

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA GLICOPROTEINA G DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR*

Gustavo Arbeláez R.** , Orlando Acosta, Olga C. Marino

R E S U M E N

Se buscó en este trabajo obtener a partir de cultivos celulares BHK infectados con el virus de la Estomatitis Vesicular (E.V.), la metodología que proporcionara mayor rendimiento, pureza e integridad de la proteína G₁ para su futura utilización en ensayos de la proteína frente a la enfermedad.

Se describen los procedimientos para la separación de la proteína G, de la membrana del virus de la E.V., empleando los detergentes no iónicos Nonidet P-40 (NP-40) y Tritón X-100, así como los métodos para su caracterización, por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

Se obtuvo el mejor rendimiento, cuando el virus se purificó por concentración con PEG-6.000 al 70/o, NaCl 2.30/o y ultracentrifugación en gradientes de tartrato de sodio y potasio (15-300/o P/P). La Proteína G se obtuvo con máxima pureza e integridad fisicoquímica, mediante solubilización con Nonidet P-40 10/o (V/V) y cromatografía en Sephadex G-75.

La proporción de rendimiento de esta metodología, fue de 1.6:1 comparada con la de Triton X-100, lográndose condiciones de aislamiento y purificación de la proteína, que posibilitan su empleo en estudios de inmunogenicidad en animales de laboratorio y en especial en bovinos.

Palabras Claves: Virus de la Estomatitis Vesicular, Glicoproteína, G, Purificación, Electroforesis en gel de poliacrilamida.

A B S T R A C T

The purpose of this study was to select the best method to obtain the highest purity and maximal yield of glicoprotein G (gp-G) from vesicular Stomatitis Virus (VSV), as well as to maintain gp-G integrity for future protection assays against VSV. Various procedures employing nonionic detergentes, NonidetP-40 and Triton X-100 are described and the electrophoretic methods for its characterization are also presented.

** Respectivamente Médico Veterinario, M. Sc., Bioquímico M. Sc., Microbiólogo M. Sc., PhD. Sección Enfermedades Vesiculares. División Disciplinas Pecuarias, LIMV. Apartado Aéreo 29743, Bogotá, D.E. Colombia.

The highest gp-G production was obtained when the virus propagated in BHK 21 cell, was purified by concentration with 7o/o PEG and 2.3o/o NaCL, followed centrifugation in sodium potassium tartrate gradient (15-30o/o W/W). High purity of entire gp-G was obtained using for solubilization Nonidet P-40 followed by Sephadex G-75 filtration.

The yield rate of the selected procedure for gp-G was 1.6:1 compared to Triton X-100. The results suggest that the purification method may be useful to obtain sufficient amounts of glycoproteins G, to be tested for its antigenic and of immunogenic properties in laboratory and farm animals.

Key Words: VSV, Glycoprotein-G; purification; PAGE.

INTRODUCCION

La proteína G constituye el determinante antigénico mayor del virus de la Estomatitis Vesicular (E.V), y es la responsable de la neutralización de la infectividad y de la especificidad de tipo de virus (12,13). La proteína G puede ser removida selectivamente de la superficie del virión, por enzimas proteolíticas lo que conlleva a la pérdida de la infectividad. (6)

La mayoría de los detergentes empleados en los estudios de proteínas de membranas, son aniónicos (dodecil sulfato de sodio, SDS) o no iónicos del tipo de polioxietileno (Serie Triton X-100 y Nonidet P-40). Aunque el SDS puede extraer casi la totalidad de las proteínas integrantes de la membrana (22), el complejo resultante de SDS-proteína, muestra una pérdida total de la actividad biológica, debido a la desnaturalización producida por el SDS (11,23). Los detergentes no iónicos por el contrario, debido a su débil asociación de las proteínas solubles en agua, alcanzan las proteínas solubles en forma cooperativa, en niveles cerca a su concentración micelar crítica (CMC) (21,23). Sin embargo, a diferencia de los

detergentes aniónicos como el SDS, los detergentes no iónicos muestran una eficiencia de solubilización relativamente baja y generalmente no interfieren con la actividad biológica de las proteínas solubilizadas. Una tercera clase de detergentes llamados switterionicos (sulfobetainas), aparentemente no desnaturalizan las proteínas de membrana solubles en agua y mantienen la actividad biológica de las mismas (10).

El virus de la Estomatitis Vesicular, (E.V.), es el virus representativo de la familia **Rhabdoviridae** (17). Los viriones purificados contienen RNA, proteínas, carbohidratos y lípidos. El ácido nucleico está constituido por una molécula de cadena simple de sentido negativo con un peso molecular de alrededor de 3.6×10^6 daltons (17,18). El VEV contiene 5 polipéptidos estructurales mayores, designados como L, G, N, NS, y M con pesos moleculares de 150.000, 70.000, 50.000, 49.000 y 30.000 daltons respectivamente (26). La composición porcentual de estas proteínas en el virión es de 3.2o/o L, 28.5o/o G, 33.7o/o N, 34.1o/o M y 1-2o/o NS (24). Las proteínas L, N y NS forman

parte de la ribonucleoproteína, mientras que las proteínas G y M están asociadas con la cubierta lipídica. La proteína G contiene carbohidratos y forma las espículas que sobresalen de la cubierta del virus. La proteína G contiene ácido N-acetil-D-neuramínico, D-galactosa, D-manosa, L-fucosa y N-acetil D-glucosamina (20). El virus posee un coeficiente de sedimentación de $S_{20W} = 625$, con una forma de bala de 150 nm de largo y 70 nm de diámetro.

