

01668
129.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

CONSTRUCCION DE UNA BIBLIOTECA GENOMICA
DE *Mycobacterium bovis* EN EL VECTOR λ ZAP
EXPRESS

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE:
**MAESTRO EN CIENCIAS
VETERINARIAS: MICROBIOLOGIA**
P R E S E N T A
M.V.Z. HUGO BRIGIDO BARRIOS GARCIA



ASESORES: M.V.Z., MSc., Ph.D. ALFREDO SAHAGUN RUIZ
M.V.Z., M. EN C., Ph.D. FRANCISCO SUAREZ GÜEMES

MEXICO, D. F.

265845

1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue financiado por:

- PAPIIT IN506194
- University Development Linked Project
- Texas Agriculture Experimental Station

Durante el período de estudio en alumno fue becario de CONACyT

ÍNDICE

	Pag.
RESUMEN	1
SUMMARY	2
1 INTRODUCCIÓN	
1.1 Generalidades	3
1.2 Salud pública	4
1.3 Diagnóstico	5
2. MATERIAL Y MÉTODOS	
2.1 Cultivo	9
2.2 Extracción de DNA	9
2.3 Construcción de la biblioteca genómica	10
2.4 Selección azul - blanco	10
2.5 Titulación de la biblioteca	10
2.6 Amplificación de la biblioteca	11
2.7 Selección de sueros de bovinos positivos a PPD	12
2.8 Producción de anticuerpos policlonales anti-PPD bovino en conejo	13
2.9 Adsorción de anticuerpos contra <i>E. coli</i>	13
2.10 Selección de clonas recombinantes	13
2.11 Excisión <i>in vivo</i> del plásmido pBK-CMV	14

2.12	Extracción del plásmido	15
2.13	Digestión del plásmido pBK-CMV	16
2.14	Marcaje del DNA de <i>M. bovis</i>	16
2.15	Hibridación tipo Southern	16
2.16	Detección de la hibridación	17
3.	RESULTADOS	
3.1	Construcción de la biblioteca genómica	19
3.2	Selección azul - blanco	20
3.3	Titulación de la biblioteca	20
3.4	Selección de clonas recombinantes	20
3.5	Excisión <i>in vivo</i> del plásmido pBK-CMV	21
3.6	Digestión del plásmido e hibridación tipo Southern	21
4.	DISCUSIÓN	26
5.	CUADROS Y FIGURAS	31
6.	LITERATURA CITADA	43

RESUMEN:

Barrios García, Hugo Brígido. **Construcción de una biblioteca genómica de *Mycobacterium bovis* en el vector λ ZAP Express.** Dirigida por Dr. Sahagún Ruíz, Alfredo y Dr. Suárez Güemes, Francisco.

La tuberculosis bovina es una de las enfermedades con repercusión en la salud pública. Las pérdidas económicas en el ganado son muy importantes tanto a las debidas a la enfermedad por si misma, como por la restricción de mercados nacionales y extranjeros a los productos derivados a hatos positivos a tuberculosis. En México el control de esta enfermedad está basado en la eliminación de animales reactores positivos a la prueba de tuberculina. El objetivo del presente estudio fue el de construir una biblioteca genómica de *M. bovis* que permita identificar y aislar clonas que codifiquen para proteínas recombinantes antigénicas utilizando sueros de bovinos positivos a PPD y sueros de conejo anti-PPD bovino para su selección.

La biblioteca genómica fue construida de DNA genómico, a partir de una cepa de campo de *M. bovis* degerido por *Eco* IR. Los fragmentos entre 2 y 4 kb fueron seleccionados por electroelusión. Estos fragmentos fueron ligados al vector de expresión Lambda ZAP Express y posteriormente inducidos a formar viriones completos con el paquete GigaPack. El título de la biblioteca sin amplificar absorbida en *E. coli* XL1 azul fue estimado en 1.1×10^7 ufp/ml. Tomando en cuenta que el tamaño del genoma de *M. bovis* es de 3.1×10^9 pb, un tamaño promedio de los insertos de 3 kb y el título de la biblioteca, estimamos que existe una representación de un 99% del DNA genómico de *M. bovis* en la biblioteca construida, de acuerdo al método de Clark. Se seleccionaron clonas recombinantes mediante inmunoafinidad de las proteínas expresadas en las placas líticas hacia sueros de bovino positivos a PPD y sueros de conejo anti-PPD bovino. Las placas positivas fueron detectadas en membranas de nitrocelulosa utilizando proteína G conjugado a la enzima peroxidasa. De las clonas recombinantes seleccionadas, se les hizo excisión *in vivo* y restricción con *Eco* RI para evaluar el tamaño de los insertos. Las clonas selectas restringidas fueron hibridadas por Southern blot con una sonda biotinilada de *M. bovis* para determinar si las fracciones de DNA aisladas pertenecen a *M. bovis*.

SUMMARY:

Barrios García, Hugo Brígido. **Construction of a *Mycobacterium bovis* genomic library in λ ZAP Express.** Under supervision of Dr. Sahagún Ruíz, Alfredo and Dr. Suárez Güemes, Francisco.

Tuberculosis is considered as an important disease with public health impact. The economic losses include those due to the sickness by itself, and those due to the National and foreign marketing restrictions to tuberculosis positive cattle and their derived products. In Mexico, control of this disease is based on elimination of tuberculin positive tested animal. The objective of this study was to construct a *Mycobacterium bovis* genomic library in λ ZAP Express, to identify and select clones expressing recombinant proteins using PPD positive bovine serum and anti-bovine PPD rabbit serum.

The genomic library was constructed with *EcoRI* digested DNA of a wild strain of *M. bovis*. Fragments between 2 and 4 kb were electroeluted and ligated to Lambda ZAP Express vector. The library estimated titer was of 1.1×10^7 ufp/ml, the probability of a complete *M. bovis* genome representation was 99%. Recombinant clones were selected by immuno-affinity of protein expressed in lytic plaques to PPD-positive bovine serum and anti *M. bovis* PPD rabbit serum. Positive plaques were detected on nitrocellulose membranes using a anti-bovine-IgG peroxidase conjugate. Selected recombinant clones were excised in vivo and restricted with *EcoRI* in order to know the size of the inserts. Restricted clones were hybridized with a biotinylated *M. bovis* DNA by Southern blot to verify that the cloned belong to *M. bovis* genome.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades:

Los casos de tuberculosis humana se han incrementado en los últimos años, principalmente en países industrializados. La tuberculosis bovina tiene importancia en salud pública y es considerada una zoonosis; esta enfermedad ocasiona pérdidas económicas en la producción de carne y leche, además de las pérdidas debidas a la restricción de mercados internacionales a los productos derivados de hatos positivos a la tuberculosis (1, 2).

La tuberculosis es una enfermedad crónica que ataca de manera primaria a los pulmones, pero puede afectar cualquier órgano o tejido. Las micobacterias producen reacciones inflamatorias focales granulomatosas, en el centro de éstas frecuentemente se observa una forma peculiar de necrosis caseosa (3, 4).

El género *Mycobacterium* incluye varias especies, unas son patógenas tanto para el hombre como para los animales, otras patógenas oportunistas y otras esencialmente saprófitas (5, 6). Dentro de las micobacterias patógenas, existen dos especies muy similares: *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* que son las responsables de la tuberculosis humana y bovina respectivamente (7, 8), aunque el hombre puede ser infectado por *M. bovis* (3, 8).

Las micobacterias son bacilos delgados o ligeramente curvos, de 0.2 a 0.6 μm de diámetro y de 1 a 4 μm de longitud, aparecen como células aisladas o asociados en grupos pequeños y a veces en masas compactas, en las que no se puede distinguir cada bacilo (9, 10, 11). El bacilo de la tuberculosis es inmóvil y no forma esporas (5, 6, 12), requiere de 15 a 22 horas para su replicación, mientras que el tiempo de generación de otras bacterias puede ser de 20 a 30 minutos (9, 13). Las micobacterias no se tiñen con métodos convencionales porque hay una resistencia notable a la penetración de los colorantes, debido a la presencia de cantidades

relativamente grandes de lípidos en la pared celular, por lo que son llamados bacilos ácido-alcohol resistentes (10, 13, 14, 15).

1.2 Salud pública:

Se estima que el 5% de las vacas tuberculosas infectadas, tienen lesiones en pulmón, útero y que del 1 al 2 % en glándula mamaria. Esta localización resulta importante en las infecciones de terneros que se amamantan con la leche de modo natural o artificial. Del mismo modo, la transmisión a través de la leche es de importancia desde el punto de vista de salud pública; sin embargo, la transmisión vía aerógena es la más frecuente; ya que individuos aparentemente sanos pueden permanecer como portadores y diseminar la bacteria (8, 16). Se estima que más de una tercera parte de la población humana mundial ha sido infectada por algún tipo de micobacteria y 60 millones sufren de tuberculosis activa. Anualmente se registran 8 a 10 millones de casos nuevos, resultando en 3 a 10 millones de muertes por año (17). Se calcula que la tuberculosis es responsable de más del 6% de todas las muertes en el mundo. En total, más gente muere de infección por *M. tuberculosis* que por cualquier otro agente infeccioso (18, 19, 20). Muchos de estos diagnósticos de tuberculosis podrían ser debidos a *M. bovis*.

La evidencia de que el ganado bovino y sus productos, como la leche y la carne, son fuentes potenciales de *M. bovis* causante de infección en humanos (21), justifica la necesidad de proteger a la población mediante programas de eliminación de la enfermedad en los bovinos. Entre 1980-1991 en San Diego, California, Estados Unidos se realizó un estudio donde se identificaron 73 casos humanos de tuberculosis de origen bovino, los cuales representan el 3% de los casos de tuberculosis humana notificada durante ese período. Por otra parte, en Santa Fe, Argentina, entre 1986 y 1989 se estudio una muestra de 679 personas tuberculosas, de las cuales en 26 (3.8%) la infección fue de origen bovino. Este último estudio, indicó que los individuos infectados tuvieron una mayor relación directa con el ganado y menor con los productos derivados de ellos (22).

