la habilidad de generar moléculas de dsRNA bajo sistemas bacterianos que se enfoquen en estudios de invertebrados. En este contexto Timmons *et al.* (2001) reporta una eficiente inducción de RNAi en el gusano mutante de *Caenorhabditis elegans* (OGM para proteína verde fluorescente), administrándoles como alimento bacterias productoras de dsRNA específico del gen *gfp*. Su método hace uso de la

bacteria de *E.coli* HT115 (DE3) que es deficiente para la enzima RNasa III, una enzima que normalmente degrada dsRNA en la célula bacteriana. Esta modificación fue necesaria para manipular la producción y bioacumulación de dsRNA en altas cantidades. Cuando se alimentó con esta bacteria a *C. elegans* mutante se observó la supresión del gen *gfp* mediante el fenotipo en el organismo OGM. Esta investigación marcó el inicio de una serie de reportes de esta índole, como es el caso del trabajo realizado por Ongvarrasopone *et al.* (2007) que reportan un sistema de producción de dsRNA similar al trabajo de Timmons *et al.* (2001). No obstante, se enfocaron en comparar la producción de dsRNA del gen específico proteasa de YHV *in vivo* bajo el mismo sistema bacteriano en comparación con técnicas tradicionales de transcripción *in vitro*, el cual fue validado mediante un ensayo de reto con el virus de Cabeza Amarilla (YHV) en células linfoides de camarón o células OKA. Sus resultados mostraron una inhibición similar en la replicación viral. Sin embargo, el sistema de producción *in vivo* resultó más barato y sencillo que la técnica tradicional de producción *in vitro*.

Un año después, Sarathi *et al.* (2008a) reportó un trabajo similar a estos dos antecedentes, enfocándose en la producción de dsRNA específico del gen *vp28* del virus WSSV y lo validó mediante un ensayo de reto con el virus WSSV en camarón *L.vannamei*, sugiriendo que el sistema de expresión procariótico podría ser una alternativa de producción de dsRNA a gran escala para su aplicación práctica en el cultivo de camarón. Por otra parte, El mismo grupo a su vez exploró, la posibilidad de proteger a los individuos contra el virus WSSV a partir de dsRNA viral específico producido en bacterias, administrándolo oralmente en *Penaeus monodon*, como un potencial agente terapéutico contra WSSV en camarones (Sarathi *et al.*, 2008b). Estas investigaciones dieron hincapié para la formulación del presente sistema bacteriano de producción de dsRNA. Sin embargo, enfocándose al gen *wsv151* del virus WSSV como plataforma contra la enfermedad del Síndrome de la Mancha Blanca.



### **3. JUSTIFICACIÓN**

Actualmente el dsRNA específico contra WSSV se produce *in vitro* para fines experimentales, por lo que es necesario producirlo en grandes cantidades para su aplicación en campo. Una alternativa de producción *in vivo* es utilizando construcciones en vectores plasmídicos, clonados en cepas bacterianas o algún otro microorganismo, como sistemas microbianos que sirvan como plataformas tecnológicas de producción de dsRNA. Además, en dado caso de ser efectiva esta tecnología de síntesis de dsRNA, se tiene el potencial de reducir drásticamente los gastos de producción y posibilita su uso como una opción terapéutica.

## 4. HIPÓTESIS

La construcción de un vector plasmídico diseñado de un fragmento del gen viral *wsv151* clonado en la cepa de *Escherichia coli* HT115, mutante para la RNAsaIII, podrá sintetizar y acumular dsRNA tipo “*hairpin*” específico de este gen para utilizarlo como biofármaco en camarón contra el Virus del Síndrome de la Mancha Blanca.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general:

Generar una plataforma *in vivo* de producción de dsRNA tipo *hairpin* específico contra el virus de la mancha blanca, bajo un sistema bacteriano de expresión transcripcional inducible a partir de un vector plásmido recombinante.

### 5.2 Objetivos particulares:

1. Construir y clonar un vector lhRNA específico del gen *wsv151* en la cepa de *Escherichia coli* HT115 (DE3).
2. Caracterizar la síntesis de la construcción *hairpin* en el vector pJET1.2/blunt determinando la producción de dsRNA específico desde una de las clonas bajo el promotor T7.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Obtención, clonación y confirmación de fragmentos específicos del gen *wsv151*

#### 6.1.1 Bacterias de *E.coli* y Oligonucleótidos utilizados

Las cepas bacterianas de *E.coli* en este trabajo se encuentran descritas en la tabla 1, y todos los oligonucleótidos usados están descritos en la tabla 2.

**Tabla 1. Cepas de *E.coli* utilizadas en este trabajo**

Cepa de <i>E.coli</i>	Genotipo o descripción
TOP10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 <math>\Delta</math>(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i>(StrR) <i>endA1</i> <math>\lambda</math>-</i>
JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB</i> <sup>+</sup> $\Delta$ ( <i>lac-proAB</i> ) <i>e14-</i> [F' <i>traD36 proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15] <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> )
HT115 (DE3)	F', <i>mcrA</i> , <i>mcrB</i> , <i>IN(rrnD-rrnE)1</i> , <i>lambda-</i> , <i>rnc14::Tn10</i> (lisogeno DE3: promotor <i>lacUV5</i> – T7 polimerasa ) (T7 RNA polimerasa inducible de IPTG) (menos RNAsa III)

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo**

Oligonucleótido	Secuencia de los oligonucleótidos utilizados	Sitio
EcoRI-F1	5' AAGAATTCGAAGAAGCGCACGAATGACG 3'	<i>EcoRI</i>
PstI-RI	5' AACTGCAGCCTCCCCCTCCACAACACTGC 3'	<i>PstI</i>
PstI-Rin151	5' AACTGCAGGCATAATGCAGTAGCGTCAACGGC 3'	<i>PstI</i>
pJET1.2 Forward	5' CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3'	
pJET1.2 Reverse	5' AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG 3'	
T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	

### 6.1.2 Muestras biológicas de camarón

Se procesaron muestras de camarón positivo al virus WSSV, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Claudio Humberto Mejía Ruiz del CIBNOR. Todas las muestras provenían de granjas del Parque Acuícola La Atanasia, Sonora, fijadas en alcohol al 70%.

### 6.1.3 Extracción de DNA

Se extrajo DNA genómico a partir de camarón infectado con WSSV de acuerdo al método estándar de Sambrook y Russell (2001) modificado para camarón, el cual se describe en el *apéndice 1*. Las muestras obtenidas se sometieron a electroforesis horizontal a 80 voltios por 45 minutos en gel de agarosa al 1X (en TAE al 1%) teñido con bromuro de etidio (10µg/mL) para verificar su integridad.

### 6.1.4 Amplificación con oligonucleótidos modificados con sitio de restricción

Se amplificaron 2 regiones específicas del gen *wsv151* por PCR mediante oligonucleótidos modificados con sitio de restricción *EcoRI* y *PstI* para llevar a cabo un ensamble sitio-específico entre estos. Las condiciones de reacción de la PCR se realizaron de la siguiente manera.

<b>Reacción de PCR #1</b>	<b>Reacción de PCR #2</b>
Agua MiliQ.....17.8µL	Agua MiliQ.....17.8µL
Buffer (10X).....2.5µL	Buffer (10X).....2.5µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM).....1.0µL	MgCl <sub>2</sub> (50mM).....1.0µL
dNTPs (10 mM).....0.5µL	dNTPs (10 mM).....0.5µL
<i>EcoRI-F1</i> (10 mM).....1.0µL	<i>EcoRI-F1</i> (10 mM).....1.0µL
<i>PstI-RI</i> (10mM).....1.0µL	<i>PstI-Rin151</i> (10mM).....1.0µL
DNA.....1.0µL	DNA.....1.0µL
<u>Taq Polimerasa (5U/µl).....0.2µL</u>	<u>Taq Polimerasa (5U/µl).....0.2µL</u>
<b>VOLUMEN TOTAL.....25.0µL</b>	<b>VOLUMEN TOTAL.....25.0µL</b>

Las condiciones de amplificación para ambas reacciones de PCR se realizaron de la siguiente manera, ver tabla 3.

**Tabla 3. Condiciones de PCR utilizando los oligonucleótidos EcoRI-F1 y PstI-Rin151**

Etapa de la PCR	Temperatura	Tiempo	Ciclos de PCR
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1x
Desnaturalización ciclos	94°C	40 segundos	
Alineamiento ciclos	60°C	30 segundos	30x
Extensión ciclos	72°C	40 segundos	
Extensión final	72°C	10 minutos	1x

Por último, las amplificaciones resultantes fueron sometidos a electroforesis horizontal a 80 voltios a 45 minutos en gel de agarosa al 1X (en TAE al 1%) teñido con BrEt (10µg/ml) para interpretar los resultados obtenidos.

### 6.1.5 Preparación de células químicamente competentes

Para la obtención de células químicamente competentes, se empleó el protocolo reportado por Sambrook y Russell (2001), al cual se le hicieron algunas modificaciones para adecuarlo a las condiciones imperantes. El método consistió en inocular la cepa *E.coli* TOP10 en 2 mL de medio LB fresco, el cual se incubó a 37°C durante toda la noche en agitación constante de 200 rpm. Después se tomó 1mL del cultivo y se inocularon en un matraz con 50 mL de medio LB, luego se incubó a 37°C con las mismas condiciones de centrifugación mencionadas anteriormente, hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.4. Una vez que se obtuvo la OD<sub>600</sub> adecuada, se transfirieron 25 mL de cultivo a dos tubos de 50 mL, y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. Luego, se decantó el sobrenadante de cada tubo y se añadieron 12.5 mL de solución 100mM de CaCl<sub>2</sub>, frío cuidando de no dañar el pellet bacteriano; los tubos se mezclaron suavemente por pipeteo con puntas de boca ancha, y después se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante, y se añadió 2.5 mL de de CaCl<sub>2</sub> 100mM fría, mezclándose suavemente por pipeteo. Por último, se añadió glicerol a una concentración final de 15%, y se prepararon alícuotas de 200 µL en tubos eppendorf de 1.5 mL de para su almacenamiento a -70°C. La preparación de las soluciones y medios de

cultivo empleados se describen en las secciones de los *apéndices* 2 y 3.

### 6.1.6 Clonación de los fragmentos de interés en pJET1.2/blunt

Los productos de PCR del paso 6.3, se purificaron mediante el kit *QIAquick PCR purification* (ver *apéndice* 4) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, se calculó con la siguiente fórmula, la cantidad de ng requerida por cada producto purificado de PCR a una relación molar 8:1 para su clonación en el vector pJET1/blunt.

$$\left[ \frac{\text{ng del vector} \times \text{Tamaño del inserto en Kb}}{\text{Tamaño del vector en Kb}} \right] \times \text{Relación molar inserto:vector}$$

De acuerdo a los resultados obtenidos, se utilizó 1 µL de producto de PCR purificado correspondiente al fragmento viral de 0.6 Kb, y 1.5 µL de producto de PCR correspondiente al fragmento viral de 0.4 Kb para clonarlos en el vector pJET1.2/blunt, respectivamente. Los cocteles de clonación se prepararon bajo las siguientes condiciones de reacción.

#### Coctel de clonación (0.4Kb)

Buffer H (10X).....10.0µL  
 Producto de PCR.....1.5µL  
 Vector pJET1.2 (50ng).....1.0µL  
 Agua MiliQ.....6.5µL  
T4 DNA ligasa (10U/µL).....1.0µL  
**VOLUMEN TOTAL.....20.0µL**

#### Coctel de clonación (0.6Kb)

Buffer H (10X).....10.0µL  
 Producto de PCR.....1.0µL  
 Vector pJET1.2 (50ng).....1.0µL  
 Agua MiliQ.....7.0µL  
T4 DNA ligasa (10U/µL).....1.0µL  
**VOLUMEN TOTAL.....20.0µL**

Los cocteles de clonación se mezclaron suavemente por separado y se incubaron a 22°C por 30 minutos, e inmediatamente se procedió a la transformación.

### 6.1.7 Transformación y determinación de su eficiencia

Los productos clonados en pJET1.2 (pJET1.2::0.6Kb, y pJET1.2::0.4Kb) y pUC19 (plásmido control) fueron utilizados para transformar la cepa *E. coli* TOP10 mediante el siguiente procedimiento: se mezclaron suavemente por separado, los 20 µL del paso 6.3.3 con 200 µL de células competentes TOP10, y de igual forma 5 µL de pUC19 (10ng/µL) con 200 µL de células en tubos de 1.5 mL estéril. Posteriormente se incubaron en hielo por 30 minutos, después se incubaron a 37°C por 5 minutos, e inmediatamente se le añadió 1 mL de medio LB, y se dejó incubando a 37°C por 1:30 hrs en agitación constante de 200 rpm, luego se tomaron 100 µL de cada cultivo y se inocularon en placa LB con ampicilina a una concentración final de 100µg/mL, X-gal (80µg/mL), e IPTG (0.5mM). Por último se dejaron incubando a 37°C por toda la noche. La eficiencia de transformación se determinó en ufc/µg con las siguientes fórmulas.

$$\text{ufc transformadas} = \frac{(\text{No. de colonias})(\text{Coeficiente dilución})(\text{Vol. original de transformación})}{\text{Volumen empleado en la placa}}$$

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{ufc transformadas}}{\text{DNA de plásmido (en } \mu\text{g)}}$$

### 6.1.8 Confirmación de clonas positivas mediante PCR de colonia

Se seleccionaron 14 colonias transformadas con la construcción pJET1.2::0.6Kb y 17 colonias transformadas con la construcción pJET1.2::0.4Kb de acuerdo a su coloración observada (blanco). Estas fueron transferidas con palillos estériles a una placa de LB con ampicilina a una concentración final de 100µg/mL, dejándose incubar a 37°C durante toda la noche. Luego se picó cada colonia crecida con palillos estériles, y se transfirieron individualmente a 20 µL de agua miliQ en tubos de 1.5 mL, después se incubaron a 95°C durante 10 minutos para lisarlas. A la par se preparó un *master mix*, multiplicando los siguientes volúmenes por número de reacción (31 reacciones).

### Reacción de PCR

Agua MiliQ.....	12.5µL
Buffer (10X).....	2.0µL
MgCl <sub>2</sub> (50mM).....	1.0µL
dNTPs (10 mM).....	0.5µL
<i>pJET1.2 Forward</i> (10 mM).....	0.4µL
<i>pJET1.2 Reverse</i> (10mM).....	0.4µL
Taq Polimerasa (5U/µl).....	0.2µL
<b>VOLUMEN TOTAL.....</b>	<b>17.0µL</b>

El *master mix* se mezcló suavemente y se repartieron en 14 viales de 17 µL, luego se les añadieron 3 µL de sobrenadante de células lisadas a cada vial. Por último, se realizó una PCR con las siguientes condiciones de amplificación, ver tabla 4.

**Tabla 4. Condiciones de PCR utilizando el set de oligonucleótidos para pJET1.2**

Etapa de la PCR	Temperatura	Tiempo	Ciclos de PCR
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1x
Desnaturalización ciclos	94°C	30 segundos	
Alineamiento ciclos	60°C	30 segundos	25x
Extensión ciclos	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1x

Las amplificaciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% teñido con BrEt (10mg/mL), el cual fue corrido a 90 Voltios por 40 minutos y visualizado en un transiluminador UV.

#### 6.1.9 Obtención de DNA plasmídico puro

A partir de la clonas positivas a la transformación, se procedió a extraer DNA plasmídico de la siguiente manera: se picó cada clona con un palillo estéril y se transfirió a 5 mL de medio LB con ampicilina a una concentración final de 50µg/mL, luego se incubaron a 37°C por toda la noche en agitación constante de 200 rpm. Después se cosecharon a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C, y finalmente se realizó un Miniprep mediante el kit “*RPM Miniprep*”, siguiendo las recomendaciones del fabricante (ver *apéndice 5*).



### **6.1.10 Secuenciación**

Las muestras de DNA plasmídico obtenido del paso anterior, se mandaron a secuenciar a la empresa “GENEWIZ” (New jersey, USA) para obtener la secuencia nucleotídica y posteriormente, analizarlas mediante un análisis de alineamiento en el programa *BLASTn* del Centro Nacional de Información Biotecnológica “NCBI” con el fin de inferir y hacer homología entre las secuencias ya reportadas.

## **6.2 Diseño y construcción del vector pJC410**

La construcción del vector plasmídico pJC410 se llevó a cabo a partir de la construcción pJET1.2::0.6, acorde al peso molecular del inserto que transporta y apreciaciones de expresión transcripcional.

### **6.2.1 Extracción de DNA plasmídico (pJET1.2::0.6Kb)**

Se inocularon 12 colonias transformadas con construcción pJET1.2::0.6Kb en tubos que contenían 5 mL de medio LB con ampicilina a una concentración final de 50µg/mL, dejándose incubar a 37°C en agitación constante a 200 rpm durante toda una noche. Después se cosecharon a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C y se les extrajo DNA plasmídico mediante el método de Perclorato de Sodio (NaClO<sub>4</sub>) descrito en el *apéndice 6*.

### **6.2.2 Determinación de la orientación del inserto**

Para determinar y conocer la orientación del inserto viral de 0.6Kb, se realizó un análisis bioinformático de la construcción pJET1.2::0.6Kb mediante un reconocimiento espacial de los sitios únicos de restricción a través del programa: *NEBcutterV2.0*, determinando el uso de la enzima *PstI* para conocer la orientación del inserto. El coctel de digestión se preparó con las siguientes condicione de reacción:

**Condiciones de reacción:**

Agua MiliQ.....	5.5µL
pJET1.2::0.6Kb.....	7.5µL
Buffer H (10X).....	1.5µL
<u>PstI (10U/µL).....</u>	<u>0.5µL</u>
<b>VOLUMEN TOTAL.....</b>	<b>15µL</b>

La reacción de digestión se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por toda la noche. Posteriormente, se realizó un análisis electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt para comparar el patrón de restricción obtenido con el patrón de restricción estimado mediante el programa: “*Serial Cloner 3.1*”

**6.2.3 Linearización del vector pJET1.2::0.6Kb**

Se determinó preparar una digestión parcial con diluciones 1:10 de la enzima *PstI* para linearizar el vector pJET1.2::0.6Kb mediante una cinética de digestión, ver tabla 5.

**Tabla 5. Condiciones de la digestión parcial con *PstI***

Coctel de restricción	1	2	3	4	5
pJET::0.6Kb	15µL	15µL	15µL	15µL	15µL
Buffer H 10X	3µL	3µL	3µL	3µL	3µL
H <sub>2</sub> O	11µL	10µL	9µL	8µL	7µL
Enzima <i>PstI</i>	1µL	2µL	3µL	4µL	5µL
<b>Volumen total</b>	<b>30µL</b>	<b>30µL</b>	<b>30µL</b>	<b>30µL</b>	<b>30µL</b>

Se prepararon 5 cocteles de digestión y se incubaron a 37°C por 15 minutos. Posteriormente, se determinó el patrón de restricción mediante un análisis electroforético en un gel analítico de agarosa al 1% teñido con BrEt. Por último, se preparó un gel preparativo para cortar las bandas de interés y purificarlas mediante el kit *PCR Purification*, ver *apéndice 7*.

#### 6.2.4 Digestión con *NcoI*

Se digirió la construcción pJET1.2::0.6Kb linearizada con la enzima de restricción *NcoI* mediante la preparación del siguiente coctel de digestión.

##### Condiciones de reacción:

Agua MiliQ.....	11.0µL
Vector linearizado.....	60.0µL
Buffer H (10X).....	8.0µL
<i>NcoI</i> (10U/µL).....	1.0µL
<b>VOLUMEN TOTAL.....</b>	<b>80.0µL</b>

El coctel de digestión se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por toda la noche. Posteriormente, se realizó un análisis electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt para comparar el patrón de restricción obtenido con el patrón de restricción estimado mediante el programa *Serial Cloner 3.1*.

#### 6.2.5 Liberación del fragmento de 0.4Kb

Se extrajo DNA plasmídico a partir de colonias positivas a la construcción pJET1.2::0.4Kb, para liberar el inserto viral de 0.4 Kb mediante el método de Perclorato de Sodio (NaClO<sub>4</sub>), ver *apéndice 6*. El coctel de digestión se preparó con las siguientes condiciones de reacción.

