

INTRODUZIONE

La sindrome della lepre bruna europea (EBHS) è una forma acuta e altamente contagiosa di epatite virale necrotizzante che affligge *Lepus europaeus* e *Lepus timidus* comportando un'alta mortalità fra gli animali di allevamento. Il virus dell'EBHS, un calicivirus appartenente alla famiglia dei *Lagovirus*, è costituito da un singolo filamento di RNA (~7.5-8 kb) e da un capsidico sprovvisto di envelope del diametro di 35-39 nm costituito da una singola proteina capsidica (CP) di 60 kDa (1). La CP dell'EBHSV autoassembla spontaneamente a formare le "virus-like particles" (VLPs) che sono morfologicamente ed antigenicamente identiche al virione (2, 3, 4). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di sintetizzare in sistema baculovirus la CP munita di un tag 6xHis inserito in posizione 310 della sequenza amminoacidica e la sua successiva purificazione mediante cromatografia per affinità.

MATERIALI E METODI

Clonaggio del gene CP310-His e generazione del baculovirus ricombinante: Il gene codificante la CP contenente al suo interno il tag-6xHis è stato ottenuto mediante PCR utilizzando come target un costrutto CP/pOET-2C precedentemente generato nel nostro laboratorio (5). Brevemente, sono state impiegate le seguenti due coppie di primers CP-EcoPol-F/EBHS H₆-1-R e H₆-1-F/CP-Hind-R rispettivamente per l'amplificazione della regione ammino-terminale e carbossi-terminale della CP.

I due amplificati ottenuti sono stati purificati, miscelati in quantità equimolecolari e infine sottoposti ad un secondo ciclo di amplificazione con CP-EcoPol-5'-F/CP-Hind-R al fine di ottenere l'intero gene codificante per la CP310-His. Il prodotto finale di PCR purificato è stato digerito con le endonucleasi di restrizione EcoRI-HindIII e clonato in vettore pOET-2C. Le sequenze nucleotidiche sono state confermate mediante sequenziamento.

Per la generazione del baculovirus ricombinante le cellule di insetto Sf21 sono state cotrasfettate con il costrutto precedentemente descritto e il DNA bacmidico.

Espressione e purificazione della proteina capsidica: 30 x 10⁶ cellule Sf21 sono state infettate con il baculovirus ricombinante ed incubate a 27 ° C per 3 giorni.

Le cellule sono state raccolte e lisate con 5 mL di tampone di lisi (50 mM tampone Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8, 300 mM NaCl, 1% triton X100). La proteina è stata purificata sottoponendo l'estratto cellulare a cromatografia per affinità mediante la resina His-Select Ni⁺⁺ (Sigma-Aldrich). L'analisi delle varie frazioni e del prodotto purificato è stata eseguita tramite ELISA e SDS-PAGE/coomassie.

RISULTATI E DISCUSSIONE

L'analisi della sequenza nucleotidica del gene codificante la CP310-His ha mostrato il corretto inserimento del tag 6xHis al suo interno. Il test ELISA ha evidenziato un elevato livello di produzione della CP310-His nelle cellule di insetto Sf21 (fig 1). L'indagine effettuata attraverso l' SDS-PAGE e la successiva colorazione del gel con coomassie brilliant blue ha mostrato una banda proteica delle dimensioni attese (fig 2). Dai dati presentati si evince che il processo di purificazione della CP310-His garantisce un'ottima resa in termini quantitativi oltre ad un apprezzabile grado di purezza (fig 1 e 2).