En América, de los casi 420 millones de bovinos, poco menos de la mitad se encuentra en países exentos de tuberculosis bovina o donde los niveles de infección son bajos (<1%), el resto se distribuye en los países con prevalencias mayores al 1% causando grandes pérdidas económicas. Las pérdidas anuales directas e indirectas por tuberculosis bovina de cinco países de Centroamérica se estiman en 20 millones de dólares y en México en 26.5 millones dólares. En Sudamérica el número de bovinos infectados, podrían superar las cuatro millones de cabezas. En Argentina se estima que las pérdidas anuales sobrepasan los 60 millones de dólares (80). En general, la tuberculosis bovina ha sido localizada en 94 (69%) de 136 países en el trópico (23).

En 1992, México contaba con 32,731,924 cabezas de ganado bovino, de las cuales 3,433,641 (10.5%) corresponden a bovinos productores de leche y 29,298,283 (89.5%) corresponden a bovinos productores de carne. Los datos registrados sobre la prevalencia de la tuberculosis bovina indican un 11.1% y 2.9% para el ganado productor de leche y carne respectivamente¹. Por otra parte en 1997, se tuberculinizaron 4,132,793 bovinos, de los cuales 1,432,437 corresponden a ganado productor de carne, 1,440,267 a ganado productor de leche, 7,22,243 por motivo de movilización y 537,846 por exportaciones; de los cuales se registraron 28,300 reactores, lo que se estima que la prevalencia hasta diciembre de este año era de 0.68%².

1.3 Diagnóstico:

La forma más precisa de diagnosticar al complejo tuberculosis es mediante el aislamiento e identificación del microorganismo a partir del individuo enfermo (9, 10, 24), pero debido a su lento crecimiento, el aislamiento de las micobacterias representa un problema especial para el laboratorio, ya que llegar a una identificación final, tardaría cuando menos

¹ Ante proyecto de norma Oficial NOM-031-200-1995 de la campaña contra la tuberculosis bovina de la SAGAR, 1995.

² Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria; Campaña Nacional contra la tuberculosis bovina; SAGAR. 1997.

cuatro semanas. Una ayuda al diagnóstico es el estudio anatomopatológico debido a que, cuando las lesiones son evidentes podrán ser identificadas durante la necropsia y confirmadas con el estudio histopatológico, donde se observan los característicos granulomas que conjuntamente con las tinciones para bacterias ácido-alcohol resistentes, aportan un diagnóstico presuntivo de tuberculosis. Sin embargo, para emitir un diagnóstico concluyente, es necesario identificar las micobacterias a través del aislamiento. Una técnica equivalente al aislamiento e identificación del microorganismo, es la detección de presencia de ácidos nucleicos del microorganismo en la muestra clínica o muestras previamente fijadas en formol. Esto es posible mediante la utilización de sondas de DNA específicas o bien, mediante la amplificación fragmentos de DNA del microorganismo por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando iniciadores específicos como el IS6110 (16, 18, 25, 26).

En México, el diagnóstico de la tuberculosis en humanos depende de los síntomas clínicos, evidencias radiológicas de la enfermedad y la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en las muestras, por lo que las infecciones por *M. bovis* se pueden diagnosticar erróneamente como *M. tuberculosis*. En el ganado vacuno se emplea la prueba de la tuberculina, que consiste en la inoculación intradérmica de un derivado proteico purificado (PPD) de *Mycobacterium*, el cual en animales positivos causa un engrosamiento del sitio de aplicación, debido a una reacción de hipersensibilidad tardía (27). Esta prueba es la base de la Campaña de Erradicación de la Tuberculosis Bovina en México (CANETB), la cual implica la detección y la eliminación subsecuente de los animales reactivos positivos. Se han detectado algunas limitaciones en esta prueba, como reacciones falsas negativas en casos de anergia o hembras que han tenido un parto de cuatro a seis semanas precedentes a la prueba, y reacciones falsas positivas en infecciones con otras micobacterias como *M. avium* sub-especies *avium* o *paratuberculosis* (5, 28). Estas limitaciones de la prueba resultan en la

eliminación de reactores falsos positivos, originando mermas en la producción, así como la posible permanencia de animales positivos que representan un peligro para el resto del hato.

Por otra parte, la forma de desarrollo bacteriano para la producción de PPD es un proceso relativamente largo, ya que el cultivo de las micobacterias se realiza en la superficie del medio líquido en forma estática en condiciones controladas de temperatura y aereación por un período de 20 a 30 días. Una alternativa a la producción a PPD, sería la utilización de proteínas recombinantes.

Para poder tener proteínas recombinantes de *M. bovis* se han utilizado técnicas de clonación; una de ellas es la construcción de bibliotecas genómicas que nos permite trabajar genes aisladamente para su caracterización. En una biblioteca construida en *lambda* gt 11, de 32 clonas seleccionadas, 5 fueron reconocidas por anticuerpos monoclonales anti-MPB-70 y SB10, de los cuales se seleccionó una clona que contenía un inserto de 253 pares de bases y que codifica para un polipéptido que fue reconocido por sueros de bovinos infectados con *M. bovis* (29). También han sido descritas otras proteínas, como el antígeno alfa de 30-kDa, el cual se une a fibronectina y es una proteína secretoria principal de crecimiento micobacteriano y estimula blastogénesis linfocitaria *in vitro*, a partir de células de animales positivos a PPD (30). Otra proteína recombinante de 130 kDa, aislada de una biblioteca construida en el vector de expresión *lambda* gt 11, es capaz de inducir una respuesta de inmunidad tardía de piel en ratones inmunizados o infectados con *M. bovis* o *M. tuberculosis* (31). Otro epítotope que es capaz de inducir una respuesta de hipersensibilidad tardía en humanos, está localizado en la terminación carboxilo de una proteína de 38-kDa de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (32). También se obtuvo otra proteína recombinante (rMPB64) en el vector pMAL64c expresada y clonada en *E. coli*, esta proteína fue probada en cuyes para hipersensibilidad tipo retardada, donde encontraron que el rMPB64 tiene la misma reactividad como la proteína nativa MPB64 y su capacidad para inducir hipersensibilidad retardada fue 13.4 veces mas alto

que PPD. Debido a que existen algunas proteínas que solo se producen en *M. tuberculosis* y algunas cepas de *M. bovis* BCG, este antígeno rMPB64, podría ser de utilidad para el diagnóstico específico de la tuberculosis por *M. tuberculosis* y *M. bovis*, ya que descartaría infecciones causadas por *M. avium*(33).

El presente estudio pretende la construcción de una biblioteca genómica de *M. bovis*, con la finalidad de seleccionar clonas recombinantes que expresen antígenos de *M. bovis* reconocidos por anticuerpos policlonales específicos, así como, la caracterización de los insertos clonados. Dichas clonas podrían ser la base del desarrollo de pruebas diagnósticas más sensibles y específicas como sondas de DNA, iniciadores de PCR y proteínas recombinantes para intradermo-reacción y serología.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Cultivo:

*Mycobacterium bovis*³ fue cultivada en caldo de Middlebrook 7H9 suplementado con albúmina-dextrosa-catalasa (ADC) a 37°C en agitación a 100 rpm por tres semanas (34, 35, 36). Se ajustó a una densidad óptica de 1 (600 nm de longitud de onda luz visible) que representa 3×10^8 UFC/ml de medio de cultivo (37).

2.2 Extracción de DNA:

Para la extracción del DNA genómico, el cultivo de micobacterias se centrifugó a 4,000 xg por 5 minutos y la pastilla resultante fue resuspendida en 200 µl de solución de lisis alcalina (0.1 M NaOH, 2M NaCl, SDS 0.5%) e incubado a 95°C por 15 minutos. El DNA resultante de la lisis, fue extraído dos veces con fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1) con agitación fuerte por un minuto, transfiriendo la fase acuosa a un tubo limpio y nuevo cada vez. El DNA fue precipitado manteniéndolo media hora a -70°C con acetato de amonio 300 mM y etanol absoluto; seguido de una centrifugación a 12,000 xg por 5 minutos. La pastilla se lavó una vez para disminuir la cantidad de sales con etanol al 70% y el DNA fue recuperado por centrifugación a 12,000 x g por 5 minutos. La pastilla resultante fue resuspendida en 100 µl de TE 10:1 (10 mM Tris/1 mM EDTA) (38).

2.3 Construcción de la biblioteca genómica:

El DNA de *M. bovis* se sometió a una digestión parcial con diferentes concentraciones de la enzima *EcoRI* (39) 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 U/µl (Figura 1) con el fin de determinar la concentración óptima para generar un mayor

³ Aislamiento de campo donado por la sección de diagnóstico del Depto. de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

número de fragmentos entre 2 y 4 kb (40, 41); los fragmentos resultantes de la digestión fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE (45mM Tris HCl/Borato, 10mM EDTA).

Los fragmentos entre 2 y 4 kb fueron seleccionados por electroelusión y posteriormente purificados, utilizando cartuchos Glass Max® (Gibco). Los fragmentos de DNA fueron ligados a los sitios *EcoRI* de los brazos del vector λ ZAP Express ®(Stratagene) a una proporción 10:1 de (inserto/vector). El ligado de los insertos se realizó usando la enzima T4 DNA ligasa ®(Stratagene); posteriormente se indujo la formación de viriones completos con el paquete GigaPack® (42).