##### Condiciones de reacción:

Agua MiliQ.....	10.0µL
pJET1.2::0.4Kb.....	60.0µL
Buffer H (10X).....	8.0µL
<i>PstI</i> (10U/µL).....	1.0µL
<i>NcoI</i> (10U/µL).....	1.0µL
<b>VOLUMEN TOTAL.....</b>	<b>80.0µL</b>

El coctel de digestión se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por toda una noche. Posteriormente, se realizó un análisis electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con

BrEt para comparar el patrón de restricción obtenido con el patrón de restricción estimado mediante el programa *Serial Cloner 3.1*.

### 6.2.5 Purificación y cuantificación

La purificación se llevó a cabo mediante el kit *GeneJET PCR Purification*, siguiendo las recomendaciones del fabricante (ver *apéndice 7*). La cuantificación del producto purificado se llevó a cabo mediante espectrofotometría. Por otra parte, el vector digerido se purificó mediante el kit “*RPM Miniprep*” (ver *apéndice 5*), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### 6.2.6 Ligación

El coctel de ligación se preparó con las siguientes condiciones de reacción, incubándose a 16°C por toda la noche.

#### Condiciones de reacción:

Buffer H (10X).....	10.0µL
Fragmento de 0.4Kb.....	5.0µL
pJET1.2::0.6Kb linearizado.....	1.0µL
Agua MiliQ.....	3.0µL
<u>T4 DNA ligasa (10U/µL).....</u>	<u>1.0µL</u>
<b>VOLUMEN TOTAL.....</b>	<b>20.0µL</b>

### 6.2.7 Transformación en *E.coli* TOP10

La construcción resultante se denominó pJC410, y fue utilizada para transformar la cepa *E.coli* TOP10 mediante el siguiente procedimiento: se mezclaron cuidadosamente 200 µL de células competentes TOP10 con los 20 µL de la ligación del paso anterior, luego la reacción se incubó en hielo por 30 minutos en un tubo eppendorf de 1.5 mL, después se le dio un choque térmico a 37°C por 5 minutos, se le agregó a la reacción con 1 mL de medio

LB, y se incubó a 37°C por 1:30 hrs en agitación constante de 200 rpm. Posteriormente se inocularon los 200 µL del cultivo en una caja petri de LB con ampicilina a una concentración final de 100µg/mL, por último se incubaron a 37°C por toda la noche.

### 6.2.8 Confirmación del ensamble

Se confirmó el ensamble realizado mediante análisis de restricción, con el juego de enzimas *EcoRI* y *PstI*, de acuerdo a las siguientes condiciones de reacción.

#### Condiciones de reacción:

Agua MiliQ.....	10.0µL
pJET1.2::0.4Kb.....	60.0µL
Buffer H (10X).....	8.0µL
<i>PstI</i> (10U/µL).....	1.0µL
<i>NcoI</i> (10U/µL).....	1.0µL
<b>VOLUMEN TOTAL.....</b>	<b>80.0µL</b>

El coctel de digestión se mezcló suavemente y se incubó a 37°C por toda la noche. Posteriormente se realizó un análisis electroforético del patrón de restricción obtenido en gel de agarosa al 1% teñido con BrEt. El patrón de restricción obtenido se comparó con el patrón de restricción estimado mediante el programa *Serial Cloner 3.1*.

### 6.3 Conjugación

La cepa bacteriana *E.coli* HT115 (DE3) fue utilizada como receptora, debido a que en su genotipo revela la ausencia del plásmido F o factor de fertilidad. Esta cepa fue obtenida a partir de *Caenorhabditis Genetics Center*, disponible en la página: <http://biosci.cbs.umn.edu/CGC/CGChomepage.htm>.

Por otra parte, la cepa *E.coli* JM109 se utilizó como donadora de material genético (pJC410), ya que su genotipo revela la presencia de un plásmido F por un evento de

recombinación anterior, que tiene la capacidad de aparearse con una cepa F a través de conjugación.

### **6.3.1 Preparación de la cepa donadora.**

La construcción pJC410 se utilizó para transformar la cepa *E.coli* JM109 mediante choque térmico mediante el siguiente procedimiento: se mezcló cuidadosamente en un tubo eppendorf de 1.5 mL, 200  $\mu$ L de células competentes JM109 con 20  $\mu$ L DNA plasmídico (construcción pJC410) a partir de clonas que dieron positivo al plásmido en TOP10 mediante el kit “*RPM Miniprep*”, siguiendo las recomendaciones del fabricante (ver *apéndice 5*). La reacción se incubó en hielo por 30 minutos, después se les dio un choque térmico a 37°C por 5 minutos, y se resuspendió en 1 mL de medio LB, y se incubó a 37°C por 1:30 hrs en agitación constante de 200 rpm, posteriormente se tomaron 100  $\mu$ L de la reacción y se inocularon en placa LB agar con ampicilina a una concentración final de 100 $\mu$ g/mL, por último se incubaron a 37°C por toda la noche. A la par se creció la cepa receptora HT115 (DE3) en medio LB con ampicilina y tetraciclina a una concentración final 100 y 12.5 $\mu$ g/mL respectivamente, por toda una noche con las mismas condiciones de crecimiento a la anterior.

### **6.3.2 Conjugación biparental.**

Para llevar a cabo la conjugación biparental entre esta dos cepas, se realizó el siguiente procedimiento: En un tubo Eppendorf se realizaron diluciones del cultivo de la cepa donadora 1:100, 1:1000, 1:10000 con agua destilada estéril, en un volumen final de 1 mL, se tomó 100  $\mu$ L de cada dilución y se transfirió en tubos eppendorf de 1.5 mL, luego se mezcló con 100  $\mu$ L de la cepa receptora HT115 (DE3), pipeteando cuidadosamente, y se incubaron a 37°C por 30 minutos a 120 rpm. Finalmente se tomaron 100  $\mu$ L del cultivo y se inocularon en placas LB con antibióticos ampicilina y tetraciclina a una concentración final 100 y 12.5 $\mu$ g/mL, respectivamente, posteriormente se incubaron por toda la noche a 37°C.

### 6.3.3 Selección de candidatas y extracción de DNA plasmídico.

Se seleccionaron 10 colonias transconjugantes al azar, y se extrajo DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina descrito por Sambrook y Russell, (2001) (ver *apéndice 8*). Por último se analizó el perfil plasmídico mediante un análisis electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con *RedGel*, comparándolos con la cepa de *E. coli* HT115 (DE3) no transformada (control).

### 6.3.4 Confirmación de la conjugación mediante PCR

La conjugación biparental se confirmó mediante PCR, para esto se preparó el coctel de reacción de la siguiente manera.

#### Condiciones de reacción:

Agua MiliQ.....	28.5µL
Buffer HF (10X).....	10.0µL
dNTPs (2.5mM).....	2.5µL
<i>T7-F</i> (10 pmol/µL).....	2.5µL
<i>PstI-RI</i> (10 pmol/µL).....	2.5µL
DNA Templado.....	1.0µL
<u>Taq Polimerasa (5U/µL).....</u>	<u>0.5µL</u>
<b>VOLUMEN TOTAL.....</b>	<b>50.0µL</b>

La amplificación se realizó en un Termociclador *C1000 therma cyclor* de BIORAD, con los siguientes parámetros que se encuentran descritos en la tabla 6.

**Tabla 6. Condiciones de PCR utilizando los oligonucleótidos *EcoRI-F1* y *PstI-Rin151***

<b>Etapa de la PCR</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos de PCR</b>
Desnaturalización inicial	98°C	2 minutos	1x
Desnaturalización ciclos	98°C	1 minuto	
Alineamiento ciclos	58°C	1 minuto	25x
Extensión ciclos	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	10 minutos	1x

Por último, se analizó mediante los resultados mediante un análisis electroforético en gel de agarosa al 1% teñido con *RedGel*, el cual fue corrido a 80 Voltios por 45 minutos.

## **6.4 Inducción de dsRNA**

Se transfirió una colonia de HT115 DE3 conjugada en 3 mL de medio LB con ampicilina a una concentración final de 100µg/mL y tetraciclina a 12.5µg/mL, y se dejó crecer a 37°C toda la noche en agitación constante 200 rpm, luego se tomó 250 µL del cultivo y se inoculó en 25 mL de medio LB con los mismos antibióticos anteriormente descritos, y mismas condiciones de crecimiento hasta alcanzar un OD<sub>600</sub> de 0.4. Posteriormente se añadió 125 µL de IPTG a una concentración final de 0.5mM y se incubó por 4 horas con las mismas condiciones. Finalmente se cosechó por centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C y de inmediato se procedió a extraer el RNA total por el método de Trizol.

### **6.4.1 Extracción de dsRNA por TRIZOL**

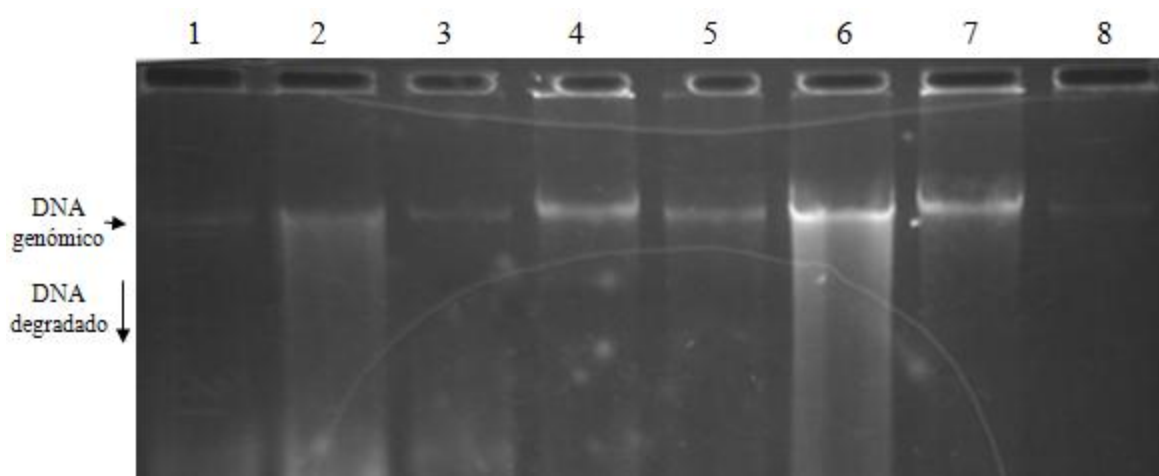
El cultivo se centrifugó y el sobrenadante se retiró para que el botón se disolviera en 100 µL de solución de SDS al 0.1% en buffer PBS, se mezcló por pipeteo, y se incubó a 95°C por 2 minutos. Posteriormente se procedió a extraer el RNA total mediante el método de Trizol, (ver *apéndice 9*). Una vez obtenidas las muestras de RNA total, se les añadió 1 µL de DNAsa I (3 mg/mL), y se incubó a 37°C por 30 minutos y luego se añadió 1 µL RNAsa A (1µg/mL) incubándose a 37°C por 15 minutos. Por último, se cuantificaron por espectrofotometría las muestras resultantes, y se checó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 75 Voltios por 60 minutos.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Extracción de DNA

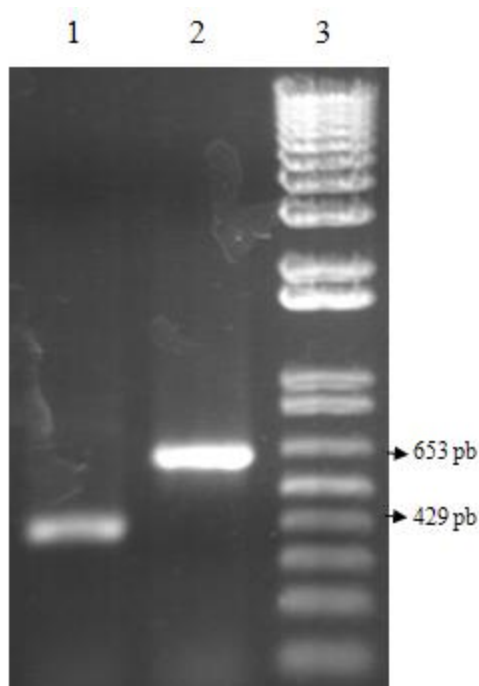
Se realizaron 8 extracciones de DNA de camarón infectado con WSSV mediante el método descrito por Sambrook y Russel *et al.* (2001) modificado para camarón (ver apéndice 1). El análisis electroforético observado en el gel indicó que las muestras **1** y **8** exhibieron poca concentración de DNA, comparado con el resto de las muestras (**2, 3, 4, 5, 6, 7**), las cuales exhiben buena concentración de DNA pero con cierta degradación. Los resultados revelan que la muestra **7** tiene buena calidad y cantidad para realizar experimentos posteriores de PCR (Fig. 8).



**Figura 8. Extracción de DNA de camarón *L. vannamei* positivo al virus WSSV.** Los carriles **1-8**, corresponden a muestras de DNA genómico a partir de musculo abdominal de camarón por el método descrito por Sambrook y Russel *et al.* (2001) modificado para camarón. El DNA genómico se encuentran señalados con las flechas y su respectiva degradación.

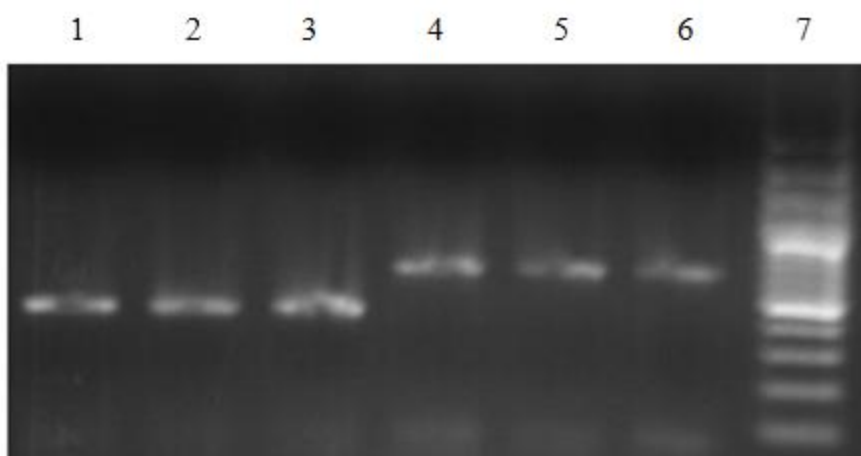
## 7.2 Amplificación por PCR y clonación en pJET1.2/blunt

Se utilizó la muestra de DNA del carril 7 para estandarizar las condiciones de PCR de ambas regiones de interés (Fig. 36), utilizando oligonucleótidos modificados con sitios de restricción (*EcoRI* y *PstI*). El análisis electroforético reveló la presencia de dos productos únicos. En el carril 1, se obtuvo un producto de ~400 pb, y en el carril 2, un producto de ~600 pb, con respecto al marcador de pesos moleculares (Fig. 9). Estos resultados son consistentes a las dos regiones de interés esperadas de 429 y 653 pb respectivamente, lo que sugirió su obtención.



**Figura 9. Estandarización de las condiciones de PCR.** El carril 1, corresponde al fragmento viral de 0.4Kb. El carril 2, corresponde al fragmento viral de 0.6Kb. El carril 3, corresponde al Marcador de Peso Molecular (1 kb Plus, Invitrogene).

Una vez estandarizadas las condiciones de PCR, se realizó una amplificación por triplicado de cada región de interés (Fig. 10), las cuales se purificaron a través del kit *QIAquick PCR purification*. La cuantificación de los productos purificados se realizó por medio de espectrofotometría, los resultados se muestran en la tabla 7.



**Figura 10. Amplificación de los fragmentos específicos del gen *wsv151*.** Los carriles **1-3**, corresponden al fragmento viral de 0.4 Kb. Los carriles **4-6**, corresponden al fragmento viral de 0.6 Kb. El carril **7**, corresponde al Marcador de Peso Molecular (1 kb Plus, *Invitrogene*).

**Tabla 7. Lecturas de los productos purificados de PCR mediante espectrofotometría**

Muestra	Concentración de DNA (ng.μL <sup>-1</sup> )	Relación 260/280	Relación 260/230
0.4 Kb	32 ng.μL <sup>-1</sup>	1.800	0.022
0.6 Kb	60 ng.μL <sup>-1</sup>	1.902	0.112

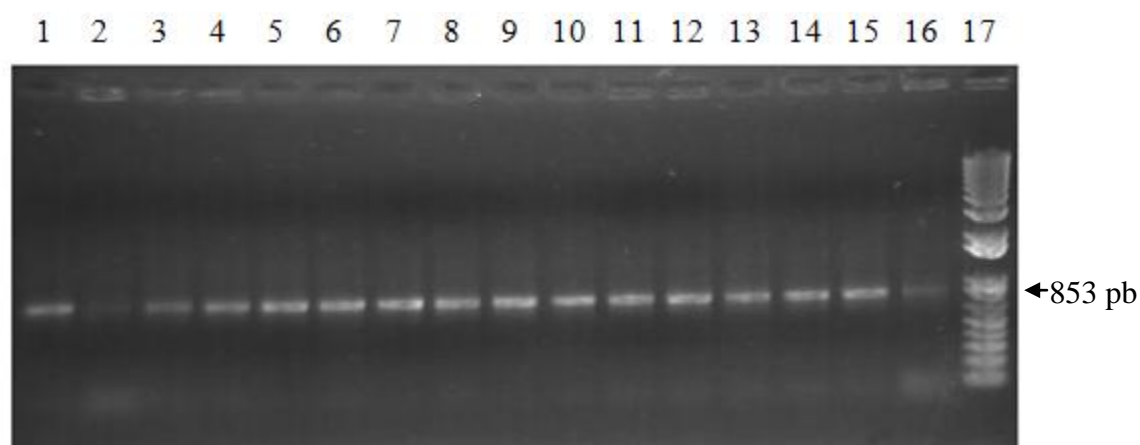
Las lecturas obtenidas sugieren un valor aceptable de concentración de DNA y pureza del mismo. A partir de estos datos, se determinó la cantidad necesaria en ng para la preparación del coctel de clonación, teniendo como base, la concentración del vector pJET1.2/blunt en ng/μL, el tamaño del fragmento en Kb, el tamaño del vector en Kb, y la relación molar que se va a utilizar (8:1); a partir de estos parámetros se obtuvo el siguiente valor.

$$[(50 \text{ ng de vector} \times \underline{0.4 \text{ kb del inserto}}) \div \sim 3.0 \text{ kb vector}] \times (8 \div 1) = \underline{\underline{53.3 \text{ ng de inserto}}}$$

$$[(50 \text{ ng de vector} \times \underline{0.6 \text{ kb del inserto}}) \div \sim 3.0 \text{ kb vector}] \times (8 \div 1) = \underline{\underline{80 \text{ ng de inserto}}}$$

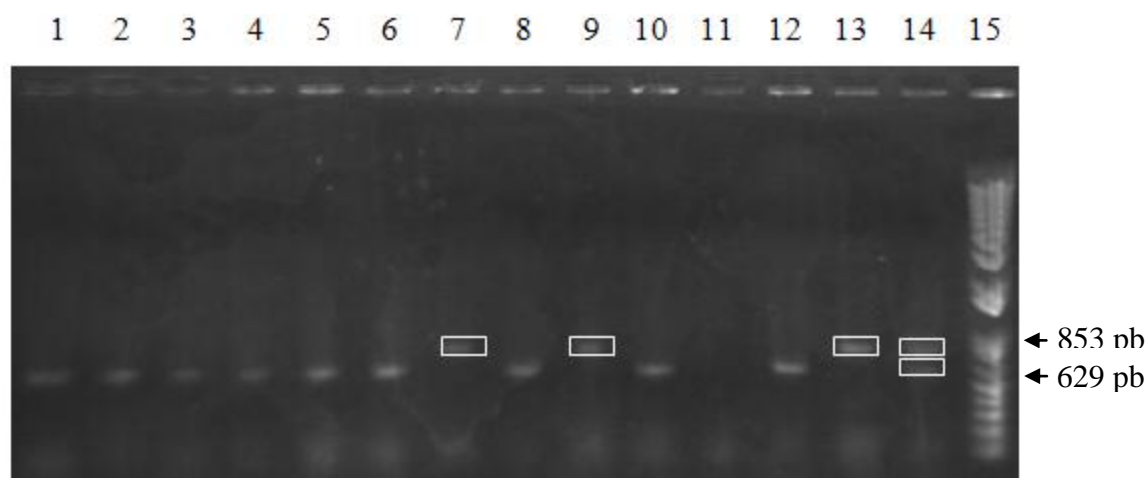
### 7.3 Transformación y confirmación mediante PCR de colonia

Se seleccionaron un total de 17 clonas transformadas con la construcción pJET1.2::0.6Kb, de acuerdo a su fenotipo observado (colonias blancas). Los resultados sobre confirmación mediante PCR de colonia, se muestran en la Figura 11. El análisis electroforético reveló un patrón de bandeo consistente en la mayoría de los productos amplificados, de un peso de ~800 pares de bases con respecto al marcador de pesos moleculares. Estos resultados indican la amplificación u obtención del inserto en torno al tamaño esperado, debido a que los oligonucleótidos que se utilizaron flanquean a 90 y 110 pares de bases cercanos al sitio de clonación múltiple (MCS del inglés; *Multiple Cloning Site*) que sumados al inserto viral (653 pares de bases), comprenden un producto de 853 pares de bases. Por lo tanto, estos resultados sugieren que efectivamente las células seleccionadas fueron transformadas con la construcción mencionada anteriormente.