En este informe se presenta la evaluación de tres métodos de purificación de la proteína G, teniendo como criterios principales el de su integridad fisicoquímica, su pureza y su rendimiento, con el objeto de seleccionar el mejor método de obtención para inmunizar cobayos y bovinos de experimentación.

El aislamiento y purificación de la proteína G, lo mismo que su empleo en los estudios de inmunización en bovinos (28), podría abrir la perspectiva de hacer estudios sobre la factibilidad de la producción industrial de una vacuna, bien sea con el polipéptido completo o con el fragmento más inmunogénico.

Lo anterior con el propósito de iniciar estudios que complementen la información recolectada hasta el momento sobre el empleo de un mejor inmunógeno, ya que las vacunaciones a virus vivo han presentado limitaciones en la evaluación de su protección (3, 7, 8, 15) en tanto que la utilización de vacunas de subunidades, es prometedora para virus similares estructuralmente y de elevada estabilidad antigénica, como parecen ser el virus de la E.V. y el virus de la rabia (2). Además, es conocido que con este tipo de vacunas se evita la inducción de brotes por reversión de la forma rivulenta o introducción acci-

dental del virus a reservorios. Dada la capacidad neutralizante de los anticuerpos producidos por la proteína G y la protección demostrada, permite además, emplear pruebas diagnósticas específicas y diferenciales entre animales infectados naturalmente y vacunados, lo cual tendría gran repercusión epidemiológica. Los brotes de E.V. presentan un impacto económico significativo sobre la producción ganadera y además dificultan el reconocimiento y control de los brotes de Fiebre Aftosa (5).

MATERIALES Y METODOS

Cultivo de Células

Se utilizaron células BHK₂₁ Clon 13, obtenidas del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Brasil, mantenidas en monocapa, con medio Eagle suplementado con suero fetal bovino al 60/o. Los cultivos a gran escala se hicieron en frascos rotantes de cultivo (37 cm., L x 10 cm. d.i.) en un número de 15 frascos por lote. Estos lotes se emplearon para determinar inicialmente la curva de crecimiento del virus y posteriormente para la obtención rutinaria del virus.

Producción y Purificación del Virus

Para la obtención del virus se utilizó la Cepa New Jersey-7546, a una multiplicidad de infección de 1.000 DICT₅₀/ml contenidas en 60 ml del medio Eagle 1X, por frasco rotante. Los cultivos se incubaron a 37°C. durante 39 horas; se recolectó el virus previa congelación y descongelación y se centrifugó a 12.000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se recolectó y constituyó el virus semilla para todos los experimentos. En la determinación del mejor método de purificación y concentración inicial del

virus se evaluaron tres métodos, tres lotes de virus para los dos primeros métodos, dos lotes para el tercero. El rendimiento se midió por concentración protéica, infecciosidad y capacidad fijadora del complemento (FC), así como la pureza electroforética de las proteínas estructurales del virus purificado.

En el primer método, el virus contenido en el sobrenadante de centrifugación por 20 minutos a 12.000 x g, se concentró 5 veces por ultrafiltración con membrana de Amicón X M-50 y se centrifugó a 32.000 x g durante tres horas a 4°C. El sedimento obtenido se resuspendió en la mitad del volumen inicial en solución salina tamponada con fosfatos (PBS: 0.4 M NaCl, 27 mM KCL, 6.7 mM Na₂PHO₄, 1.4 mM KH₂P0₄, pH 7.4), se sonicó a 30W por segundo (sonicador Bronson)* para asegurar una buena resuspensión. El virus obtenido fue almacenado en alícuotas a -70°C.

Como segundo método de purificación se empleó la precipitación con polietilenglicol 6.000 (PEG-6.000) al 7.0o/o y NaCl al 2.3o/o, con agitación continua durante 12 horas 4°C. El sedimento obtenido después de la centrifugación a 10.000 x g durante 20 minutos a 4°C, se suspendió en 1/10 del volumen inicial en medio Eagle y se dializó contra salina tamponada con fosfatos (PBS), pH 7.4 por 18 h a 4°C. El virus obtenido, luego de clarificación a 5.000 x g por 10 minutos a 4°C, se ultracentrifugó en gradiente preformado de tartrato de sodio y potasio del 15-40o/o (P/P), a 136.000 x g por 2.5 horas en un rotor SW36*. La banda del virus obtenida por aspiración se suspendió en la mitad del volumen inicial, se dializó contra PBS pH 7.4 y se almacenó a -70°C.

