



## SEMIPURIFICACIÓN DEL VPPA POR COLCHÓN DE SACAROSA

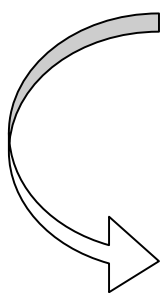
### • INTRODUCCIÓN

En la semipurificación del VPPA se obtienen diferentes proteínas virales dónde la VP73 es la proteína estructural mayoritaria de la cápsida. Esta proteína induce anticuerpos en una infección natural, de ahí su importancia como reactivo para diferentes técnicas de diagnóstico. Otras proteínas importantes por su capacidad antigénica obtenidas tras el proceso de semipurificación son la proteína p32 y la proteína p54. Estas proteínas son parcialmente purificadas (junto con otras proteínas del VPPA) por simple extracción a partir de las partículas virales presentes en la fracción citoplasmática de células infectadas. El extracto de virus semipurificado es usado como antígeno efectivo para el diagnóstico de PPA mediante la técnica de ELISA e IB.

### • MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS.

**TRIS HCl 1M pH=8 ( $V_{FINAL}= 500$  ml)**

- 60,57 gr Tris
- 300 ml de H<sub>2</sub>O destilada
- Ajustar el pH a 8 con HCl y completar con H<sub>2</sub>O hasta 500 ml

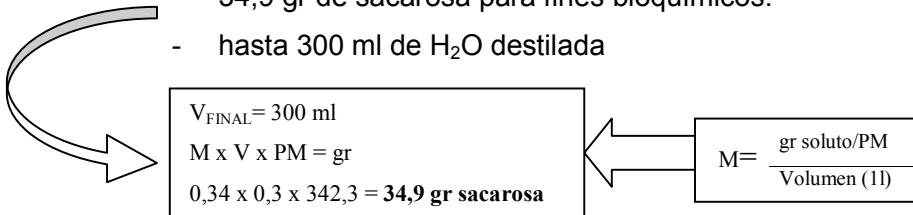


$V_{FINAL}= 500$ ml $M \times V \times PM = \text{gr}$ $1 \times 0,5 \times 121,14 = \mathbf{60,57}$ gr Tris	$M = \frac{\text{gr soluto/PM}}{\text{Volumen (l)}}$
--	--



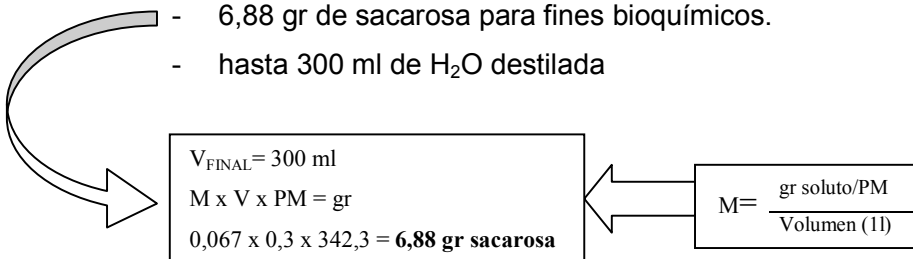
**SACAROSA 0,34 M en Tris HCl 5mM pH=8 (V<sub>FINAL</sub>= 300 ml)**

- 1,5 ml de Tris HCl 1M
- 34,9 gr de sacarosa para fines bioquímicos.
- hasta 300 ml de H<sub>2</sub>O destilada



**SACAROSA 0,067 M en Tris HCl 5mM pH=8 (V<sub>FINAL</sub>= 300 ml)**

- 1,5 ml de Tris HCl 1M
- 6,88 gr de sacarosa para fines bioquímicos.
- hasta 300 ml de H<sub>2</sub>O destilada



**NP40 al 10% en agua (V<sub>FINAL</sub>= 200 ml)**

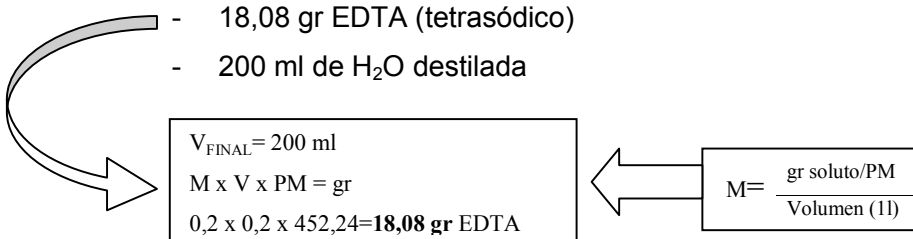
- 20 ml de NP40
- 180ml de H<sub>2</sub>O destilada.

