

Expresión de la proteína E del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz, transformados mediante biobalística

West Nile virus E protein expressed in transformed corn embryogenic callus type II, by biobalistic

Luis Gómez-Núñez^{ab}, María Teresa de Jesús Olivera Flores^c, Lilia Soto Ruiz^a, Miguel Angel Gómez-Lim^d, Elizabeth Loza-Rubio^a

RESUMEN

La clonación y expresión heteróloga de antígenos de agentes patógenos que afectan humanos y animales, ha demostrado ser una buena alternativa para la obtención de vacunas subunitarias. En este estudio se analiza la expresión estable del gen *E* que codifica la glicoproteína de envoltura del virus del Oeste del Nilo (VON) en callos embriogénicos de maíz, que fueron transformados mediante biobalística empleando el promotor constitutivo CAMV35S. La expresión del transgen fue determinada mediante RT-PCR en los callos embriogénicos de maíz transformados con la secuencia codificante de la glicoproteína E del VON. Para verificar la expresión de la proteína se realizó un Western blot con extractos de la proteína soluble total (PST) de los callos transformados. De esta manera se identificó una proteína de 68 kDa. Empleando este sistema de expresión se pudo obtener un 0.86 % de PST. En este estudio por primera vez se analiza la expresión de la glicoproteína E del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz. Siendo la glicoproteína E del VON la responsable de la inducción de la inmunidad en contra de este virus, esta investigación representa un avance importante en el diseño de un inmunógeno experimental, que permitiría iniciar estudios en animales de laboratorio, con la finalidad de obtener una vacuna prototipo para la prevención y el control de la infección por el VON.

PALABRAS CLAVE: Callos embriogénicos de maíz, Proteína E, Virus del Oeste del Nilo.

ABSTRACT

Cloning and heterologue expression of antigens to pathogenic agents which affect humans and animals is an effective way of producing subunitary vaccines. An analysis was done of stable expression of the *E* gene coding for the West Nile Virus (WNV) envelope (E) glycoprotein in corn type II embryogenic callus transformed with biobalistics using the constitutive CAMV35S promoter. This protein is responsible for WNV immunity induction. Transgene expression in transformed calluses with the WNV E glycoprotein was identified by RT-PCR. Western Blot was used to verify protein expression with total soluble protein (TSP) extracts from the transformed calluses. A 68 kDa protein was identified and 0.86 % TSP attained. This WNV E glycoprotein production system allows production of this protein in almost half the time of conventional techniques, a significant advance in experimental immunological design. This is the first time that this kind of evaluation was done. We suggest evaluating the transformed embryogenic calluses in animals by oral route in order to test its efficacy as a candidate of vaccine.

KEY WORDS: Corn embryogenic callus, E Protein, West Nile virus.

INTRODUCCIÓN

El virus del Oeste del Nilo (VON), es miembro del género *Flavivirus*, la partícula que envuelve al virión

INTRODUCTION

West Nile virus (WNV) belongs to the *Flavivirus* genus. The particle surrounding the virion measures

Recibido el 10 de mayo de 2010. Aceptado el 4 de octubre de 2010.

^a Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias INIFAP-CENID Microbiología Animal, Carretera México Toluca Km. 15.5, Colonia Palo Alto. 05110. México D, F. loza.elizabeth@inifap.gob.mx. Correspondencia al último autor.

^b Facultad de Medicina Veterinaria-UNAM.

^c Facultad de Química-UNAM. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

^d CINVESTAV Irapuato. Instituto Politécnico Nacional.

mide entre 45 y 50 nm de diámetro, presenta un núcleo icosaédrico, posee en su interior una sola cadena de ARN de sentido positivo de aproximadamente 11,000 nucleótidos⁽¹⁾. El ARN es un solo marco de lectura que codifica para diez proteínas, entre ellas la glicoproteína de envoltura (E) juega un papel importante en la fusión a la membrana y se reconoce como el principal antígeno y promotor de anticuerpos neutralizantes del virus⁽²⁾. Es por ello que ha sido elegida el principal blanco para elaborar inmunógenos de nueva generación. Estos biológicos han utilizado diferentes vectores, como: lentivirus, baculovirus, e incluso el virus del sarampión. Por otro lado, una sola inmunización con una vacuna de ADN desnudo que codifica para las proteínas prM y la E ha demostrado tener la capacidad de estimular una respuesta inmune y proteger eficazmente a ratones y a caballos⁽³⁾.

Actualmente en México, existen dos vacunas de virus inactivado para la prevención del VON en equinos, la primera se encuentra disponible en los EUA (Fort Dodge®), que confiere una protección del 94 % de los animales inmunizados ante un desafío por vía parenteral⁽⁴⁾ y la producida por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONAVIVE), que obtuvo buenos resultados de protección⁽⁵⁾. La inmunización con estas vacunas resulta costosa debido a que requieren inicialmente de la aplicación de dos dosis continuas para que la protección sea completa, además el contener al virus completo dificulta la vigilancia epidemiológica, puesto que no se puede diferenciar entre animales vacunados de los infectados en el campo.

La biotecnología basada en plantas ha permitido la obtención de diversos productos como: vacunas, proteínas terapéuticas, enzimas y anticuerpos^(6,7). Los callos embriogénicos de maíz han sido comúnmente utilizados para la expresión de proteínas heterólogas, por ser un sistema útil para la transformación mediante biobalística y para la obtención de plantas transgénicas. El callo Tipo II procedente del escutelo, es de crecimiento rápido con la presencia de numerosos embriones somáticos, que mantienen su capacidad embriogénica y regenerativa por periodos largos^(8,9). Por lo anterior, el objetivo del

from 45 to 50 nm, its nucleus is icosahedric and contains a single positive-sense RNA chain of approximately 11,000 nucleotides⁽¹⁾. RNA is a single reading framework coding for ten proteins, among them the envelope (E) glycoprotein, which plays a vital role in fusion to the membrane and is recognized as the main antigen and promoting neutralizing antibodies against WNV⁽²⁾. It is therefore frequently chosen as the principal target for producing new generation immunogens. Lentivirus, baculovirus and even measles virus have been used as vectors. Indeed, a single immunization with a naked DNA vaccine coded for the prM and E proteins is able to stimulate an immune response and effectively protect rats and horses⁽³⁾.

Two inactivated virus vaccines are currently used in Mexico for WNV prevention in horses. The first is produced in the United States (Fort Dodge®) and confers immunized animals 94 % protection against a parenteral challenge⁽⁴⁾. The second (PRONAVIVE, Productora Nacional de Biológicos Veterinarios) is produced in Mexico and has had positive protection results⁽⁵⁾. Immunization with these vaccines is costly because it initially requires application of two continuous doses to provide complete protection. In addition, the fact that they contain the complete virus makes epidemiological monitoring difficult since no distinction can be made between vaccinated animals and those infected in the field.