El tercer método, constituyó una variante del método anterior y consistió en

resuspender el virus precipitado con PEG-buffer TEN (10 mN DE TRIS HCL, pH 7.4, 01 de NaCl y mM de EDTA), en 1/5 del volumen inicial. La suspensión viral se sonicó (5 golpes de un segundo entre 30-40W) y se centrifugó a 2.000 x g durante 5 minutos a 4°C. La fracción sobrenadante, se centrifugó a 136.000 x g en un rotor Beckman SW50 durante 1.5 h a 4°C. y el virus sedimentado, se resuspendió en buffer TEN. Esta suspensión se colocó sobre gradiente lineal de tartrato de sodio y potasio (15-40o/o) preformado colocando capas sucesivas de 1 ml. de 40o/o, 1 ml de 25o/o, 1 ml de 20o/o y 05 del 15o/o en los tubos de rotor SW50 y se centrifugó a 140.000 x g por lo menos 5 horas a 4°C. La banda viral blanquecina, se colectó aspirando con una jeringa, se diluyó en tres volúmenes de buffer TEN y se sedimentó a 136.000 x g en el rotor 40 durante 4.0 horas a 4°C.

Aislamiento y Purificación de la Proteína

Se probaron tres métodos de obtención y purificación de la proteína G; los dos primeros se evaluaron usando 5 lotes de virus y el tercero usando solamente tres lotes. En el primer método, de acuerdo a Thimming y Col (24), se empleó una suspensión viral de buffer TEN a la cual se le añadió Nonidet-P-40 hasta una concentración del 1o/o (V/V), seguido de agitación durante 20 minutos a 20°C.

La nucleocapside fue separada de las proteínas G y M solubilizadas, por sedimentación a través de una solución del 20o/o de sacarosa a 136.000 x g durante 90 minutos a 4°C. El sobrenadante fue concentrado 3-5 veces con Amicon XM-50 y las proteínas M y G fueron separadas por cromatografía de filtración en Columna de Sephadex G-75 (50 x 1.5 cm), usando solución salina tamponada con fosfatos (PBS) para eluir las proteínas.

El segundo método fue esencialmente el reportado por Kelley y Col. (13). La proteína G fue solubilizada añadiendo Triton X-100, hasta una concentración del 2o/o a una suspensión del virus en 0.01 M Hepes pH. 7.8. Después de agitar por una hora a 18°C., la mezcla fue centrifugada a 140.000 x g durante 90 minutos a 5°C. y el sobrenadante, que contiene la proteína G, fue recolectado y almacenado a -70°C. El sedimento fue reconstituido en 1/10 del volumen, en buffer Hepes e igualmente almacenado a -70°C.

El tercer método descrito por Reading y Col (20), consistió en el tratamiento de una suspensión viral en 10 mM tris-HCL, pH 8.0 y 0.1 mM PMSF (Fenilmetilsulfonil fluoruro), con una solución de Triton X - 100 al 20o/o (V/V) hasta una concentración final del 2o/o (V/V) seguida de agitación ocasional, durante 1 hora a 20°C. La nucleocapside no solubilizada, se separó de la proteína G, por centrifugación a 136.000 x g en el rotor SW 50 durante 2.5 h a 5°C. La solución sobrenadante que contiene la proteína G, se precipitó con 10 volúmenes de acetona. El precipitado se separó por centrifugación a 2.000 x g durante 5 minutos a 4°C. y se resuspendió en 10 mM de Tris-HCL, pH 8.0. La proteína G así obtenida, se dializó contra el mismo buffer y se almacenó a -70°C. En todos los casos la proteína fue cuantificada por el método de Lowry y Col (16) con una modificación, para evitar la interferencia del Triton X-100 (27). El rendimiento de la proteína G fue expresado con relación al título infeccioso, a la fijación del complemento y a la masa proteica total del virus purificado.

Electroforesis en GEL de Poliacrilamida

La pureza e integridad de la proteína G, fue evaluada por electroforesis em-

pleando los sistemas continuo y discontinuo. En el primer caso, se utilizó el sistema Tris-Borato-EDTA esencialmente como lo describe Peacock y Dingman (19). Se polimerizaron geles cilíndricos (T = 7.7o/o, C = 2.5o/o) en tubos con d.i de 5 mm en buffer (Tris 0.09 M ácido bórico 0.08M y EDTA-Na₂ 0.025M) con 0.1o/o de SDS. Las muestras fueron preparadas con el mismo buffer, con 2o/o de SDS, 40o/o de Sacarosa y 0.001o/o de azul de bromofenol, seguido de calentamiento por dos minutos en un baño de agua hirviendo. La electroforesis se corrió inicialmente a 50 voltios por 15 minutos y luego a 120 voltios por tres horas.