2.4 Selección azul - blanco:

El sitio de inserción *EcoRI* en el vector, es un sitio único localizado en el gene *lacZ* de la enzima β -galactosidasa; la inserción de DNA recombinante en esta región permitió la selección azul / blanco en agar LB (Luria Bertani) con X-gal (Promega) por la inactivación del gene *lacZ* dentro del fago λ ZAP Express.

Se adicionó 0.1 μ l de la reacción de fagos empaquetados a 200 μ l de *E. coli* XL1 azul a una concentración de 600 nm de longitud de onda en 1 y se incubaron por 15 minutos a 37°C. La suspensión bacteriana infectada se mezcló con 3 ml de agar semisólido NZY conteniendo 15 μ l de 0.5 M de (isopropil-tiogalacto-piranosido) IPTG y 250 mg/ml de X-gal; y se vació en cajas con agar NZY que fueron incubadas a 37°C en oscuridad. Las placas líticas fueron visibles después de 8 horas de incubación. Las placas de color azul son indicativas de la ausencia de inserto, mientras que las placas líticas recombinantes dan un color blanco (42).

2.5 Titulación de la biblioteca:

La bacteria hospedadora *E. coli* XL1 azul MRF (Stratagene), se cultivó en agitación a 30°C por toda la noche, en 50 ml de caldo LB, suplementado

con maltosa al 2% y 10 mM MgSO₄. Se hizo una dilución 1:100 de cultivo en el medio LB suplementado y se incubó a 37°C por 4 horas; se infectaron 600 µl del cultivo con 1 µl de cada una de las diluciones del fago a partir de 10 µl: 10¹, 10⁰, 10⁻¹, 10⁻² y 10⁻³ y se incubaron por 15 minutos a 37°C. Se mezclaron con 6.5 ml de agar semisólido NZY a 48°C, se colocaron en cajas de agar NZY y se incubó a 37°C por 8 horas hasta la formación de placas líticas de aproximadamente de 2 mm de diámetro; finalmente se contaron las placas.

Para calcular la probabilidad de que todos los genes de *M. bovis* estén representados en la biblioteca, se utilizó la siguiente fórmula de Clarke y Carbon (43):

$$P = 1 - (1 - f)^N$$

Donde:

P = probabilidad

f = fracción del genoma en una recombinante

N = número de clones recombinantes

2.6 Amplificación de la biblioteca:

La biblioteca se sembró utilizando 600 µl de la bacteria y 1 µl de fago recombinante a una dilución de 1:10, correspondiente a 5.7 X 10⁴ unidades formadoras de placas. El fago fue adsorbido por 15 minutos a 37°C. Enseguida, se mezcló la bacteria infectada con 6.5 ml de agar semisólido NZY a 48°C, se colocó en cajas de agar NZY y se incubó a 37°C por 8 horas, hasta la formación de placas líticas de aproximadamente 2 mm de diámetro. Posteriormente, se cubrió el plato con 10 ml de solución SM (100mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 50 mM Tris HCl pH 7.5, 2% gelatina) y se dejó en agitación a 4°C por 8 horas. Después de este período, se recuperó la solución SM y se le adicionó cloroformo al 5% y se incubó por 15 minutos; en seguida la solución fue centrifugada a 500 xg por 10 minutos. y el sobrenadante fue distribuido en frascos de 500 µl en tubos nuevos; se le adicionó 15 µl de cloroformo para

tener una concentración final del 3% y 35 μ l de dimetilsulfoxido (DMSO) para tener una concentración final del 7%; finalmente, la biblioteca fue almacenada en nitrógeno líquido y en congelación a -70°C .

2.7 Selección de sueros de bovino positivos a PPD:

Se trabajaron con 30 sueros de bovinos positivos a PPD, obtenidos de un rancho en el estado de Hidalgo, México. Estos sueros fueron evaluados mediante la prueba de inmunotransferencia de punto "Dot blot".

Se colocó 1 μ l de PPD bovino como antígeno en membranas de nitrocelulosa y se bloqueo con 3% gelatina en TBS-Tween (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) por 1 hora. Las membranas fueron incubadas por 8 horas con cada uno de los sueros, así como, con sueros negativos como testigo. Posteriormente, fueron lavadas dos veces con TBS-Tween y uno con TBS (10 mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl), por 5 minutos cada lavado para eliminar los anticuerpos que no se unieron al antígeno. Las membranas lavadas fueron incubadas con proteína G (CALBIOCHEM ®) conjugada a peroxidasa a una dilución de 1:3,000 por 4 horas, seguida de otro ciclo de lavados. Finalmente las membranas fueron tratadas con 0.1 % de peróxido de hidrógeno en 100 ml PBS con 60 mg de 4 cloro naftol en 20 ml de metanol frío por 10 minutos aproximadamente, con el fin de evidenciar la presencia de anticuerpos específicos a PPD.

2.8 Producción de anticuerpos policlonales anti-PPD bovino en conejos:

Se inocularon conejos Nueva Zelanda hembras de 12 semanas de edad, libres de patógenos específicos con 0.1 ml de derivado proteico purificado bovino (PPD) vía intramuscular y con 0.1 ml vía intravenosa (IV) en la primera semana; posteriormente siete inoculaciones semanales de 0.1 ml de PPD vía IV. La producción de anticuerpos contra PPD bovino, fue evaluada por inmunotransferencia de punto ("Dot blot").

2.9 Adsorción de anticuerpos contra *E. coli*:

Se cultivaron dos litros de *E. coli* XL1 azul (Stratagene) durante 12 horas a 37°C con agitación a 200 rpm en medio de LB. Un litro de *E. coli* XL1 azul fue tratada con autoclave por 1 hora/15 libras/121°C y el otro litro con 0.1% de formaldehído; los lisados obtenidos por ambos tratamientos fueron mezclados y colocados en tubos de 50 ml, centrifugados a 4,000 xg por 10 minutos. La pastilla resultante fue resuspendida en una dilución de 1:50 con cada uno de los sueros a utilizar. La adsorción se llevo a cabo incubado a temperatura ambiente por 8 horas (44). Finalmente, los sueros fueron esterilizados por filtración con poro de 0.22 µm y refrigerados a 4°C hasta su utilización.

2.10 Selección de clones recombinantes:

La biblioteca genómica fue cultivada en un título de 25,000 unidades formadoras de placa (UFP) en agar NZY, para lo cual, el fago λ ZAP *Express* recombinante fue adsorbido en *E. coli* XL1 azul MRF(Stratagene) a una concentración de 0.5 en 600 nm por incubación a 37°C por 20 minutos; la bacteria infectada con el fago λ fue mezclada con agar NZY semisólido y después sembrada en cajas de agar NZY, las cuales se incubaron a 37°C 4-8 horas hasta observar placas de 1-2 mm de diámetro.

Se impregnaron membranas de nitrocelulosa con 10 mM IPTG por media hora y fueron colocadas sobre las placas para inducir la transcripción del gene de la β-galactosidasa y así, la expresión de las proteínas fusionadas a β-galactosidasa que se adsorben a la membrana de nitrocelulosa. Las placas con las membranas se incubaron a 37°C por 4 horas (45)

Las membranas se removieron suavemente y fueron sometidas a un ciclo de 2 lavados en TBS-T y uno con TBS de 5 minutos cada uno. Se agregó 0.5 mg de PPD bovino sobre un extremo de la membrana como testigo positivo para las inmunotransferencia.

Los sitios activos en la membrana fueron bloqueados con gelatina al 3% en TBST por 30 minutos, el exceso de gelatina fue removido con un ciclo de lavados. Las membranas fueron incubadas por 8 horas a 22°C con suero de bovino positivo a tuberculosis, mediante la reacción de PPD o con suero de conejo anti-PPD bovino; así como, con testigo negativo a PPD. Todos los sueros fueron previamente absorbidos con el lisado de *E. coli* (ver arriba); además, se utilizó como testigo para el conjugado, TBST con 1% de gelatina sin suero (44). Después de un ciclo de lavados, las membranas se incubaron con proteína G conjugada a la enzima peroxidasa (CALBIOCHEM®) a una dilución de 1:3,000 en TBS por 4 horas; después de otro ciclo de lavados, las placas positivas se hicieron evidentes, utilizando el sustrato peróxido de hidrógeno al 0.1 % y el indicador de color 4-cloro-1-naftol al 0.3% (46).

Las placas con proteínas recombinantes que produjeron una señal de mayor intensidad en las inmunotransferencias, fueron identificadas en las cajas de Petri y colectadas del agar para su purificación y posterior caracterización.

2.11 Excisión *in vivo* del plásmido pBK-CMV:

El fagémido pBK-CMV fue excidido *in vivo* a partir del vector λ ZAP *Express* mediante co-infección de *E. coli* XL1 azul con el λ ZAP *Express* recombinante seleccionado y el bacteriófago cooperador R-408 (Stratagene). El plásmido obtenido contiene el DNA insertado.

Se creció *E. coli* XL1 azul en caldo LB y *E. coli* XL0LR en caldo NZY toda la noche a 30°C; ambos cultivos fueron centrifugados separadamente a 150 xg y resuspendidos en la mitad del volumen de una solución de sulfato de magnesio MgSO₄ 10 mM. Se colocaron 200 μ l de *E. coli* XL1 azul a una concentración de 1 en 600 nm, 250 μ l del fago lambda ZAP *Express* y 1 μ l del fago cooperador R-408 y se incubaron a 37°C por 15 minutos. Después de esta incubación, se le adicionaron 3 ml de caldo NZY y se continuó la incubación por 16 horas a 37°C en agitación a 200 rpm. Las células aun viables fueron inactivadas por calor a 69°C por 20 minutos y centrifugadas a

1000 xg por 15 minutos. El sobrenadante conteniendo el pBK-CMV excidido, fue transferido a otro tubo. En un tubo nuevo conteniendo 200 µl de bacterias *E. coli* XL0LR en 10 mM MgSO₄, se agregó 100 µl pBK-CMV excidido y se incubó a 37°C por 15 minutos; posteriormente, se le adicionaron 3 ml de caldo NZY y se continuó la incubación a 37°C por 45 minutos; finalmente la bacteria fue sembrada en platos de agar LB conteniendo 50 mg/ml de monosulfato de kanamicina (SIGMA), únicamente las bacterias que fueron transformadas se desarrollaron (Stratagene).