Use of plant-based biotechnology has led to development of products such as vaccines, therapeutic proteins, enzymes and antibodies^(6,7). Corn embryogenic calluses are commonly used for heterologous protein expression because this system is useful for biolistic transformation and production of transgenic plants. Type II callus from the scutellum grows quickly, has numerous somatic embryos, and preserves its embryogenic and regenerative capacities for long periods^(8,9). The objective was to express and identify West Nile virus envelope protein in corn (*Zea mays* L) type II embryogenic callus in order to implement a new expression system.

presente trabajo fue expresar e identificar a la proteína E del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz tipo II (*Zea mays* L), para implementar un nuevo sistema de expresión.

MATERIALES Y METODOS

Establecimiento de los callos embriogénicos de maíz

El establecimiento y transformación de los callos embriogénicos de maíz tipo II fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica-UNAM. Los callos línea costeño, se obtuvieron a partir de embriones cigóticos inmaduros a los 15 días después de la polinización. La inducción de los callos embriogénicos y la transformación genética fue realizada de acuerdo a lo reportado por Jimenez-Villalobos⁽¹⁰⁾.

Construcción del vector de expresión para la proteína E del VON y análisis de restricción

La secuencia codificadora del gen E del virus del Oeste del Nilo de 1,503 pb, con número de acceso AY660002 se obtuvo del GenBank, la cual corresponde a la cepa aislada de un cuervo (*Corvus corax*) en el estado de Tabasco, México (TM-171-03)⁽¹¹⁾. Dicha secuencia fue clonada dentro del plásmido pCambia 3301. La construcción nombrada INIFAP-VON 3301 fue utilizada para transformar células competentes DH5 α mediante choque térmico. Posteriormente el ADN se purificó utilizando un kit comercial Maxiprep Qiafilter™ (Qiagen, n°. cat. 12262, California, USA), de acuerdo a las especificaciones del proveedor. El purificado fue cuantificado en un nanofotómetro™ (INPLEN, n°. cat. LKB529, Múnich, Alemania).

Para analizar la construcción se realizó un mapeo de restricción del plásmido INIFAP-VON 3301, se cortó con las enzimas de restricción *Nco* I (Invitrogen, n°. cat. 15421-019, California, USA) y *Kpn* I (Invitrogen, n°. cat. 15232-010, California, USA) para liberar el gen E del VON de 1,503 bp. La reacción se incubó durante 1 h a 37 °C y los productos de la reacción fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

MATERIALS AND METHODS

Callus establishment

Establishment and transformation of the corn (*Zea mays* L) type II embryogenic callus was done in the Vegetal Tissue Culture Laboratory of the Department of Biochemistry, National Autonomous University of Mexico (UNAM). The coastal line calluses were produced from immature zygotic embryos 15 d after pollination. Embryogenic callus induction and genetic transformation were done according to Jimenez-Villalobos⁽¹⁰⁾.

Building of WNV E protein expression vector and restriction analysis

A WNV E gene sequence was acquired from GenBank (Access No. AY660002) which corresponded to a strain isolated from a crow (*Corvus corax*) collected in the state of Tabasco, Mexico (TM-171-03)⁽¹¹⁾. This sequence was cloned in pCambia 3301 plasmid. The construction called INIFAP-VON 3301 was used to transform competent DH5a cells by thermal shock. The DNA was then purified with a commercial kit (Maxiprep Qiafilter™, Qiagen, Cat. # 12262, California, USA) following manufacturer instructions. The resulting purificate was quantified with a Nanophotometer™ (INPLEN, Cat. # LKB529, Munich, Germany).

To analyze the construction, a restriction mapping was done of the INIFAP-VON 3301 plasmid which was cut with the restriction enzymes *Nco* I (Invitrogen, Cat. # 15421-019, California, USA) and *Kpn* I (Invitrogen, Cat. # 15232-010, California, USA) to release the 1503 bp WNV E gene. The reaction was incubated for 1 h at 37 °C and the reaction products viewed in 1% agarose gel dyed with ethidium bromide.

Genetic transformation by biobalistic

Using biobalistics, 100 type II, coastal line embryogenic calluses were transformed with INIFAP-VON 3301. As a positive control, 20 calluses were transformed with pCambia 3301 plasmid and as a negative control 20 calluses were transformed with 0.4 μ m M5 tungsten bullets. Bombarded cells were transferred to N₆P⁽¹²⁾ medium containing 3 mg L⁻¹

Transformación genética de maíz por biobalística

Se transformaron 100 callos embriogénicos de maíz tipo II línea costeño con el plásmido INIFAP-VON 3301 mediante biobalística. Como testigo positivo se transformaron 20 callos con el plásmido pCambia 3301 y 20 callos con balas de tungsteno M5 (0.4 µm) como testigo negativo. Los callos embriogénicos bombardeados fueron transferidos en medio N₆P⁽¹²⁾, con 3 mg L⁻¹ de glufosinato de amonio, para permitir la proliferación de las células transformadas, basados en la expresión del gen *bar*. El control negativo se mantuvo en las mismas condiciones.

Prueba histoquímica de expresión transitoria para el gen uidA (β-glucoronidasa)

A las 48 h posteriores al bombardeo se realizó una prueba histoquímica de expresión para el gen reportero *uidA* en los callos embriogénicos de maíz, utilizando el protocolo reportado por Jefferson⁽¹³⁾. Los explantes fueron incubados con el sustrato X-Glu® (PhytoTechnology, n°. cat. X877, Irapuato, GTO México) a 37 °C durante 48 h.

Identificación del gen E del virus del Oeste del Nilo mediante RT-PCR

Para identificar la secuencia codificadora del gen *E* del virus del Oeste del Nilo en los callos de maíz transformados con el plásmido INIFAP-VON 3301, se realizó una extracción de ARN. Como testigo negativo se usaron callos transformados con el vector pCambia 3301. El ARN fue tratado previamente con 1 ml de DNasa I (Invitrogen, n°. cat. 1868-015, California, USA) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. A las muestras obtenidas se les realizó una RT-PCR con un kit de Qiagen One-Step™ (Qiagen, n°. cat. 210212, California, USA). La secuencia de los oligonucleótidos utilizada para la RT-PCR fue la siguiente: WNVe+ Sentido 5'gac aag gag tgg tgg aca 3'; WNVe- antisentido 5' att cca aca cca cag tgc 3'. El programa para la RT-PCR se describe a continuación: síntesis de ADN complementario 45 °C 60 min, PCR desnaturalización inicial 94 °C 2 min, desnaturalización 94 °C 30 seg, alineación 50 °C 2 min, extensión 72 °C 1 min (40 ciclos), extensión final 72 °C 10 min. Como

glufosinate-ammonium to allow for cell proliferation based on *bar* gene expression. The negative control was kept under the same conditions.

Histochemical test of transitory uidA (β-glucoronidase) gene expression

Forty-eight hours after bombardment, a histochemical expression test was done for the *uidA* reporting gene in the calluses following Jefferson⁽¹³⁾. Explants were incubated with X-Glu® substrate (PhytoTechnology, Cat. # X877, Irapuato, Mexico) at 37 °C for 48 h.