En la electroforesis discontinua, se empleó básicamente el método publicado por Laemmly y (14). Se construyeron geles tanto en tubo como en placa vertical, con T = 4o/o, C = 2.7o/o y T = 12.5o/o, C = 2.7o/o para los geles de concentración y separación respectivamente. Las muestras de la electroforesis en tubo, se suspendieron en buffer Tris HCL 0.01M, pH 8.0, EDTA 0.001M, SDS 1o/o, 2-Mercaptoetanol 5o/o, glicerol 10o/o y azul de bromofenol 0.001o/o seguido de calentamiento en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos. Se aplicaron 60 voltios durante 30 minutos y luego 120 voltios hasta que la tinta marcadora llegó al extremo del gel.

Las muestras de la electroforesis en placa, se suspendieron en la mezcla de tratamiento de Laemmly (14) y se corrieron a 30 Ma durante 3.5 horas. En todos los casos, los geles se tiñeron con azul de Coomassie al 0.125o/o en metanol/ácido acético/agua (50:10:40) y se detiñeron por difusión contra una solución de metanol al 25o/o y ácido acético al 7o/o.

RESULTADOS

Curva de Crecimiento del Virus de la E.V.

El máximo de infecciosidad y capacidad fijadora del complemento para el virus de la E.V., titulada en función de dosis-inóculo y tiempo de recolección, fue detectado para la dosis 1.000 DICT 50, alrededor de las 39 horas, (Figura 1).

Producción y Purificación del Virus

Comparando los métodos para la purificación y concentración inicial del virus, la concentración por PEG-6.000 (método 2), demostró rendimiento significativo (≤ 0.1), en valores de proteína ($X = 7.33$ mg/ml), con respecto a la ultrafiltración ($X = 1.109$ mg/ml) y por consiguiente se empleó para los ensayos posteriores de obtención de proteína G. Es de anotar que los análisis respectivos para infecciosidad, no presentaron diferencias significativas y la fijación del complemento no permitió ningún análisis, pues algunas de las preparaciones presentaron actividad anti-complementaria. (Tabla 1). El análisis electroforético de las partículas virales purificadas, presenta las 5 proteínas estructurales mayores características del virus (26). El método 1 no se utilizó en la obtención posterior de proteína G, debido a su bajo rendimiento.

Aislamiento y Purificación de la Proteína G.

En los lotes donde se tomaron alícuotas para ser tratadas en una forma comparable (lotes 1-5) con ambos detergentes, se observó siempre una mayor producción de proteína G con Nonidet P-40 que con Triton X-100 en una relación promedio cerca de 1, 6:1 (Tabla 2). Teniendo en

cuenta la composición porcentual de las proteínas estructurales del virus purificado (24), se encontró que la proteína G, se libera en más de un 90o/o con ambos tratamientos, pero la producción de proteína G pura recobrada al final con relación a las proteínas totales de virión, fue de apenas 11.90o/o con Nonidet P-40 y de 7.95o/o con Triton X-100.

Al analizar la pureza y la integridad fisicoquímica de la proteína G aislada con Triton X-100 con 0.01M Hepes pH 7.8, y con Nonidet P-40, en PAGE-SDS con el sistema de Tris-borato EDTA, se encontró un comportamiento electroforético esencialmente homogéneo con un solo componente, resuelto claramente en el gel teñido con azul de Coomassie (Figura 3). Esta homogeneidad electroforética también se evidenció con el sistema discontinuo de Laemmly (Figura 4 C), exhibiendo un peso molecular de alrededor de 69.000 y siendo además indistinguible de la aislada con Triton X-100 en 0.01M Tris-HCL, pH 8.0 y 0.1 mM PMSF, (Figura 4, h-i).

La proteína G aislada con Nonidet P-40, cuando se evaluó por PAGE-SDS antes de ser pasada a través de la columna de Sephadex G-75, mostró una escasa contaminación con otras proteínas, especialmente con la proteína M y con otra de alto peso molecular (más de 200.000), las cuales sólo fueron detectadas en condiciones de excesiva sobrecarga del gel. Después de la filtración por Sephadex G-75, la proteína G apareció esencialmente pura migrando la misma distancia que la proteína G, aislada con Triton X-100 (Figura 4, d,i).

En los aislamientos con Triton X-100, se encontró que prácticamente toda la proteína G se libera de la membrana del

virus y que las proteínas L, N, MS, y M, se recuperan en la fracción que contenía la nucleocapside (Figura 5,b). Cuando en este mismo experimento, se comparó la proteína G aislada, con la presente en la membrana del virión intacto, se observó que la migración electroforética fue idéntica (Figura 5a., c).

Los resultados de la integridad biológica de la proteína G, aislada con ambos detergentes, se evaluaron de acuerdo a su antigenicidad e inmunogenicidad en cobayos y bovinos de experimentación, (manuscrito en preparación).

DISCUSION

Con respecto a la metodología de purificación viral, se determinó que, aunque la infecciosidad no se vio influenciada en los lotes probados, fue evidente la superioridad del método de PEG sobre el de ultrafiltración, en cuanto a concentración proteica; sin embargo, se determinaron títulos bajos y anticomplementarios, cuando la concentración viral se evaluó por fijación del complemento.