2.12 Extracción del plásmido:

Las bacterias transformadas, se cultivaron en caldo LB con 50 µg/ml de kanamicina a 37°C por toda la noche en agitación a 300 rpm. El cultivo en 1.5 ml fue centrifugado a 12,000 xg por un minuto, se decantó el sobrenadante y se permitió secar la pastilla. La pastilla se resuspendió en 100 µl en la solución de lisis fría (25 mM de Tris-HCl pH8, 10 mM de EDTA, 50 mM de glucosa) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. En seguida se le adicionaron 200 µl de una solución preparada recientemente con 0.2 N de NaOH y 1% de SDS (sodio dodecil sulfato), se mezcló y se incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente, adicionaron 150 µl de acetato de potasio pH 4.8 frío y se prosiguió con la incubación por otros 5 minutos en hielo, seguida de centrifugación a 12,000 xg por 5 minutos. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio y al cual se le agregó RNAsa A a una concentración final de 20 µg/ml y fue incubado a 37°C por 20 minutos. En seguida, se le adicionó un volumen de fenol/cloroformo saturado de TE (10 mM Tris-HCL pH8, 1 mM EDTA), se agitó fuertemente por un minuto y se centrifugó a 12000 xg por 2 minutos. Posteriormente, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se le adicionó un volumen de cloroformo isoamílico (24 :1), se agitó fuertemente por un minuto y se centrifugó a 12,000 xg por 2 minutos. El DNA en el sobrenadante fue precipitado con etanol frío y lavado con etanol al 70 % (39, 47).

2.13 Digestión del plásmido pBK-CMV:

El plásmido recuperado, se sometió a una digestión con 10 U/μl de la enzima *Eco R1* por una hora a 37°C, para determinar la presencia y tamaño del inserto clonado de *M. bovis*.

2.14 Marcaje del DNA de *M. bovis*:

El DNA de *M. bovis* fue marcado por el sistema de iniciadores al azar Bioprime (GibcoBRL). Un μl de DNA genómico de *M. bovis* a una concentración de 250 ng/μl fue disuelto en 10 μl de y desnaturalizado por calentamiento a 100°C por 10 minutos; inmediatamente después fue colocado en hielo. Se adicionaron 5 μl de 10X dNTP (1mM biotin-14-dCTP; 1 mM dCTP; 2 mM dATP; 2mM dGTP; 2mM dTTP en 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM Na₂EDTA), 20 μl de 2.5 X iniciadores al azar (125 Mm Tris-HCl, pH 6.8; 12.5 mM MgCl₂; 25 mM 2-mercaptoetanol; 750 μg/ml oligo-deoxi-ribonucleótido), 13 μl de agua destilada y finalmente 3 μl del fragmento Klenow de la polimerasa I (40 U/μl de fragmento klenow en 100 K₂HPO₄ pH 7.0, 10 mM 2-mercaptoetanol, 50% glicerol). La reacción fue incubada a 37°C por 4 horas y fue detenida con 5 μl de la solución de alto (0.2 M Na₂EDTA, pH 7.5) El DNA se precipitó con 300 mM de acetato de sodio y etanol a -70°C por 15 minutos y se centrifugó a 15,000 xg por 10 minutos. La pastilla fue secada a temperatura ambiente y resuspendida en TE 10:1. El DNA marcado, fue adicionado a 10 ml de solución de hibridación (SSC 10X [1.5 M NaCl, 150 mM Citrato de Na], SDS 0.5%, 100 mg de DNA de esperma de salmón, 50 % de formamida) y almacenado a -20°C hasta su uso.

2.15 Hibridación tipo Southern:

Los plásmidos recombinantes seleccionados fueron digeridos con la enzima *Eco RI* a 37°C por 30 minutos; los fragmentos digeridos, fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% a 80 V por 30

minutos (geles de 8 centímetros) en TBE (42). El gel se sumergió en varios volúmenes de 0.25 N HCl por 10 minutos y se enjuagó con agua desionizada; en seguida el gel fue colocado en una solución desnaturalizante (1.5 M de NaCl, 0.5 M de NaOH) por 20 minutos a temperatura ambiente; se detuvo la reacción con una solución neutralizante (1M Tris [pH 7.5] 1.5M NaCl) por 20 minutos. El gel fue transferido a una membrana de nylon, cargada positivamente (GIBCO BRL), por capilaridad con SSC 10X durante 12 horas. El DNA transferido fue fijado a la membrana de nylon utilizando una fuente de luz UV Crooslinker (Stratalinker 1800/Stratagene) a 254 nm con 120,000 micro-joules. Las membranas fueron pre-hibridadas durante 2 horas a 42°C en una solución de pre-hibridación (6X SSC; 5X reactivo de Denhardt's [50X: 0.1% ficoll, 0.1% polivinilpirrolidona, 0.1% albumina sérica bovina]; 0.5% SDS; 100 µg/ml esperma de salmón, 50% formamida). Después de la pre-hibridación la membrana se incubó con la solución de hibridación, durante 16 horas a 42°C. Esta solución contiene el DNA de *M. bovis* marcado; el cual fue desnaturalizado por ebullición por 10 minutos previamente a su uso .

2.16 Detección de la hibridación:

Las membranas hibridadas se lavaron dos veces por 5 minutos en 5X SSC con 0.5% de SDS, a 65°C, posteriormente se lavaron por 30 minutos en 0.1X SSC con 1% de SDS a 50°C, después se lavaron por 5 minutos en 2X SSC a temperatura ambiente . Las membranas fueron enjuagadas con TBS-T pH 7.5 y bloqueadas con 3% de albúmina sérica bovina en TBS-T pH 7.5, por 60 minutos a 65°C con agitación. Después, la membrana se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente con el conjugado SA-AP (Streptavidin-Fosfatasa alcalina) (Photogene) diluído (1:1,000) en TBS-Tween, en seguida las membranas fueron lavadas dos veces en TBS-Tween pH 7.5 por 10 minutos y por último, fueron sometidas a un lavado con la solución de lavado final (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂ .6H₂O pH 7.5) por 60 minutos. Las bandas hibridadas fueron detectadas, agregando luminophos sobre la membrana dentro de un folder de acetatos para revelado. Después de

incubadas a 37°C por 60 minutos en oscuridad, se colocó la película radiográfica y se permitió la exposición por 15 minutos. La película fue revelada colocándola en solución reveladora (Kodak) por 15 minutos, en seguida en una solución fijadora (Kodak) por 15 minutos y enjuadada en agua corriente por 15 minutos (GibcoBRL).

Los perfiles de las bandas en el "Southern Blot" fueron comparados entre los plásmidos digeridos y sin digerir.

3. RESULTADOS

3.1 Construcción de la biblioteca genómica:

La figura 1 muestra en los carriles 1, 2, 3, 4 y 5 las digestiones del DNA genómico de *M. bovis* con 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 U/ μ l de la enzima *EcoRI* respectivamente se evaluado en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio; en el carril número 6 se encuentra el marcador de peso molecular λ digerido con *Hin* d III. Se determinó que con 10 U/ μ l de la enzima *EcoRI*, se obtiene una mayor concentración de fragmentos entre 2 y 4 kb.

En el carril 1 de la figura número 2, se muestran 250 ng/ μ l de DNA genómico de *M. bovis* sin digerir; en el carril número 2 se observan 250 μ g/ml de DNA de *M. bovis* después de una digestión parcial con la enzima *EcoRI* a una concentración de 10 U/ μ l; el carril 3 se encuentra el marcador de peso molecular λ *Hin* d III.

La figura 3 carril 2 muestra el DNA de *M. bovis* digerido y seleccionado entre 2 y 4 kb, la diferencia entre el peso molecular del DNA genómico del carril 1 del seleccionado en el carril 2 se observa al comparar el DNA seleccionado con el marcador de peso molecular λ *Hin* d III del carril 3.

En la figura 4, carril 3 muestra los fragmentos selectos ligados al vector λ ZAP Express con un peso molecular de 22 kb , en el carril 1 se observa el DNA genómico de *M. bovis* sin digerir de un peso molecular aproximado de 24 kb; en el carril 2 se observan los fragmentos seleccionados antes de ser ligados al vector. En el carril 4 se observa el marcador de peso molecular λ *Hin* d III.

3.2 Selección azul - blanco:

Después de 8 horas de incubación se observó el 100 % de placas líticas de color blanco por lo que se asume que todas las clonas presentes tenían un inserto de *M. bovis*.

3.3 Titulación de la biblioteca:

La biblioteca genómica fue titulada en unidades formadoras de placa (ufp) para determinar su tamaño. Se contaron 1,150 placas líticas en una dilución de 10^{-1} , lo que corresponde a un título de 1.1×10^7 ufp/ml.

Considerando que el tamaño del genoma de *M. bovis* es de 3.1×10^9 pb (26), un tamaño promedio de los insertos de 3 kb y el título de la biblioteca se estima que existe una representación del genoma de *M. bovis* en la biblioteca del 99%.