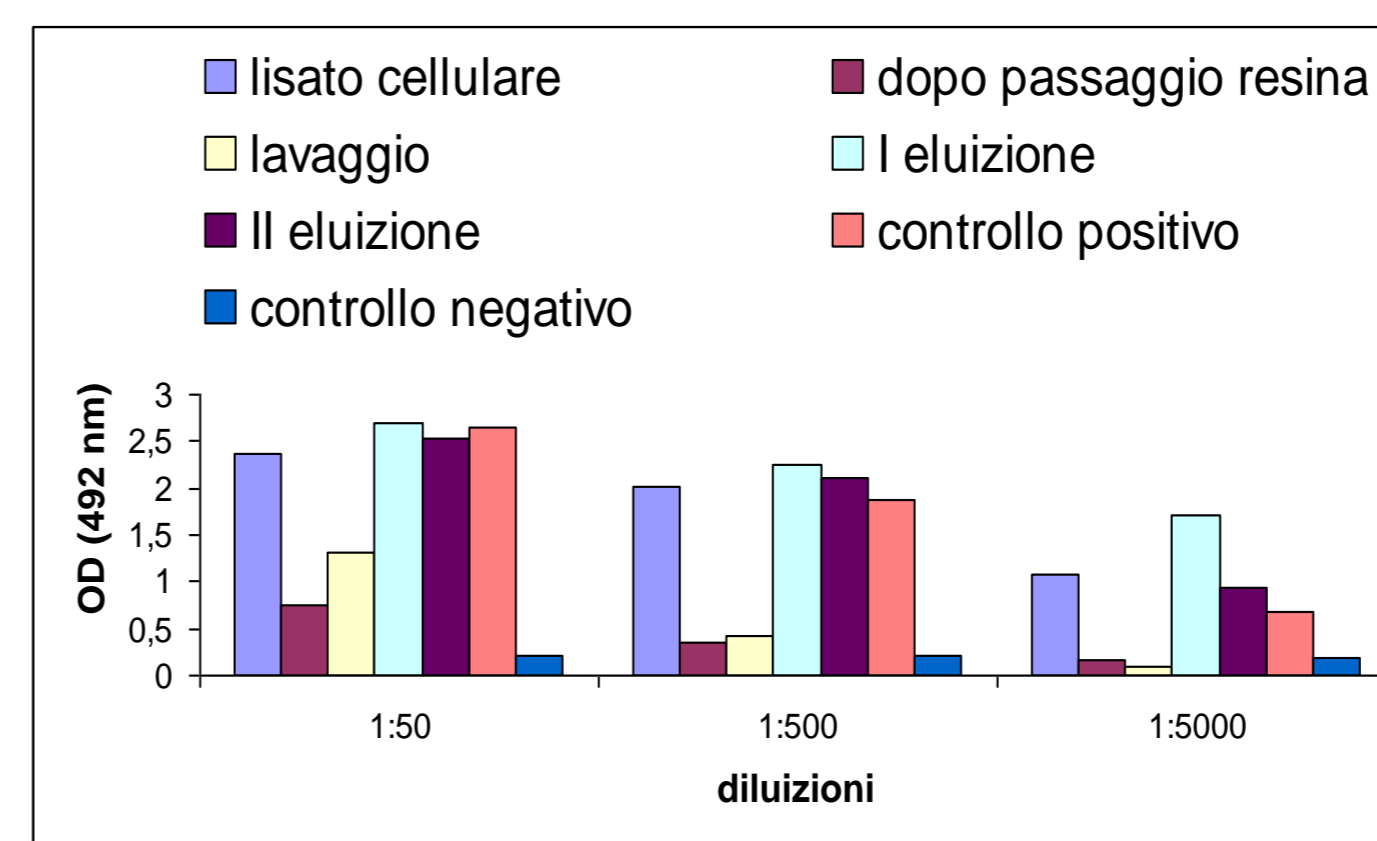


Figura 1. Test ELISA sulle frazioni ottenute nel corso del processo di purificazione.