RT-PCR identification of WNV E gene

An RNA extraction was done to identify the WNV *E* gene coding sequence in the calluses transformed with INIFAP-VON 3301 plasmid. The negative control consisted of calluses transformed with the pCambia 3301 vector. Following manufacturer instructions, the RNA was previously treated with 1 ml DNase I (Invitrogen, Cat. # 1868-015, California, USA). The extracted samples were subjected to RT-PCR with a Qiagen One-Step™ kit (Qiagen, Cat. # 210212, California, USA). Two oligonucleotides were used in the RT-PCR: WNVe+ sense 5'gac aag gag tgg tgg aca 3'; WNVe- antisense 5' att cca aca cca cag tgc 3'. The RT-PCR run was as follows: complementary DNA synthesis at 45 °C/60 min; PCR denaturation, initial 94 °C/2 min, denaturation 94 °C/30 sec, alignment 50 °C/2 min, extension 72 °C/1 min (40 cycles), final extension 72 °C/10 min. Inactivated WNV vaccine (Fort Dodge®, License # 112, Iowa, USA) was used as a positive control. The RT-PCR products were viewed in 0.8% agarose gel dyed with ethidium bromide.

Identification of E protein by Western Blot

Before identifying the WNV *E* protein, the Western Blot technique was standardized to titer the anti-West Nile Virus 8150 monoclonal primary antibody (Chemicon, Cat. # 92590, California USA). Antibody dilutions were 1:1,000, 1:2,500, 1:5,000 and 1:10,000; peroxidase-conjugated anti-rat IgG antibody (Amersham Bioscience, Cat. # NIF825, New Jersey, USA) at a 1:3,000 dilution was used

control positivo se utilizó una vacuna de virus inactivado para el VON (Fort Dodge® License n° 112, Iowa, USA). Los productos de la RT-PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

Identificación de la proteína E mediante Western Blot

Previo a la identificación de la proteína E del VON, se estandarizó la técnica de Western blot para titular el anticuerpo primario monoclonal anti-West Nile Virus 8150 (Chemicon, n°. cat. 92590, California USA), utilizando diluciones del anticuerpo 1:1,000, 1:2,500, 1:5,000 y 1:10,000, y como anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa (Amersham Bioscience, n° cat. NIF825, New Jersey, USA) a una dilución 1:3,000. Los extractos crudos de la proteína soluble total (PST) de los callos embriogénicos transformados fueron obtenidos utilizando la metodología ya descrita⁽¹⁴⁾. Cuarenta (40) microgramos de proteína soluble total, determinados por Bradford⁽¹⁵⁾, fueron resueltas por electroforesis en un SDS-PAGE al 10% desnaturizante, realizando por duplicado el ensayo. Al término del corrimiento, uno de los geles fue teñido con Coomassie R-250™ al 0.25%. El gel adicional fue electro-transferido a una membrana de PDVF (Millipore, n° cat. IPVH00010, Massachusetts USA) durante 1 h 30 min. Posteriormente la membrana fue teñida con una solución de rojo de Ponceau al 0.5% (Sigma, n° cat. 7687; Durango, México) para garantizar la transferencia de las proteínas. La membrana fue bloqueada en una solución fosfatos salina (PBS) con 5% de leche descremada, 0.1% Tween-20 durante 1 h a 4 °C. Posteriormente se incubó el anticuerpo primario anti-West Nile Virus 8150 (dilución 1:1,000), durante toda la noche a 4 °C. Después de tres lavados con PBS-Tween20 (0.1%) durante 5 min cada uno, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa (dilución 1:3,000), durante 1 h a 4 °C. La reacción de peroxidasa se desarrolló por luminiscencia con el Kit de Millipore HRP Immobilon Western™ (Millipore, n°. cat. WBKLS0500, Massachusetts USA).

as a secondary antibody. Crude extracts of total soluble protein (TSP) from the transformed embryogenic calluses were isolated using a previously described method⁽¹⁴⁾. Forty (40) micrograms TSP, determined according to Bradford⁽¹⁵⁾, were resolved by SDS-PAGE electrophoresis at 10% in duplicate. Later, one gel was dyed with 0.25% Coomassie R-250™. The remaining gel was electro-transferred to a PVDF membrane (Millipore, Cat. # IPVH00010, Massachusetts, USA) for 1 h 30 min. The membrane was then dyed with 0.5% Ponceau red (Sigma, Cat. # 7687; Durango, Mexico) to ensure protein transference. It was then blocked with a PBS solution containing 5% skim milk and 0.1% Tween-2 for 1 h at 4 °C. The anti-West Nile virus 8150 primary antibody (1:1,000 dilution) was incubated overnight at 4 °C. The membrane was then washed three times with 0.1% PBS-Tween20 for 5 min each wash and then incubated for 1 h at 4 °C with the peroxidase-conjugated anti-rat IgG secondary antibody (1:3,000 dilution). The peroxidase reaction was done by luminescence with a Millipore HRP Immobilon Western™ kit (Millipore, Cat. # WBKLS0500, Massachusetts, USA).

Recombinant protein quantification

Densitometry was used to quantify recombinant protein content by measuring the area of the protein of interest expressed in the calluses transformed with INIFAP-VON 3301 plasmid. A standard concentration curve for bovine serum albumin was used as a control. A regression analysis was applied to determine the amount of protein expressed in 40 mg TSP, and then protein expression percentage calculated based on the TSP isolated from 200 mg of tissue.

RESULTS

Restriction analysis of INIFAP-VON 3301 construction

Nanophotometric analysis showed the INIFAP-VON 3301 plasmid to have intact DNA, with a 5.327 µg/µl concentration and a 1.934 A260/A280 ratio. Before biobalistic transformation, a restriction analysis was done to release the WNV E gene codifying sequence with the *Kpn I* (Invitrogen) and

Cuantificación de la proteína recombinante

Se llevó a cabo mediante densitometría, midiendo el área de la proteína de interés expresada en los callos embriogénicos de maíz transformados con el plásmido INIFAP-VON 3301. Como control se utilizó una curva de concentraciones previamente conocidas de albúmina sérica bovina. Para determinar la cantidad de proteína expresada en 40 mg de PST se realizó un análisis de regresión, posteriormente se calculó el porcentaje de expresión de la proteína a partir de la PST obtenida de 200 mg de tejido.

RESULTADOS

Análisis de restricción de la construcción INIFAP-VON 3301

El plásmido INIFAP-VON 3301 se cuantificó en un nanofotómetro obteniendo una concentración de 5.327 mg/ml y una relación A260/A280 de 1.934, verificando la integridad del ADN. Previo a la transformación por biobalística, se realizó un análisis de restricción para liberar la secuencia codificadora del gen *E* del VON, con las enzimas *Kpn* I

Nco I (Invitrogen) enzimas. This produced a molecular-sized product >11,000 bp in size which corresponds to the pCambia 3301 plasmid, and an approximately 1503 bp product which corresponds to a WNV *E* gene codifying sequence isolated in Mexico (Figure 1). In the same analysis, a band appeared at approximately 400 bp corresponding to an *E* gene internal cut site for the *Kpn* I enzyme. This confirms insertion of the WNV *E* gene codifying sequence in the INIFAP-VON 3301 plasmid. Concentration was later adjusted to 1 µg/µl for callus transformation.