**Figura 11. Confirmación de la transformación mediante PCR de colonia (1).** Los carriles 1-16, corresponden al producto amplificado del fragmento viral de 0.6Kb. El carril 17, corresponde al Marcador de Peso Molecular (1 kb Plus, *Invitrogene*). El fragmento de interés se encuentra señalado con la flecha y su respectivo tamaño en pares de bases.

Por otra parte, se seleccionaron 14 clonas transformadas con la construcción pJET1.2::0.4Kb de acuerdo a su coloración. De igual manera, se confirmaron mediante PCR de colonia siguiendo las condiciones descritas en la sección 6.1.8. El análisis electroforético reveló un patrón de bandeado consistente en las clonas 1-6, 8, 10, y 12 con el peso esperado de 629 pares de bases, de acuerdo al marcador de pesos moleculares, sugiriendo la inserción de la construcción pJET1.2::0.4Kb en la bacteria. No obstante, las clonas 7, 9, 13, y 14 sugieren una contaminación cruzada con las clonas transformadas con pJET1.2::0.6Kb (Fig. 12).



**Figura 12. Conformación de la transformación mediante de PCR de colonia (2).** Los carriles **1-6, 8, 10,** y **12,** corresponden a productos amplificados del fragmento viral de 0.4 Kb. Los carriles **7, 9,** y **13,** corresponden a productos amplificados del fragmento viral de 0.6 Kb. El carril **14,** corresponde a una contaminación cruzada de dos clonas diferentes. El carril **15,** corresponde al Marcador de Peso Molecular (1 kb Plus, *Invitrogene*). Los fragmentos señalados con cuadros representan contaminaciones cruzadas y sus respectivos tamaños en pb se encuentran señalados con flechas.

La eficiencia de transformación de TOP10 con pJET1.2::0.6Kb fue la siguiente.

$$ufc \text{ transformadas} = (54) (10,000) (200) / 100 = \underline{10.8 \times 10^5}$$

En la ecuación anterior, el 54 corresponde al número de colonias observadas en placas LB después de inocularla toda la noche. El volumen de células competentes previo a la transformación fue de 200  $\mu\text{L}$ , al cual se le añadieron posteriormente 1 mL más de medio LB, por lo cual, el coeficiente de dilución fue de 100,000. El 100 corresponde al volumen de medio de cultivo empleado en  $\mu\text{L}$  sobre la placa.

Para calcular la eficiencia de transformación se divide el valor obtenido de *ufc* entre la cantidad de vector empleado en  $\mu\text{g}$ , dando el siguiente valor.

$$\text{Eficiencia de transformación} = 10.8 \times 10^5 / 0.05 \mu\text{g} = 2.16 \times 10^7$$

Por otro parte, se obtuvieron un total de 48 clonas transformadas con la construcción pJET1.2::0.4Kb, y 78 clonas transformadas con pUC19, dando los siguientes resultados.

$$\text{ufc transformadas (pJET1.2::0.4Kb)}^1 = (48) (10,000) (200) / 100 = 9.6 \times 10^5$$

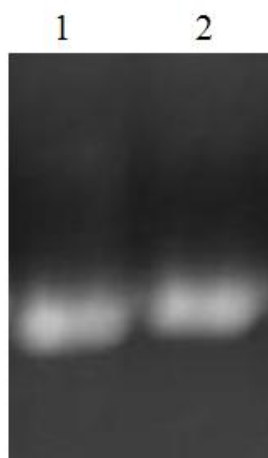
$$\text{ufc transformadas (pUC19)}^2 = (78) (10,000) (200) / 100 = 15.6 \times 10^6$$

$$\text{Eficiencia de transformación}^1 = 9.6 \times 10^5 / 0.05 \mu\text{g} = 1.92 \times 10^7$$

$$\text{Eficiencia de transformación}^2 = 15.6 \times 10^5 / 0.05 \mu\text{g} = 3.12 \times 10^7$$

#### 7.4 Purificación de DNA plasmídico y envío de muestras a secuenciación

En la Figura 13, se muestran los resultados de las extracciones de DNA plasmídico procedentes de la clona 7 (Fig. 12), la cual fue transformada con la construcción pJET1.2::0.4Kb y la clona 1 (Fig. 11), que fue transformada con la construcción pJET1.2::0.6Kb respectivamente. El análisis electroforético y las lecturas obtenidas del índice 260/280, 260/230 se presentan en la tabla 8.



**Figura 13. Purificación de DNA plasmídico.** El carril 1, corresponde a la extracción de DNA plasmídico a partir de la clona 7 transformada con pJET1.2::0.4Kb. El carril 2, corresponde a la extracción de DNA plasmídico a partir de las clona 1 transformadas con pJET1.2::0.6Kb.

**Tabla 8. Lecturas de las purificación de DNA plasmídico mediante espectrofotometría**

Muestra	Concentración de DNA (ng. $\mu\text{L}^{-1}$ )	Relación 260/280	Relación 260/230
1	94.8 ng. $\mu\text{L}^{-1}$	1.830	2.242
2	64.9 ng. $\mu\text{L}^{-1}$	1.882	2.302

Las muestras se enviaron a secuenciar a una concentración final de 500 ng de DNA plasmídico por muestra, acorde a las especificaciones de la empresa GENEWIZ inc.

## 7.5 Análisis bioinformático en *BLASTn*

Los resultados de la secuenciación del fragmento viral de 0.4 Kb se encuentran en el recuadro de la figuras 14, el cual se analizó mediante un alineamiento de secuencias en *BLASTn*, revelando un 100% de identidad con respecto a una fracción del genoma del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (AF369029) (Fig. 15).

```
AAGAATTCGAAGAAGCGCACGAATGACGCACCAGCGATTACACCTCATGTGGCCGTGTACGACTACAGTGGAGACG
GGAAAGAACAATTGCTCTATATGATAACCGAGTATGAAAACACGGCTAGTTGGTGCAACGCAAACGGTGTGGTCAC
ATCTGACAGTGGATTTCTAACGAATGTGCAATTAGTGATATGAATGACTTGTGCTGTTTTGCTGACTGCATCGAT
GTTACTGTTAATAATGAAGAACATGAAGAACGTTCTATGAATATTGTGGTCAATCTGACAGGCGCTTTTTGATG
CTAGTCCTTCCCCATCAAGACGGAAGAAGATGGAGAAAATTCATCGTCATCGTCTTCTCTCCAACAGTTCTCTCC
TCCTACACCATACGAAGGTAACGCAGTTGTGGAGGGGAGGCTGCAGAA
```

**Figura 14. Resultados de la secuenciación (1).** El recuadro muestra los resultados de la secuenciación del fragmento viral de 0.4 Kb

White spot syndrome virus, complete genome					
Sequence ID: <a href="#">gb AF369029.2</a> Length: 292967 Number of Matches: 1					
Range 1: 129197 to 129612 <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <span style="float: right;">▼ Next Match ▲ Previous Match</span>					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
769 bits(416)	0.0	416/416(100%)	0/416(0%)	Plus/Plus	
Query	86	GAAGAAGCGCACGAATGACGCACCAGCGATTACACCTCATGTGGCCGTGTACGACTACAG			145
Sbjct	129197	GAAGAAGCGCACGAATGACGCACCAGCGATTACACCTCATGTGGCCGTGTACGACTACAG			129256
Query	146	TGGAGACGGGAAAGAACAATTGCTCTATATGATAACCGAGTATGAAAACACGGCTAGTTG			205
Sbjct	129257	TGGAGACGGGAAAGAACAATTGCTCTATATGATAACCGAGTATGAAAACACGGCTAGTTG			129316
Query	206	GTGCAACGCAAACGGTGTGGTCACATCTGACAGTGGATTTCTAACGAATGTGCAATTAG			265
Sbjct	129317	GTGCAACGCAAACGGTGTGGTCACATCTGACAGTGGATTTCTAACGAATGTGCAATTAG			129376
Query	266	TGATATGAATGACTTGTGCTGTTTTGCTGACTGCATCGATGTTACTGTTAATAATGAAGA			325
Sbjct	129377	TGATATGAATGACTTGTGCTGTTTTGCTGACTGCATCGATGTTACTGTTAATAATGAAGA			129436
Query	326	ACATGAAGAACGTTCTATGAATATTGTGGTCAATCTGACAGGCGCTTTTTGATGCTAG			385
Sbjct	129437	ACATGAAGAACGTTCTATGAATATTGTGGTCAATCTGACAGGCGCTTTTTGATGCTAG			129496
Query	386	TCCTTCCCCATCAAGACGGAAGAAGATGGAGAAAATTCATCGTCATCGTCTTCTCTCC			445
Sbjct	129497	TCCTTCCCCATCAAGACGGAAGAAGATGGAGAAAATTCATCGTCATCGTCTTCTCTCC			129556
Query	446	AACAGTTCCTCCTTACACCATACGAAGGTAACGCAGTTGTGGAGGGGGAGGAAG			501
Sbjct	129557	AACAGTTCCTCCTTACACCATACGAAGGTAACGCAGTTGTGGAGGGGGAGGAAG			129612

**Figura 15. Alineamiento de la secuencia del fragmento viral de 0.4 Kb en *BLASTn*.** Figura que muestra el porcentaje de similitud del fragmento viral de 0.4 Kb del gen de interés con respecto al genoma de virus WSSV, el cual se encuentra señalado con el recuadro de color rojo.

A la par se realizó otro análisis con la secuencia del fragmento viral de 0.6 Kb en *BLASTn* (Fig. 16), los resultados revelaron un 99% de identidad de la secuencia con respecto al genoma del Virus del Síndrome de la Mancha Blanca (Fig. 17).



```

AAGAATTCGAAGAAGCGCACGAATGACGCACCAGCGATTACACCTCATGTGGCCGTGTACGACTACAGTGGAGA
CGGAAAGAACAATTGCTCTATATGATAACCGGATGAAAACACGGCTAGTTGGTGCAACGCAAACGGTGTGG
TCACATCTGACAGTGGATTTCTAACGAATGTGCAATTAGTGATATGAATGACTTGTGCTGTTTGGCTGACTGC
ATCGATGTTACTGTTAATAATGAAGAACATGAAGAACGTTCTATGAATATGTGGTTCGAATCTGACAGGCGTCT
TTTTGATGCTAGTCCTTCCCCCATCAAGACGGAAGAAGATGGAGAAAATTCATCGTCATCGTCTTCCTCTCCAA
CAGTTCCTCCTACACCATACGAAGGTAACGCAGTTGTGGAGGGGGAGGAAGAAGAGGAAGAAATGTATGAA
GACGAAAGTAGCAAGTATGAAGGTTTCAGAGATGCTCTTGTATGAAGAAATAGCCAAGCTTCTACTATGAA
ACAAATGAGAAGGGTTAAGAATGAACCTGCACTCAAATTACTTCTGGGGTAACAATAGTAGCAGTAGTATCA
ATAACGAAGATGATGGTGTATGATGACGATGCCGTTGACNCTACTNCATTATGCCTGCAGAA

```

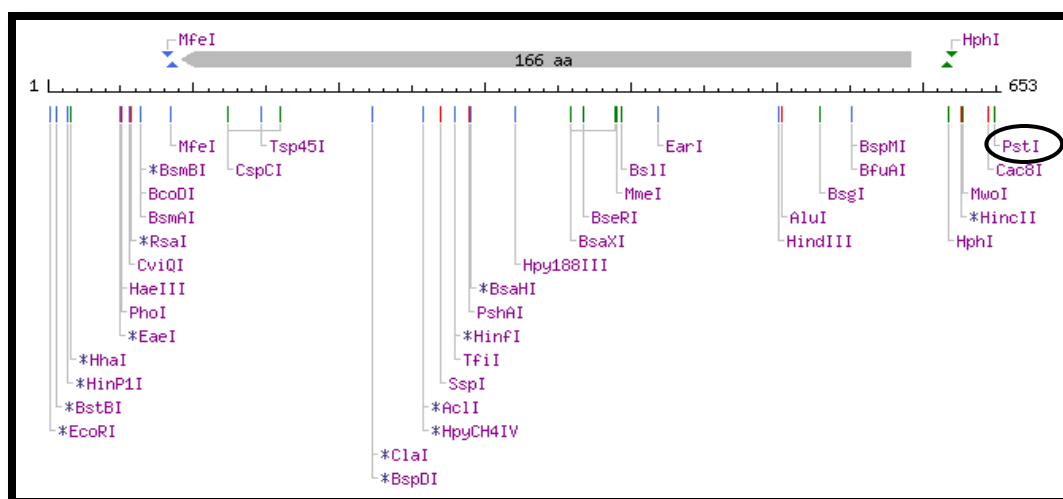
**Figura 16. Resultados de secuenciación (2).** El recuadro muestra los resultados de la secuenciación del fragmento viral de 0.4 Kb

Download		GenBank		Graphics	
White spot syndrome virus, complete genome					
Sequence ID: <a href="#">gb AF369029.2 </a> Length: 292967 Number of Matches: 1					
Range 1: 129197 to 129834		GenBank		Graphics	
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1171 bits(634)	0.0	636/638(99%)	0/638(0%)	Plus/Plus	
Query	9	GAAGAAGCGCACGAATGACGCACCAGCGATTACACCTCATGTGGCCGTGTACGACTACAGTGGAGA	68		
Sbjct	129197	GAAGAAGCGCACGAATGACGCACCAGCGATTACACCTCATGTGGCCGTGTACGACTACAG	129256		
Query	69	TGGAGACGGGAAAGAACAATTGCTCTATATGATAACCGAGTATGAAAACACGGCTAGTTG	128		
Sbjct	129257	TGGAGACGGGAAAGAACAATTGCTCTATATGATAACCGAGTATGAAAACACGGCTAGTTG	129316		
Query	129	GTGCAACGCAAAACGGTGTGGTTCACATCTGACAGTGGATTTCTAACGAATGTCAATTAG	188		
Sbjct	129317	GTGCAACGCAAAACGGTGTGGTTCACATCTGACAGTGGATTTCTAACGAATGTCAATTAG	129376		
Query	189	TGATATGAATGACTTGTGCTGTTTTGCTGACTGCATCGATGTTACTGTTAATAATGAAGA	248		
Sbjct	129377	TGATATGAATGACTTGTGCTGTTTTGCTGACTGCATCGATGTTACTGTTAATAATGAAGA	129436		
Query	249	ACATGAAGAACGTTCTATGAATATTGTGGTTCGAATCTGACAGGCGTCTTTTGTATGCTAG	308		
Sbjct	129437	ACATGAAGAACGTTCTATGAATATTGTGGTTCGAATCTGACAGGCGTCTTTTGTATGCTAG	129496		
Query	309	TCCTTCCCCCATCAAGACGGAAGAAGATGGAGAAAATTCATCGTCATCGTCTTCCTCTCC	368		
Sbjct	129497	TCCTTCCCCCATCAAGACGGAAGAAGATGGAGAAAATTCATCGTCATCGTCTTCCTCTCC	129556		
Query	369	AACAGTTCCTCCTACACCATACGAAGGTAACGCAGTTGTGGAGGGGGAGGAAGAAGA	428		
Sbjct	129557	AACAGTTCCTCCTACACCATACGAAGGTAACGCAGTTGTGGAGGGGGAGGAAGAAGA	129616		
Query	429	GGAAGAAATGATGAAGACGAAAGTAGCAAGTATGAAGGTTCAGAAGATGCTCTTGTAT	488		
Sbjct	129617	GGAAGAAATGATGAAGACGAAAGTAGCAAGTATGAAGGTTCAGAAGATGCTCTTGTAT	129676		
Query	489	GAAGAAATAGCCAAGCTTCTACTATGAACAATGAGAAGGTTAAGAAATGAACCTGC	548		
Sbjct	129677	GAAGAAATAGCCAAGCTTCTACTATGAACAATGAGAAGGTTAAGAAATGAACCTGC	129736		
Query	549	ACTCAAATTACTTCTGGGGTAACAATAGTAGCAGTAGTATCAATAACGAAGATGATGG	608		
Sbjct	129737	ACTCAAATTACTTCTGGGGTAACAATAGTAGCAGTAGTATCAATAACGAAGATGATGG	129796		
Query	609	TGATGATGACGATGCCGTTGACNCTACTNCATTATGCC	646		
Sbjct	129797	TGATGATGACGATGCCGTTGACGCTACTGCATTATGCC	129834		

**Figura 17. Alineamiento de la secuencia del fragmento viral de 0.6 Kb en BLASTn.** Figura que muestra el porcentaje de similitud del fragmento viral de 0.6 Kb del gen de interés con respecto al genoma de virus WSSV, el cual se encuentra señalado con el recuadro de color rojo.

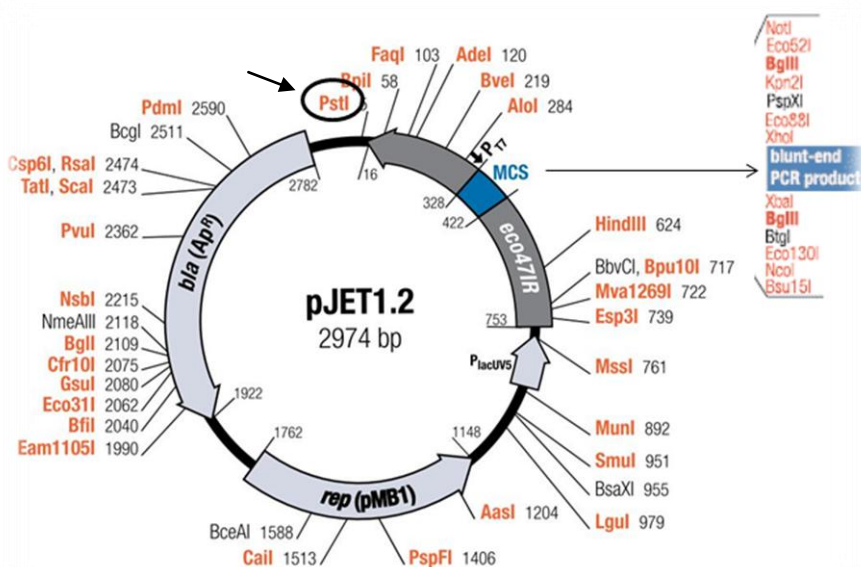
## 7.6 Estimación *in silico* de la orientación del inserto viral 0.6 Kb

Para conocer la orientación del inserto viral de 0.6 Kb en pJET1.2/blunt por análisis de restricción fue necesario primeramente realizar un análisis *in silico* para determinar los sitios únicos de restricción del inserto viral de 0.6Kb mediante el programa *NEBcutter V2.0*. Los resultados sugieren que el sitio para la enzima *PstI*, es el principal sitio de restricción candidato, dado que reveló un único sitio de restricción y su ubicación en el extremo 3' del inserto viral (Fig. 18).



