

Comunicación breve

TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA LA DETECCION
DEL VIRUS DE HEPATITIS DELTA I:
OBTENCION DE LA SONDA DIAGNOSTICA ESPECIFICA

FELIX I. TORO (*), JOSE L. RAMIREZ (**), NICOLAS E. BIANCO (*), IRMA V. MACHADO (*)

Una sonda específica para la detección de genomas del VHD fue desarrollada a partir del plásmido recombinante $p\delta$ -1. La sonda fue marcada mediante un método no isotópico, lo cual permite el almacenamiento prolongado de la misma. Palabras claves: Virus Delta, Genoma Virus Delta; Plásmido recombinante.

DELTA HEPATITIS VIRUS DIAGNOSTIC PROBE
A specific probe to detect DHV genomes was developed using as a source the $p\delta$ -1 recombinant plasmid. The probe was labelled by using the non-isotopic method which allows its longer storage. The sensitivity of this DHV probe varies between 1 to 5 pcg. Key words: Delta Virus, Delta Virus genome; Recombinant plasmid.

El virus de la hepatitis delta (VHD) es un virus defectivo humano el cual requiere para su replicación de funciones cooperadoras aportadas por el virus de la hepatitis B (VHB) ¹. Inicialmente fue descrito en 1977 como un antígeno nuclear novel en biopsias de pacientes infectados crónicamente con VHB ². La partícula viral presenta una estructura esférica

con un diámetro de 36 nm y está constituida por una cubierta externa la cual representa el antígeno de superficie del VHB que a su vez envuelve el genoma viral y el antígeno delta ^{1,3}. El genoma está formado por ARN de cadena sencilla circular con un tamaño aproximado de 1.7 Kilobases (Kb). El ARN exhibe una marcada estructura secundaria aparentando la forma de un bastón de doble cadena de 840 pares de bases (pb) ⁴. Adicionalmente, en el virion se encuentran dos polipéptidos específicos de 24 y 27 Kilodaltons (Kd) de peso molecular aproximado, los cuales, en conjunto, constituyen el antígeno delta ^{5,6}.

El progreso en la biología molecular del VHD no sólo ha permitido comprender en mayor detalle diversos aspectos sobre la organización genómica y replicación del virus, sino también ha favorecido el desarrollo de nuevos ensayos de diagnóstico. Con la introducción de técnicas de hibridación molecular se hace ahora posible detectar genomas virales tanto

(*) Secciones de Biología Molecular e Inmunología Gastrointestinal, Centro Nacional de Referencia en Inmunología Clínica, Centro Colaborador de la OMS (OPS, SAS, UCV)

(**) Laboratorio de Genética Molecular; Centro de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, UCV, Caracas.

ABREVIATURAS:

VHD: Virus Hepatitis Delta; VHB: Virus Hepatitis B; ARN: Acido Ribonucleico; ADNc: Acido Deoxirribonucleico complementario; pb: pares de bases; Amp Tetr: Ampicilina sensible, Tetraciclina resistente; Kb: Kilobase.

Investigación financiada por Fundación Polar.

en suero como en tejido. Esto representa una muy valiosa prueba de diagnóstico ya que la presencia de genomas en circulación o en tejidos está estrechamente correlacionada con actividad viral y por ende con el grado de infección. Los avances recientes que se han realizado en el clonamiento de secuencias genómicas del VHD han hecho posible desarrollar sondas de diagnóstico de ADN complementario (ADNc) las cuales permiten detectar ARN viral mediante las técnicas de dot-blot, slot-blot e hibridización "in situ"^{7,8}.

En el presente trabajo se muestran resultados preliminares del proceso de estandarización de la técnica de hibridización molecular para la detección de secuencias genómicas del VHD. A partir de un vector recombinante (p δ -1) correspondiente al plásmido pBR322 más una secuencia de 520 pb del genoma del VHD, hemos obtenido una sonda de ADN complementario para la detección específica de dicho virus. La sonda fue marcada mediante el método no isotópico de "random priming" con digoxigenina lo cual permite el almacenamiento prolongado de la misma con una sensibilidad comparable a la descrita con métodos radiactivos.

MATERIAL Y METODOS

Naturaleza del plásmido p δ -1

En este estudio se empleó el plásmido recombinante p δ -1 (donado por el Dr. Colin Howard de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de la Universidad de Londres). El vector, mantenido en la cepa JM103 de *E. coli*, consiste de una secuencia de 520 pb de ADN complementario al genoma del VHD y que ha sido clonada en el sitio de restricción Pst 1 del plásmido pBR322.