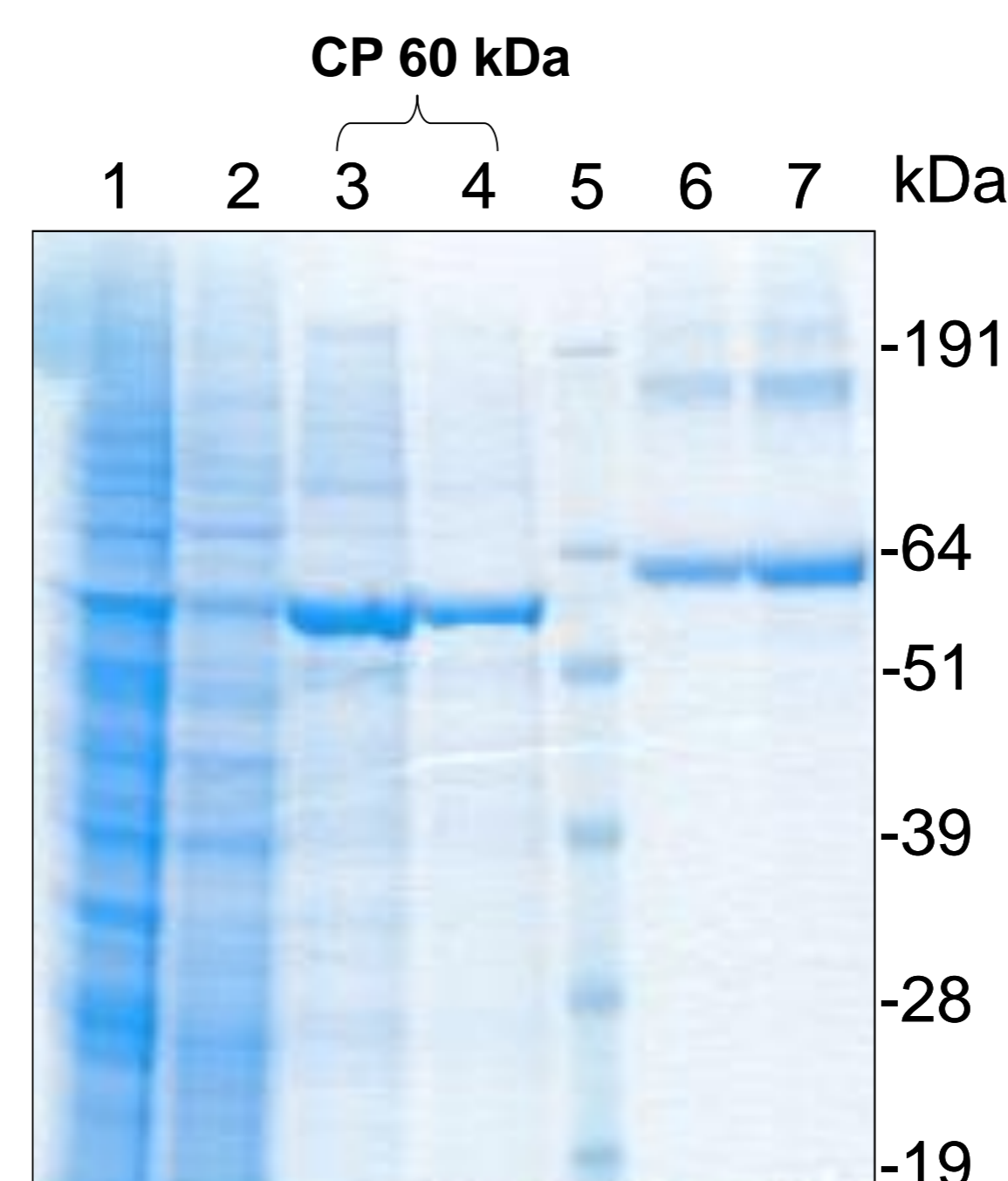


Figura 2. SDS-PAGE/Coomassie nel corso del processo di purificazione. 1) lisato cellulare, 2) lisato cellulare dopo passaggio attraverso la resina, 3) I eluizione, 4) II eluizione, 5) marker di peso molecolare, 6) BSA 1 µg, 7) BSA 2 µg.

Obiettivi futuri: valutare le eventuali capacità autoaggreganti della CP310-His a formare VLP e un suo potenziale impiego come presidio immunizzante.

BIBLIOGRAFIA

- Wirblich C et al. European brown hare syndrome virus: relationship to rabbit hemorrhagic disease virus and other caliciviruses. *J Virol* (1994) 68, 5164-73
- Laurent S et al. Structural, antigenic and immunogenic relationships between European brown hare syndrome virus and rabbit haemorrhagic disease virus. *J Gen Virol* (1997) 78, 2803-11
- Crisci E et al. Chimeric calicivirus-like particles elicit protective anti-viral cytotoxic responses without adjuvant. *Virology* (2009), 387, 303-312
- Grgacic EV, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* (2006) 40, 60-65
- Madeo L, Pezzotti G, Mangili PM, Serroni A, Manuali E, De Giuseppe A. Expression and purification of the C-terminal His-tagged capsid protein of European brown hare syndrome virus. 3^o EAVLD abstract book pag. 37. EAVLD Congress - Pisa (Italy), October 12-15, 2014