

Anexo 1

Purificación de ADN viral

1. Partir de un sobrenadante de un cultivo celular infectado y clarificado.
2. Concentrar las formas brotantes de los baculovirus por centrifugación (centrifugar 1,5 ml de sobrenadante de un cultivo infectado durante 20 minutos, a $>12.000 \times g$ y 4°C). Descartar el sobrenadante.
3. Resuspender en 100 μl de *buffer* de lisis (10 mM TrisHCl pH 7,6; 10mM EDTA; 0,25% SDS), asegurarse que el *pellet* esté bien resuspendido.
4. Agregar Proteinasa K a una concentración final de 500 $\mu\text{g/ml}$. Incubar a 55°C durante 15 minutos (hasta que la suspensión esté translúcida).
5. Agregar 1 vol. de cloroformo-isoamílico y mezclar suavemente hasta lograr una buena emulsión (**no usar vortex**). Centrifugar 5 minutos a $>12.000 \times g$ y 4°C . Trasvasar la fase acuosa a otro tubo.
6. Agregar 0,1 vol. de 3 M NaAcO y 1 vol. de Isopropanol. Mezclar suavemente. Incubar 15 minutos a -20°C . Centrifugar 15 minutos a $12.000 \times g$ a 4°C . Descartar el sobrenadante.
7. Lavar el pellet con 200 μl de etanol 70% frío. Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm. Descartar el sobrenadante.
8. Evaporar los restos de etanol al aire (**cuidar que no se seque excesivamente**).
9. Disolver en un pequeño volumen de agua estéril o *buffer* TE (10 mM Tris HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA).
10. Conservar a 4°C .

Purificación plasmídica mediante miniprep por lisis alcalina

1. Inocular la cepa bacteriana en 5 ml de media LB con el antibiótico correspondiente, crecer *overnight* (a saturación) con agitación (37°C , 200-220 rpm).
2. Colocar 1,5 ml del cultivo en un tubo tipo *Eppendorf* de 1500 μl . Centrifugar 30 segundos a 14.000 rpm. Retirar el sobrenadante. Repetir 3 veces.
3. Resuspender con vortex el *pellet* obtenido en 200 μl de **solución I**. Centrifugar 30 segundos a 14.000 rpm. Retirar el sobrenadante.
4. Resuspender con vortex el *pellet* obtenido en 200 μl de **solución I** suplementada con la enzima RNasa A (1 μl de solución 10 mg/ml por cada 1 ml inicial de cultivo bacteriano).
5. Agregar 300 μl de **solución II** recién preparada, mezclar por inversión.
6. Incubar durante 3-5 minutos a temperatura ambiente.
7. Agregar 300 μl de **solución III**. Mezclar por inversión (se debe formar un precipitado blanco) e incubar 10 minutos.
8. Centrifugar 10 minutos a 14000 rpm.
9. Trasvasar el sobrenadante cuidando de no tomar el precipitado.

10. Agregar 1 volumen de la mezcla **cloroformo:isoamilico** (24/1), mezclar por inversión hasta formación de emulsión. Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm y trasvasar la fase acuosa.
11. Agregar 0,8-1 volúmenes de **isopropanol**, mezclar por inversión.
12. Incubar durante 15-20 minutos a -20°C.
13. Centrifugar 15 minutos a 14000 rpm y a 4°C. Descartar el líquido cuidando de no perder el *pellet*.
14. Agregar 500 µl de **etanol 70%** (v/v). Mezclar por inversión. Centrifugar 5 minutos a 14.000 rpm a 4°C.
15. Descartar el líquido de lavado. Retirar con micropipeta p200 los restos de líquido y secar el *pellet* de ADN en baño a 55°C. Evitar que se deshidrate.
16. Disolver el cccdsDNA en 20 µl de agua bidestilada estéril. Vórtex suave.

Cuantificación del genoma viral mediante PCR cuantitativa con estándar externo

Para determinar el número de partículas virales mediante PCR se realizará una curva de calibración con un plásmido recombinante conteniendo el gen *egt* de AcMNPV (pGEMT-EGT), exactamente cuantificado. De este modo se utilizarán distintas diluciones del mismo como molde de reacción, en paralelo con las diluciones del ADN viral purificado. Con los datos de moléculas de molde inicial incorporado en cada tubo de reacción, más las moléculas de producto obtenidas en cada reacción de PCR (utilizando un *Software* adecuado para determinar las masas de producto), se podrá establecer el número de moléculas virales.

Transferencia horizontal mediante electroporación

1. Esterilizar las cubetas de electroporación durante 15 minutos.
2. Mezclar 1 µl de la ligación con 100 µl de *E. coli* DH10BAC electrocompetentes, colocar la mezcla en la cuba de electroporación.
3. Colocar la cuba en el electroporador.
4. Apretar los dos botones rojos del equipo, y mantenerlos simultáneamente apretados hasta escuchar la alarma.
5. Sacar la cuba del equipo y rápidamente colocarle 900 µl de medio LB estéril sin antibiótico, pipetear varias veces. Tomar todo el volumen y transferirlo a un *ependorf* estéril.
6. Incubar durante 2 hs a 37°C, a 220 rpm.
7. Plaquear en medio LB sólido suplementado con Kanamicina, X-Gal e IPTG.
8. Incubar durante 24 horas a 37°C.

Transferencia horizontal mediante Shock térmico

1. Descongelar en baño de hielo las células DH10Bac competentes (químicas).
2. Colocar 100 µl de las células en *ependorf* de 1,5 ml.