3.4 Selección de clonas recombinantes:

Se seleccionaron 29 clonas de un total de 38 con sueros de bovinos positivos a PPD y 20 clonas de un total de 40 con sueros de conejo anti-PPD bovino en base a la mayor intensidad de color en las inmunotransferencias. Con la finalidad de purificar estas clonas se realizó un segundo, tercero y cuarto tamizado hasta obtener una purificación del 100% de clonas recombinantes a partir de una clona recombinante que expresen todas ellas la proteína inducida. En la figura 5, la parte A muestra el primer tamizado y la parte B muestra el cuarto tamizado. Al final de los tamizados, se obtuvieron cinco clonas recombinantes seleccionadas con sueros de bovinos positivos a PPD y cuatro con suero de conejo anti-PPD bovino, dando un total de nueve clonas recombinantes.

3.5 Excisión *in vivo* del plásmido pBK-CMV:

A las nueve clonas seleccionadas se les realizó la excisión *in vivo* y se obtuvieron plásmidos pBK-CMV que se muestran en el cuadro 1. Los plásmidos seleccionados a partir de sueros de bovinos positivos a PPD fueron nombrados pMb-I, pMb-II, pMb-III, pMb-IV y pMb-V y los plásmidos seleccionados con sueros de conejo positivos a PPD bovino fueron designados pMb-VI, pMb-VII, pMb-VIII y pMb-IX. Estos plásmidos mostraron pesos moleculares aproximados de 7, 9.5, 23, 14 y 9 kb correspondientes al primer grupo y 9.3, 9.3, 9.2 y 9.4 kb al segundo grupo respectivamente, al evaluarlos en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y compararlos al marcador de peso molecular λ *Hin* dIII.

3.6 Digestión del plásmido e hibridación tipo Southern blot:

Los plásmidos pBK-CMV extraídos fueron digeridos con la enzima *EcoR*I para separar los insertos clonados. El peso molecular aproximado en kb de los fragmentos obtenidos en la digestión fueron calculados en base a la migración del marcador de peso molecular λ *Hin* dIII en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El cuadro 1 muestra las fracciones obtenidas después de digerir.

La figura 6 - A, muestra clonas seleccionadas con sueros de bovinos positivos a PPD digeridos con la enzima *EcoR*I liberando inserto de *M. bovis* del plásmido pBK-CMV ; en el carril número 1, se observa el pMb-I sin digerir con un peso molecular aproximado de 7 kb, en el carril número 2 el mismo plásmido digerido con *EcoR*I liberando un inserto de 3.8 kb; en el carril número 3 se observa el pMb-II sin digerir con un peso molecular aproximado de 9.5 kb, en el carril número 4 el mismo plásmido digerido con *EcoR*I liberando un inserto de 3 kb; en el carril número 5, se observa el pMb-III sin digerir con un peso molecular aproximado de 23 kb, en el carril número 6 el mismo plásmido digerido con *EcoR*I liberando un inserto de 2.3 kb; en el carril número 7 se localiza en marcador de peso molecular λ *Hin* dIII. La hibridación tipo Southern blot de los plásmidos sin digerir y digeridos puede observarse en

la figura 6 - B. Los carriles de las figuras 6 - A y 6 -B son correspondientes. En la figura 6 - A se observa el plásmido pBK-CMV señalado con la letra "p" de un peso molecular aproximado de 4.3 kb, mientras que en la figura 6 - B, el plásmido pBK-CMV no hibrida con la sonda de *M. bovis* marcada con biotina. Las bandas que hibridan en el Southern blot corresponden a los insertos clonados mostrados en la figura 6 - A.

La figura 7 - A, muestra las clonas seleccionadas con sueros de bovinos positivos a PPD digeridos con la enzima *EcoRI*, liberando el inserto de *M. bovis* del plásmido pBK-CMV. En el carril número 1, se observa el pMb-IV sin digerir con un peso molecular aproximado de 14 kb, en el carril número 2 el mismo plásmido digerido con *EcoRI* liberando un inserto de 2.5 kb; en el carril número 3, se observa el pMb-V sin digerir con un peso molecular aproximado de 9 kb, en el carril número 4 el mismo plásmido digerido con *EcoRI* liberando un inserto de 4 kb; en el carril número 5 se localiza el marcador de peso molecular λ *Hid III*. La hibridación tipo Southern blot de los plásmidos sin digerir y digeridos puede observarse en la figura 7 - B. Los carriles de las figuras 7 - A y 7 -B son correspondientes. En la figura 7 - A se observa el plásmido pBK-CMV señalado con la letra "p" de un peso molecular aproximado de 4.3 kb, mientras que en la figura 7 - B, el plásmido pBK-CMV no hibrida con la sonda de *M. bovis* marcada con biotina. Las bandas que hibridan en el Southern blot corresponden a los insertos clonados mostrados en la figura 7 - A.

En la figura 8 - A, muestra clonas recombinantes seleccionadas con sueros de conejo anti-PPD bovino digeridos con la enzima *EcoRI* liberando el inserto de *M. bovis* del plásmido pBK-CMV. En el carril número 1, se observa el pMb-VI sin digerir con un peso molecular aproximado de 9.3 kb, en el carril número 2 el mismo plásmido digerido con *EcoRI*, separando 6 insertos de 4.1, 3.8, 3.6, 2.5, 2.3 y 1.8 kb; en el carril número 3, se observa el pMb-VII sin digerir con un peso molecular aproximado de 9.3 kb, en el carril número 4 el mismo plásmido digerido con *EcoRI* separando 6 insertos de 4.1, 3.5, 2.5, 2.4, 2.3 y 2 kb. en el carril número 5 se localiza el marcador de peso molecular λ

Hind III. La hibridación tipo Southern blot de los plásmidos sin digerir y digeridos puede observarse en la figura 8 - B. Los carriles de las figuras 8 - A y 8 -B son correspondientes. En la figura 8 - A se observa el plásmido pBK-CMV señalado con la letra "p" de un peso molecular aproximado de 4.3 kb, mientras que en la figura 8 - B, el plásmido pBK-CMV no hibrida con la sonda de *M. bovis* marcada con biotina. Las bandas que hibridan en el Southern blot corresponden a los insertos clonados mostrados en la figura 8 - A.

En la figura 9 - A, muestra clonas recombinantes seleccionadas con sueros de conejo anti-PPD bovino digeridos con la enzima *Eco*RI, liberando el inserto de *M. bovis* el plásmido pBK-CMV. En el carril número 1, se observa el pMb-VIII sin digerir con un peso molecular aproximado de 9.2 kb, en el carril número 2 el mismo plásmido digerido con *Eco*RI separando 4 insertos de 3.5, 2.5, 2.4 y 2.2 kb; en el carril número 3, se observa el pMb-IX sin digerir con un peso molecular aproximado de 9.4 kb, en el carril número 4 el mismo plásmido digerido con *Eco*RI separando 5 insertos de 4.1, 3.8, 3.7, 2.5 y 2.3 kb; en el carril número 5 se localiza el marcador de peso molecular λ *Hind* III. La hibridación tipo Southern blot de los plásmidos sin digerir y digeridos puede observarse en la figura 9 - B. Los carriles de las figuras 9 - A y 9 -B son correspondientes. En la figura 9 - A se observa el plásmido pBK-CMV señalado con la letra "p" de un peso molecular aproximado de 4.3 kb, mientras que en la figura 9 - B, el plásmido pBK-CMV no hibrida con la sonda de *M. bovis* marcada con biotina. Las bandas que hibridan en el Southern blot corresponden a los insertos clonados mostrados en la figura 9 - A.

Las figuras 10 y 11 agrupan los resultados de digestión e hibridación tipo Southern blot de las clonas seleccionadas. En la figura 10 - A, se observan clonas recombinantes selectas con sueros de bovino positivos a PPD bovino digeridas con *Eco*RI; se observan 3 bandas por cada carril, la de mas alto peso molecular corresponde al plásmido recombinante sin digerir, la banda del centro corresponde al plásmido pBK-CMV y la banda de menor peso molecular corresponde a los insertos de *M. bovis* clonados; en el carril número 2 se observa el pMb-I con un peso molecular estimado de 7 kb y el

inserto clonado de 3.8 kb, en el carril número 3 corresponde al pMb-II con un peso molecular de 9.5 kb y el inserto clonado de 3 kb, en el carril número 4 se encuentra el pMb-III con 23 kb y el inserto clonado de 2.3 kb de peso, el carril número 5 corresponde al pMb-IV con un peso de 14 kb y un inserto clonado de 2.5 kb y en el carril número 6 se localiza el pMb-V con un peso molecular de 9 kb y un inserto clonado de 4 kb; en los carriles 2, 3, 4, 5 y 6 muestran una banda del mismo peso molecular aproximado a 4.3 kb la cual corresponde al vector sin el inserto clonado. El carril 1 y 7 muestra el marcador de peso molecular λ *Hin* d III. La hibridación tipo Southern blot de los plásmidos sin digerir y digeridos puede observarse en la figura 10 - B. Los carriles de las figuras 10 - A y 10 -B son correspondientes. En la figura 10 - A se observa el plásmido pBK-CMV señalado con la letra "p" de un peso molecular aproximado de 4.3 kb, mientras que en la figura 10 - B, el plásmido pBK-CMV no hibrida con la sonda de *M. bovis* marcada con biotina. Las bandas que hibridan en el Southern blot corresponden a los insertos clonados mostrados en la figura 10 - A.