Histochemical test of transitory *uidA* (β -glucuronidase) gene expression

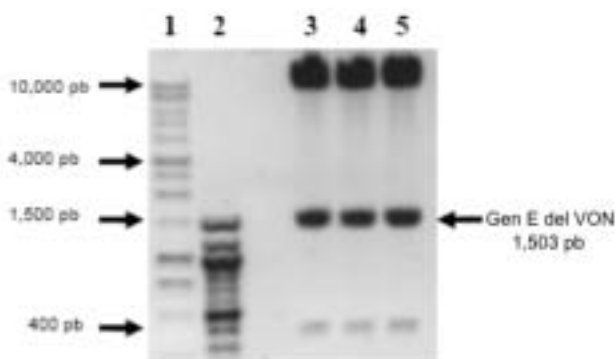
Indigo blue zones were observed as a result of X-Gluc® substrate hydrolysis with the α -glucuronidase protein. These zones indicate that 48 h post-bombardment a recombinant α -glucuronidase protein was expressed in the calluses transformed with INIFAP-VON 3301 (Figure 2B) and pCambia 3301 (positive control) (Figure 2C).

RT-PCR identification of WNV *E* gene

The RT-PCR analysis confirmed expression of the WNV *E* gene in the calluses transformed with INIFAP-VON 3301 plasmid, which amplified a

Figura 1. Análisis de restricción del plásmido INIFAP-VON 3301 con las enzimas *Kpn* I y *Nco* I, para liberar al gen *E* del virus del Oeste del Nilo de 1,503 pb

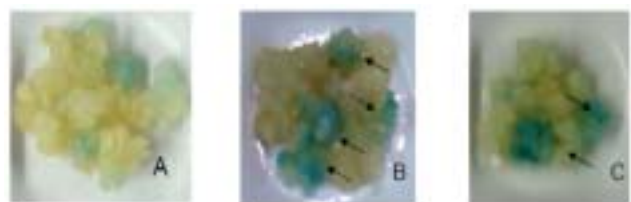
Figure 1. Restriction analysis of the INIFAP-VON 3301 plasmid with the *Kpn* I and *Nco* I enzymes to release a 1503 bp West Nile Virus *E* gene



Lane 1= 1 kb DNA Ladder marker (Promega, Cat. # G5711, California, USA); Lane 2= 100 bp DNA Ladder marker (Biolabs, Cat. # N3231, Ipswich, MA, USA); Lanes 3 to 5= INIFAP-VON 3301 plasmid.

Figura 2. Prueba histoquímica para la expresión transitoria de la proteína β -glucuronidasa en los callos embriogénicos de maíz a las 48 h post-bombardeo

Figure 2. Histochemical test of transitory β -glucuronidase protein expression in corn type II embryogenic calluses 48 h post-bombardment



A) Calluses bombarded with M5 (0.4 mm) pellets; B) Calluses bombarded with INIFAP-VON 3301 plasmid; C) Calluses bombarded with pCambia 3301 plasmid. Indigo blue zones indicate β -glucuronidase protein expression.

(Invitrogen) y *Nco I* (Invitrogen). En la Figura 1, se muestra en la parte superior del gel de agarosa un producto de tamaño molecular superior a las 11,000 pb que corresponde al plásmido pCambia 3301. Por otra parte se visualiza un producto de aproximadamente 1,503 pb que corresponde a la secuencia codificadora del gen *E* del virus del Oeste del Nilo aislada en México. En la parte inferior se observa una banda de aproximadamente 400 bp que corresponde a un sitio de corte interno del gen *E* para la enzima *Kpn I*. Este resultado confirma la inserción de la secuencia codificadora del gen *E* del virus del Oeste del Nilo, en el plásmido INIFAP-VON 3301. Posteriormente la concentración tuvo que ser adecuada a 1 mg/ml para la transformación de los callos embriogénicos de maíz.

Prueba histoquímica de expresión transitoria para el gen uidA (β-glucuronidasa)

Los resultados de la prueba histoquímica de expresión transitoria para el gen reportero *uidA* en los callos embriogénicos de maíz transformados con el plásmido INIFAP-VON 3301 y pCambia 3301, exhibieron zonas de coloración azul índigo a consecuencia de la hidrólisis del sustrato X-Gluc® con la proteína α-glucuronidasa. En la Figura 2 se muestran los resultados de la prueba en los callos embriogénicos de maíz transformados (B y C) y no transformados (A). Las tonalidades azul índigo muestran la expresión de la proteína β-glucuronidasa recombinante en callos de maíz transformados con los plásmidos INIFAP-VON 3301 (Figura 2B) y pCambia 3301 (testigo positivo) a las 48 h post-bombardamiento (Figura 2C).

Identificación del gen E del virus del Oeste del Nilo mediante RT-PCR.

Posteriormente, se determinó la expresión del gen *E* del virus del Oeste del Nilo en los callos embriogénicos de maíz transformados con el plásmido INIFAP-VON 3301, utilizando como control negativo callos embriogénicos transformados con el plásmido pCambia 3301, los cuales fueron mantenidos en medio N₆P, con el agente de selección glufosinato de amonio durante 3-4 meses post-bombardamiento. A partir del ARN del tejido vegetal se realizó una RT-PCR utilizando los iniciadores específicos

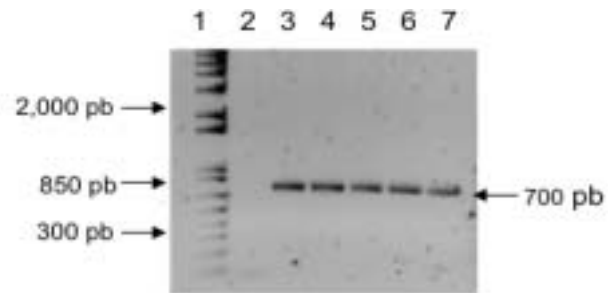
700 bp product (Figure 3, Lines 3-7), in contrast to the pCambia 3301 control (Line 2).

Anti-West Nile virus 8150 antibody titration

For the Western Blot analysis, the E protein was identified in the commercial inactivated virus vaccine (Fort Dodge®) using dilutions from 1:5,000 to 1:1,000 dilutions at an approximately 64 kDa molecular

Figura 3. Identificación del gen *E* del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz mediante RT-PCR. La flecha muestra un producto amplificado de aproximadamente 700 bp del gen *E* del VON

Figure 3. West Nile virus *E* gene in corn embryogenic calluses identified RT-PCR. Arrow to right indicates an approximately 700 bp amplified product of the WNV *E* gene



Lane 1= 1Kb DNA Ladder marker (Promega); Lane 2= Calluses bombarded with pCambia 3301 plasmid (negative control); Lanes 3 to 7= Calluses transformed with INIFAP-VON 3301 plasmid.