Así mismo, al comparar la modificación del procedimiento que emplea PEG y cuantificar las fases de virus crudo y purificado (Tabla 1), no se detecta variación significativa con respecto al título infeccioso ($p < 0.5$), corroborando la efectividad de este. Sin embargo, de nuevo, la medición de fijación del complemento, impidió la comparación por la anticomplementaridad y tendencia a la disminución del título, luego de la purificación. No se conocen exactamente los participantes estructurales del virus en esta prueba de FC, pero se asume que el virus completo purificado presentaría un antígeno apropiado. Posiblemente la falla se deba al aumento proporcional del contenido de

lípidos en el proceso de concentración viral y estos sean responsables del fenómeno de anticomplementaridad (4). Se considera interesante efectuar estudios específicos sobre la correlación infecciosidad-fijación del complemento, con el objeto de aclarar el significado de estos resultados.

No obstante emplearse en el experimento lotes de virus obtenidos bajo idénticas condiciones, las diferencias observadas están dentro de los rangos esperados de dispersión de las pruebas biológicas, por esta razón se emplearon como parámetros de evaluación de rendimiento, además de la infecciosidad, la concentración proteica por volumen obtenido por lote (Tabla 2).

Los detergentes no iónicos Nonidet P-40 y Triton X-100 son considerados como esencialmente idénticos (1,11), sin embargo, éstos presentan diferencias en su capacidad o eficiencia de solubilización de las proteínas asociadas a la membrana del VEV (9,13). Nuestros resultados estarían indicando que ambos detergentes remueven principalmente casi la totalidad de la proteína G y muy poco de la proteína M. El Triton X-100 remueve selectivamente la proteína G, debido a su concentración micelar crítica baja, pero la remoción por diálisis se hace difícil lo mismo que la reconstitución de la proteína G (25,28). En nuestro trabajo estas dificultades también se evidenciaron, principalmente en la reconstitución de la proteína G después de la precipitación con acetona.

Los resultados indican que con ambos detergentes se remueve prácticamente toda la proteína G en el proceso inicial, pero el rendimiento más bajo del aislamiento con Triton X-100 considerado

sobre el producto final puro, se podría explicar por la pérdida en la precipitación con acetona, en la reconstitución y en su diálisis posterior.

Con los métodos evaluados se produce la proteína G con alta pureza e integridad fisicoquímica como lo demuestran los diferentes sistemas de PAGE empleados y se escogió como método rutinario

de preparación hasta el momento, el que hace uso de Nonidet P-40 seguido de concentración con membrana de Amicon y filtración por Sephadex G-75. Resta por evaluar el método que hace uso de B-D-octilglicósido, un detergente no iónico con una concentración micelar crítica alta fácilmente dializable que se ha usado con éxito en el aislamiento de la proteína G con un 97o/o de pureza (28).

TABLA 1. Títulos Infeccioso y Fijador del complemento de los virus Crudo y Purificado de los diferentes lotes experimentales obtenidos por los dos métodos que emplearon concentración por precipitación con PEG — 6000.

Lote No.	TITULO FIJADOR DE COMPLEMENTO*		TITULO INFECCIOSO **	
	Virus Crudo	Virus Purificado	Virus Crudo	Virus Purificado
1 PEG	39	36	10 ⁹ - 1	10 ⁶ - 7
2 PEG	AC	AC	10 ⁸ - 8	10 ⁶ - 9
3 PEG	54	AC	10 ⁸ - 8	10 ⁷ - 1
4 PEG	13	6	10 ⁸ - 6	10 ⁷ - 7
5 PEG	ND	16	ND	10 ⁹ - 0
6 PEG Modificado	6	AC	10 ⁹ - 8	10 ⁸ - 0
7 PEG	6	4	10 ⁹ - 1	10 ⁷ - 6
8 PEG	AC	23	10 ⁹ - 6	10 ⁹ - 8

* / Unidades Fijadoras del Complemento 50% expresadas como el recíproco de la dilución del antígeno.

** / Título Infeccioso en DICT₅₀/ml expresado en logaritmo base 10.

AC Anticomplementario

ND No Determinado.

TABLA 2. Rendimiento de la Proteína G aislada con los detergentes Nonidet P-40 y Triton X – 100

Lote No.	mg TOTALES DE PROTEINA G		RENDIMIENTO RELATIVO Nonidet P-40/Triton X – 100
	Nonidet P-40	Triton X – 100	
1	27.50	12.20	2.25
2	5.51	3.50	1.57
3	20.00	15.40	1.29
4	17.00	12.90	1.31
5	6.70	4.72	1.41
6	22.10	ND	ND
7	ND	0.62	ND
8	ND	2.00	ND

ND = No Determinado.