Amplificación y purificación del plásmido p δ -1

El proceso de amplificación y purificación del plásmido p δ -1 se realizó siguiendo protocolos ya estandarizados para tal fin⁹. La cepa de *E. coli* JM103 conteniendo el vector recombinante fue crecida en medio Luria-Bertani (LB) consistente de: 1% extracto de levadura, 1% bactotripton, 0.5% NaCl. Luego de un chequeo fenotípico de la cepa bacteriana, aquellas colonias con fenotipo Amp^r, tetr fueron selec-

cionadas y recultivadas en medio LB conteniendo tetraciclina a una concentración de 15 μ g/ml. Luego de 6 horas de recultivo se agregó al medio cloranfenicol a una concentración final de 250 μ g/ml. Después de incubar durante 12 horas, las bacterias fueron cosechadas y centrifugadas a 6.870 g por 10 min. El pellet bacteriano fue lavado a 6.870 g por 10 min con NaCl al 0.85% y sometido a lisis por 10 min a 4°C con 5 ml de buffer Tris-HCl 25mM pH 8.0, glucosa 50mM, EDTA 10mM, lisozima 2 mg/ml. Seguidamente 20 ml de solución de NaOH 0.2 M, SDS al 1% fueron añadidos a la suspensión mezclando ésta suavemente y manteniéndola a 4°C por 15 min. La mezcla fue neutralizada con 15 ml de solución de CH₃COOK 3M, ácido acético glacial mezclando de nuevo suavemente y manteniéndola a 4°C por 20 min. Luego de centrifugar la suspensión a 16.300 g por 30 min, 4°C, el sobrenadante fue cuidadosamente transferido a otro tubo añadiendo posteriormente un volumen igual de isopropanol. Después de mezclar y dejar en reposo por 10 min la solución fue centrifugada a 16.300 g por 30 min. Seguidamente el sobrenadante fue descartado y el pellet, conteniendo el plásmido, fue secado al aire. El pellet fue posteriormente resuspendido en 1 ml de buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8.0). El ARN presente en la muestra fue digerido mediante tratamiento con RNasa (2mg/ml) por 30 min a 37°C. El ADN en solución fue de nuevo precipitado con medio volumen de polietilenglicol 8.000 al 30% en NaCl 1.5M. Después de incubar a 4°C por 30 min, la solución fue centrifugada a 16.300 g por 30 min y el pellet resultante fue suspendido en 400 μ l de buffer TE. La muestra resuspendida en 400 μ l de buffer TE. La muestra fue sometida a tres extracciones con fenol: cloroformo (1:1) y una extracción con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Finalmente la muestra fue resuspendida en 400 μ l de buffer TE y almacenada a 4°C hasta su posterior tratamiento.

Obtención del inserto (ADNc) específico para el VHD

Con la finalidad de obtener el fragmento específico de ADNc para el VHD, el plásmido p δ -1 fue sometido a digestión enzimática con la enzima de restricción Pst I. Para ello se siguieron métodos estandarizados de digestión con endonucleasas⁹. La digestión del plásmido

fue chequeada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris-borato 0.089 M, borato 0.089 M, EDTA 2mM). Una vez confirmada la digestión, se realizó una electroforesis preparativa en geles de agarosa al 1.2% en TBE. La corrida electroforética se llevó a cabo a 7 v/cm por 3 horas, luego de la cual el gel fue teñido con solución de bromuro de etidio (5 µg/ml) y visualizado bajo luz ultravioleta. La banda de 520 pb correspondiente al ADNc fue cortada y extraída del gel y posteriormente electroeluída de acuerdo a protocolo estandarizado⁹. Luego de la electroelución, se procedió a remover el bromuro de etidio contenido en el fragmento de ADNc mediante dos extracciones con isobutanol seguidas por una extracción con fenol: cloroformo (1:1) y otra con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Seguidamente el fragmento de ADNc fue precipitado por 12 horas a -20°C con 1/10 de volumen de CH₃COONa (2.5 M) más 2 y medio volúmenes de etanol al 100%. Luego de centrifugar a 12.000 g por 30 min, el ADNc fue resuspendido en 20 µl de buffer TE y almacenado a 4°C hasta el momento de su procesamiento para el marcaje.