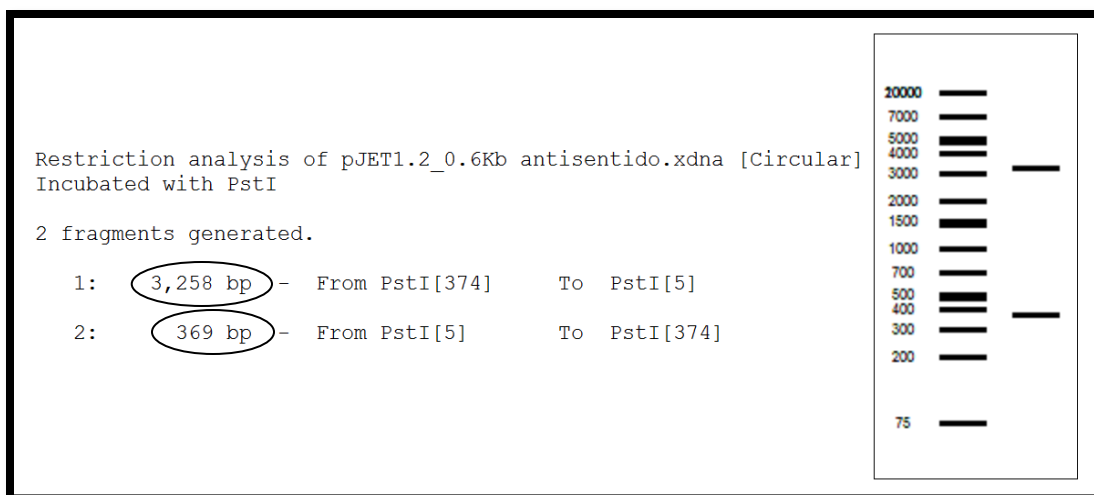
**Figura 18. Mapa de restricción del inserto viral de 0.6Kb mediante el programa *NEBcutter V2.0*.** Figura que muestra la ubicación del sitio único de restricción *PstI* en el inserto de 0.6 Kb, el cual se encuentra señalado con el círculo.

A la par se realizó un análisis de los principales sitios únicos de restricción del vector pJET1.2/blunt (Fig. 19). Los resultados indican la existencia de otro sitio *PstI* cercano al MCS o sitio de clonación múltiple, lo que sugiere su uso para la determinación de la orientación del inserto viral.



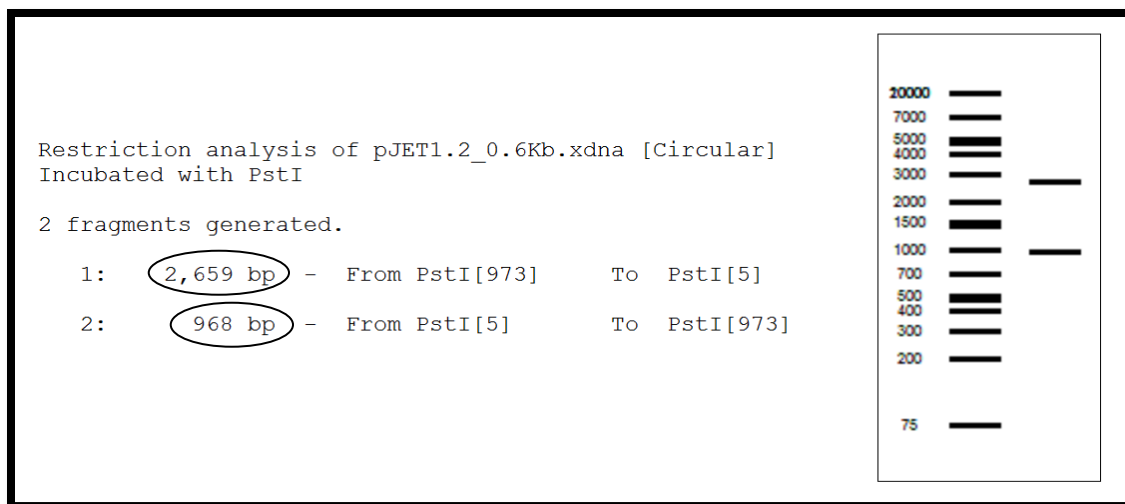
**Figura 19. Mapa de restricción del vector pJET1.2/blunt (1).** Figura que muestra la ubicación del sitio *PstI* en pJET1.2, el cual se encuentra señalada con la flecha y el círculo.

Por otra parte, se realizó un análisis bioinformático mediante el programa *Serial Cloner 3.1* con la finalidad de estimar el patrón de restricción utilizando la enzima de restricción *PstI*. El programa arrojó 2 resultados. El primer resultado simula dos cortes específicos, uno de 2.6 Kb y el otro de 968 pb. Sugiriendo que el inserto viral de 0.6 Kb se encuentra orientado en dirección sentido en el vector (Fig. 20).



**Figura 20. Modelación del patrón de restricción en dirección sentido mediante el programa Serial Cloner 3.1.** Figura muestra simula el patrón de restricción en dirección sentido y su respectivo tamaño en pb se encuentran señalados en círculos.

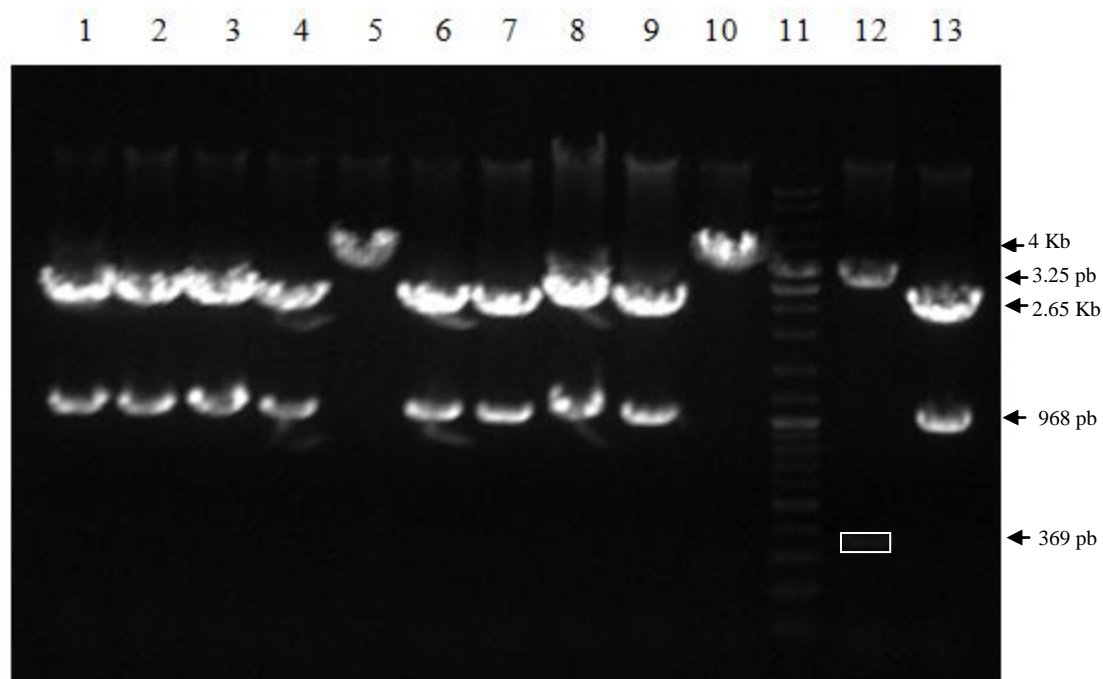
El segundo resultado también simula dos cortes específicos, uno de 3.2 Kb y el otro de 369 pares de bases. Sugiriendo que el inserto viral se encuentra orientado en dirección antisentido en el vector (Fig. 21).



**Figura 21. Modelación del patrón de restricción en dirección antisentido mediante el programa *Serial Cloner 3.1*.** Figura muestra simula el patrón de restricción en dirección antisentido y su respectivo tamaño en pb se encuentran señalados en círculos.

### 7.7 Determinación de la orientación del inserto viral 0.6Kb

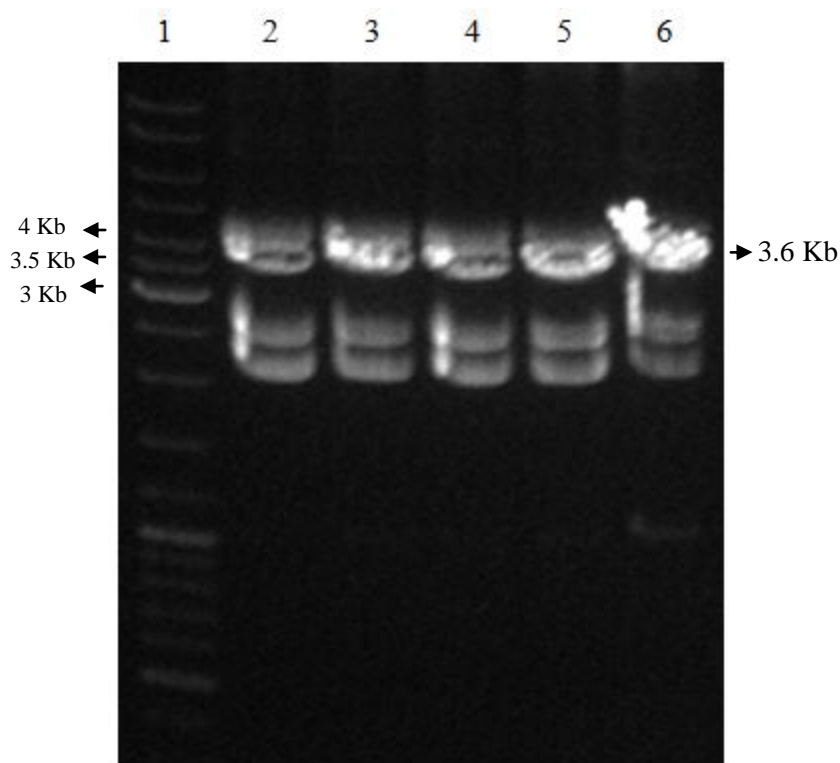
Conforme a los resultados obtenidos del análisis bioinformático, se sugiere que el inserto viral de 0.6 Kb en las muestras de DNA plasmídico (**1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 13**) se encuentra orientado en dirección sentido en base a los patrones de restricción obtenidos con la enzima *PstI*, mientras que solamente en la muestra **11**, el inserto viral se encuentra orientado en dirección antisentido. Por algún motivo aparente las muestras **5** y **10**, no presentaron actividad enzimática.



**Figura 22. Determinación de la orientación del inserto viral de 0.6 Kb.** Los carriles **1-4, 6-9, y 13**, corresponden al patrón de restricción de inserto viral de 0.6Kb en dirección sentido. Los carriles **5** y **10**, corresponden a muestras de DNA plasmídico sin actividad enzimática. El carril **11**, corresponde al Marcador de Peso Molecular GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10000 pb, *Fermentas*). El carril **12**, corresponde al patrón de restricción en dirección antisentido.

### 7.8 Linearización del vector mediante la digestión parcial con *PstI*

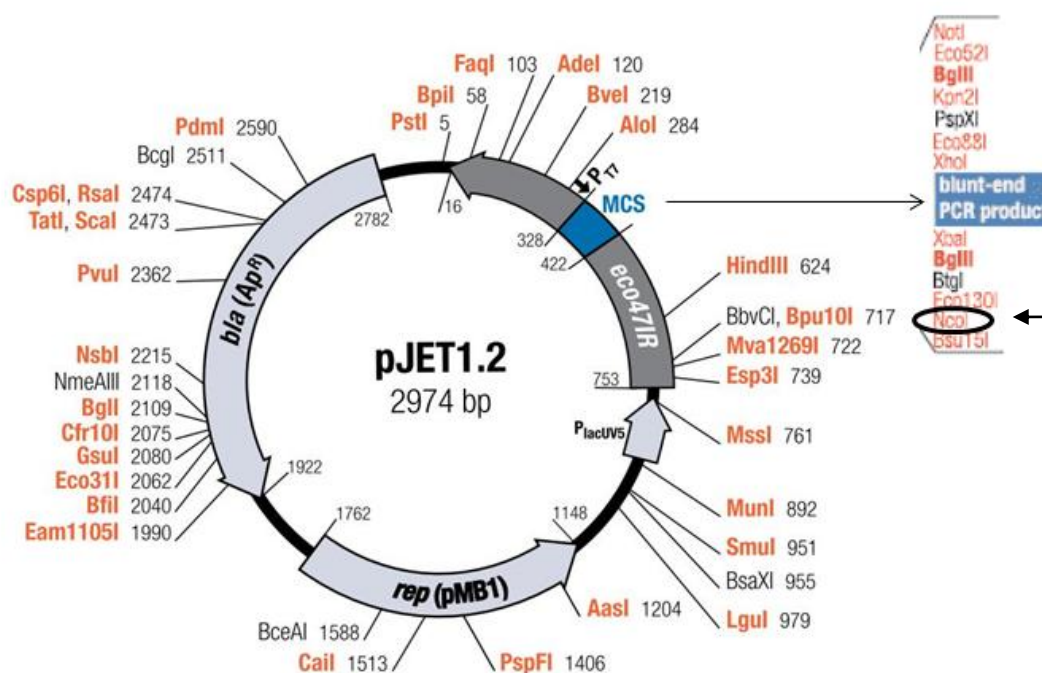
Los resultados de la digestión parcial con la enzima *PstI* conforme a la metodología mencionada en la sección 6.2.3, mostró un patrón de restricción consistente en las cinco muestras (Fig. 23). Cabe resaltar que la banda superior marcada corresponde al vector linearizado, indicando la linearización de la construcción pJET::0.6Kb, tanto en el extremo 3' del inserto viral (sitio de clonación múltiple), como en el vector dada la localización de los dos sitios *PstI* mencionados anteriormente en la sección 7.4.



**Figura 23. Linearización de la construcción pJET1.2::0.6Kb.** El carril 1, corresponde al Marcador de Peso Molecular de GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10000 pb, *Fermentas*). Los carriles 2, 3, 4, 5, y 6, corresponden al patrón de restricción de inserto viral de 0.6 Kb en dirección sentido. La banda superior señalada con la flecha y el recuadro corresponde al vector linearizado mediante la digestión parcial con la enzima *PstI*.

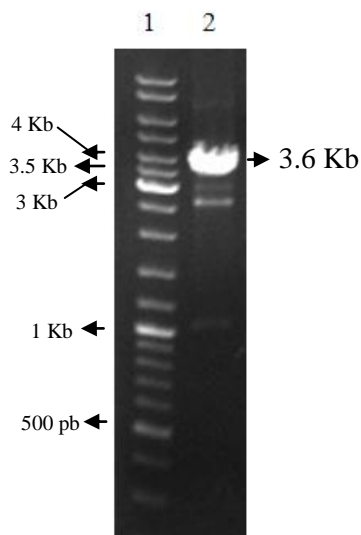
### 7.9 Digestión con *NcoI* y ensamble sitio-específico con el fragmento viral de 0.4 Kb

Se analizaron los sitios únicos de restricción del sitio de clonación múltiple (MCS) para realizar una segunda digestión con la finalidad de evitar una recirculación del vector previamente linearizado, y de efectuar el ensamble sitio específico con el fragmento viral de 0.4 kb en ese lugar. Se concluyó que el sitio único para la enzima *NcoI* sería utilizado debido a su cercanía en el extremo 3' del inserto viral, y por su única existencia en el MCS (Fig. 24) e inserto (Fig. 18).



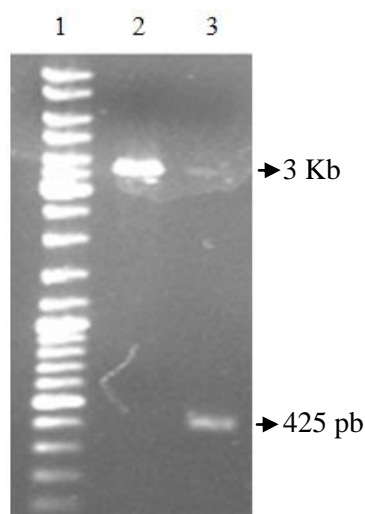
**Figura 24. Mapa de restricción del vector pJET1.2/blunt (2).** Figura que muestra la ubicación del sitio único de restricción *NcoI* en pJET1.2, el cual se encuentra señalado con la flecha y el círculo.

En la digestión con *NcoI* se obtuvo un patrón de restricción de 3 bandas bien definidas de 3.6 Kb, 2.5 Kb, y 1 Kb, sugiriendo una digestión completa (Fig. 25). La banda superior de 3.6 Kb indica el producto de interés en la dirección deseada, y el resto corresponden al artefacto linearizado en el otro sitio *PstI* obtenido en la digestión parcial de la sección 7.7.



**Figura 25. Digestión con *NcoI* a partir de la construcción linearizada.** El carril 1, corresponde al Marcador de Peso Molecular (GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10000 pb, *Fermentas*)). El carril 2, corresponde al patrón de restricción del inserto viral de 0.6 Kb en dirección sentido. La banda superior señalada con la flecha corresponde al vector linearizado.

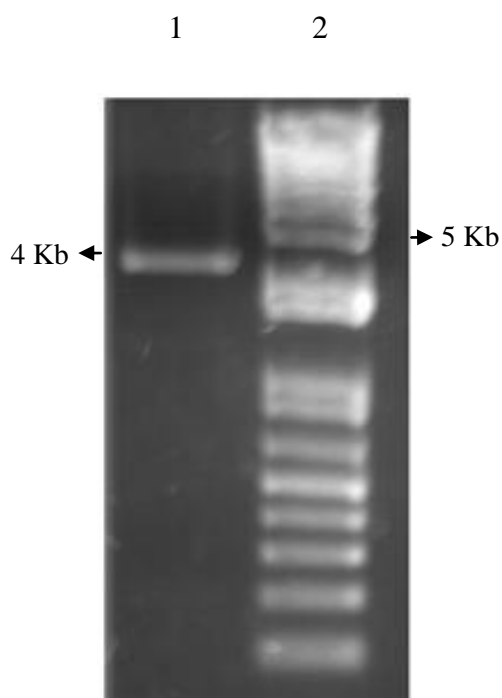
Por otra parte, se realizó una digestión total de la construcción pJET1.2::0.4Kb con las enzimas de restricción *NcoI* y *PstI*. Los resultados sugieren la liberación de fragmento viral de 0.4 Kb, debido al patrón de restricción obtenido de ~3 Kb y de ~400 pb tomando de referencia el marcador de pesos moleculares (Fig. 26).



**Figura 26. Liberación del inserto viral de 0.4Kb.** El carril 1, corresponde al Marcador de Peso Molecular GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10000 pb, *Fermentas*). El carril 2, corresponde a la construcción pJET1.2::0.4Kb no digerida. El carril 3, corresponde a la construcción pJET1.2::0.4Kb digerida con las enzimas *PstI* y *NcoI*. El fragmento liberado de 0.4 Kb se encuentra señalado con la flecha.



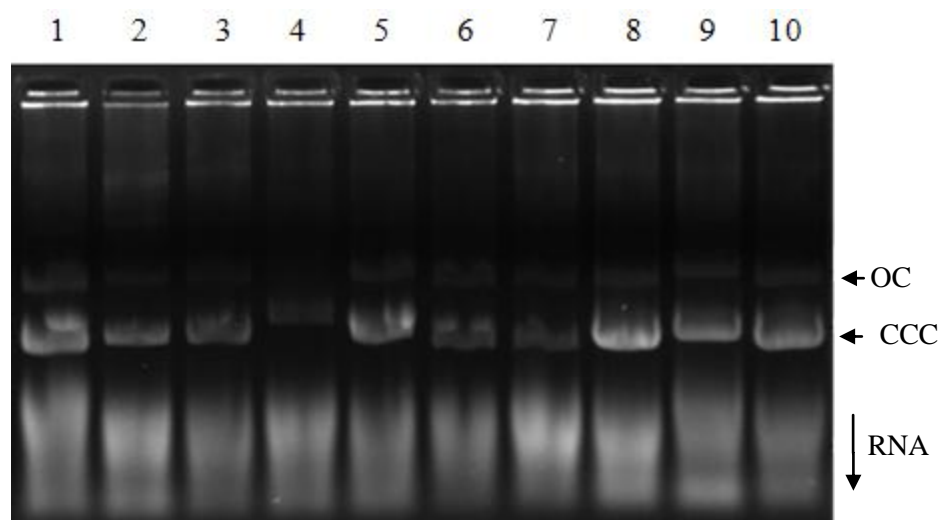
Una vez teniendo aislado el fragmento viral mencionado, se ligó mediante ensamble sitio dirigido al vector linearizado pJET1.2::0.6 mediante la actividad de la DNA ligasa T4; a esta construcción resultante se le denominó pJC410 y fue utilizada para transformar la cepa bacteriana *E.coli* TOP10 por medio de choque térmico.