La figura 11 - A, muestra clones recombinantes selectas con sueros de conejo anti-PPD bovino digerido con *Eco*Rl. Las bandas de mayor peso molecular corresponde al plásmido recombinante sin digerir, la banda siguiente corresponde al plásmido pBK-CMV y las banda de menor peso molecular corresponde a los insertos de *M. bovis* clonados; en el carril número 2 se localiza en pMb-VI con un peso molecular aproximado de 9.3 kb y múltiples bandas clonadas de 4.1, 3.8, 3.6, 2.5, 2.3 y 1.8 kb; en el carril número 3 se encuentra el pMb-VII mostrando un peso molecular de 9.3 kb y 6 insertos de 4.1, 3.5, 2.5, 2.4, 2.3 y 2 kb; en el carril número 4 se localiza el pMb-VIII con un peso molecular de 9.2 kb y los insertos clonados de 3.5, 2.5, 2.4 y 2.2 kb; en el carril número 5 se encuentra el pMb-IX con un peso molecular de 9.4 kb y 5 insertos de 4.1, 3.8, 3.7, 2.5 y 2.3 kb; en los carriles 2, 3, 4 y 5 kb, muestran una banda de DNA con un peso molecular de 4.3 kb, el cual corresponde al vector libre del inserto de *M. bovis*. El carril 1 y 6 muestra el marcador de peso molecular λ *Hin* dIII. La hibridación tipo Southern blot de

los plásmidos sin digerir y digeridos puede observarse en la figura 11 - B. Los carriles de las figuras 11 - A y 11 -B son correspondientes. En la figura 11 - A se observa el plásmido pBK-CMV señalado con la letra "p" de un peso molecular aproximado de 4.3 kb, mientras que en la figura 11 - B, el plásmido pBK-CMV no hibrida con la sonda de *M. bovis* marcada con biotina. Las bandas mostradas en la radiografía que hibridan en el Southern blot corresponden a los insertos clonados mostrados en la figura 11 - A.

4. DISCUSIÓN

Como resultado del impacto económico y en salud pública que ocasiona la tuberculosis, se han desarrollado métodos para el diagnóstico y control de esta enfermedad; sin embargo debido a las características propias del género *Mycobacterium*, los métodos actuales para su detección, control y eliminación suelen ser tardados o no precisos en algunos casos (5, 10, 28). El uso de herramientas como la biología molecular, puede ser una alternativa confiable, ya que permite el desarrollo de nuevos métodos para una más certera y rápida detección del agente (16, 25). Las principales metas son detectar genes que sean capaces de inducir una buena inmunidad, ya sea para el desarrollo de nuevas tecnologías en el diagnóstico o para inmunización (26).

Los proyectos de mapeo genómico hasta hace poco, se han enfocado exclusivamente a genes específicos o a un blanco regional (48); para poder tener una visión más amplia y mayor oportunidad de conocer otros antígenos, se ha recurrido a la construcción de bibliotecas genómicas, donde el principal objetivo es el de mantener el mayor número de genes posibles del genoma con la finalidad de que sea representado en su totalidad (49). Actualmente Cole y colaboradores han secuenciado el genoma completo de *M. tuberculosis*, el cual tiene 4,000 genes en 4,411,529 pares de bases (50) esta información no coincide con lo descrito por McFadden quien estima un tamaño de *M. bovis* de 3.1×10^9 pb (26); esta diferencia en el tamaño de los genomas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* dada a conocer tanto por McFadden y Cole respectivamente, la eficiencia de representación de los genes clonados en las bibliotecas genómicas construídas podrían verse afectadas; no obstante aunque se conoce el tamaño del genoma de *M. tuberculosis* el cual es muy similar a *M. bovis*, debería haber diferencias que no afectarían la estimación en el tamaño de las bibliotecas construídas con *M. bovis*. La secuenciación de *M. tuberculosis* es de gran ayuda para las futuras

investigaciones lo cual permitirá comparar genes clonados ya sea aleatoriamente o seleccionados a partir de una biblioteca genómica .

Actualmente se han construido bibliotecas genómicas de diferentes especies del género *Mycobacterium*; Thole y colaboradores construyeron una biblioteca genómica de *M. bovis* BCG y con anticuerpos monoclonales seleccionaron una proteína de 65 Kda la cual fue reconocido por linfocitos T, esta proteína está propuesta como antígeno para vacunación (51); de igual manera Oftuna y colaboradores construyeron una biblioteca en λ gt 11 de *M. tuberculosis* y seleccionaron 3 proteínas de 65, 19 y 14 Kda (52); otro ejemplo fueron Young y colaboradores quienes construyeron otra biblioteca en λ gt 11 de *M. tuberculosis* sin embargo en este caso los fragmentos clonados fueron tomados sin seleccionar las fracciones a clonar (53); Andersen y colaboradores (54) utilizaron la misma técnica que Young. La biblioteca genómica construida para este trabajo, fue clonada en λ Zap Express y se calculó su representación de acuerdo con el tamaño del genoma reportado por McFadden (26) y de acuerdo a este dato se estimó que la biblioteca construida de *M. bovis* está representada en un 99 %; el hecho de tener este porcentaje nos da mayor oportunidad de obtener genes que codifiquen para antígenos inmunoreactivos.

La selección de clonas recombinantes se ha realizado utilizando sondas de DNA marcadas dirigidas a un sitio blanco del genoma como lo describe Haeseleer y colaboradores, Mong y colaboradores (55, 56), o bien a través de anticuerpos monoclonales específicos dirigidos hacia a una proteína recombinante ya conocida (42, 45, 47), sin embargo cuando se quiere encontrar y estudiar genes no conocidos, se utilizan sueros policlonales para captar una mayor cantidad de genes involucrados en los procesos de interés. El uso de sueros policlonales fue inicialmente utilizado por Young y colaboradores (a y b) (56, 57) y posteriormente por Tripp y colaboradores (58) quienes describen buenos resultados en el tamizado de bibliotecas genómicas utilizando esta técnica.

En el tamizado de las bibliotecas genómicas de *Mycobacterium* construidas por Thole y colaboradores (51), Young y colaboradores (53) y Andersen y colaboradores (54), utilizaron sueros de animales infectados con tuberculosis para la selección de proteínas recombinantes; por otro lado, Oftung y colaboradores (52) utilizaron anticuerpos monoclonales para este fin. La utilización de los sueros de bovino positivos a PPD y sueros de conejo anti-PPD bovino para la selección de clonas recombinantes de la biblioteca genómica de *M. bovis* construida en este trabajo, permitió la identificación por inmuno-blot de las clonas que expresan proteínas recombinantes de *M. bovis*.

El tamaño de los insertos clonados fue determinado mediante digestión del vector pBK-CMV con *EcoRI*. En el caso de las clonas seleccionadas con sueros de bovinos positivos a PPD, se observaron 2 bandas discretas por clona, después de la digestión con *EcoRI*. Estas bandas incluyen una de 4.3 kb correspondiente al plásmido, y las bandas de 3.8, 3, 2.3, 2.5 y 4 kb correspondientes a cada uno de los fragmentos clonados, las cuales fueron identificadas por análisis tipo Southern blot con una sonda cruda biotinilada de *M. bovis*. Sin embargo, con las clonas selectas con los sueros de conejo anti-PPD bovino, además de la banda correspondiente al plásmido, se encontraron múltiples bandas entre 1.8 y 4.1 kb de peso molecular, las cuales hibridan específicamente a la sonda de *M. bovis* en Southern blot. Este resultado fue inesperado puesto que el ADN con que se construyó la biblioteca fue parcialmente digerido con *EcoRI* por lo cual los sitios *EcoRI* en el inserto son poco probables. Por otra parte el vector de clonación pBK-CMV tiene un sitio *EcoRI* único, en el cual fueron ligadas las fracciones de *M. bovis*, por lo que se esperaba observar solo dos bandas después de la digestión con esta enzima; una correspondiente al plásmido de 4.3 kb y otra al inserto. La presencia de varias bandas, podría ser debido a que al momento de ligar las fracciones DNA al vector, pudieron haberse incluido varias fracciones entre sí, es decir más de un inserto por clona. El ligado de los fragmentos de DNA al vector de clonación, está influenciado por la concentración de DNA; si la concentración del DNA en la reacción es baja se favorece la recircularización

del vector y la eficiencia de ligación disminuye; lo contrario ocurre en altas concentraciones de DNA, el producto inicial del ligado podrían ser dímeros o grandes oligómeros del vector (42). Otra posibilidad es la inclusión de un fragmento de DNA de *Mycobacterium* de alto peso molecular conteniendo secuencias repetidas que pudieran incluir sitios *EcoRI*.

Para poder determinar si el DNA clonado en el vector Lambda pertenece al genoma de *M. bovis*, se realizó la técnica de hibridación descrita por Southern (57), donde el DNA del microorganismo de interés es fijado en membranas de nylon y otra parte del DNA es marcado ya sea con métodos radioactivos o no radioactivos con la finalidad que después de someterlos ambos a un proceso de desnaturalización, en el que si son complementarias se unan y puedan observarse en una radiografía. Los insertos de las clonas seleccionadas con sueros de bovino positivos a PPD y con sueros de conejo anti-PPD bovino, hibridaban específicamente con el DNA marcado de *M. bovis*. Esta sonda de *M. bovis* no hibridó con la banda de aproximadamente 4.3 kb que corresponde al vector; esto nos indica que las fracciones de DNA clonadas en λ Zap Express corresponden a fracciones del genoma de *M. bovis* seleccionadas a partir de la biblioteca genómica y que excluye cualquier DNA extraño, que es lo que ocurre con el DNA del fago Lambda.