Marcaje del ADNc

Para el marcaje del fragmento de ADNc se empleó un Kit comercial desarrollado por la compañía Boehringer Mannheim basado en el método no isotópico de marcaje de "random priming" con digoxigenina-dUTP. Como paso previo al marcaje, el fragmento de ADNc fue desnaturalizado a 95°C por 10 min e inmediatamente enfriado a 4°C. Luego la siguiente mezcla de reacción fue preparada: 1 µg de ADNc, 2 µl de mezcla de hexanucleótidos, 2 µl de la mezcla de marcaje de deoxinucleótidos, 1 µl de la enzima Klenow y agua destilada suficiente para 20 µl de volumen final. La mezcla fue incubada a 37°C por 3 a 4 horas, luego del cual la reacción fue detenida con 2 µl de EDTA 0.2 M pH 8. El ADNc marcado fue posteriormente precipitado con 2 µl de LiCl 4 M más 60 µl de etanol al 100% frío, manteniendo esta mezcla a -70°C por 30 min. Después de centrifugar a 12:000 g por 30 min, el pellet de ADNc marcado fue lavado con etanol frío al 70% (v/v), secado al vacío y resuspendido en 50 µl de buffer TE.

La evaluación del marcaje de la sonda de

ADNc fue realizada mediante la técnica de "spot-blot". Para ello se efectuaron diluciones seriadas tanto de la sonda de ADNc como del control marcado contenido en el Kit, y luego 1 µl de cada una de estas diluciones fue añadido por separado a un filtro de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0.45 µ (Bio-Rad Lab.). Después de ser horneada a 80°C por 2 horas, el filtro fue revelado siguiendo las instrucciones descritas en el Kit de marcaje (Boehringer Mannheim).

RESULTADOS Y DISCUSION

En el presente trabajo una sonda de ADNc específica para la detección del VHD fue preparada. La figura 1 representa un análisis electroforético del plásmido p ϕ -1 bajo diferentes condiciones experimentales. Luego de amplificado y purificado (Fig. 1b), el plásmido recombinante fue sometido a digestión enzimática con la enzima de restricción Pst I, generándose un fragmento de 4.3 Kb, correspondiente al plásmido PBR322, más el inserto de 520 pb correspondiente al ADNc para el genoma del VHD (Fig. 1c). Mediante electroforesis preparativa se obtuvo suficiente cantidad del inserto el cual fue electroeluído del gel de agarosa y purificado tal como fue descrito en materiales y métodos (Fig. 1d)

El fragmento de ADNc fue posteriormente marcado mediante el método de "random priming" con digoxigenina dUTP. La figura 2 representa un spot-blot de la sonda de ADNc a diferentes diluciones, comparada con el control de ADN marcado. Tomando como referencia la concentración del control (5 µg/ml de ADN marcado), la concentración estimada para la sonda de ADNc fue de 0.5 µg/ml.

La tecnología anteriormente descrita representa la primera fase en el desarrollo de técnicas de hibridización molecular para la detección serológica del VHD en Venezuela, técnicas éstas que presentan un alto grado de especificidad y sensibilidad. Aún más, el uso de sondas de diagnóstico marcadas con métodos no radioactivos ofrece una serie de ventajas adicionales como son:

- 1) El empleo de material radiactivo no es requerido con lo cual se evita la necesidad de una infraestructura especial para el manejo de radioisótopos.