**Figura 27. Construcción del vector pJC410.** El carril 1, corresponde al vector pJC410 construido mediante ensamble sitio-dirigido, el cual se encuentra señalado con la flecha y su respectivo tamaño en pares de bases. El carril 2, corresponde al marcador de peso molecular plus (1 kb, *Invitrogene*).

### 7.10 Extracción de DNA plasmídico a partir de clonas candidatas

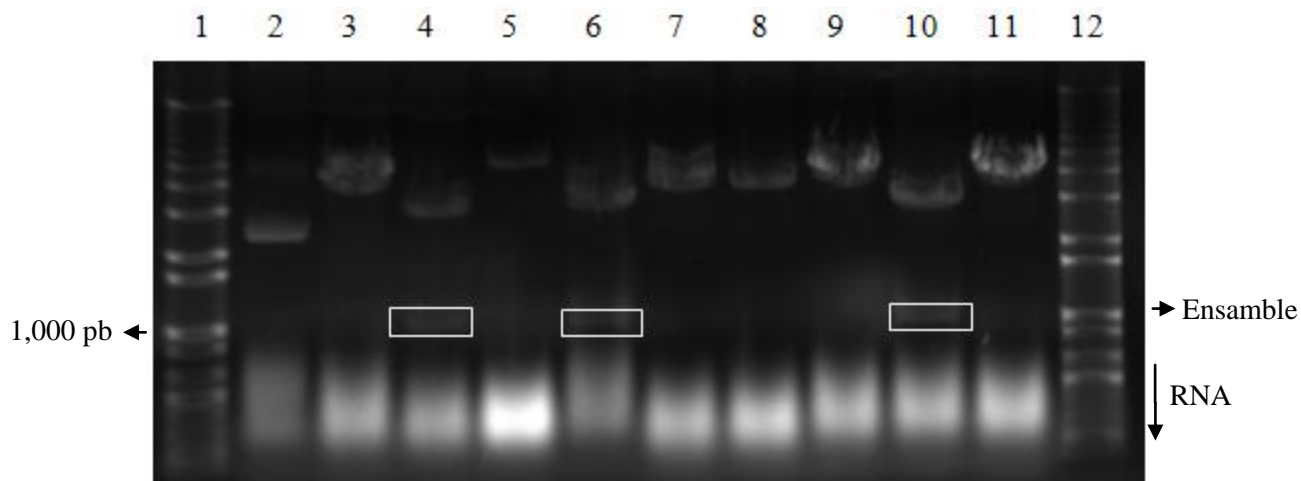
Se extrajeron un total de 10 muestras de DNA plasmídico provenientes de bacterias TOP10 transformadas con la construcción pJC410. Los resultados muestran la presencia de topoisómeros del DNA plasmídico en las 10 muestras provenientes de las transconjugantes, y la ausencia de DNA plasmídico en la 2 muestras restantes. Con respecto a los topoisómeros en las muestras de DNA plasmídico, la banda superior correspondiente a la forma circulo abierto “OC” (Por sus siglas en inglés: *Open Circular*), y la banda inferior corresponde a la forma circulo covalentemente cerrado “CCC” (Por sus siglas en inglés: *Covalently Closed Circle*) el cual presenta superhelicidad o superenrollamiento. Por otra parte, la mayoría de las muestras de DNA plasmídico muestran residuos de RNA, debido al nulo tratamiento con RNAsa (Fig. 27).



**Figura 28. Extracción de DNA plasmídico a partir de transconjugantes.** Los carriles 1-10, corresponden a extracciones de DNA plasmídico provenientes de las bacterias transformadas con la construcción pJC410. Los topoisómeros OC y CCC están señalados con flechas, así como la presencia de residuos de RNA.

### 7.11 Confirmación por análisis de restricción

A partir de una selección de clonas de *E.coli* TOP10 previamente transformadas con la construcción denominada pJC410 descrita anteriormente, se extrajo DNA plasmídico. Los DNAs extraídos se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI*, para confirmar dicho ensamble y transformación. El análisis electroforético reveló que las muestras 3, 5, y 9 (carriles 4, 6, y 11) muestran un patrón de restricción de 3 y 1 Kb, correspondiente a la construcción a pJC410, lo que sugiere que las células fueron transformadas con éxito.



**Figura 29. Confirmación de la transformación por análisis de restricción.** Los carriles 4, 6, y 10, corresponden al patrón de restricción que confirma el ensamble sitio-específico de la construcción pJC410. Los carriles 1 y 12, corresponden al Marcador de Peso Molecular (1 kb Plus, *Invitrogene*).

## 7.12 Análisis de la secuencia

La secuencia de DNA del ensamble de la construcción pJC410 se encuentra en el recuadro de la Figura 29, el cual se analizó mediante un alineamiento de secuencias en *BLASTn*, revelando un 99% de identidad con respecto al genoma de WSSV (Fig. 30).

```

AAGAATTCGAAGAAGCGCATGAATGACGCACCAGCGATTACACCTCATGTGGCCGTGTACGACTACAGTGGAGACGGGAAAGA
ACAAATTGCTCTATATGATAACCGAGTATGAAAACACGGCTAGTTGGTGCAACGCAAACGGTGTGGTCACATCTGACAGTGGAT
TTTCTAACGAATGTGCAATTAGTGATATGAATGACTTGTGCTGTTTTGCTGACTGCATCGATGTTACTGTTAATAATGAAGAA
CATGAAGAACGTTCTATGAATATTGGTTCGAATCTGACAGGCGTCTTTTTGATGCTAGTCCCTCCCCCATCAAGACGGGAAGA
AGATGGAGAAAATTCATCGTCATCGTCTTCCCTCCCAACAGTTCCTCCTACACCATACGAAGGTAACGCAGTTGTGGAGG
GGGAGGCTGCAGGCATAATGCAGTAGCGTCAACGGCATCGTCATCATCACCATCATCTTCGTTATGATACTACTGCTACTAT
TGTTACCCCCAGAAGTAATTTTGTAGTGCAGGTTCAATCTTAACCCCTTCTCATTTGTTTCATAGTAGAAAAGCTTGGCTAATTTT
TTCATAACAAGAGCATCTTCTGAACCTTCATCTTGCTACTTTTCGCTTTCATCAATTTCTTCCCTCTTCTTCCCTCCCTCCAC
AACTGCGTTACCTTCGTATGGTGTAGGAGGAGGAACTGTTGGAGAGGAAGACGATGACGATGAATTTTCTCCATCTTCTTCCG
TCTTGATGGGGGAAGGACTAGCATCAAAAAGACGCCGTGTCAGATTTCGACCACAATATTCATAGAAGCTTCTTTCATGTTCTTCA
TTATTAACAGTAACATCGATGCAGTCAGCAAAAACAGCACAAAGTCAATTCATATCACTAATTGCACATTCGTTAGAAAATCCACT
GTCAGATGTGACCACCGTTTGCCTGTCACCAACTAGCCGTGTTTTTCATACTCGGTTATCATATAGAGCAATTGTTCTTTCC
CGTCTCCACTGTAGTCGTACACGGCCACATGAGGTGAATCGCTGGTGCCTCATTCATGCGCTTCTTCCGAATTCAA

```

**Figura 30. Secuencia de DNA del constructo pJC410.** El recuadro muestra como se ensamblaron los fragmentos sentido y antisentido del gen viral

White spot syndrome virus strain K-LV1, complete genome  
Sequence ID: [gb|JX515788.1](#) Length: 295884 Number of Matches: 2

Range 1: 78581 to 79231 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1181 bits(639)	0.0	647/651(99%)	0/651(0%)	Plus/Minus

```

Query 568 GGCATAATGCGTAGCGTCAACGGCATCGTCATCATCACCATCATCTTCGTTATTGATAC 627
Sbjct 79231 GGCATAATGCGTAGCGTCAACGGCATCGTCATCATCACCATCATCTTCGTTATTGATAC 79172

Query 628 TACTGCTACTATTGTTACCCCCAGAAGTAATTTTGTAGTGCAGGTTCAATCTTAACCCCTTC 687
Sbjct 79171 TACTGCTACTATTGTTACCCCCAGAAGTAATTTTGTAGTGCAGGTTCAATCTTAACCCCTTC 79112

Query 688 TCATTTGTTTCATAGTAGAAAAGCTTGGCTAAATTTCTTCATAACAAGAGCATCTTCTGAAC 747
Sbjct 79111 TCATTTGTTTCATAGTAGAAAAGCTTGGCTAAATTTCTTCATAACAAGAGCATCTTCTGAAC 79052

Query 748 CTTCACTTGTACTTTTCGCTTTCATCAATTTCTCCTCTTCTTCCCTCCCTCCACAA 807
Sbjct 79051 CTTCACTTGTACTTTTCGCTTTCATCAATTTCTCCTCTTCTTCCCTCCCTCCACAA 78992

Query 808 CTGCGTTACCTTCGTATGGTCTAGGAGCAGCAACTGTTGGAGGGAAGACCATGACCATG 867
Sbjct 78991 CTGCGTTACCTTCGTATGGTCTAGGAGCAGCAACTGTTGGAGGGAAGACCATGACCATG 78932

Query 868 AATTTTCCCACTCTTCTTCGCTTTCATGGGGGAAGGACTAGCATCAAAAAGACGCGCTGT 927
Sbjct 78931 AATTTTCCCACTCTTCTTCGCTTTCATGGGGGAAGGACTAGCATCAAAAAGACGCGCTGT 78872

Query 928 CAGATTCGACCCACAATATTCATAGAAGCTTCTTCATGTTCTTCATTATTAACAGTAACAT 987
Sbjct 78871 CAGATTCGACCCACAATATTCATAGAAGCTTCTTCATGTTCTTCATTATTAACAGTAACAT 78812

Query 988 CGATGCAGTCAGCAAAAACAGCACAAGTCAATTCATATCACTAATTCACATTCGTTAGAAA 1047
Sbjct 78811 CGATGCAGTCAGCAAAAACAGCACAAGTCAATTCATATCACTAATTCACATTCGTTAGAAA 78752

Query 1048 ATCCACTGTCAGATGTGACCAACCGCTTTGCGTTGCACCAACTAGCCGTTTTCATACT 1107
Sbjct 78751 ATCCACTGTCAGATGTGACCAACCGCTTTGCGTTGCACCAACTAGCCGTTTTCATACT 78692

Query 1108 CGGTTATCATATAGAGCAATTTCTTTCCCGTCTCCACTGTAGTGCATACACGGCCACAT 1167
Sbjct 78691 CGGTTATCATATAGAGCAATTTCTTTCCCGTCTCCACTGTAGTGCATACACGGCCACAT 78632

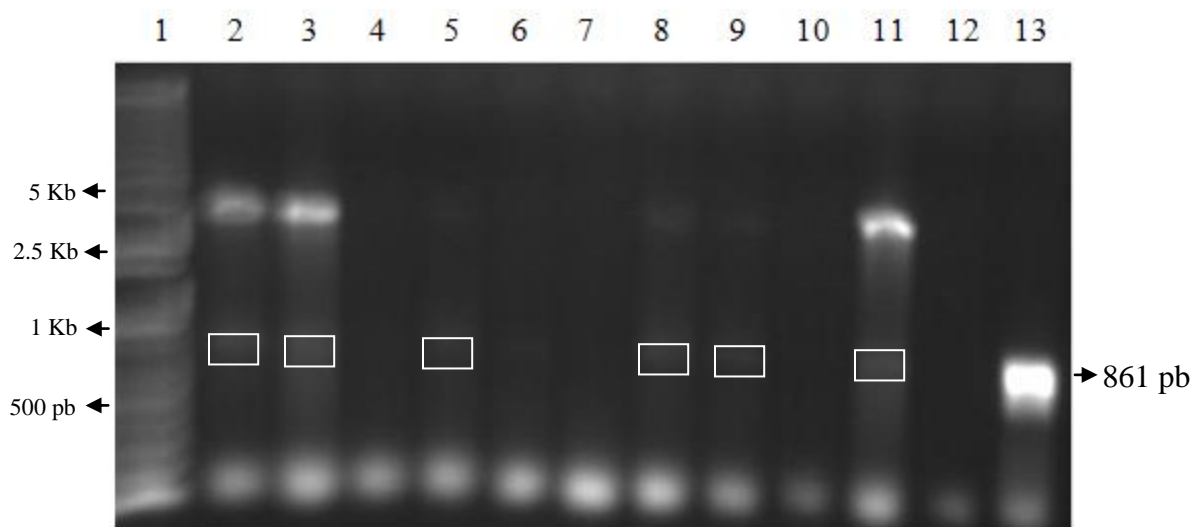
Query 1168 GAGGTGAATCGCTGGTCCGTCATTCAATGCGCTTCTTCGAATTCAAATCTT 1218
Sbjct 78631 GAGGTGAATCGCTGGTCCGTCATTCAATGCGCTTCTTCCTCTCCAAATCTT 78581

```

**Figura 31. Alineamiento de la secuencia del ensamble de la construcción pJC410 en *BLASTn*.** Figura que muestra el porcentaje de similitud del ensamble dirigido con respecto al genoma de virus WSSV, el cual se encuentra señalado en el recuadro rojo.

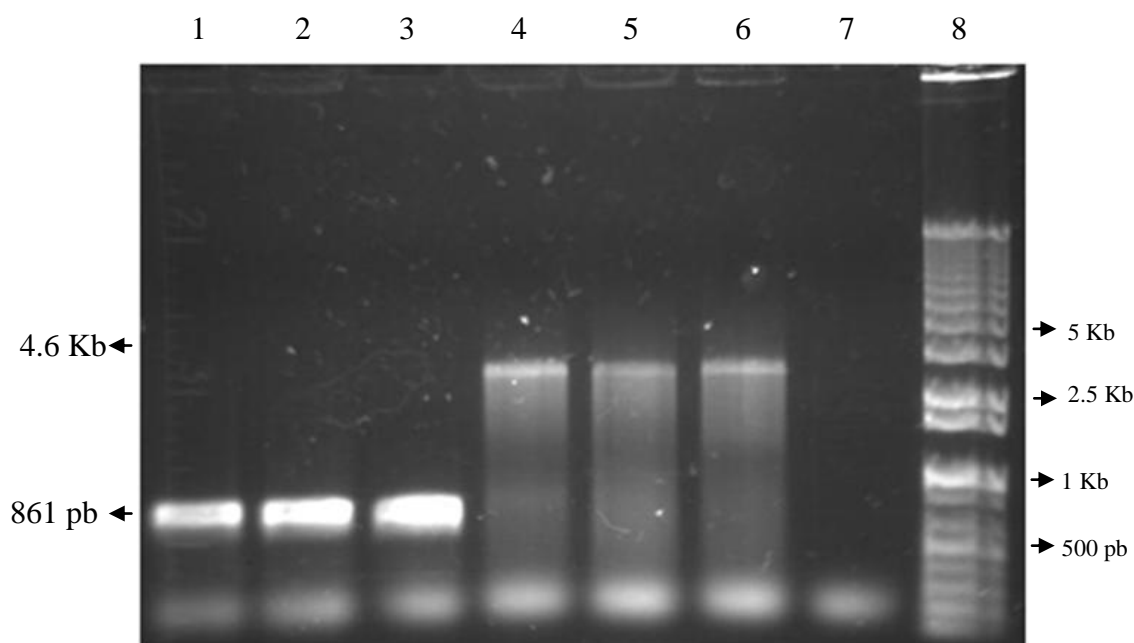
### 7.13 Confirmación de la conjugación por PCR de colonia

Tales muestras de DNA plasmídico sirvieron como templado para amplificar una región específica de la construcción pJC410 mediante PCR, utilizando los oligonucleotidos T7 + pstR1. Se incluyeron como control positivo, la construcción pJET1.2::0.6Kb, y como control negativo agua, con la finalidad de no obtener un falso positivo y tener una mejor confianza en los resultados del experimento. Los resultados revelaron productos que corresponden a los estimados en las muestras 2, 3, 5, 8, 9, 11 comparados con los controles, lo cual sugiere que estas células receptoras de HT115 (DE3) fueron conjugadas con la célula donante de JM109 conforme a los controles antes mencionados (Fig. 31). Por lo que, se realizó un segundo experimento de amplificación para tener una confianza en lectura de estos resultados, los cuales se mencionan a continuación.



**Figura 32. Confirmación de la conjugación mediante PCR de colonia.** El carril 1, corresponde al Marcador de Peso Molecular (1 kb Plus, *Invitrogene*). Los carriles 2-11, corresponden a las amplificaciones específicas con el juego de oligonucleótidos T7+pstR1. El carril 12, corresponde al control negativo. El carril 13, corresponde al control positivo (pJET1.2::0.6Kb). Los fragmentos de interés se encuentran señalados con los recuadros.

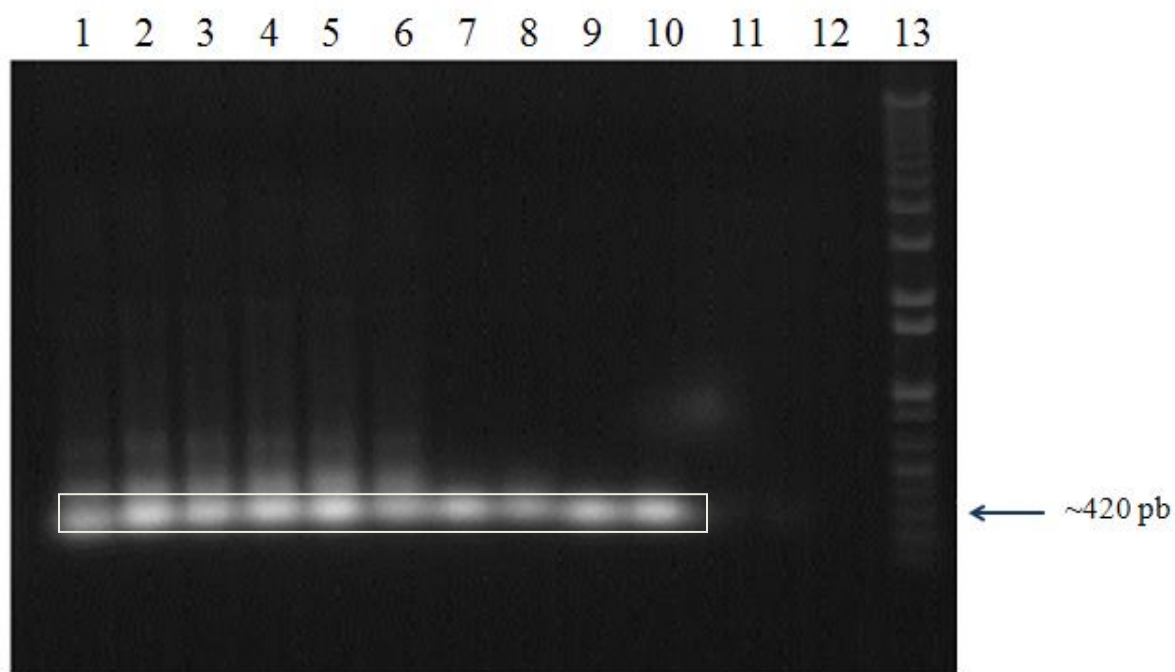
En la Figura 32, se muestra la amplificación de DNA con el mismo juego de oligonucleotido específicos, enfocándose solamente en las muestras de los carriles 2, 3, y 5. Los controles de experimentación consistieron en la utilización de DNA plasmídico pL4440 (carriles 4, 5 y 6) con un peso molecular de 4.6 Kb, y finalmente agua (carril 7) como templados para la reacción control de PCR. Los resultados revelaron un patrón de bandeo en los carriles 1, 2, y 3 consistentes al tamaño esperado de 861 pb, esto sugiere la confirmación de la conjugación entre estas dos bacterias.