3. Agregar 5ul del plásmido donador recombinante (en 5 μ l de H₂O estéril) y mezclar suavemente el DNA por inversión.
4. Incubar la mezcla en hielo durante 30 minutos.
5. Shock térmico de la mezcla transfiriendo el tubo a un baño 42°C durante 45 segundos.
6. Enfriar la mezcla en hielo durante 2 minutos.
7. Agregar 900 μ l de medio LB.
8. Incubar en un agitador a 37°C durante 4 horas.
9. Plaquear en medio LB sólido suplementado con Kanamicina, Gentamicina, X-Gal e IPTG.
10. Incubar al menos durante 24 horas a 37 °C, debido a que es necesario mayor incubación para poder discernir entre colonias blancas y azules.

Aislamiento del Bácmido Recombinante

1. Sembrar en medio líquido (LB + Kan + Gen) la colonia con el fenotipo correcto. Incubar ON a 37 °C con agitación.
2. Transferir 1,5 ml del cultivo en tubos *eppendorf* y centrifugar a 14.000 rpm durante 1 minuto. Descartar el sobrenadante. Repetir el proceso.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender (suavemente con *vortex* o pipeteando si es necesario) cada *pellet* en 300 μ l de solución I (15 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA; 100 μ g/ μ l de RNasa A). Agregar 300 μ l de solución II (0,2 N NaOH; 1% SDS) y mezclar suavemente. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
4. Agregar 300 μ l de solución III + 1,5 μ l de RNasa. Mezclar suavemente durante la adición. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Centrifugar durante 10 minutos a 14000 rpm.
6. Tomar el sobrenadante y agregar 1 vol de cloroformo-isoamílico. Mezclar suavemente.
7. Centrifugar durante 5 minutos a 14000 rpm.
8. Tomar la fase acuosa y agregarle 800 μ l de Isopropanol absoluto. Mezclar suavemente por inversión y colocarlos a -20 °C de 15-20 minutos. (En esta etapa la mezcla puede ser almacenada a -20°C ON.)
9. Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 14000 rpm.
10. Desechar el sobrenadante y agregar 500 μ l de EtOH 70 %. Invertir el tubo varias veces para lavar el pellet. Centrifugar 5 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente.
11. Descartar el sobrenadante con cuidado.
12. Secar al aire de 5-10 minutos a temperatura ambiente o en baño a 50°C y disolver el ADN en 20 ul H₂O o buffer TE. (¡OJO cuidar que el DNA se reseque!!!)
13. Sembrar una alícuota en gel de agarosa sembrar 10 ul 0,6%.

Transfección de células de insecto UFL-Ag-286 con el ADN del bácmido recombinante

1. Sembrar 9×10^5 células por well de 35 mm en 2 ml de medio GRACE'S completo.
2. Dejar que las células se adhieran a la superficie e incubar la placa durante 24 hora a 27°C.
3. Preparar las siguientes soluciones en tubos estériles.

Solución A: para cada transfección, diluir aproximadamente 5 μ l de la *miniprep* del ADN del bácmido en 100 μ l de medio GRACE'S sin antibióticos y suero.

Solución B: para cada transfección, diluir aproximadamente 6 μ l del reactivo *Cellfectina* en 100 μ l de medio GRACE'S sin antibióticos y sin suero. Mezclar con vortex suave para formar una emulsión fina.

4. Combinar las dos soluciones, mezclar suavemente, e incubar de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar las células con 2 ml de medio GRACE'S sin antibióticos y sin suero.
6. Por cada transfección agregar 800 μ l de medio GRACE'S (sin antibióticos y sin suero) a cada tubo conteniendo los complejos DNA-lípido. Mezclar suavemente.
7. Aspirar el medio de lavado de las células y cubrirlas con la mezcla Medio-ADN-lípido.
8. Incubar las células durante 5 horas a 27 °C.
9. Remover las mezclas de transfección y agregar 2 ml de medio GRACE'S + antibióticos + suero. Incubar la mezcla a 27°C durante 72 hs
10. Cosechar el sobrenadante conteniendo las formas brotantes del virus AcMNPV recombinante (título esperado 2×10^7 PFU/ml).

Infección de células de insecto con los baculovirus recombinantes

1. Infectar un cultivo de células UFL-Ag-286 (2×10^6 células/ml) con 1000 μ l del stock viral (2×10^7 PFU/ml) a una MOI de 0,1.
2. Cosechar el virus a las 48 horas post-infección. Esto podrá representar aproximadamente 10 veces la amplificación del virus.

Sincronización

1. Levantar los gusanos de la placa con 3ml de buffer M9, aspirando y botando con pipeta (P1000) para despegar los gusanos. Transferir el producto lavado a un tubo de 15 ml.
2. Centrifugar a 2000 rpm durante 20 segundos. Eliminar el sobrenadante.
3. Agregar 5 ml de una solución de NaOH/Cl₂ y agitar con la mano por 4 minutos (exactos). Con este tratamiento se rompen los gusanos y se liberan los huevos.
4. Agregar 2 volúmenes de M9 estéril para diluir la solución de cloro/NaOH.
5. Centrifugar a 2000 rpm durante 20 segundos. Eliminar el sobrenadante.
6. Realizar dos lavados con 15ml de buffer M9 estéril. Centrifugar a 2000 rpm durante 20 segundos entre cada lavado. Descartar el sobrenadante.

7. Resuspender los huevos en 3,5ml de buffer M9 estéril-antibiótico, y dejar toda la noche en agitación.
8. Al día siguiente las L1 se transfieren a placas con comida.