Figura 4. Titulación del anticuerpo monoclonal anti-West Nile virus 8150 a partir de la proteína E de la vacuna de virus inactivado (Fort Dodge®). MPM.- Marcador Benchmark Pre-stained protein ladder (Invitrogen®)

Figure 4. Titration of anti-West Nile virus 8150 monoclonal antibody from E protein from an inactivated virus vaccine (Fort Dodge®). MPM.- Benchmark Pre-stained protein ladder marker (Invitrogen®)



Lane 1= 1:10,000 dilution; Lane 2= 1:5,000; Lane 3= 1:2,500; Lane 4= 1:1,000. Arrow indicates an approximately 64 kDa E protein contained in the inactivated WNV vaccine.

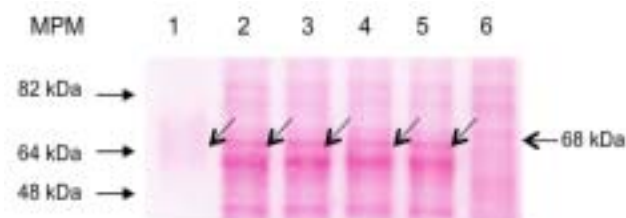
descritos en la metodología. En la Figura 3 se muestra la expresión del gen *E* del VON en los callos transformados con el plásmido INIFAP-VON 3301 que amplificaron un producto de 700 pb (carriles 3-7), en comparación al testigo pCambia 3301 (carril 2) (Figura 3).

Titulación del anticuerpo anti-West Nile Virus 8150, mediante Western blot

Para identificar la proteína E del virus del Oeste del Nilo en los callos embriogénicos de maíz, previamente se estandarizó la técnica de Western blot, utilizando como antígeno la proteína E contenida en una vacuna comercial de virus inactivado (Fort Dodge®). En la Figura 4, se muestran los resultados de la titulación del anticuerpo. A partir de la dilución 1:5,000 a la dilución 1:1,000 se logró identificar la proteína E (Fort-Dodge®), con un peso molecular aproximado a los 64 kDa, por lo que se decidió utilizar la concentración 1:1,000, para ensayos posteriores debido a que se obtenía mayor señal y se requería menor periodo de exposición de la placa fotográfica.

Figura 5. Membrana de PDVF teñida con rojo de Ponceau al 0.5%, donde se visualiza la expresión de la proteína E del VON de aproximadamente 68 kDa en callos embriogénicos de maíz. MPM.- Marcador Benchmark Pre-stained protein ladder (Invitrogen®)

Figure 5. An approximately 68 kDa WNV E protein in corn embryogenic calluses viewed on PVDF membrane dyed with 0.5% Ponceau red. MPM.- Benchmark Pre-stained protein ladder marker (Invitrogen®)



Lane 1= E protein from inactivated virus vaccine (Fort Dodge®); Lanes 2 to 5= Corn embryogenic calluses transformed with INIFAP-VON 3301 plasmid; Lane 6= Corn embryogenic calluses transformed with pCambia 3301 plasmid (negative control). Arrow indicates expression of approximately 68 kDa WNV E protein.

weight (Figure 4). It was decided to use the 1:1,000 concentration for later trials because it produced a stronger signal and required less exposure time to the photographic plate.

Identification of E protein by Western Blot

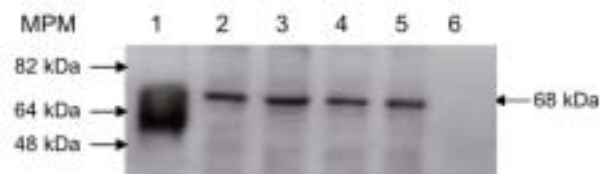
The calluses which expressed the WNV *E* gene in the RT-PCR were analyzed by Western Blot to identify E protein expression in the calluses. Representative samples of each transformed batch with INIFAP-VON 3301 plasmid were used as well as negative control (calluses transformed with pCambia 3301). Figure 5 shows the protein pattern of the embryogenic calluses in the membrane of the PDVF stained with Ponceau red. The resulting protein patterns showed that the calluses transformed with INIFAP-VON 3301 plasmid expressed an approximately 68 kDa protein not expressed in the control (Figure 6). This confirms that the calluses transformed by biobalistic expressed WNV E protein three to four months after genetic transformation.

E protein quantification

Comparison of the densitometry results for recombinant E protein expression in the corn type

Figura 6. Identificación de la proteína E del VON en callos embriogénicos de maíz mediante Western blot. MPM.- Marcador Benchmark Pre-stained protein ladder (Invitrogen®)

Figure 6. Western Blot identification of WNV E protein in corn embryogenic calluses. MPM.- Benchmark Pre-stained protein ladder marker (Invitrogen®)



Lane 1= E protein from inactivated virus vaccine (Fort Dodge®); Lanes 2 to 5= Corn embryogenic calluses transformed with INIFAP-VON 3301 plasmid; Lane 6= Corn embryogenic calluses transformed with pCambia 3301 plasmid (negative control). Arrow indicates expression of approximately 68 kDa WNV recombinant E protein.

Identificación de la proteína E expresada en callos de maíz, mediante Western blot

Los callos embriogénicos que expresaron el gen *E* del VON en la prueba de RT-PCR, fueron analizados mediante Western blot, para identificar la expresión de la proteína E recombinante de maíz. Para ello se utilizaron muestras representativas de cada uno de los lotes de callos transformados con el plásmido INIFAP-VON 3301. Como testigo negativo se utilizaron callos embriogénicos transformados con el vector pCambia 3301. En la Figura 5 se muestra el patrón proteinico de los callos embriogénicos de maíz en la membrana de PDVF teñida con rojo de Ponceau. Las muestras transformadas con el plásmido INIFAP-VON 3301 expresaron una proteína de peso aproximado a los 68 kDa que no se observa para el testigo negativo (Figura 6). Este resultado confirma la obtención de callos embriogénicos de maíz transformados por biobalística que expresan la proteína E del VON después de tres a cuatro meses de su transformación genética.

Cuantificación de la proteína E expresada en callos embriogénicos de maíz

La cuantificación por densitometría se realizó midiendo el área de la proteína E recombinante de maíz en un gel de poliacrilamida al 10% desnaturizante (Figura 7). Como testigos para la prueba se utilizó una curva de albúmina sérica bovina con concentraciones previamente conocidas (Figura 8). Posteriormente se llevó a cabo un análisis de regresión, para conocer la cantidad de proteína E recombinante en los 40 µg de la PST cargados en el gel. Por último se calculó el porcentaje de expresión del total de la PST obtenida a partir de los 200 mg de tejido. Los resultados mostraron que el nivel de expresión de la proteína E recombinante en callos embriogénicos de maíz tipo II fue del 0.86 % de la PST.