**Figura 33. Confirmación de la conjugación mediante PCR de colonia.** Los carriles 1, 2 y 3, corresponden a las muestras de los carriles 2, 3 y 5 amplificadas con los oligonucleótidos T7+pstR1, respectivamente. Los carriles 4, 5, y 6, corresponden al control HT115 (DE3)::pL4440. El carril 7, corresponde al control agua. El carril 8, corresponde al Marcador de Peso Molecular (1 kb Plus, *Invitrogene*).

### 7.14 Obtención de dsRNA

Se realizó un experimento con el fin de verificar la producción de dsRNA en estas transconjugantes de HT115 (DE3), teniendo como referencia control a bacterias de HT115 (DE3) no conjugadas. La expresión transcripcional se indujo a partir de IPTG a una concentración final de 0.4mM, y la extracción de RNA total se realizó mediante Trizol. Por último, estas muestras obtenidas, se incubaron con RNAsa A y DNAsa para discernir la presencia de RNA y DNA en la muestras. El análisis electroforético reveló que la mayoría de la muestras presentan un patrón de bandeo similar de una masa molecular de 420 pares de bases que corresponde con el rango de lo esperado, lo que sugiere la presencia de dsRNA, debido a los tratamientos enzimáticos realizados en comparación con la referencia control.

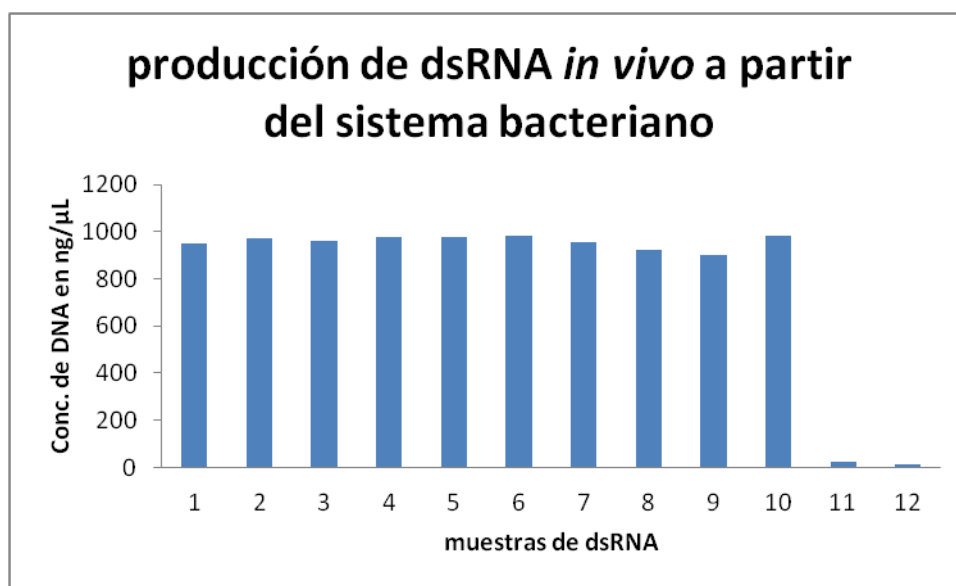


**Figura 34. Electroforesis que muestra la producción de dsRNA a partir del sistema microbiano.** El dsRNA generado a partir del sistema bacteriano se encuentra señalado con la flecha y su respectivo tamaño en pb.

El dsRNA obtenido del sistema bacteriano fue cuantificado mediante espectrofotometría dando los siguientes valores (ver tabla 9), los cuales se graficaron para tener un mejor panorama de la producción.

**Tabla 9. Cuantificación de dsRNA obtenido del sistema bacteriano**

Muestra	Concentración de DNA (ng. $\mu$ L <sup>-1</sup> )
1	951
2	971
3	961
4	976
5	977
6	981
7	957
8	922
9	902
10	983
11	022
12	014



**Figura 35. Producción de dsRNA a partir del sistema propuesto.** Figura que muestra la gráfica sobre la producción de dsRNA a partir del sistema bacteriano.



## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Uso del gen *wsv151* para la síntesis de dsRNA *in vivo*

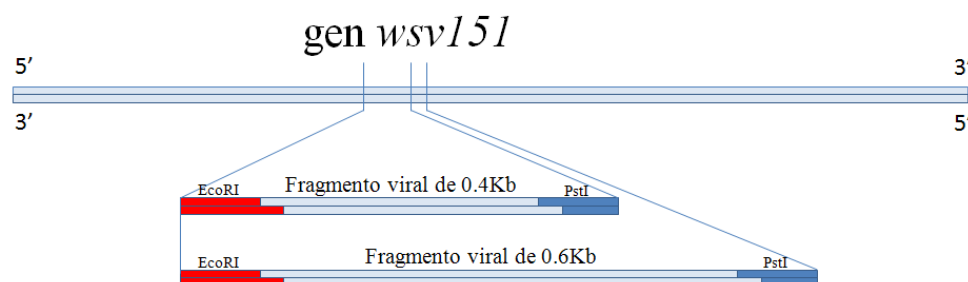
La primera parte del proyecto consistió en definir cual gen del virus WSSV podría utilizarse para la producción de dsRNA bajo el sistema bacteriano propuesto. En el presente estudio se decidió utilizar el gen *wsv151*, en base a 2 antecedentes sobre estudios de RNAi, en los cuales se evaluaron la efectividad de dsRNA específicos para genes estructurales y funcionales de WSSV, desafiándolos con inoculos de este virus en camarones *L.vannamei* (Mejía *et al.*, 2005, no publicado; Escobedo-Bonilla *et al.*, en revisión). En el primer estudio (Mejía *et al.*, 2005) se obtuvo un aumento significativo en la supervivencia hasta de 96.6%, con respecto al uso de dsRNA específico del gen *wsv151* en organismos infectados (Fig. 6). Es decir, una mortalidad menor del 10% comparado con el resto de los genes utilizados. El segundo estudio de Escobedo-Bonilla *et al.*, (en revisión) consistió en comparar la efectividad del dsRNA de *wsv151* con respecto al uso de dsRNA específico para el gen estructural *vp28*, que es comúnmente utilizado dada su efectividad en desafíos virales con WSSV. Los resultados mostraron el mismo patrón del ensayo anterior, con respecto al uso del gen *wsv151* al obtener una mortalidad menor al 10%, comparado con el dsRNA de *vp28* que obtuvo una mortalidad del 12% (Fig. 7), esto indica que el utilizar dsRNA específico del gen *wsv151* puede resultar una estrategia prometedora contra el virus WSSV dada su efectividad.

Una posible explicación acerca de las altas tasas de sobrevivencia logradas con dsRNA específico de *wsv151* (Mejía *et al.*, 2005 y Escobedo-Bonilla *et al.*, en revisión), quizás se deba a que el producto de este gen regula los promotores de otros genes relacionados con los proceso de replicación y comienzo de la lisis, o sea regulando algunos genes tempranos y tardíos (Marks *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008), y no solamente durante el periodo de latencia como lo sugieren Khadijah *et al.* (2003) y Hossain *et al.* (2004).

## 8.2 Obtención, clonación y confirmación de las regiones específicas del gen *wsv151*

La obtención de DNA genómico proveniente de camarón infectado con WSSV fue una parte esencial para el inicio del proyecto de tesis, ya que este proceso dio hincapié para la obtención de las regiones de DNA correspondientes para la construcción del plásmido pJC410. En este escenario, se probaron 4 diferentes métodos de extracción, de los cuales 2 fueron convencionales (Cruz-Hernández, 2003; Sambrook y Russell, 2001 modificado para camarón), y 2 fueron comerciales (GENECLEAN®Kit y DNAzol®Reagent). En base a los resultados obtenidos, se determinó que la extracción de DNA genómico resultante de la utilización del método de Sambrook y Russell, (2001) modificado para camarón, fue el más adecuado para la obtención DNA genómico. Sin embargo, se obtuvieron degradaciones menores en algunas de las muestras obtenidas (Fig. 8), probablemente debido a la longevidad de las muestras de tejido (2 años) fijadas en alcohol al 70%, aun así se pudo extraer DNA de cantidad y calidad suficiente para realizar pruebas de PCR. En este sentido, cuando se habla de calidad en la muestras, se refiere a la posibilidad de almacenar el DNA por tiempo indefinido, manteniendo su estructura y propiedades, y es la calidad del DNA el factor responsable de la reproducibilidad en experimentos posteriores. Por su parte, la cantidad es un concepto relativo que depende, entre otros, del número y estado de las células propias del tejido a estudiar (Sambrook y Russell, 2001; Rocha-Salavarieta, 2002; Oliveira y Revers, 2011).

Otro aspecto clave del proyecto de la tesis, fue determinar que regiones del gen *wsv151* se utilizarían para el diseño el plásmido recombinante pJC410, dado que este gen mide ~4.3 Kb de longitud. En este contexto, se decidió diseñar el bloqueo a partir de una región intermedia del gen, ya que esta región proyecta una mayor sensibilidad, reconocimiento y eficiencia de silenciamiento (comunicación personal con el Dr. Humberto Mejía). En base a lo planteado, se sintetizaron oligonucleótidos modificados con sitio de restricción que amplificaran dos fragmentos específicos de dicha región intermedia del gen *wsv151* con una característica especial, que compartieran un mismo sitio inicial (Fig. 35).



**Figura 36. Ubicación de las 2 regiones de interés en el gen *wsv151*.** La figura muestra la ubicación de las regiones del gen *wsv151* que se utilizaron para la construcción pJC410 por medio de un ensamble entre ellos en el vector pJET1.2/blunt.

Como se puede apreciar en la tabla 2, se incorporó el sitio único de restricción en el extremo 5' de la secuencia del oligonucleótido, debido a que la ubicación de este sitio no altera la especificidad de alineamiento en la secuencia blanco. Además, se decidió, añadir 2 bases más de adeninas (A) posteriores al sitio de restricción, para aumentar el reconocimiento y la eficiencia del rompimiento de las enzimas de restricción (McPherson y Møller, 2006). La razón principal de incorporar sitios únicos de restricción en los oligonucleótidos fue con la finalidad de lograr un ensamble dirigido entre los productos amplificados.

De acuerdo con McPherson y Møller, (2006) cuando se logra aislar una secuencia completa o fragmento de un gen mediante PCR por lo regular, los productos generados suelen ser purificados para posteriores usos, como: clonación, análisis de secuencias directas o para su uso en pruebas de hibridación. En este escenario, cuando se obtuvieron los patrones de bandeo que corresponden al tamaño de productos estimados (410 pb y 640 pb respectivamente), se realizó una purificación para su clonación inmediata, con el propósito de obtener una fuente permanente de los fragmentos de interés para manipulaciones futuras. La purificación reveló valores entre 1.7-1.9 por espectrofotometría, que de acuerdo a las lecturas 260/280, se considera aceptable (Stulnig y Amberger, 1994; Yeates *et al.*, 1998; Sambrook y Russell, 2001; Hansen *et al.*, 2007; Oliveira y Revers, 2011). Alternativamente, uno pudiera pensar que estas muestras presentan impurezas, dadas las lecturas por debajo de 2 obtenidas de la relación 260/230. No obstante, de acuerdo a Clark

y Christopher, (2000) se considera aceptable si el resultado de la lectura de 260/230 se encuentra por debajo de 0.5, sugiriendo libre de compuestos aromáticos o impurezas de los búferes utilizados. Esto nos permitió tener productos limpios para su clonación.

La estrategia para clonar los productos de PCR de interés, fue usar el vector pJET1.2/blunt debido principalmente a que porta un promotor T7 cercano al MCS. Esta característica resulta favorable para inducir *in vitro*, la expresión transcripcional de genes clonados en la cepa *E. coli* HT115 (DE3), puesto que contiene el fago lisogénico  $\lambda$ DE3 integrado a su genoma, lo que permite la inducción de la síntesis de la RNA polimerasa T7 en respuesta a IPTG. Las construcciones resultantes de la estrategia de clonación planteada, se denominaron pJET1.2::0.6Kb y pJET1.2::0.4Kb, las cuales hacen referencia a la integración de cada producto de interés en el vector pJET1.2/blunt. Por consiguiente, estas construcciones fueron utilizadas para transformar la cepa bacteriana *E. coli* TOP10 mediante choque térmico. En este sentido, la introducción de DNA exógeno dentro de *E. coli* por medio de transformación química, deriva de observaciones de Mandel y Higa, (1970) y Cohen *et al.* (1972), quienes demostraron que las bacterias *E. coli* tratadas en frío con una solución de CaCl<sub>2</sub>, y sometidas a un choque térmico a 37°C o 42°C, se hacen “competentes” y permiten la entrada de DNA del fago  $\lambda$  y DNA plasmídico.

El mecanismo por el cual se induce la competencia con CaCl<sub>2</sub> se desconoce. No obstante, se postulan dos modelos que explican el mecanismo de transformación. Según el primer modelo, el DNA libre se une a un receptor en la membrana celular y es transportado a través de canales, ya sea en forma circular o lineal. Este modelo se basa en el papel importante que representan los canales formados por el complejo poli- $\beta$ -hidroxi-butilato (PHB)/calcio/polifosfato en la captación y entrada de moléculas de DNA (Castuma, 1995; Huang y Reusch, 1995; Chan *et al.*, 2006). El segundo modelo asume que el choque térmico desestabiliza la membrana celular, de manera que favorece la entrada del DNA a la célula a través de poros temporales formados en aquella (Huang y Reusch, 1995; Clark *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2006).

Con respecto a la eficiencia de transformación (ET), se obtuvo una ET de  $1.92 \times 10^7$  ufc/ $\mu$ g con el uso de la construcción pJET1.2::0.4 Kb, mientras que para la construcción pJET1.2::0.6 Kb se obtuvo una ET de  $2.16 \times 10^7$  ufc/ $\mu$ g. En ambos procesos se utilizó la cepa bacteriana *E.coli* TOP10 como hospedero. Estos resultados se encuentran por debajo, de lo reportado en el catálogo No. K4500-01 de TOPO TA Cloning, que la máxima eficiencia alcanzable de esta cepa es de  $\sim 1 \times 10^9$  ufc/ $\mu$ g. Sin embargo, se consideran aceptables, ya que por lo común, la eficiencia de transformación de cada cepa bacteriana, suele oscilar entre  $10^6$  a  $10^9$  transformantes por  $\mu$ g de DNA plasmídico (Sambrook *et al.*, 1989; Tang *et al.*, 1994)

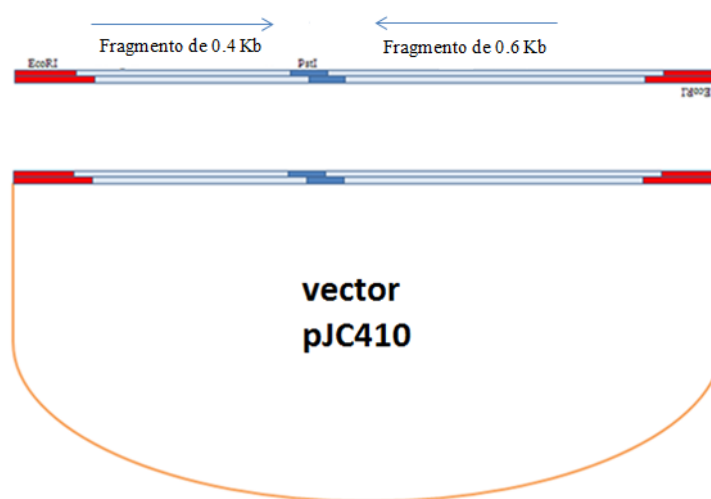
La selección y confirmación de clonas transformantes mediante PCR de colonia, permitió identificar que la clona 7 (Fig. 11) y la clona 1 (Fig. 12) transportaban en su interior, las construcciones pJET1.2::0.6Kb y pJET1.2::0.4Kb, respectivamente. Estos resultados permitieron identificar a estas clonas para purificar material genético dispuesto en DNA plasmídico mediante el kit descrito en la sección del apéndice 5, con la finalidad de enviarse a secuenciar directamente. En este contexto, las secuencias de DNA obtenidas se analizaron mediante el programa BLASTn, con el fin de buscar patrones de caracteres comunes y establecer correspondencia residuo-residuo entre las secuencias relacionadas en la base de datos del GeneBank (Altschul *et al.*, 1994; Altschul *et al.*, 1997; Altschul *et al.*, 2005; Xion, 2006). Los resultados del alineamiento en BLASTn revelaron que la secuencia “query” de 0.6 Kb corresponde con un 100% de identidad al fragmento del gen *wsv151* del genoma de WSSV. No obstante, el alineamiento de la secuencia de 0.4 Kb en BLASTn, reveló un 99% de identidad con respecto a dicho gen. Quizás este resultado se debe a errores propios del proceso de secuenciación por efecto de algún residuo de baja masa molecular en la muestra. Sin embargo, este resultado no altera la similitud con el gen alineado, puesto que son únicamente 2 nucleótidos que no se pudieron identificar correctamente.

### 8.3 Construcción del plásmido recombinante pJC410

La construcción del vector pJC410 se derivó de los fragmentos 0.6 Kb y 0.4 Kb obtenidos de pJET1.2::0.6Kb y de pJET1.2::0.4Kb, este último en dirección invertida (Fig. 36). Sin embargo, para obtener la construcción pJC410, se diseñó un mapa de restricción utilizando los softwares bioinformáticos *NEBcutter V2.0* y *Serial Cloner 3.1*, para localizar el número y posición de los sitios únicos de restricción en la construcción pJET1.2::0.6Kb, de esta manera, se analizó cual endonucleasa de restricción sería útil. El análisis del mapa de restricción de la construcción pJET1.2::0.6Kb reveló dos sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *PstI*, un sitio ubicado en uno de los extremos del inserto y el otro sitio cercano al Sitio de Clonación Múltiple o MCS del vector, mostrando ser una enzima potencial para determinar y delimitar la orientación del inserto dentro del vector en las clonas seleccionadas. Los resultados mostraron que la mayoría de las clonas utilizadas transportaban la construcción deseada. Sin embargo, únicamente se seleccionó el DNA plasmídico de la clona identificada como 5 que se muestra en el carril 6 de la figura 28 para evitar contaminaciones cruzadas.

Por otro lado, debido a que era necesario linearizar la construcción pJET1.2::0.6Kb a partir del sitio *PstI* de la región 3' del inserto viral y teniendo en cuenta que el mapa de restricción del vector pJET1.2/blunt realizado mediante los softwares bioinformáticos *NEBcutter V2.0* y *Serial Cloner 3.1*, revela la presencia de otro sitio *PstI*, se decidió realizar una cinética de restricción para obtener 2 linearizaciones fortuitas, tanto en el sitio de reconocimiento de la región 3' del inserto viral, como en el sitio de reconocimiento en el vector. Para identificar la linearización correcta, se optó por una segunda digestión, la cual implicó tener en cuenta el número de sitios de restricción y el tamaño de los fragmentos de DNA que se obtendrían. De acuerdo al mapa de restricción del vector, se decidió utilizar la enzima *NcoI*, debido a la presencia de un solo sitio de reconocimiento y su ubicación cercana al sitio *PstI* en el extremo 3' del inserto (~15 pb).

Por último, una doble digestión con las enzimas de restricción *PstI* y *NcoI*, permitió liberar el fragmento de 0.4 Kb, dejando los extremos cohesivos compatibles para dirigir el ensamble sitio-específico entre la construcción pJET1.2::0.6Kb linearizada y el fragmento viral de 0.4 Kb mediante la actividad de la enzima T4 DNA ligasa, la cual cataliza la formación de un puente fosfodiéster entre nucleótidos adyacentes.