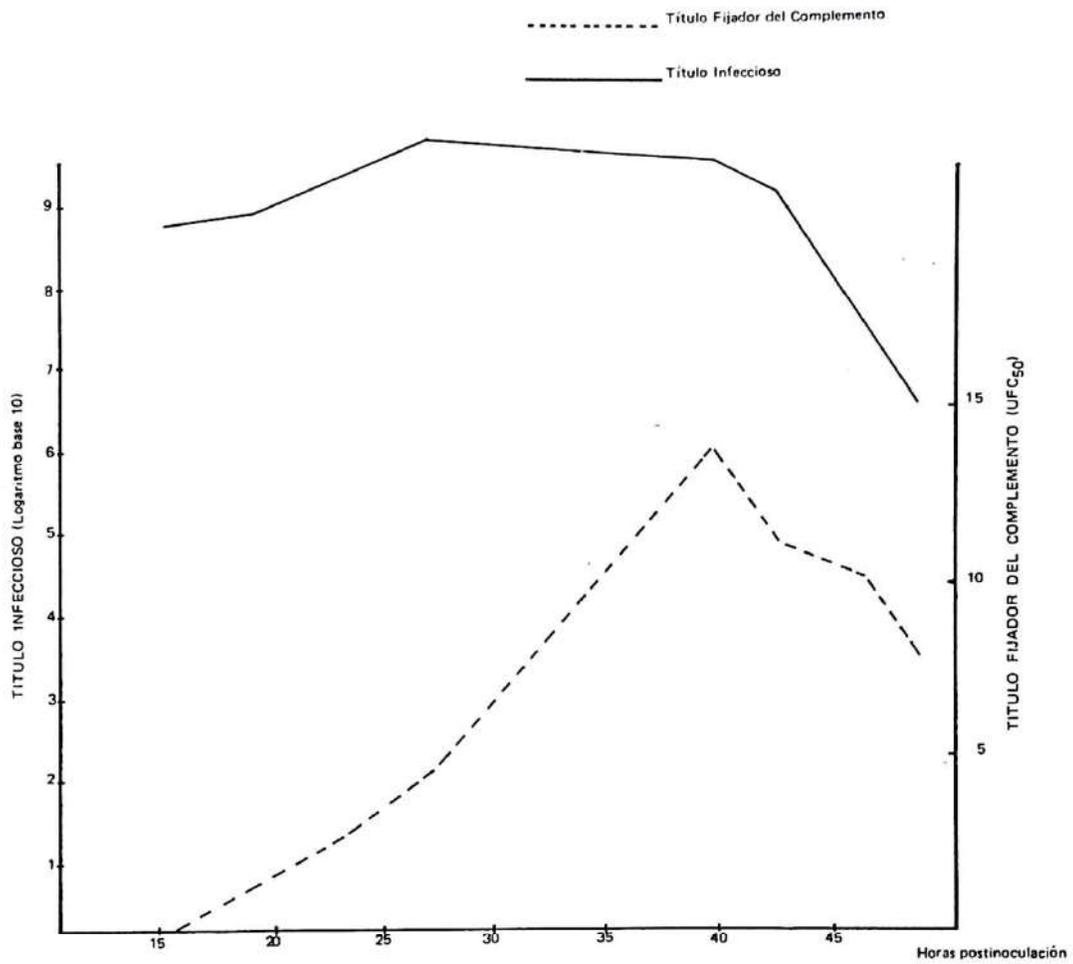


FIGURA 1. Título Infeccioso y Fijador del Complemento Postinoculación de 1000 DICT₅₀ de la Cepa de Estomatitis Vesicular NJ 7546.

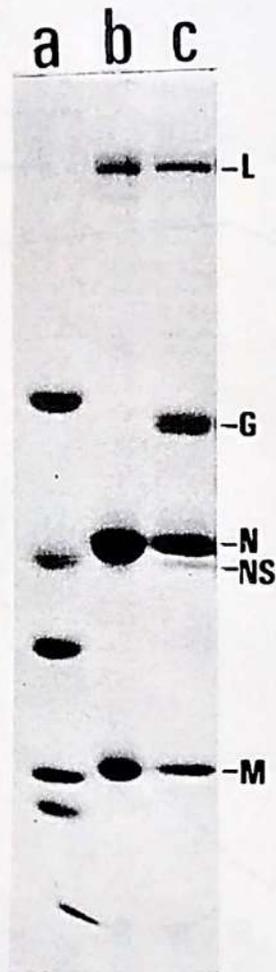


FIGURA 2: PAGE-SDS de las proteínas estructurales del VEV purificado. a) Proteínas marcadoras de peso molecular (Albúmina de suero bovino 68.000, ovoalbúmina 45.000, gliceraldehido 3- fosfato deshidrogenasa 36.000, anhidrasa carbónica 29.000, tripsinógeno 24.000, e inhibidor de tripsina 20.000). b) Nucleocapside de VEV obtenida por tratamiento con Triton X-100. c) VEV purificado en gradientes de tartrato de sodio y potasio. El gel de concentración fue de 4o/o poliacrilamida y el gel de separación del 10o/o. La tinción se hizo con azul de Coomassie.