DISCUSION

En este estudio se reporta por primera vez la transformación genética de callos embriogénicos de maíz tipo II (*Zea mays* L), empleando el gen que codifica para la proteína E del virus del Oeste del Nilo. Los callos embriogénicos transformados

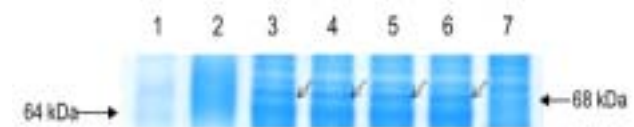
II embryogenic calluses (Figure 7) to the control (Figure 8), showed E protein expression to be 0.86 % of TSP.

DISCUSSION

This is the first report of genetic transformation of corn (*Zea mays* L) type II embryogenic calluses with a gene coding for the WNV E protein. The calluses transformed with the INIFAP-VON 3301 construction efficiently expressed a protein weighing approximately 68 kDa as detected by the anti-West Nile virus 8150 monoclonal antibody. The E protein expressed in the embryogenic calluses was somewhat heavier than E protein in an inactivated virus vaccine

Figura 7. Gel de poliacrilamida al 10% SDS desnaturizante con 40 mg de la PST de callos embriogénicos de maíz

Figure 7. Denaturing 10% SDS polyacrylamide gel with 40 mg total soluble protein (TSP) from corn embryogenic calluses



Lane 1= Benchmark Pre-stained protein ladder marker (Invitrogen®), Lane 2= E protein from inactivated virus vaccine (Fort Dodge®); Lanes 3 to 6= Corn embryogenic calluses transformed with INIFAP-VON 3301 plasmid; Lane 7= Corn embryogenic calluses transformed with pCambia 3301 plasmid (negative control). Small arrows indicate protein quantified by densitometry.

Figura 8. Curva de albúmina sérica bovina para la cuantificación de la proteína E del virus del Oeste del Nilo expresada en callos embriogénicos de maíz tipo II

Figure 8. Bovine serum albumin for quantification of West Nile Virus E protein expressed in corn type II embryogenic calluses



Lane 1= 1µg; Lane 2= 2µg; Lane 3= 3µg; Lane 4= 4µg; Lane 5= 5µg; Lane 6= 6µg; Lane 7= 7µg.

con la construcción INIFAP-VON 3301 expresaron eficientemente una proteína de peso aproximado a los 68 kDa, la cual fue detectada por el anticuerpo monoclonal anti-West Nile virus 8150. La proteína E expresada en los callos embriogénicos presentó un ligero incremento en su peso molecular en comparación con la proteína E de la vacuna de virus inactivado (Fort Dodge®), debido seguramente a que al ser expresada en los callos embriogénicos de maíz algunos de los azúcares que se unen para llevar a cabo la glicosilación, son diferentes a los que están presentes en las células animales. Estos carbohidratos pueden alterar la movilidad de las proteínas en los geles⁽¹⁶⁾. La discrepancia en el peso molecular se ha observado cuando diferentes genes que codifican para proteínas de cubierta que son glicosiladas se han expresado en plantas. Sin embargo, también se ha notado que este cambio en la talla de la proteína expresada no repercute en su poder inmunogénico, cuando se les ha evaluado *in vivo*^(17,18,19).

La traducción de la proteína E recombinante expresada en los callos de maíz tipo II, conserva las características bioquímicas de la proteína E viral, por lo que es reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-West Nile virus 8150. Dicho anticuerpo ha sido utilizado en la detección de anticuerpos en pollos mediante la técnica Mac-ELISA, así como en estudios antigénicos y en pruebas inmuno histoquímicas, mostrando una alta sensibilidad y especificidad para el virus del Oeste del Nilo y el virus Kunjin⁽²⁰⁻²³⁾.

En el presente estudio el nivel de expresión de la proteína E del virus del Oeste del Nilo en callos embriogénicos de maíz tipo II fue del 0.86 % de la PST, el cual se encuentra dentro de los niveles reportados previamente para las semillas de maíz (0.8 a 3.0 %). Los niveles de expresión varían dependiendo de la proteína expresada y la especie de planta utilizada para llevar a cabo la expresión. La elección de los callos embriogénicos de maíz tipo II, obedeció al tiempo que se ahorraría para obtener una planta transgénica de maíz adulta, ya que además de los cuatro meses que se requieren para que los callos crezcan previo a la transformación genética, se necesitan otros cuatro

(Fort Dodge®). This difference is most probably the result of differences between the sugars used in plant cells versus animal cells for protein bonding during glycosylation, since these carbohydrates can alter gel mobility in gels⁽¹⁶⁾. Discrepancies in molecular weight have been observed when different genes coding for covering protein (i.e. glycosylates) are expressed in plants. However, in an *in vivo* evaluation, this change in expressed protein size had no effect on immunogenic strength^(17,18,19).

Translation of the recombinant E protein expressed in the calluses preserved the biochemical characteristics of the viral E protein meaning it is recognized by the anti-West Nile virus 8150 monoclonal antibody. This antibody has been used to detect antibodies in chickens with the Mac-ELISA technique, and has shown high sensitivity to and specificity for WNV and Kunjin virus in antigenic studies and immune-histochemical tests⁽²⁰⁻²³⁾.

West Nile virus E protein expression in the type II corn embryogenic calluses was 0.86% of TSP, which is within previously reported levels for corn seeds (0.8 to 3.0 %). Expression levels varied according to the protein expressed and the plant vehicle used for expression. Corn type II embryogenic calluses were used in the present study to save time in producing an adult transgenic corn plant: before genetic transformation, the calluses must grow for four months; then an additional four to five months are required to produce a plant *per se*. Finally, at least one month is needed to characterize a plant and quantify its percentage of expressed protein, which is particularly important since each plant expresses a different percentage of recombinant protein. This process can also be quite inconvenient because it must be done under controlled greenhouse conditions due to the potential danger of growing transgenic plants, particularly open pollination species such as corn. The above considerations and the fact that type II calluses have a higher proliferation index than type I calluses, suggested that use of this system could play a significant role in producing high densities of transformed cells and that it has an adequate transgenic tissue propagation index⁽²⁴⁾.

o cinco meses para obtener la planta *per se* y al menos un mes para caracterizarla y cuantificar el porcentaje de proteína expresada, ya que cada planta expresa un porcentaje diferente de la proteína recombinante, además del inconveniente de crecer este tipo de plantas en un invernadero controlado, por el peligro potencial que puede presentarse, sobre todo en especies como el maíz que presentan polinización abierta. Es por ello y debido al alto índice de proliferación que presentan los callos tipo II, comparado con los callos embriogénicos tipo I, por lo que se pensó que pudieran representar un factor importante para la obtener una alta densidad de células transformadas y un adecuado índice de propagación del tejido transgénico⁽²⁴⁾.