**Figura 37.** Figura muestra el ensamblaje sitio-específico que dio origen a la construcción pJC410.

#### 8.4 Conjugación biparental y expresión de dsRNA

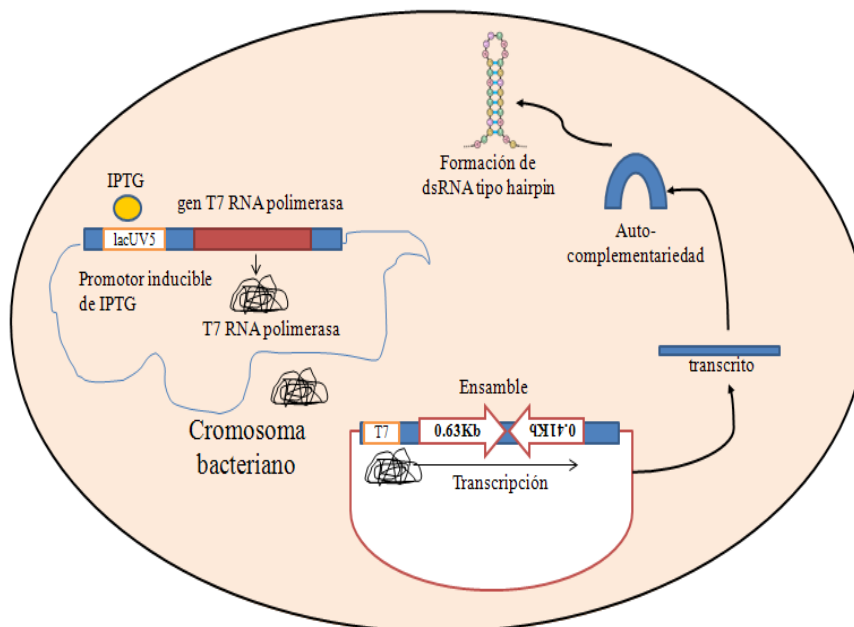
La conjugación bacteriana es el mecanismo de transferencia de material genético que ocurre entre una célula donadora, la cual es portadora de un plásmido conjugativo, y una célula receptora o recipiente libre de plásmido, mediante el contacto directo o una conexión que las une (pilus) (Phornphisutthimas *et al.*, 2007). La conjugación bacteriana es un mecanismo de transferencia horizontal de genes como la transformación y la transducción, con la diferencia de que estos últimos no involucran contacto intracelular. Este mecanismo en ocasiones es considerado como un tipo de reproducción sexual en bacterias, debido a que implica el intercambio de material genético. En este contexto, se decidió realizar esta vía de recombinación genética ocurriente en procariotas como alternativa a la de

transformación, la cual cuando se intentó, no generó colonias transformantes de la bacteria de *E. coli* HT115 (DE3).

Para validar el uso de esta técnica, se analizó el genotipo de la cepa bacteriana *E. coli* HT115 (DE3) en la base de datos OPENWETWARE (ver tabla 1) y fuentes bibliográficas para verificar si corresponde a una célula receptora. Los resultados permitieron inferir que efectivamente la bacteria es receptora, ya que carece del factor de fertilidad o plásmido F (plásmido conjugativo). Por su parte, también se analizó mediante el mismo protocolo, para identificación de que cepa bacteriana de *E. coli* podría ser utilizada como célula donante. En este sentido, se encontró que la cepa de *E. coli* JM109 presenta el factor de fertilidad ( $F^+$ ). Teniendo en cuenta estas características, se transformó la bacteria JM109 con la construcción pJC410 para iniciar el experimento de conjugación biparental.

Las transconjugantes de *E. coli* HT115 (DE3) fueron identificadas de acuerdo a su resistencia antibiótica (ampicilina-tetraciclina), perfil plasmídico y PCR convencional. La razón por la cual esta cepa es muy importante para el proyecto estriba en su genoma, el cual transporta el fago lisogénico (DE3) derivativo de la región de inmunidad del fago  $\lambda$ . Por lo tanto, transporta una copia cromosomal del gen que codifica para la RNA polimerasa T7 bajo control del promotor *lacUV5*, lo que permite inducir la expresión del gen de la RNA polimerasa T7 en respuesta a lactosa o su derivado sintético, el IPTG (Studier y Moffatt, 1986). La RNA polimerasa T7 es muy selectiva y es capaz de hacer transcritos completos de cualquier DNA que se encuentre localizado bajo el promotor T7 (Chamberlin *et al.*, 1970). Además, puede alargar una cadena de RNA ocho veces más rápido que las RNA polimerasas nativas de *E. coli* (Booner *et al.*, 1994). Con fin de tener un mayor entendimiento de este panorama, se diseñó un esquema que detalla el proceso sobre la síntesis de dsRNA mediante el sistema bacteriano propuesto (Fig. 37).





**Figura 38. Esquema de la expresión y síntesis de dsRNA bajo el sistema microbiano.** Se ilustra la síntesis de dsRNA generado a partir del sistema bacteriano, considerando los procesos principales.

El genotipo de la bacteria *E. coli* HT115 (DE3) indica que puede bioacumular el dsRNA generado debido a la interrupción del gen *rnc14*, (gen que codifica para la enzima RNAsa III) mediante la actividad del transposon Tn10 con el antibiótico tetraciclina, este proceso impide que se degrade el dsRNA dentro de la bacteria. El generar un dsRNAs, de alrededor de 400 nucleótidos, radica en el conocimiento de que en invertebrados como es el caso del camarón, los dsRNA largos ( $\geq 100$  nucleótidos) son más efectivos, ya que hacen posible producir varias moléculas de siRNA, aumentando el silenciamiento efectivo del gen blanco (Dykxhoorn *et al.*, 2003). Además, pueden ser usados efectivamente para silenciar la expresión de genes sin la activación de la proteína kinasa activada por dsRNA (PKR) o por la respuesta interferón, como en el caso en los sistemas celulares en mamíferos (Barracco *et al.*, 2008). Por último, cabe mencionar que actualmente no existe ningún reporte científico sobre el uso del gen *wsv151* para estudios de síntesis de dsRNA *in vivo* bajo algún sistema microbiano, y estos resultados sugieren que este modelo de producción de dsRNA puede fomentar una plataforma tecnológica para combatir el virus WSSV en campo.

## 9. CONCLUSIONES

1. Se clonaron dos fragmentos del gen *wsv151* en la cepa de *E. coli*, los cuales fueron utilizados para la construcción del plásmido pJC410 capaz de producir un dsRNA tipo *hairpin* con las regiones parciales sentido y antisentido del gen.
2. La transferencia del plásmido pJC410 dentro de la cepa HT115 (DE3) de *E. coli* resultó exitosa mediante el empleo de la conjugación biparental.
3. Los análisis de restricción, amplificación específica por PCR y secuenciación del plásmido pJC410 permitieron confirmar que la cepa JC-Wsv151-410 derivada de la cepa HT115 (DE3) de *E. coli* tiene el constructo diseñado.
4. Según se demostró posteriormente la cepa HT115 (DE3) de *E. coli* produjo RNA de doble cadena específico, molécula que deberá ser evaluada en bioensayos de reto en cuanto a su capacidad de silenciamiento del gen en cuestión; pudiendo ser la base de producción del biofármaco que inhiba la replicación de una infección por el virus de la mancha blanca en el camarón de cultivo.
5. Por lo anterior, el uso del gen *wsv151* como estrategia de control resulta interesante y prometedor contra la enfermedad del Síndrome de la Mancha Blanca.

## 10. PERSPECTIVAS

1. El constructo pJC410 pretende servir de plataforma tecnológica para la producción de dsRNA *in vivo* para una posible aplicación en campo y una forma de reducir los gastos de operación, por lo tanto, deberán continuarse las investigaciones para evaluar la cantidad de dsRNA específico que puede generar la cepa que transporta tal constructo.
2. Realizar los bioensayos de reto contra el virus WSSV con el fin de evaluar la efectividad del producto generado por el constructo pJC410.
3. Subclonar la construcción pJC410 en una levadura marina (*Yarrowia lipolitica*) con el fin de optimizar la producción de dsRNA específico contra el virus de la mancha blanca y buscar la mejor manera de aplicar esta tecnología incorporándola a una dieta para el camarón.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Alday, V. 1999. Diagnóstico y prevención de la enfermedad del punto blanco. *El Mundo Acuícola*. 5(1): 3-6.
- Altschul, S.F., Boguski, M.S., Gish, W., Wootton, J.C. 1994. Issues in searching molecular sequence databases. *Nature Genetics*. 6: 119-129.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25: 3389-3402.
- Altschul, S.F., Wootton, J.C., Gertz, E.M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schaffer, A.A., Yu, Y.K. 2005. Protein database searches using computationally adjusted substitution matrices. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. 272: 5099-5100.
- Álvarez-Ruiz, P. 2012. Inducción de la actividad antiviral por el silenciamiento del gen endógeno *rab7* en *Litopenaeus vannamei* mediante RNA de interferencia. Tesis Doctoral en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, Centro de Investigaciones Biológica del Noroeste.
- Balasubramanian, G., Sarathi M., Venkatesan, C., Thomas, J., Sahul-Hameed, A.S. 2008. Oral administration of antiviral plant extract of *Cynodon dactylon* on a large scale production against White spot syndrome virus (WSSV) in *Penaeus monodon*. *Aquaculture*. 279: 2-5.
- Barracco, M.A., Perazzolo, L.M., Rosas, R.G. 2008. Inmunología del camarón pp. 169-224. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Peneidos. *Programa CYTED Red II-D Vannamei*, Panamá, Republica de Panamá, 270pp.

- Bondad-Reantaso, M.G., Subasinghe, R.P., Arthur, J.R., Ogawa, K., Chinabut, S., Adlard, R., Tan, Z., Shariff, M., 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology*. 132: 249-272.
- Bustillo-Ruiz, M.I, Escobedo-Bonilla, C.M., Sotelo-Mundo, R.R. 2009. Revisión de patogénesis y estrategias moleculares contra el virus del síndrome de la mancha blanca en camarones penidos. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 44(1): 1-11
- Castuma, C.E., Huang, R., Kornberg, A., Reusch, R.N. 1995. Inorganic Polyphosphates in the Acquisition of Competence in *Escherichia Coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 270 (22): 12980-12983.
- Coen, D.M., Kosz-Vnenchak, M., Jacobson, J.G., Leib, D.A., Bogard, C.L., Schaffer, P.A., Tyler, K.L., Knipe, D.M., 1989. Thymidine kinase negative herpes simplex virus mutants established latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 86: 4736-4740.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Hsu, L. 1972. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 69: 2110-2114.
- Coleman, H.M., Lima, B., Morton, V., Stevenson, P.G., 2003. Murine gammaherpesvirus 68 lacking thymidine kinase shows severe attenuation of lytic cycle replication in vivo but still establishes latency. *Journal of Virology*. 77: 2410-2417.
- Correa de Adjounian, M.F., Adjounian, H., & Adjounian, S. H. 2008. Silenciamiento de genes mediante RNA interferencia Consideraciones sobre el mecanismo y diseño de los sistemas efectores. *Archivos venezolanos de farmacología y Terapéutica*. 27(1): 22-26

- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Liao, I.C. 2003. Dietary-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 15: 297-310.
- Chan, J., Davis, C., Jokic, I. 2006. Influences of growth temperature and preparation of competent cells on efficiency of chemically-induced transformation in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*. 9: 92-96.
- Chaves-Sánchez, M.C., Higuera-Ciapara, I. 2003. Manual de buenas prácticas de producción acuícola de camarón para la inocuidad alimentaria. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Mazatlán, México. 1-95pp.
- Clark, W., Christopher, K. 2000. An introduction to DNA: spectrophotography, degradation, and the frankengel experiment, 81-99 pp. In Karcher, S.J (ed.). 2000. Tasted studies for laboratory teaching, Volume 22, 22<sup>nd</sup> Work Shop/Conference of the association for Biology Laboratorio Educational (ABLE). University of Alberta, Canada, 489 pp.
- Clark, J., Hudson, J., Mak, R., McPherson, C., Tsin, C. 2002. A look at transformation efficiencies in *E. coli*: An investigation into the relative efficiency of *E. coli* to take up plasmid DNA treated with the complex molecular trivalent cations spermine or spermidine within the context of the Hanahan protocol for transformation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*. 2: 68-80
- Cruz-Hernández, P. 2003. Identificación, caracterización y herencia de microsatélites y su aplicación como marcadores moleculares en un programa de mejoramiento de camarón blanco *Litopenaeus vannamei*. Tesis Doctoral en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, Centro de Investigaciones Biológica del Noroeste.
- Barracco, M.A., Perazzolo, L.M., Rosas, R.G. 2008. Inmunología del camarón pp. 169-224. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica - Patología e

- Inmunología de Camarones Peneidos. *Programa CYTED Red II-D Vannamei*, Panamá, República de Panamá, 270pp.
- Dieffenbach, C., Dveksler, G. 2003. Primer design PCR primer laboratory manual. 2nd Ed. 61-75pp.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., Sharp, P.A. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature*. 4: 457-466.
- Elbashir, S.M., Harborth J., Lendeckel, W., Yalcin, A, Weber, K., Tuschl, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411(6836):494-8.
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J. 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *Journal of fish diseases*. 31(1): 1-18.
- Escobedo-Bonilla, C.M. 2008. Problemática del Uso de Bioensayos de Reto Virales para Evaluar la Eficacia de Productos con Actividad Antiviral Suministrados en los Alimentos y Otros Productos para Reducir el Impacto del Virus de la Mancha Blanca. 455 - 469 pp. Editores: L. Elizabeth Cruz Suárez, Denis Ricque Marie, Mireya Tapia Salazar, Martha G. Nieto López, David A. Villarreal Cavazos, Juan Pablo Lazo y Ma. Teresa Viana. Avances en Nutrición Acuícola IX. IX Simposio Internacional de Nutrición Acuícola. 24-27 Noviembre. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.
- Escobedo-Bonilla, C.M. 2011. Application of RNA interference (RNAi) against viral infections in shrimp: A Review. *Journal Antivirals & Antiretrovirals* S9. doi:10.4172/jaa.S9-001.

- Esparza-Leal, H.M., Magallón-Barajas, F.J., Portillo-Clark, G., Perez-Enriquez, R., Álvarez-Ruíz, P., Escobedo-Bonilla, C.M., Méndez-Lozano, J., Mañón-Ríos, N., Valerio-García, R.C., Hernández-López, J., Vibanco-Pérez, N., Casillas-Hernández, R., 2010. Infection of WSSV-negative shrimp, *Litopenaeus vannamei*, cultivated under fluctuating temperature conditions. *Journal of the World Aquaculture Society*. 41: 912-922.
- FAO – Fisheries and Aquaculture Department, 2007. *Aquaculture Newsletter*, 36p.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391: 806–811.
- Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K. 2011. Shrimp molecular responses to viral pathogens. *Marine biotechnology*. 13(4): 587–607.
- Flint, S., Enquist, L., Krug, R., Racaniello, V. Skalka, A. 2000. Principles of virology: Molecular biology, pathogenesis and control of animal viruses. ASM Press, Washington. 944 pp
- Guan, Y., Yu, Z., Lia, C., 2003. The effects of temperature on white spot syndrome infections in *Marsupenaeus japonicus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 83: 257-260.
- Groves, A.K., Cotter, M.A., Subramanian, C., and Robertson, E.S. 2001. The latency-associated nuclear antigen encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates two major essential Epstein-Barr virus latent promoters. *Journal of Virology*. 75: 9446–9457.



- Hills, D., Moritz, C., Mable, B. 1996. Molecular systematic 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc. Canada. 169–321 pp.
- Huang, R., Reusch R.N. 1995. Genetic competence in *Escherichia coli* requires poly- $\beta$ hydroxybutyrate/calcium phosphate membrane complexes and certain divalent cations. *Journal of Bacteriology*. 177: 486-490.
- Iwanaga, S., Lee, B.L. 2005. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry and molecular Biology. Biol.* 38: 128–150.
- Jiravanichpaisal, P., Bangyeekhun, E., Soderhall, K., Soderhall, I. 2001. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 47: 151-157.
- Khadijah, S., Neo, S. Y., Hossain, M. S., Miller, L.D., Mathavan, S., Kwang, J. 2003. Identification of white spot syndrome virus latency-related genes in specific pathogen-free shrimps by use of a microarray, *Journal of Virology*. 77: 10162-10167.
- Kim, C.S., Kosuke, Z., Nam, Y.K., Kim, S.K., Kim, K.H. 2007. Protection of shrimp (*Penaeus chinensis*) against white spot syndrome virus (WSSV) challenge by double-stranded RNA. *Fish & Shellfish Immunology*. 23: 242-246.
- Kim, D.H., Belkhe, M.A., Rose, S.D., Chang, M.S., Choi, S., Rossi, J.J. 2005. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nature Biotechnology*. 23: 222-226.
- Kozak, M. 1989. The scanning model for translation: an update. *Journal of Cell Biology*. 108: 229-241.

- Labreuche, Y., Warr, G.W. 2013. Insights into the antiviral functions of the RNAi machinery in penaeid shrimp. *Fish & shellfish immunology*. 34(4): 1002–1010.
- Lee, S.Y., Söderhäll, K. 2002. Early events in crustacean innate immunity. *Fish Shellfish Immunology*. 12: 421-437.
- Leib, D.A., Nadeau, K.C., Rundle, S.A., and Schaffer, P.A. 1991. The promoter of the latency-associated transcripts of herpes simplex virus type 1 contains a functional cAMP-response element: role of the latency-associated transcripts and cAMP in reactivation of viral latency. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*. 88: 48-52.
- Leu, J.H., Yang, F., Zhang, X., Xu, X., Kou, G.H., and Lo, C.F. 2009. Whispovirus. 198-223 pp. In: James, L., Van Etten (ed.). 2009. Lesser Known Large dsDNA Viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Verlag Berlin Heidelberg*. 328pp.
- Li, Z., Lin, Q., Chen, J., Wu, J.L., Lim, T.K., Loh, S.S., Tang, X., Hew, C.L. 2007. Shotgun identification of the structural proteome of shrimp white spot syndrome virus and iTRAQ differentiation of envelope and nucleocapsid subproteomes. *Molecular and Cellular Proteomics*. 6: 1609-1620.
- Lightner, D.V. 1999. The Penaeid Shrimp Viruses TSV, IHHNV, WSSV, and YHV: Current Status in the Americas, Available Diagnostics Methods, and Management Strategies. *Journal of Applied Aquaculture*. 9(2): 27-52.
- Lightner, D.V. 2005. Biosecurity in shrimp farming: pathogen exclusion through use of SPF stock and routine surveillance. *Journal of the World Aquaculture Society*. 36: 229-247.

- Lightner D.V. 2011. Virus diseases of farmed shrimp in the western Hemisphere (the Americas): A review. *Journal of Invertebrate Pathology*. 106: 110-130.
- Liu, W.J., Chang, Y.S., Wang, H.C., Leu, J.H., Kou, G.H., Lo, C.F. 2008. Transactivation, dimerization, and DNA-binding activity of white spot syndrome virus immediate early protein IE1. *Journal of Virology*. 82(22): 11362-11373.
- Lo, C.F., Ho C.H., Chen, C.H., Liu, K.F., Chiu Y.L., Yeh, P.Y., Peng, S.E., Hsu, H.E., Liu, H.C., Chang, C.F., Su, M.S., Wang, C.H., Kou, G.H. 1997. Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organs. *Diseases of Aquatic Organisms*. 30: 53-72.
- Lotz, J.M., Anton, L.S., Soto, M.A., 2005. Effect of chronic Taura syndrome virus infection on salinity tolerance of *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 65: 75-78.
- Mandel, M., Higa, A. 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of Molecular Biology*. 53: 159-16.
- Maldonado, M., Rodriguez, J., De Blas, I. 2004. El camarón de cultivo frente al WSSV, su principal patógeno. *AquaTIC*. 23: 20-35.
- Marks, H., van Duijse, J.J.A., Zuidema, D., van Hulten, M.C.W., Vlak, J.M. 2005. Fitness and virulence of an ancestral White Spot Syndrome Virus isolate from shrimp. *Virus Research*. 110: 9-20.
- Martínez-Cordero, J.M., Sánchez-Zazueta, E., Mariscal-Lagarda, M. 2011. Aplicación del análisis bioeconómico en la acuicultura: efectos de las estrategias de manejo en la rentabilidad de granjas camaronícolas en el noroeste de México pp.165-175. En: Ruiz-

- Luna, A., Berlangas-Robles, C.A., y M, Betancourt-Lozano (eds). 2011. Avances en acuicultura y manejo ambiental. 1<sup>a</sup> ed. Editorial Trillas, CIAD. México. 304pp.
- Martínez-Córdova, L.F. 1994. Camaronicultura: Bases Técnicas y Científicas Para el Cultivo de Camarones Peneidos. AGT Editor S.A. México, D.F. 233pp. ISBN: 968-463-072-7
- Mejía-Ruiz, C.H. and Escobedo-Bonilla, C.M. 2008. New contributions for genomic studies of white spot virus (WSSV) and shrimp. *Panorama Acuicola Magazine*. 13(4): 56-63.
- Mejía-Ruiz, C.H., Vega-Peña, S., Álvarez-Ruiz, P., Escobedo-Bonilla, C.M. 2011. Double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) vp28 or vp26 reduced susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to WSSV, and survivors exhibited decreased susceptibility in subsequent re-infections. *Journal of invertebrate pathology*. 107(1): 65–8.
- Morales-Covarrubias, M.C. 2010. Enfermedades del camarón: detección mediante análisis en fresco e histopatología. 2<sup>a</sup> ed. Editorial Trillas-CIAD. México. 180pp. ISSN: 978-607-17-0436-8.
- Moser, J. R., Galván, D. A., Mendoza, F., Encinas, T., Coronado, D. E., Portillo, G., Risoleta, M., *et al.* 2012. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. *Aquaculture*. 326-329.
- McPherson, M.j., Møller, S.G. 2006. PCR the basics (2<sup>th</sup> Ed.). Taylor & Francis Group. EUA. 23-63 pp. ISBN 0-203-00267-9.