FIGURA 3: PAGE-SDS continua en tubo, de la proteína G aislada con Triton X-100 en 0.01 M Hepes pH 7.8. La concentración del gel cilíndrico fue T = 7.7o/o, C = 2.5o/o en buffer Tris 0.09 M, ácido bórico 0.08 M y EDTA-Na₂ 0.025 M con 0.1o/o SDS. Coloración con azul de Coomassie.

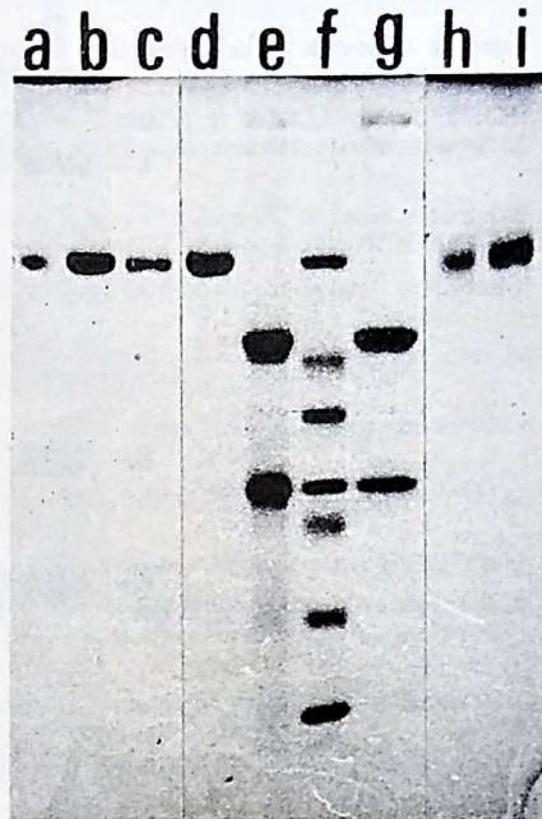


FIGURA 4: PAGE-SDS de la proteína G aislada con los dos detergentes. El gel de concentración fue de 4o/o poliacrilamida y el gel de separación de 12.5o/o. La tinción se hizo con azul de Coomassie. a). Proteína G aislada con Nonidet P-40, lote 5, antes de ser filtrada por Sephadex G 75. b). Proteína G aislada con Nonidet-P-40 lote 6, antes de ser filtrada por Sephadex G-75. c) Proteína G aislada con Nonidet P-40, fracción pico después de la filtración por Sephadex G-75, lote 5. d) Proteína G aislada con Nonidet P-40 después de la filtración por Sephadex G-75, lote 2. e). Nucleocapside obtenida por tratamiento de VEV con Triton X-100, lote 7. f). Marcadores de peso molecular (albúmina de suero bovino 68.000, ovoalbúmina 45.000, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa 36.000, anhidrasa carbónica 29.000, tripsinogeno 24.000, inhibidor de tripsina 20.000 y lacto albúmina 14.200. g). Nucleocapside obtenida por tratamiento de VEV con Triton X-100, lote 8. h). Proteína G aislada con Triton X-100 en 0.01 M tris-HCL, pH 8.0, y 0.1 mM de PMSF, i) Mezcla de las proteínas G aisladas como se describe en c), d) y (h).

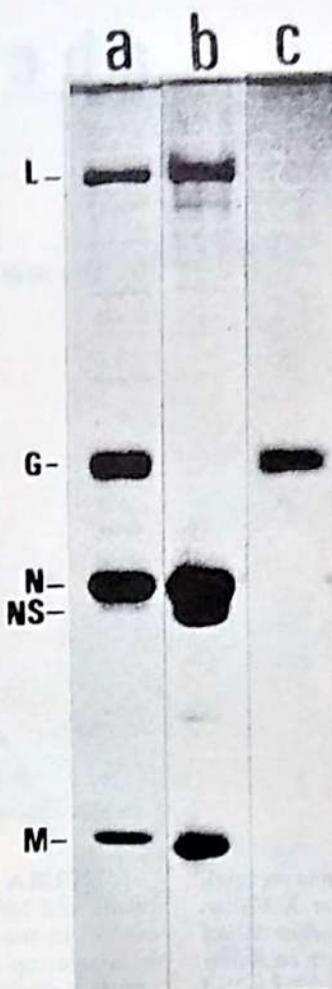


FIGURA 5: PAGE-SDS de la proteína G aislada con Triton X-100 en 0.01 M tris HCL, pH 8.0 y 0.1 mM de PMSF. El gel de concentración fue de 4o/o poliacrilamida y el gel de separación de 10o/o. La tinción se hizo con azul de Coomassie. a). VEV purificado. b). Nucleocapside del VEV aislada con Triton-X-100 c). Proteína G aislada con Triton X-100.