**SACAROSA 64% Tris HCl 0,4M. (V<sub>FINAL</sub>= 200 ml)**

- 80 ml de Tris HCl 1M pH 8
- 128 gr de sacarosa para fines bioquímicos.
- hasta 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada

**EDTA 0,2 M. (V<sub>FINAL</sub>= 200 ml)**

- 18,08 gr EDTA (tetrasódico)
- 200 ml de H<sub>2</sub>O destilada



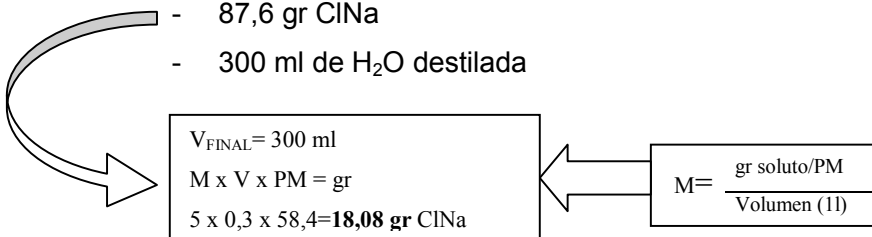


### TAMPÓN TNE

- 4,75 ml de H<sub>2</sub>O destilada
- 1,4 ml de EDTA 0,2 M
- 0,35 ml Tris HCl 1M pH 8
- 0,5 ml de β-mercaptoetanol

### ClNa 5M (V<sub>FINAL</sub> = 300 ml)

- 87,6 gr ClNa
- 300 ml de H<sub>2</sub>O destilada



Se disuelve en calor y en agitación

### SACAROSA 20% (p/p) en Tris HCl 50 mM pH 8 (V<sub>FINAL</sub> = 300 ml)

- 20 ml de Tris HCl 1M pH 8 (cálculos para un volumen de 400 ml)
- 60 gr de sacarosa para gradiente de concentración
- Se va añadiendo el disolvente (H<sub>2</sub>O destilada) hasta un peso final de 300 gr (relación peso/peso, no peso/volumen)



## • METODOLOGÍA

Cultivo de células MS o VERO infectadas con una moi de 10 del aislado infeccioso del VPPA E70 (aproximadamente 15 falcon T150).

### Inoculación

- Células MS o VERO confluentes al 70%.
- Se elimina el medio y se añaden 3 ml de virus + 3 ml de medio sin suero.
- 2 horas a 37° en agitación
- Se completa con medio + un 2% de suero porcino.
- Se mantienen a 37° en atmósfera de CO<sub>2</sub> 24-48 horas

A uno de los T150 inoculados se les añade 50 ml de medio con un 10% de suero de cerdo y se congela a -70 para utilizarlo como inóculo. Previo a la inoculación hay que sonicar el virus.



## PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN

1. Recoger las células MS ó VERO infectadas levantando el tapiz con espátula. Debe haber efecto citopático pero que las células no estén rotas para recuperar la mayor cantidad de virus intracelular. Repartir en botellas estériles de 250 ml y centrifugar a 600g durante 20' (Sorvall).
2. Lavar las células (**precipitado**) con **SACAROSA 0,34M en Tris HCl 5 mM pH=8** (aproximadamente 20 ml).
3. Centrifugar a 600g durante 10 '. Retirar con cuidado el sobrenadante y resuspender las células (**precipitado**) en tampón hipotónico; **SACAROSA 0,067 M en Tris HCl 5mM pH=8**, añadiendo por cada falcon 1,8 ml. Sirve para hinchar las células.

*Ejemplo;* si tenemos antes de empezar a purificar 15 falcon de T150 inoculados los cálculos serán 15 falcon x 1,8 ml=27 ml

4. Agitar con pipeta hasta disolver las células colocándolas en hielo 10', agitando a los 5'suavemente.
5. Añadir 1/9 del volumen total) de **NP40 al 10%**, agitar y colocar en hielo 10'agitando a los 5'. Se produce lisis celular.

*Ejemplo;* 27 ml +1 ml de precipitado=28 ml de volumen total  
1/9 de 28 ml= 3,1 ml  
28 ml + 3,1 ml NP40= 31,1 ml de volumen total.