Los pesos moleculares aproximados de las clonas selectas, pueden variar en los diferentes ensayos; un ejemplo de este acontecimiento se observa en las bandas del vector pBK-CMV, el cual tiene un peso de 4.5 kb, sin embargo al compararlo con el marcador de peso molecular λ *Hin* dIII, corresponde a un peso molecular de 4.3 kb. Las principales razones para que fracciones conocidas de un determinado peso molecular se observen en otro peso, puede deberse a que todas las extracciones fueron hechas con la técnica de extracción de plásmido "Maxi Prep", en la cual se usan altas concentraciones de sales que afectan el corrimiento electroforético; otros factores pueden ser la concentración y conformación del DNA las cuales varía el patrón de migración y por último otro factor que afectan la migración, especialmente en el caso de plásmidos, es el estado físico en que se

encuentra ya sea superenrollado que migra mas rápido que relajado, (39, 45); estos factores influyen significativamente en los tamaños calculados para los plásmidos clonados, a los cuales se les asignó un valor más aproximado por comparación con la migración del marcador de peso molecular λ *Hin* dIII pero podría haber alguna variación.

Las clonas seleccionadas, podrían ser evaluadas en cuanto a su capacidad de inducir una respuesta inmune en una vacuna de DNA como lo ha descrito Tascon y colaboradores (58) y Huygen y colaboradores (59), quienes han probado una proteína de 65 kDa y antígeno 85 respectivamente de *M. bovis* BCG, donde Tascon sugiere que la vacunación con DNA podría reemplazar a la vacuna con *M. bovis* BCG convencional. Las clonas también podrían ser utilizadas como sondas para hibridar con diferentes especies de *Mycobacterium* para conocer si discrimina alguna de ellas, principalmente con *M. avium* que está incluida dentro del complejo tuberculosis, esto podría ser de utilidad en pruebas diagnósticas. Otra función de estas clonas puede ser secuenciarlas, conociendo la secuencia podrias diseñar iniciadores de para PCR que funcionarían bien si es una secuencia repetitiva y específica de *M. bovis* y determinar para que codifican y si es para una proteína de tipo estructural, expresarlo en *E. coli* y el producto resultante, utilizarlo como antígeno de captura para valorar la respuesta inmune humoral, como podrían ser a través de técnicas como el ELISA o bien para intradermoreacción. La elección alternativa de cualquiera de estos procesos, puede brindar alternativas para la detección y el control de la tuberculosis bovina.

5. CUADROS Y FIGURAS

Cuadro No. 1 Plásmidos pBk-CMV clonados con fracciones de *M. bovis* mostrando sus pesos moleculares y el peso molecular de las fracciones clonadas de *M. bovis* en cada uno.

Plásmido pBk-CMV	Peso molecular del plásmido (kb)	Fracciones clonadas de <i>M. bovis</i> (kb)
pMb-I	7	3.8
pMb-II	9.5	3
pMb-III	23	2.3
pMb-IV	14	2.5
pMb-V	9	4
pMb-VI	9.3	4.1
		3.8
		3.6
		2.5
		2.3
pMb-VII	9.3	1.8
		4.1
		3.5
		2.5
		2.4
pMb-VIII	9.2	2.3
		2
		3.5
		2.5
pMb-IX	9.4	2.4
		2.2
		3.5
		3.8
		2.3

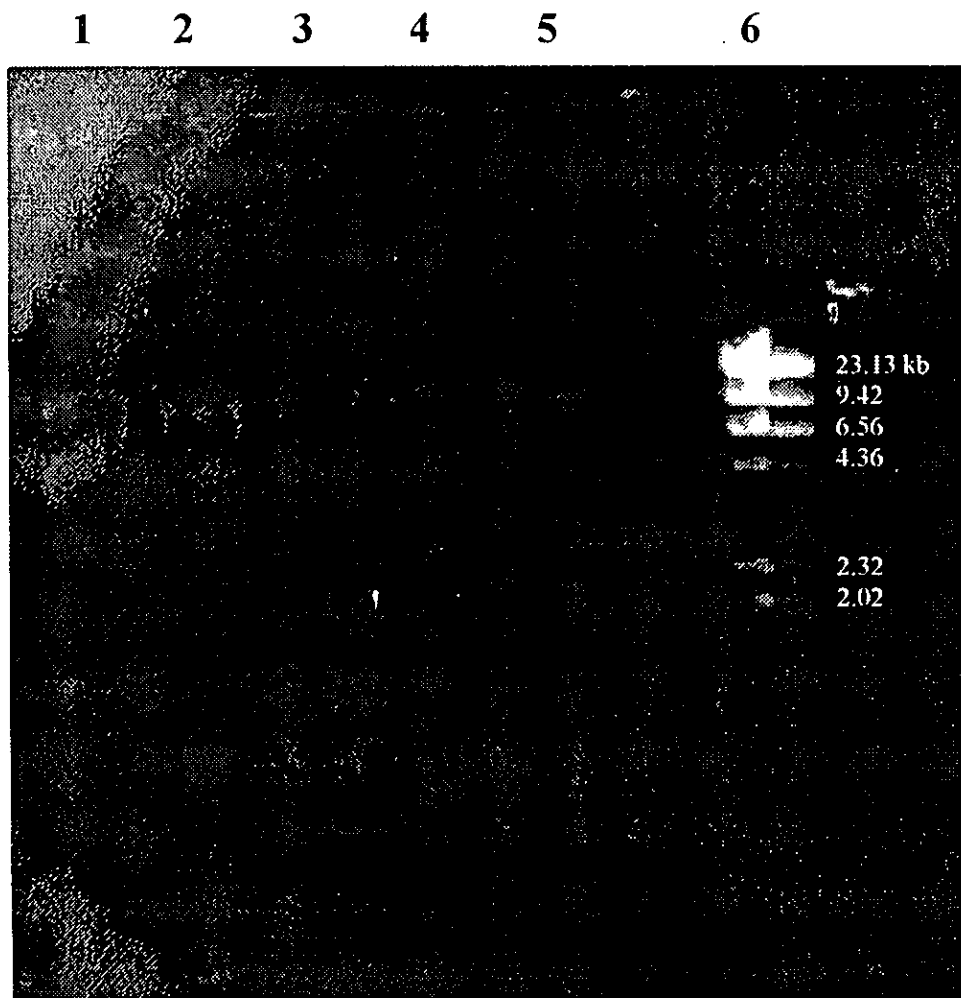


Figura 1. Optimización de la concentración de la enzima de restricción *EcoRI*. Carril 1, 10 U/μl de *EcoRI*. Carril 2, 5 U/μl. Carril 3, 2.5 u/μl. Carril 4, 1.5 U/μl. Carril 5, 0.625 U/μl. Carril 7, marcador λ *Hin* dIII.

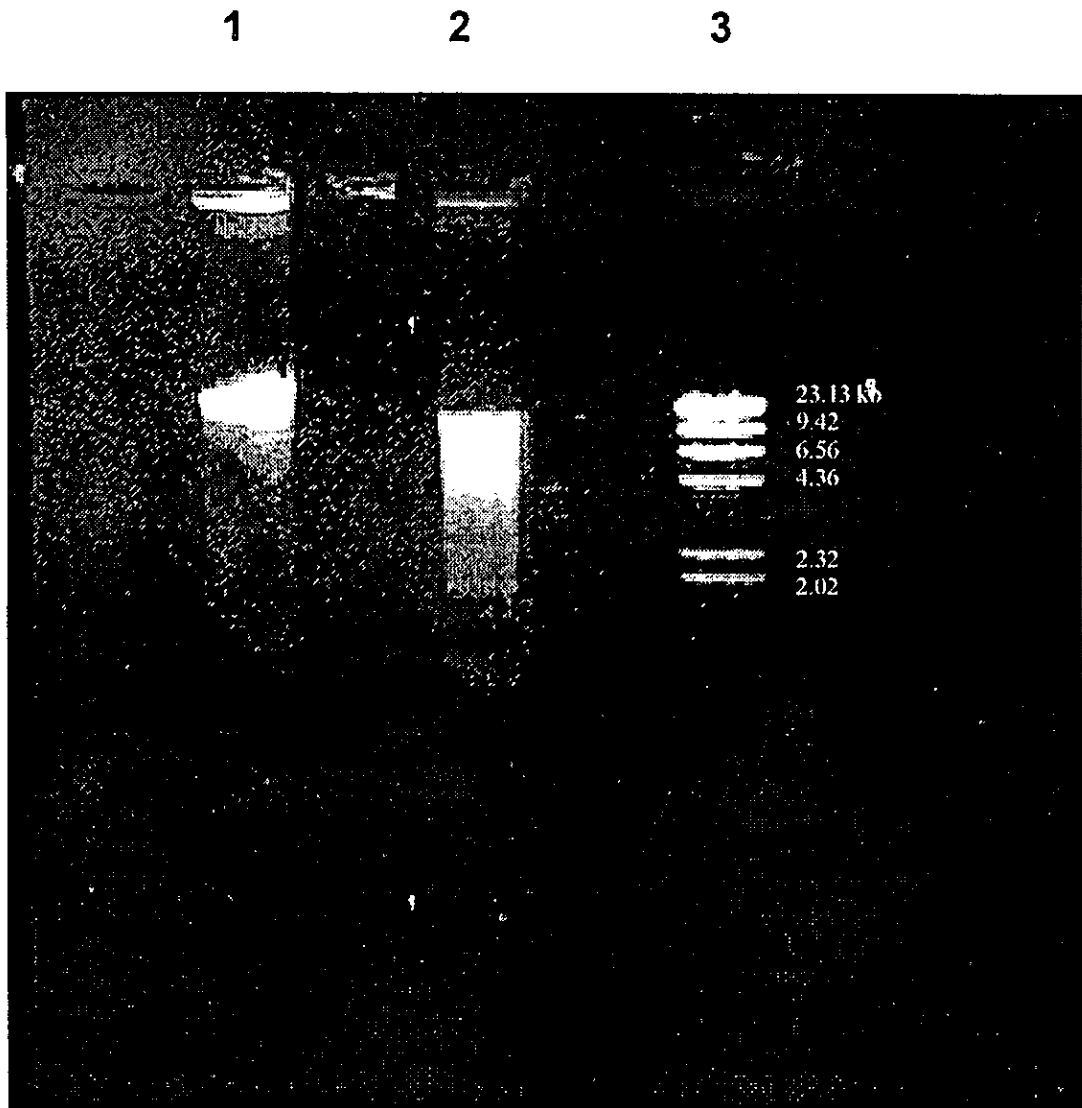


Figura 2. Digestión parcial de DNA genómico de *M. bovis*. Carril 1, DNA genómico de *M. bovis* a una concentración estimada de 250 ng/ μ l. Carril 2, DNA de *M. bovis* digerido con la enzima *EcoRI*. Carril 3, marcador de peso molecular λ *Hin* dIII.