- Oliveira, N., Revers, L.F. 2011. Developing a rapid, efficient and low cost method for rapid DNA extraction from arthropods. *Ciencia rural*. 41(9): 1563-1570.
- Ongvarrasopone, C., Roshorm, Y., & Panyim, S. 2007. A simple and cost effective method to generate dsRNA for RNAi studies in invertebrates. *Science asia*. 33: 35-39.
- Pantoja, C. y D.V. Lightner. 2008. Enfermedades virales pp. 55-114. En: Morales, V. y J. Cuéllar-Anjel (eds.). 2008. Guía Técnica - Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos. *Program CYTED Red II-D Vannamei*, Panamá, República de Panamá. 270pp.
- Peraza-Gómez, V., Luna-González, A., Campa-Córdova, A., López-Meyer, M., Fierro-Coronado, A., Álvarez-Ruiz, P. 2009. Probiotic microorganisms and antiviral plants reduce mortality and prevalence of WSSV in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. *Aquaculture Research*, 40: 1481-1489.
- Prichard, M.N., Gao, N., Jairath, S., Mulamba, G., Krosky, P., Coen, D.M., Parker, B.O., Pari, G.S., 1999. A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency. *Journal of virology*. 73: 5663-5670.
- Phornphisutthimas, S., Thamchaipenet, A., Panijpan, B. 2007. Conjugation in *Escherichia coli*. *Biochemistry and molecular biology education*. 35(6): 440-445.
- Rahman, M.M., Escobedo-Bonilla, C.M., Corteel, M., Dantas-Lima, J.J., Wille, M., Alday-Sanz, V., Pensaert, M.B., Sorgeloos, P., Nauwynck, H.J. 2006. Effect of high water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. 261: 842-849.

- Rampel, R.E., Anderson, M.K., Evans, E., Trakman, P., 1990. Temperature-sensitive vaccinia virus mutants identify a gene with a essential role in viral replication. *Journal of virology*. 64: 574–583.
- Robalino, J., Bartlett, T., Shepard E.F., Prior, S., Jaramillo, G., Scura, E., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L. & Warr G.W. 2005. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to non-specific immunity in marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response?. *Journal of Virology*. 79: 13561-13571.
- Robalino, J., Browdy, C.L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., Warr, G. 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine shrimp invertebrate. *Journal of virology*. 78: 10442-10448.
- Rocha-Salavarieta, P.J. 2002. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas*. 23(3): 9-17.
- Rodríguez-Gutiérrez, M., Linné-Azueta, M., Rodríguez-Cázares, D.G., Monroy-García, Y., Mata-Sotres, J.A. 2001. Manual de Enfermedades de Camarones Peneidos en México. *Conapesca: Boletín del programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico*. 2(14): 1-10.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.T. 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2ed. Book. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU. 1,82-1,84 pp.
- Sánchez-Paz, A. 2010. In review, White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. *Veterinary research*. 41(6): 43.
- Sánchez-Martínez, J. G., Aguirre-Guzmán, G., Mejía-Ruíz, H. 2007. White Spot Syndrome Virus in cultured shrimp. *Aquaculture Research*. 38(13): 1339-1354.

- Sangamaheswaran, A.P., Jeyaseelan, M.J. 2001. White Spot Viral Disease in Penaeid Shrimp. *The ICLARM Quarterly*. 24: 3-4.
- Sarathi, M., Simon, M.C., Ahmed, V.P.I., Kumar, S.R., & Hameed, A.S.S. 2008. Silencing VP28 gene of white spot syndrome virus of shrimp by bacterially expressed dsRNA. *Marine biotechnology*. 10(2): 198-206.
- Singh, I.S.B., Manjusha, M., Pai, S.S., Philip, R. 2005. *Fenneropenaeus indicus* is protected from white spot disease by oral administration of inactivated white spot syndrome virus. *Diseases of Aquatic Organisms*. 66(3): 265-70.
- Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J., Ge, W., Linsley, P.S., Paddison, P.J., Hannon, G.J., Cleary, P.J. 2005. Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nature Biotechnology*. 23: 227-231.
- Schwoebel, E.D., Moore, M.S., 2000. The control of gene expression by regulated nuclear transport. *Essays in Biochemistry*. 36: 105-113.
- Shahadat-Hossain, M., Khadijah, S., Kwang, J. 2004. Characterization of ORF89: a latency-related gene of white spot syndrome virus. *Virology*. 325: 106-115.
- Shugar, D., 1999. Viral and host-cell protein kinases: enticing antiviral targets and relevance of nucleoside, and viral thymidine, kinases. *Pharmacology & Therapeutics*. 82, 315– 335.
- Smith, V., Brown, J., Hauton, C. 2003. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection?. *Fish & Shellfish Immunology*. 15: 71-90.

- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., Schreiber, R.D. 1998. How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry*. 67: 227-264.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J., Dubendorff, J.W. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in enzymology*. 185: 60-89.
- Stulnig, T.M., Amberger, A. 1994. Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *Biotechniques*. 16(3): 402-4.
- Tang, X., Nakata, Y., Li, H., Zhang, M., Gao, H., Fujita, A., Sakatsume, O., Ohta, T., Yokoyama, K. 1994. The optimization of preparations of competent cells for transformation of *E. coli*. *Nucleic Acids Research*. 22: 2857-2858.
- Tirasophon, W., Yodmuang, S., Chinnirunvong, W., Plongthongkum, N., Panyim S. 2007. Therapeutic inhibition of yellow head virus multiplication in infected shrimps by YHV-protease dsRNA. *Antiviral Research*. 74(2): 150-5.
- Timmons, L., Court, D.L., Fire, A. 2001. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 263: 103-112.
- Tolmachov, O.E. 1999. DNA Cloning in Plasmid Vectors. *Comprehensive Biotechnology*. 53: 60-71
- Tsai, J.M., Wang, H.C., Leu, J.H., Wang, A.H.J., Zhuang, Y., Walker, P.J., Kou G.H., Lo C.F. 2006. Identification of the nucleocapsid, tegument and envelope proteins of the shrimp white spot syndrome virus virion. *Journal of Virology*. 80: 3021-3029.
- Vaca, L. 2004. RNA interferente: una herramienta y un novedoso mecanismo de regulación génica. *Mensaje Bioquímico-UNAM*. 28: 45-60.



- Van Hulst, M.C.W., Goldbach, R.W., Vlak, J.M. 2000a. Three functionally diverged major structural proteins of white spot syndrome virus evolved by gene duplication. *Journal of General Virology*. 81: 2525-2529.
- Van Hulst, M.C.W., Westenberg, M., Goodall, S.D., Vlak, J.M. 2000b. Identification of two major virion protein genes of white spot syndrome virus of shrimp. *Virology*. 266: 227-236.
- Van Hulst, M.C.W., Witteveldt, J., Peters, S., Kloosterboer, N., Tarchini, R., Fiers, M., Sandbrink, H., Klein-Langhorst, R., Vlak, J.M. 2001. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. *Virology*. 286: 7-22.
- Vaseeharan, B., Anand, P.T., Murugan, T., Chen, J.C. 2006. Shrimp vaccination trials with the VP292 protein of white spot syndrome virus. *Letters in Applied Microbiology* 43: 137-142.
- Vega S., Mejía-Ruíz H., Escobedo-Bonilla C.M. Survival of shrimp treated with dsRNA against white spot syndrome virus non-structural genes ORF89 and VP191 upon a WSSV challenge with high infectious dose. World Aquaculture Society 09. A blue revolution to feed the World. Veracruz, México September 25-29, 2009.
- Wang, Q., White, B.L., Redman, R.M., Lightner, D.V., 1999. *Per os* challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. *Aquaculture*. 170: 179-194.
- Westenberg, M., Heinhuis, B., Zuidema, D., Vlak, J.M. 2005. siRNA injection induces sequence-independent protection in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus. *Virus Research*. 114: 133-139.

- Williams, R.B. 1997. Role of the double-stranded RNA activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochemical Society Transactions*. 25: 509-513.
- Witteveldt, J., Vlak, J.M., van Hulten, M.C. 2004. Protection of *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus using a WSSV subunit vaccine. *Fish Shellfish Immunology*. 16: 571-579.
- Wolf, D.G., Courcelle, C.T., Prichard, M.N., Mocarski, E.S., 2001. Distinct and separate roles for herpesvirus-conserved UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and encapsidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A.* 98: 1895-1900.
- Xion, J. 2006. Sequence Alignment in Xion J (Ed.). *Essential Bioinformatics*. Cambridge University Press. EUA. 31-49 pp.
- Xu, J., Han, F., Zhang, X. 2007. Silencing shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Research*. 73: 126-131.

## 12. APÉNDICES

**Apéndice 1.** Extracción DNA genómico mediante el método de Sambrook y Russel. (2001) modificado para camarón.

1. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Fenol y se mezcló por vortex levemente.
2. Se centrifugó 6 minutos a 13,000 rpm.
3. Se recuperó cuidadosamente la fase acuosa (superior) y se transfirió a un tubo nuevo.
4. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Cloroformo y se mezcló por vortex levemente.
5. Se centrifugó 6 minutos a 13,000 rpm.
6. Se recuperó cuidadosamente la fase acuosa (superior) y se pasó a un tubo nuevo.
7. Se agregaron 8  $\mu\text{L}$  de acetato de amonio 5M, y se mezcló levemente.
8. Se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (el doble del volumen recuperado).
9. Se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  aproximadamente por 24 hrs.
10. Se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm.
11. Se decantó el etanol absoluto, cuidando de no despegar el pellet del tubo.
12. Se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%.
13. Se centrifugó 6 minutos a 14,000 rpm.
14. Se pipeteó cuidadosamente el etanol al 70%, cuidando de no despegar el pellet del tubo.
15. Se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 10 minutos para evaporar completamente el etanol.
16. El pellet de DNA se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$ .

**Apéndice 2.** Preparación de soluciones

1. Se disolvieron 1.11 g de  $\text{CaCl}_2$  en un volumen final de 100 mL de agua destilada.
2. Se esterilizó a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos a 15 psi.
3. Se almacenó a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

**Apéndice 3.** Preparación de medio LB (Luria-Bertani)

Para 1 litro de medio LB (Luria-Bertani):

1. Se mezcló:   Triptona.....10gr  
                  Extracto de levadura.....5gr  
                  NaCl.....5gr
2. Se disolvió en 800 mL de agua destilada, y se ajustó el pH a 7.0 con NaOH.
3. Se aforó a 1000 mL.
4. Se esterilizó por autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos (15psi).

**Apéndice 4.** Purificación de productos de PCR mediante el kit *QIAquick PCR purification*

1. Se añadieron 5 volúmenes de Buffer PB a un volumen del producto PCR y se mezcló suavemente.
2. Se colocó las columnas *QIAquick spin* en tubos de 2 mL.
3. Se agregó la muestra de estudio a la columna y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm.
4. Se decantó el producto filtrado y se volvió a colocar la columna en el tubo de 2mL.
5. Se lavó la columna añadiendo 0.75 mL del buffer PE, y se centrifugó por 1 minuto a 13,000 rpm.
6. Se decantó el producto filtrado y volvió a colocar la columna en el tubo de 2 mL, y se centrifugó por 1 minuto.
7. Se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 mL.
8. Se añadió de 35 $\mu$ L del buffer EB a la columna, y se dejó reposar por 1 minuto.
9. Se centrifugó a 13,000rpm durante 1 minuto para eluir el DNA contenido en la columna.
10. Se verificó la cantidad cuantificándolo mediante espectrofotometría y su calidad verificó mediante un análisis electroforético.

**Apéndice 5.** Extracción de DNA plasmídico mediante el kit “*RPM Miniprep*”

1. Se inoculó una colonia transformada en 3-5 mL de medio LB con su respectivo antibiótico.
2. Se dejó crecer el cultivo por toda la noche a 37°C en agitación a 225 rpm.
3. Se cosechó a 3500 rpm por 7 minutos.
4. Se añadió 50 µL **Pre-Lysis Buffer**, y se mezcló por vortex.
5. Se añadió 100 µL **Alkaline Lysis Solution**, y se mezcló por inversión cuidadosamente (5 veces), dejándose incubar a temperatura ambiente por 1 minutos.
6. Se añadió 100 µL **Neutralizing Solution**, y se mezcló brevemente por vortex.
7. Se centrifugó por 2 minutos a 12,000 rpm.
8. Se removió el sobrenadante, y se transfirió al filtro **SPIN Filter**,
9. Se añadió 250 µL de **GLASSMILK SpinBuffer** y se mezcló por pipeteo, dejándose reposar por 1 minuto.
10. Se centrifugó por 1 minuto a 12,000 rpm, y se desechó el filtrado.
11. Se añadió 350 µL de **Wash Solution** al filtro.
12. Se centrifugó por 1 minuto a 12,00 rpm, y se desechó el filtrado.
13. Se transfirió el filtro a un tubo nuevo y se añadió 50 µL de agua miliQ a la membrana de sílica, dejándose reposar por 1 minuto
14. Se eluyó el DNA contenido en el filtro por medio de centrifugación por 1 minuto a 12,000 rpm.
15. Se almacenó a -20°C.

**Apéndice 6.** Purificación de DNA plasmídico mediante el método de NaClO<sub>4</sub>

1. Se inoculó una colonia transformada en 3-5 mL de medio LB con su respectivo antibiótico.
2. Se dejó crecer el cultivo por toda la noche a 37°C en agitación constante de 225-250 rpm.
3. Se cosechó a 3500 rpm por 7 minutos.
4. Se decantó los restos del medio, se resuspendió el pellet bacteriano con 175 mL de TES (15% sacarosa; 50mM Tris pH8.5; 50mM EDTA pH 8.0) y se mezcló suavemente.
5. Se añadió 25 µL de lisozima (10mg/mL), y se incubó en hielo por 20 minutos.
6. Se añadió 400 µL de agua destilada helada.
7. Se calentó a 73°C por 15 minutos.
8. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos.
9. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, y añadir 600 µL de alcohol isopropanol.
10. Se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos.
11. Se resuspendió el pellet formado con 1 mL de alcohol 70%.
12. Se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos.
13. Se decantó el alcohol y seco en *speed vac* por 5-10 minutos.
14. Se resuspendió en 50µL agua miliQ.

**Apéndice 7.** Purificación a partir de cortes en gel de agarosa mediante el kit “*GeneJET PCR Purification*”.

1. Se cortó la banda de interés y se pesó.
2. Se añadió 3 volúmenes de ***Binding Buffer*** con respecto a 1 volumen de la rebanada de agarosa (Ej. Agregar 300 µL de buffer QG a 100 mg de agarosa).
3. Se incubó a 50°C durante 10 minutos, vortexeando cada 2 minutos.
4. Se añadió un volumen de isopropanol a temperatura ambiente y se mezcló suavemente.
5. Se transfirió esta mezcla a una columna del kit, y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto.
6. Se decantó el producto filtrado y se regresó el filtro a la columna en el mismo tubo.
7. Se añadió 750 µL de ***Wash Buffer*** y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto.
8. Se decantó el producto filtrado, se regresó el filtro a la columna en el mismo tubo y se centrifugó de nuevo a 13,000 rpm durante 1 minuto para eliminar todo el etanol residual.
9. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL.
10. Se añadió 50 µL de ***Elution Buffer***, y dejó reposar durante 1 minuto,
11. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 minuto para eluir el DNA,
12. Al final se desechó la columna y el DNA se almaceno a -20 °C.



**Apéndice 8.** Extracción de RNA total mediante TRIZOL

1. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Fenol, y se mezcló levemente por vortex.
2. Se centrifugó 6 minutos a 13,000 rpm.
3. Se recuperó la fase acuosa (superior) pipeteando para pasarla a un tubo nuevo, tratando de no extraer la fase que contiene el fenol (inferior).
4. Se repitieron los pasos 1, 2 y 3.
5. Se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de Cloroformo, y se mezcló levemente por vortex.
6. Se centrifugó 6 minutos a 13,000 rpm.
7. Se recuperó la fase acuosa (superior) resultante, pipeteando cuidadosamente y se pasó a un tubo nuevo.
8. Se agregaron 8  $\mu\text{L}$  de acetato de amonio 5M, y se mezcló levemente.
9. Se agregaron 800  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (el doble del volumen recuperado).
10. Se almacenó en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  aproximadamente por 24 hrs.
11. Se centrifugó 10 minutos a 14,000 rpm.
12. Se pipeteó cuidadosamente el etanol absoluto, cuidando de no despegar el pellet del tubo.
13. Se agregaron 400  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%.
14. Se centrifugó 6 minutos a 14,000 rpm.
15. Se pipeteó cuidadosamente el etanol al 70%, cuidando de no despegar el pellet del tubo, y posteriormente se dejaron los tubos abiertos aproximadamente 20 minutos para que se evaporara completamente el etanol.
16. Se re-suspendieron los pellets de DNA en 100  $\mu\text{L}$ .
17. Se verificó la extracción por el corrimiento de la muestra en un gel de electroforesis con agarosa al 1% (en TAE al 1%) teñido con Bromuro de Etidio.

## Apéndice 9. Extracción de DNA plasmídico por Lisis alcalina

1. Se inoculó la bacteria portadora de la construcción pJC410 en 3 mL de medio LB con su respectivo antibiótico. Este cultivo se creció durante toda la noche a 37°.
2. Se cosechó a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C.
3. Se decantó cuidadosamente y se resuspendió con buffer STE (0.1mM NaCl, 10mM Tris-Cl, 1 mM EDTA) para lavar el pellet bacteriano de impurezas que puedan repercutir en la extracción de DNA plasmídico.
4. Se repitió el paso anterior 2 veces más.
5. Se decantó cuidadosamente y se resuspendió con 100 µL de una solución isotónica (50mM Glucosa, 25 Tris-Cl, 10mM EDTA) a 4°C, se mezcló vigorosamente.
6. Se añadió al mismo tubo, 200 µL de la solución de lisis (NaOH, SDS) que está a temperatura ambiente y recién preparada. Se mezcló por inversión cuidadosamente (5 veces) y posteriormente se incubó 5 minutos a 4°C.
7. Se añadió al mismo tubo, 150 µL de la solución de neutralización (acetato potásico 3M, pH 4,8). Se mezcló a mano por inversión del tubo (unas 5 veces). Se incubó 5 minutos a 4°C.
8. Los agregados se centrifugaron a máxima velocidad por 10 minutos a 4°C.
9. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se le añadió 1 mL de etanol absoluto frío (-20°C). Se mezcló a mano por inversión del tubo (unas 5 veces).
10. Se incubó por 15 minutos a -20°C, y el precipitado se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos a 4°C.
11. Se decantó cuidadosamente y se añadió al mismo tubo con 1 mL de etanol al 70% (4°C). Se mezcló suavemente con la mano por inversión del tubo (unas 5 veces).
12. Se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C.
13. Se decantó cuidadosamente y se dejó airear por 10 minutos a temperatura ambiente.
14. Se resuspendió en 50 µL de tampón TE (pH 8,0).
15. Se verificó la calidad mediante electroforesis.