6. Añadir 1/7 de volumen total de tampón hipertónico de **SACAROSA 64% Tris Hcl 0,4M**. Se consigue la isotonicidad necesaria y evita un posible ataque del detergente (NP40) a la membrana celular.

*Ejemplo;* 31,1 ml / 3 =4,4 ml de SACAROSA al 64%

7. Sonicar
8. Centrifugar a 1000g durante 10'. A esta velocidad caen los núcleos celulares.
9. Recogemos el **sobrenadante** desechando los núcleos que quedan en el fondo del tubo y le añadimos 1/19 al volumen total que hayamos obtenido de **tampón TNE**



(desagrega las partículas virales entre sí) y 1/10 de **CINa 5M** (recupera la isotonicidad) de forma que quede una concentración final de 0,5 M.

*Ejemplo;*  $33 \text{ ml} / 19 = 1,7 \text{ ml de TNE}$   
 $33 \text{ ml} + 1,7 \text{ ml TNE} = 34,7 \text{ ml de volumen total.}$   
 $34,7 \text{ ml} / 10 = 3,47 \text{ ml de CINa 5M}$   
 $V_{\text{FINAL TOTAL}} = 34,7 \text{ ml} + 3,47 \text{ ml} = 38,17 \text{ ml}$

10. El volumen total se reparte entre los 6 tubos de la ultracentrífuga añadiendo primero el **COLCHÓN DE SACAROSA 20% en Tris HCl 50 mM pH 8**. Después gota a gota se va añadiendo el sobrenadante de manera que no se mezclen.

*Ejemplo;*  $V_{\text{FINAL TOTAL}} = 38,17$   
 $38,17 / 6 \text{ tubos} = 6,36 \text{ ml de sobrenadante}$   
 $12 \text{ ml} - 6,36 \text{ ml} = 5,64 \text{ ml de colchón de sacarosa.}$   
Cada tubo tiene una capacidad de 12,5 ml, pero calculamos sobre 12 ml.

11. Tarar los tubos y colocarlos 1-4, 2-5, 3-6 y centrifugar a 100,000g durante 1h 5'a 4º (rotor SW 41-1)
12. Recoger la fase superior sin arrastrar el colchón de sacarosa y colocar lo de los 6 tubos en un tubo común de 50 ml. Calcular el volumen total que hay de antígeno y añadir 1% de metiolato (conservante).

## REFERENCIAS

Pastor, M.J. Sánchez-Vizcaíno, J.M., Escribano, J.M. (1988). Dos nuevas técnicas para el diagnóstico de la PPA: Immunolectro-transferencia y Enzimo-inmuno-adsorción. *Med. Vet.* 5 (5-6). 275-282.

Escribano, J.M., Pastor, M.J. y Sánchez-Vizcaíno, J.M. (1989). Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: Implications for false-positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever. *Am. J. Vet. Res.* 50 (7), 1118-1122.

Pastor, M.J., Arias, M. y Escribano, J.M. (1990). Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody. *Am. J. Vet. Res.* 51(10), 1540-1543

### PPA revisiones.:

- Arias, M., Sánchez-Vizcaíno, JM (2002). African Swine Fever (ASF). In *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*. Iowa State University press, ISBN: 0813803837. Eds. A. Morilla, K-J Yoon, J. Zimmerman. Pp 119-124.
- Arias, M., Sánchez-Vizcaíno, JM (2002). African Swine Fever Eradication: The Spanish model. In *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*. Iowa State University press, ISBN: 0813803837. Eds. A. Morilla, K-J Yoon, J. Zimmerman. pp 133-139.
- Arias, M.; Sánchez, C; González, MA; Carrasco, L; y Sánchez-Vizcaíno, JM. (2002). "Peste porcina Africana" In *curso digital de enfermedades infecciosas porcinas*. [www.sanidadanimal.info](http://www.sanidadanimal.info) /on line, July, 2002/.

## EU AND OIE REFERENCE LABORATORY FOR AFRICAN SWINE FEVER

Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA)

Valdeolmos, 28130, Madrid, SPAIN.

**Telf.: +91 6202300; Fax.: + 91 6202216**

**Contactos.:** Dr. Carmina Gallardo [gallardo@inia.es](mailto:gallardo@inia.es)  
Dr. Marisa Arias [arias@inia.es](mailto:arias@inia.es)