La transformación genética de los callos embriogénicos de maíz tipo II mediante biobalística, demostró ser un método eficiente para la expresión de la secuencia codificadora del gen *E*. Mediante la prueba de RT-PCR se identificó la expresión de un fragmento de 700 pb en los callos de maíz transformados con el plásmido INIFAP-VON 3301, confirmando la expresión del gene a partir del genoma vegetal.

Los resultados de la prueba histoquímica para el gen *uidA* en los callos embriogénicos de maíz tipo II transformados con los plásmidos INIFAP-VON 3301 y pCambia 3301 exhibieron zonas de coloración azul índigo a consecuencia de la hidrólisis del sustrato X-Glu con la proteína b-glucoronidasa (Figura 2B y 2C) a las 48 h pos-bombardeo. La detección de la proteína b-glucoronidasa mediante la prueba histoquímica, confirmó de la manera transitoria la transformación genética de los callos embriogénicos de maíz tipo II.

Otro de los aspectos importantes en el establecimiento de un protocolo de transformación genética de plantas es la elección del promotor específico para conseguir altos niveles de expresión del antígeno⁽²⁵⁾. La expresión de la proteína E del virus del Oeste del Nilo fue dirigida por el promotor CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor, el cual demostró ser eficaz para llevar a cabo la transcripción y traducción de la proteína recombinante en los callos embriogénicos de maíz

Genetic transformation of corn type II embryogenic calluses by biobalistics led to efficient expression of the *E* gene secondary coding sequence. Use of RT-PCR allowed identification of expression of a 700 bp fragment in the calluses transformed with INIFAP-VON 3301 plasmid, thus confirming gene expression from the vegetal genome.

Forty-eight hours after bombardment, histochemical testing for *uidA* gene expression in the calluses transformed with INIFAP-VON 3301 plasmid and pCambia 3301 produced indigo-colored zones due to hydrolysis of the X-Glu substrate by the β -glucoronidase protein (Figures 2B, 2C). Detection of b-glucoronidase protein constituted a transitory confirmation of callus genetic transformation.

Choosing the specific promoter to attain high antigen expression levels is a vital part of establishing a plant genetic transformation protocol⁽²⁵⁾. In the present study, WNV E protein expression was directed by the cauliflower mosaic virus CaMV35S promoter, previously reported to effectively implement recombinant protein transcription and translation in corn type II embryogenic callus⁽²⁶⁾. This promoter is commonly used to produce antigen expression for human and animal applications^(25,27).

Use of 3.0 mg L⁻¹ glufosinate-ammonium (Basta®) was an important aspect in attaining proliferation and production of transgenic corn calluses expressing WNV E protein in a four to five month selection period. The calluses containing the *bar* gene and transformed with INIFAP-VON 3301 or pCambia 3301 resisted this selection agent because this gene codes for the glutamine synthetase (GS) enzyme. This enzyme plays a central role in ammonium assimilation and nitrogen metabolism regulation in plants, and prevents organism self-toxicity⁽²⁸⁾.

Transgenic plants are potentially one of the most cost-effective systems for large-scale recombinant protein production for industrial and pharmaceutical applications. Some of their advantages include lower cost, easy scaling and no risk of contamination with human pathogens⁽²⁹⁾. Nonetheless, the reality is that almost twenty years after this technology was developed, only two biologics meet required

tipo II⁽²⁶⁾. El promotor CAMV35S ha sido comúnmente utilizado para la expresión de antígenos de interés humano y veterinario^(25,27).

La selección con glufosinato de amonio 3.0 mg L⁻¹ (Basta®), fue uno de los factores relevantes para la proliferación y obtención de callos transgénicos de maíz que expresaron la glicoproteína E del VON en un periodo de selección de tres a cuatro meses. Los callos transformados con los plásmidos INIFAP-VON 3301 y pCambia 3301 que contenían al gen *bar* fueron resistentes al agente de selección glufosinato de amonio, debido a que este gen codifica para la enzima glutamina sintetasa (GS), que juega un papel central en la asimilación de amonio, en la regulación del metabolismo de nitrógeno en la planta, al igual que previene la autotoxicidad en el organismo⁽²⁸⁾.

Según la literatura, las plantas transgénicas son potencialmente uno de los sistemas más económicos para la producción a gran-escala de proteínas recombinantes para uso industrial y farmacéutico. Algunas de las ventajas que se mencionan son menores costos, fácil escalamiento y que carecen de riesgos de contaminación con patógenos humanos, entre otros⁽²⁹⁾; sin embargo, la realidad es que después de casi 20 años en que se desarrolló esta tecnología, sólo dos biológicos cumplen con las normas requeridas, uno de ellos no está a la venta, y el otro es un anticuerpo que debe purificarse antes de ser utilizado como vacuna; y ambos deben producirse en costosas instalaciones⁽³⁰⁾, además de otras desventajas mencionadas en la literatura⁽²⁷⁾.

Otra de las principales controversias es el posible impacto ecológico para las especies nativas, una alternativa es el crecimiento de las plantas en condiciones controladas mediante el uso de invernaderos, como lo ha efectuado nuestro equipo, sin embargo esto resulta costoso. Otra de las posibles soluciones es el uso de líneas celulares o cultivos indiferenciados, lo que pudiera resolver algunos de los inconvenientes actuales para la producción de organismos genéticamente modificados.

La tecnología aquí presentada resultó eficiente para la producción de esta proteína, lo que pudiera

regulations: one is not for sale; and the other is an antibody requiring purification before use as a vaccine. Both must be produced in costly installations and have additional disadvantages⁽²⁷⁾.

A major controversy surrounding the use of transgenic plants is their possible ecological impact on native species. One preventative alternative is greenhouse cultivation, as done in the present study, although this can become costly. Another option is to use undifferentiated cell lines or cultures, which could help to resolve some current problems in the production of genetically modified organisms.

The technology used in the present study proved to be an efficient technique for WNV E protein production. This makes it a promising alternative in development of an oral vaccine since the embryogenic callus functions as a natural way of bioencapsulating the protein. Vaccine half-life in the intestine would be longer as a result, greatly increasing the probability of the antigen arriving at the mucous surface. Although WNV is a systemic infection and oral vaccines mainly induce antibody production at the mucosa level, in other diseases it has been observed that this immunogen type can produce neutralizing antibodies and induce an immune response capable of protecting against lethal strains^(14,18).

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

West Nile virus E protein, this virus's main antigen, was expressed for the first time in corn type II embryogenic calluses transformed with constructed INIFAP-VON 3301 via biobalistics. This produced a protein with an approximate weight of 68 kDa and a 0.86 % total soluble protein expression rate. If this protein is found to be immunogenic in an *in vivo* model; use of this technique could save at least four months in the production cycle of an oral West Nile virus vaccine.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by CONACYT-SAGARPA 2004-24, entitled "Desarrollo de una

convertirlo en una alternativa para el desarrollo de una vacuna comestible, dado que la bioencapsulación natural de las proteínas en callos embriogénicos, podría incrementar su vida media en el intestino y promover la presentación del antígeno en la superficie de la mucosa. Si bien la infección del VON se da por vía sistémica y las vacunas orales principalmente induce la producción de anticuerpos a nivel mucosa, se ha observado que para otras enfermedades, este tipo de inmunógenos puede producir anticuerpos neutralizantes e inducir una respuesta inmune capaz de conferir protección ante el desafío contra cepas letales^(14,18).