REFERENCIAS

1. AMES, G; NIKAIIDO, K. 1976. Two Dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Biochemistry*. 15: 616-623.
2. ANDERSON, L; SIKES, R; LONGKOP, C. MANN, J; SMITH, J; WINKLER, W; DEITICH, M. 1980. Post exposure trial of a human diploid cell strain to rabies vaccine. *Journal of Infectious diseases*. 412: 133-138.
3. ARBELAEZ, G; ROCHA, J, CARDONA, U; RIOS, W. 1982. Ensayos de vacunas contra la Estomatitis Vesicular. II. Observación experimental de campo. *Revista ICA*. 6: 27-38.
4. BARTA, O; HUBBERT, H. 1978. Testing of hemolytic complement components in domestic animals. *American Journal of Veterinary Research*. 39: 1303-1308.
5. CARDONA, U; ARBELAEZ, G; RUEDA, F. 1983. Observaciones epidemiológicas sobre la estomatitis vesicular en Colombia años 1976-1981. *Revista ICA*. 18: 193-198.
6. CARTWRIGHT, B; TALBOT, BROWN, F. 1980. The proteins of biologically active subunits of vesicular stomatitis virus. *Journal of general virology*. 7: 267-272.
7. CORREA, W. 1984. Prophylaxis of vesicular stomatitis: A field trial in guatemala dairy cattle. *American of veterinary Research*. 30: 1300-1302.
8. CRICK, J. 1981. Rabies. In: *Virus diseases of food animals*. Academic press, Nueva York.
9. EMERSON, S; WAGNER, R. 1972. Dissociation and reconstitution of the transcriptase and template activities of vesicular stomatitis B and T virions. *Journal of virology*. 10: 297-309.
10. GONENNE, A; ERNST, R. 1978. Solubilization of membrane proteins by sulfobetaines, novel Zwitterionic surfactants. *Analytical Biochemistry*. 87: 28-38.
11. HELENIUS, A; SIMONS, K. 1975. Solubilization of membranes by detergents *Biochimica et Biophysica Acta*. 415: 29-79.
12. KANG, C; PREVEC, L. 1970. Protein of vesicular stomatitis virus. *Journal of virology*. 6: 20-27.
13. KELLEY, J, EMERSON, S; WAGNER, R. 1972. The Glycoprotein of vesicular stomatitis virus is the antigen that gives rise to and reacts with neutralizing antibody. *Journal of virology*. 10: 1231-1235.
14. LAEMMLY, V. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.
15. LAWERMAN, L; HANSON, R. 1963. Field trial of live virus vaccination procedura for prevention of vesicular stomatitis in Panamá. *Proceeding of the V.S. Livestock sanitary Association*. 67: 483-490.
16. LOWRY, O; ROSEBROUGH, N; FARR, A; RANDALL, R. 1951. Protein Measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological chemistry*. 193: 265-275.
17. MATTEWS, R. 1982. Clasificación and nomenclature of virus. Fourth report of the international committee on taxonomy of viruses. *Intervirology*. 17: 109-144.
18. MUDD, J; SUMMERS, D. 1970. Polysomal ribonucleic acid of vesicular stomatitis virus infected Hela cells. *Virology*. 42: 958-968.
19. PEACOCK, A; DIMGMAN D. 1975. Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry*. 6: 1818-1827.
20. READING, C; PENHOET, E; BALLOU, C. 1978. Carbohydrate structure of vesicular stomatitis virus glycoprotein. *The journal of Biological Chemistry*. 253: 5600-5612.
21. ROBINSON, H; TANFORD, C. 1975. The binding of deoxycholate Triton X-100, sodium dodecyl sulfate and phosphatidyl-choline vesicles to cytochrome b5. *Biochemistry*. 14: 369-378.

22. SINGER, S; NICOLSON, G. 1972. The structure and chemistry of mammalian cell membranes. *Science*. 175: 720-731.
23. TANFORD, C; REYNOLDS, S. 1976. Characterization of membrane proteins in detergent solutions. *Biochimia et Biophysic Acta*. 457: 133-170.
24. THIMMING, R. HUGHES, H; KINDERS, R. MILENKOVIC A; JOHNSON, T. 1980. Isolation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus and its binding to cell surfaces. *Journal of general virology*. 50: 279-291.
25. VOLK, W; SNYDER, R; BENJAMIN, D; WAGNER, R. 1982. Monoclonal antibodies to the glycoprotein of vesicular stomatitis virus. *Journal of virology*. 42: 220-227.
26. WAGNER, R; KILLEY, M; SNYDER, R; SCHNAITMAN, C. 1972. Cytoplasmic compartmentalization of the protein and ribonucleic acid species of vesicular stomatitis virus. *Journal of virology*. 9: 672-683.
27. WANG, D; SMITH, R. 1975. Lowry determination of protein in the presence of triton X-100. *Analitical Biochemistry*. 63: 414-417.
28. YILMA, T; BREEZE, R; RISTOW, S; GORHAM, J; LEIB, S. 1984. Inmunne responses of cattle and mice to the G glycoprotein of vesicular stomatitis virus. Presented at the international conference on vesicular stomatitis. México, September 1984.