

vectores de adenovirus. Los pasos para la construcción del vector adenoviral del serotipo 5 que expresa Hath1 se resumen a continuación.

Construcción de los Plásmidos

- 5 Un plásmido denotado pAd3511gfa2.HATH1.sv se digirió 5 con enzimas de restricción para extraer en gel un casete de expresión GFAP.HATH1. Un plásmido de base que comprende un genoma adenoviral del serotipo con deleciones en las regiones E1, E3, y E4 y un espaciador transcripcionalmente inerte que contiene un poli SV40 (A) y secuencias de terminación de la transcripción, un gen de β -glucuronidasa, y un gen de la hormona de crecimiento bovino (BGH) poli (A) y secuencias de terminación de la transcripción (denotadas pAdE1 (BN) E3 (10) E4 (TIS1)) fue linealizado y purificado. El plásmido pAdE1 (BN) E3 (10) E4 (TIS1) fue recombinado homológamente con el casete de expresión GFAP.HATH1 en *E. coli*, dando como resultado el plásmido pAdE1 (GFAP.Hath1)E3(10)E4(TIS1).
- 10
- 15 **[0061]** Para asegurar la clonalidad del plásmido de vector de adenovirus de longitud completa, se utilizó una alícuota del plásmido de ADN pAdE1 (GFAP.Hath1)E3(10)E4(TIS1) AdFast™ para transformar *E. coli* de DH10B mediante la limitación de diluciones en serie. Colonias bien definidas y aisladas se seleccionaron de la placa de dilución más alta que contiene la menor cantidad de colonias. El plásmido de ADN miniprep se preparó y digirió con Hind III+SpeI para confirmar la integridad del plásmido mediante análisis RFLP. El ADN miniprep correspondiente positivo se utilizó para generar otra serie de diluciones limitantes, que se utilizaron luego para transformar DH10B de *E. coli*. Una alícuota de un cultivo líquido de una sola colonia en la placa que contiene el menor número de colonias
- 20
- 25 se utilizó para generar ADN miniprep, después de lo cual se utilizó ApaI para confirmar adicionalmente la integridad del plásmido. El cultivo líquido restante del clon positivo se utilizó para marcar una placa de LB-kanamicina. Un transformante bacteriano único se amplió para la preparación de ADN de plásmido EndoFree AdFast™ por el Kit Plasmid Maxi HISPEED™ (Qiagen, Venlo, Países 30 Bajos) siguiendo el protocolo del fabricante. La preparación de plásmido resultante se confirmó mediante la digestión de la endonucleasa de restricción
- 30