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

La proteína E del Virus del Oeste del Nilo, principal antígeno del virus, logró expresarse por primera vez en callos embriogénicos de maíz tipo II, transformados mediante biobalística con la construcción INIFAP-VON 3301, obteniéndose una proteína de aproximadamente 68 kDa y una expresión de 0.86 % de la proteína soluble total (PST), la cual de resultar inmunogénica en un modelo *in vivo* ahorraría al menos cuatro meses en el ciclo de obtención de una vacuna comestible.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero al proyecto CONACYT-SAGARPA 2004-24, titulado “Desarrollo de una vacuna comestible en sorgo para la prevención del virus del Oeste del Nilo”, y la beca para realizar estudios de Maestría del primer autor N° de registro 207410.; así mismo la asistencia técnica del Biól. Luis Jorge Saucedo y de la Dra. Edith Rojas Anaya.

LITERATURA CITADA

1. Lanciotti RS, Roehring JT, Deubel V, Smith J, Parker M. Origin of the West Nile virus responsible for the outbreak of encephalitis in the Northeastern United States. *Science* 1999;(286):2333-2337.

vacuna comestible en sorgo para la prevención del virus del Oeste del Nilo”, and a master-scholarship (No. 207410) for the first author. The authors thank to Luis Jorge Saucedo and Dr. Edith Rojas Anaya for their technical assistance.

End of english version

2. Diamond MS, Pierson TC, Fremont DH. The structural immunology of antibody protection against West Nile virus. *Immunol Rev* 2008(225):212-225.
3. Davis BS, Chang GJ, Cropp B, Roehrig JT, Martin DA, Mitchell CJ, *et al.* West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays. *J Virol* 2001;75(9):4040-7.
4. Davidson AH, Traub-Dargatz JL, Rodeheaver RM. Immunologic responses to West Nile virus in vaccinated and clinically affected horses. *J Am Vet Assoc* 2005;(226):240-245.
5. Comité Intersectorial. Guía para la Vigilancia, Prevención y Control del Virus del Oeste del Nilo. México 2003.
6. Ko-Kisung, Koprowski H. Plant biofarming of monoclonal antibodies. *Virus Res* 2005;(111):93-100.
7. Streatfield SJ, Howard JA. Plant-based vaccines. *Int J Parasitol* 2003(33):479-493.
8. Emons AM, Kieft H. Somatic embryogenesis in maize (*Zea mays* L). In *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer-Verlag (Berlin Heidelberg) 1995:24-39.
9. Kausch AP, Adams TR, Mangano SJ, Zachwieja W, Gordon-Kam, Saines R *et al.* Effects of microprojectile bombardment of embryogenic suspension cell cultures of maize (*Zea mays* L). Use for genetic transformation. *Plant* 1995;(196):501-509.
10. Jiménez-Villalobos MJ. Transformación genética de callos embriogénicos de maíz (*Zea mays* L) con el gen de la glicoproteína G del virus de la rabia. [tesis licenciatura]. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México; 2006.
11. Beasley DW, Davis CT, Estrada-Franco J, Navarro-Lopez R, Campomanes-Cortes A, Tesh RB, Weaver SC, Barrett AD. Genome sequence and attenuating mutations in West Nile virus isolated in Mexico. *Emerging Infect Dis* 2004;10(12):2221-2224.
12. Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC, Chu CY, *et al.* Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on nitrogen sources. *Sci* 1975;(18):659-668.
13. Jefferson RA, Kavanagh T, Bevan MW. Gus fusions: α -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO J* 1987;6(13):3901-3907.
14. Guerrero-Andrade O, Loza-Rubio E, Olivera-Flores MTJ, Fehérvári-Bone T, Gómez-Lim MA. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Res* 2006;(15):455-463.
15. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;(73):5583-5589.

16. Faye L, Boulaflous A, Benchabane M, Gomord V, Michaud D. Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in molecular pharming. *Vaccine* 2005;(23):1770-1778.
17. Marquet-Blouin E, Bouche FB, Steinmetz A, Muller CP. Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)- derived measles virus hemmagglutinin. *Plant Mol Biol* 2003;51:459-469.
18. Loza-Rubio, E. Rojas, L. Gómez, Olivera MTJ, Gómez-Lim MA. Development of an edible Rabies vaccine in maize using the Vnukovo strain. *Dev Biol (Karger)* 2008;(131):477-482.
19. Rojas-Anaya E, Loza-Rubio E, Olivera-Flores MT, Gomez-Lim M. Expression of rabies virus G protein in carrots (*Daucus carota*). *Trans Res* 2009;18:911-919.
20. Adams SC, Broom AK, Sammels LM, Hartnett AC, Howard MJ, Coelen RJ, *et al.* Glycosylation and Antigenic Variation among Kunjin Virus Isolates. *Virology* 1995;(206):49-56.
21. Scherret JH, Poidinger M, Mackenzie JS, Broom AK, Deubel V, Lipkin WI, *et al.* The relationships between West Nile and Kunjin Viruses. *Emerg Infect Dis* 2001;(7):697-705.
22. Höfle U, Blanco JM, Crespo E, Naranjo V, Jiménez-Clavero MA, Sánchez A, *et al.* West Nile virus in the endangered Spanish imperial eagle. *Vet Microbiol* 2008;(129):171-178.
23. Groves SS, Turrel JM, Bailey LC, Morozov NV. Rapid active assay for the detection of antibodies to West Nile Virus in Chickens. *J Trop Med* 2008;(78):63-69.
24. Aulinger IE, Peter SO, Schmid P. Gametocyte Embryos of maize as a target for biobalistic transformation. Comparison to immature zygotic embryos. *Plant Cell Rep* 2003;(21):585-591.
25. Tiwari S, Verma PC, Singh PK, Tuli R. Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens. *Biotechnol Adv* 2009;27(4):449-67.
26. Gandhi R, Maheshwari SC, Khurana P. Transient gene expression and influence on foreign gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 1999;(35):232-237.
27. Loza-Rubio E, Rojas-Anaya E. Vaccine production in plant systems –an aid to the control of viral diseases in domestic animals. *Acta Vet Hung* 2010;58(4):511-522.
28. Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gosselé *et al.* Engineering herbicide resistance in plants by expression of detoxifying enzyme. *The EMBO J* 1987;6(9):2513-2518.
29. Kusnadi RA, Nikolov LZ, Howard AJ. Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnol Bioengineering* 1997;56:473-483.
30. Rybicki EP. Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discovery Today* 2009;14:16-24.