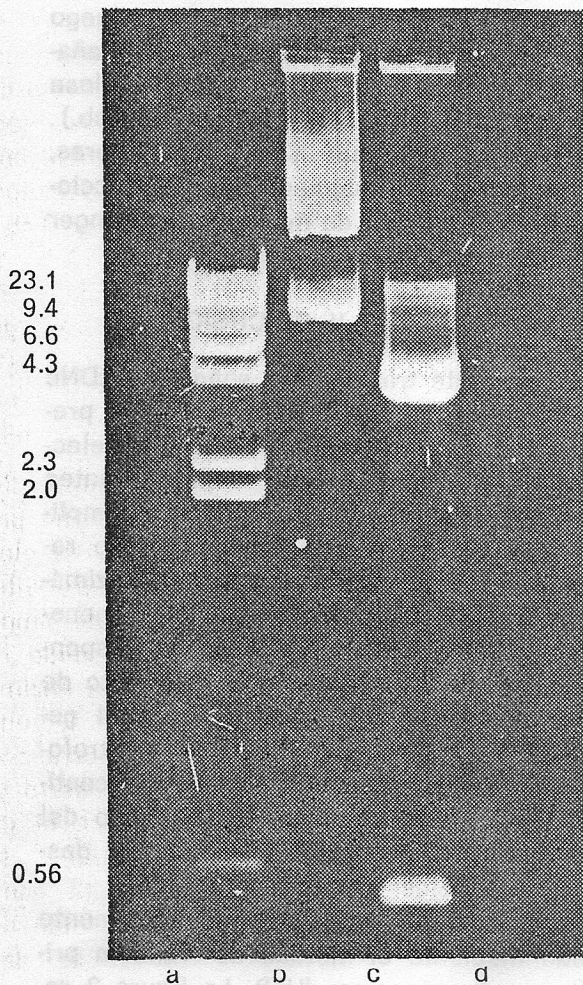


Fig. 1. Análisis electroforético del plásmido p δ -1. El plásmido p δ -1, bajo diferentes condiciones experimentales, fue analizado electroforéticamente en geles de agarosa al 1%. Los números indican tamaño de las bandas en Kilobases (Kb). a) Marcador de Peso Molecular. ADN del fago Lambda digerido con Hind III. b) Plásmido p δ -1 sin digerir. c) Plásmido p δ -1 digerido con Pst I. d) Inserto purificado de ADNc para el genoma del VHD.

- 2) Permite mantener almacenada la sonda durante un tiempo prolongado a diferencia de aquellas sondas marcadas con radioisótopos de vida media corta.
- 3) Los resultados son obtenidos en menor tiempo comparado con el requerido al utilizar métodos radiactivos.

Por último, la sensibilidad reportada utilizando el método de digoxigenina es comparable al método isotópico con ^{32}P , (1-5 pcg) ⁹.

Agradecimientos:

Al British Council y al Dr. Colin Howard, por facilitarnos pasantía en la London School of Hygiene and Tropical Medicine.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rizzetto M. The delta agent. *Hepatology*. 1983; 3: 729-37.
2. Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Bonino F, Trepo CG, Verme G. Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated with the hepatitis B virus in the liver and in the serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18:997-1003.
3. Bonino F, Hoyer B, Shih JWK et al. Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta associated particle. *Infect Immun* 1984; 43: 1000-5.
4. Wang KS, Choo KL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian RC, Thayer RM, Mullenback GT, Deniston KJ, Gerin JL, Houghton, M. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta genome. *Nature* 1986; 323: 508-13.

dil: 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6}

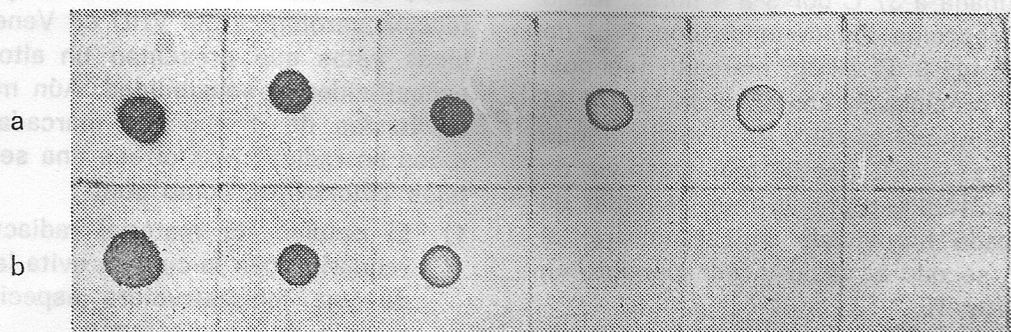


Fig. 2. Evaluación de la sonda de ADNc mediante Spot-blot. 1 μl de cada una de las diluciones de la sonda marcada fue absorbida a filtros de nitrocelulosa y revelado como se describe en materiales y métodos. a) Control de ADN marcado. b) Sonda específica de ADNc del VHD.

5. Bergman KF, Gering JL. Antigens of the hepatitis delta virus in the liver and serum of human and animals. *J Infect Dis* 1986; 154:702-6.
6. Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M, Gerlich WH. Hepatitis delta virus: Protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus derived envelope. *J Virol* 1986; 58:945-50.
7. Smedile A, Rizzetto M, Deniston K, Bonino F, Wells F, Verme G, Consolo F et al. Type D hepatitis: The clinical significance of hepatitis D virus RNA in serum as detected by a hybridization-based assay. *Hepatology* 1986; 6:1297-1302.
8. Rasshofer R, Buti M, Esteban R, Jordi R, Roggen-dorf M. Demonstration of hepatitis D virus RNA in patients with chronic hepatitis. *J Infect Diseases* 1988; 157:191-5.
9. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory. New York, 1982.
10. Casacuberta JM, Jordi R, Buti M, Puigdomenech P, San Segundo B. Comparison of different non-isotopic methods for hepatitis B virus detection in human serum. *Nuc Acid Res* 1988; 16:11834.