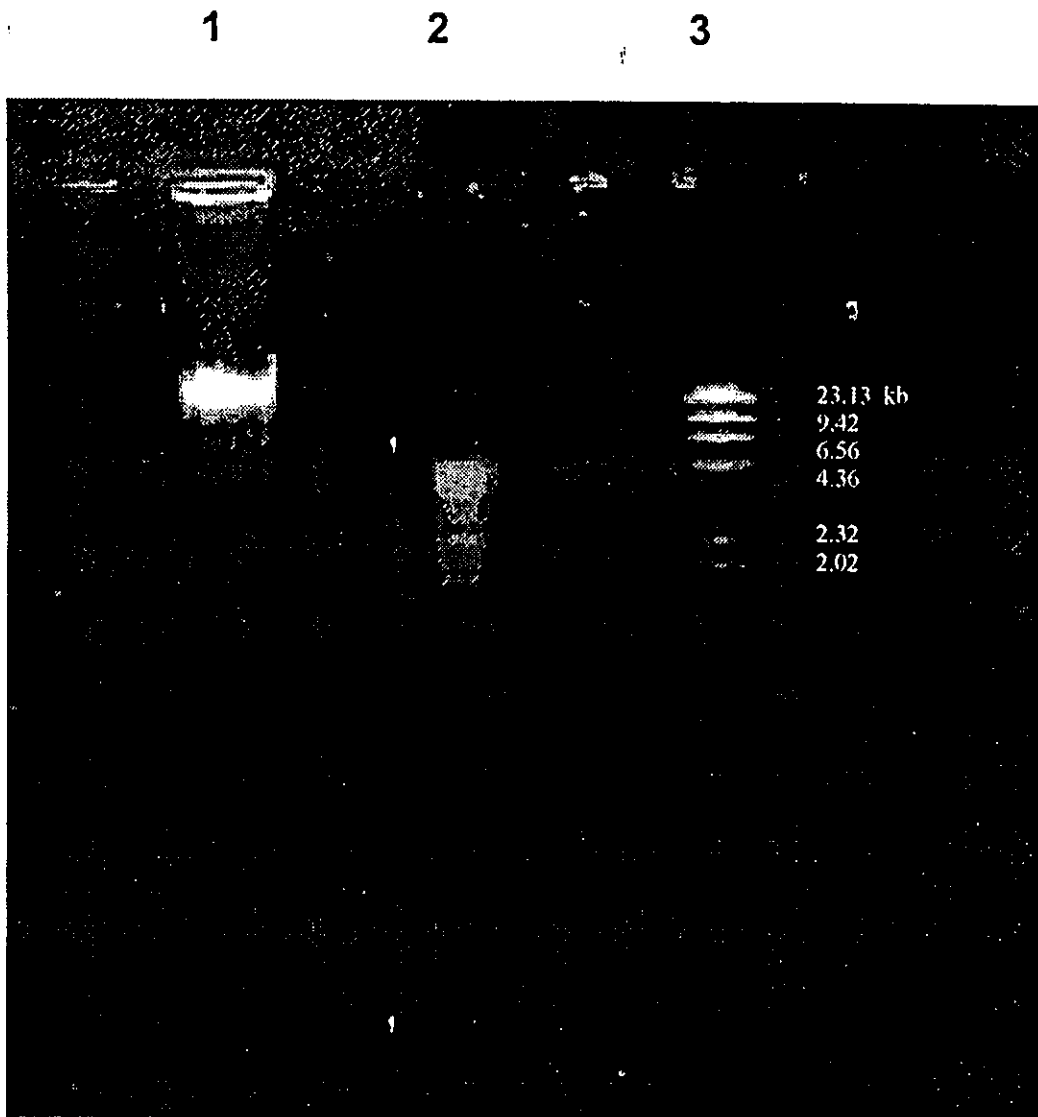


Figura 3. Selección de fracciones de DNA genómico de *M. bovis* digeridas parcialmente con la enzima *Eco*RI. Carril 1, DNA genómico de *M. bovis*. Carril 2, fracciones del genoma de *M. bovis* con sitios de corte *Eco*RI seleccionados por electroelución entre 2 y 4 kb. Carril 3, marcador de peso molecular λ *Hin* dIII.

1 2 3 4

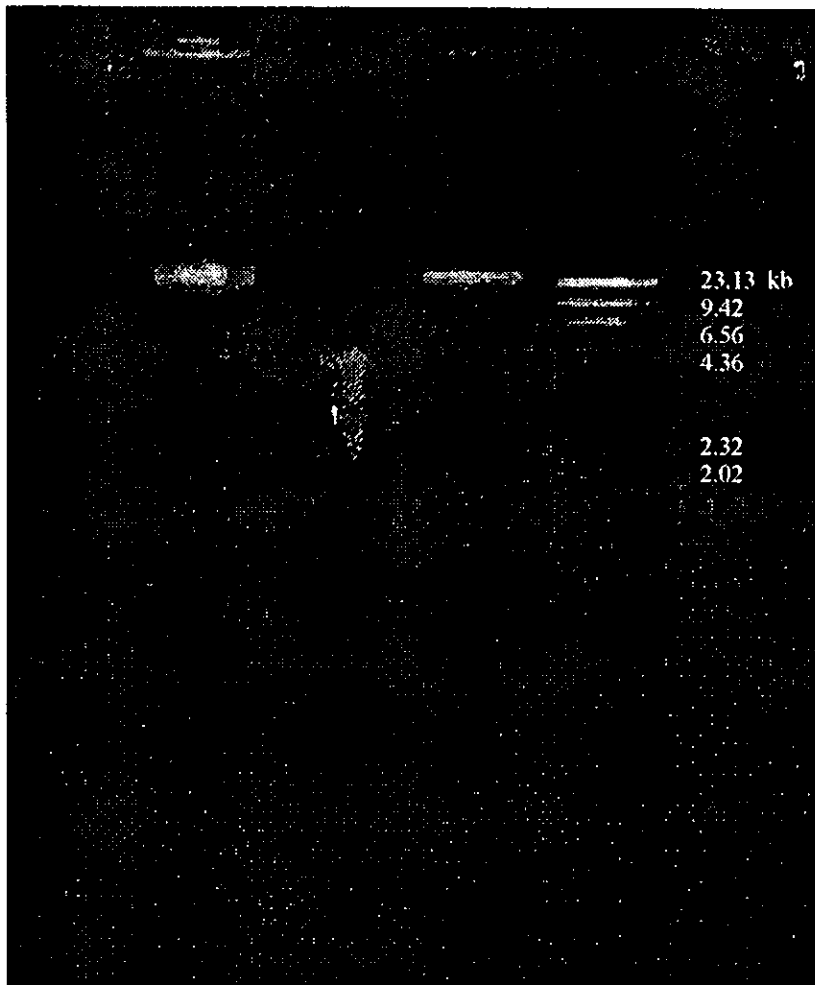
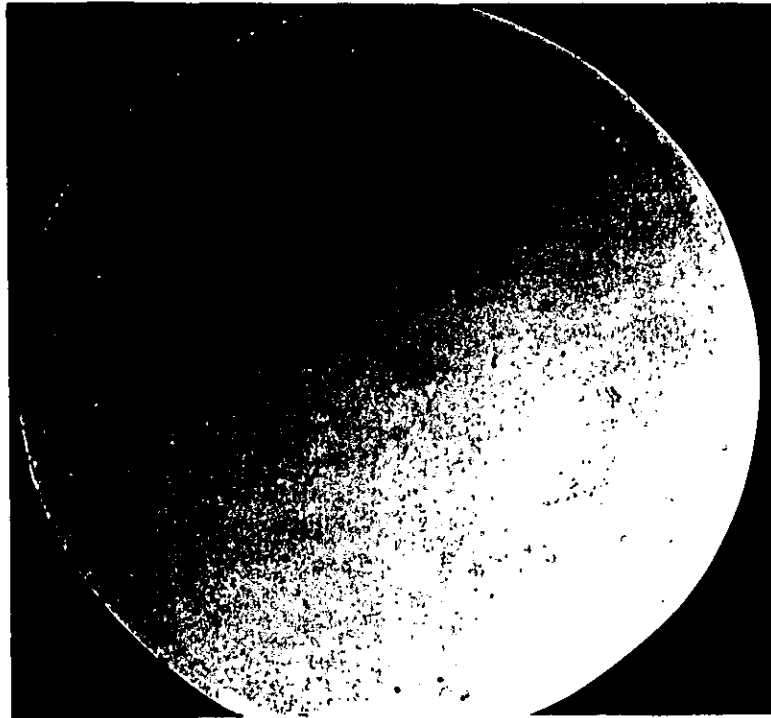


Figura 4. Ligado de fragmentos seleccionados al vector λ ZAP Express. Carril 1, DNA genómico de *M. bovis*. Carril 2, fracciones seleccionadas entre 2 y 4 kb. Carril 3, fragmentos de DNA ligados a los brazos del λ ZAP Express. Carril 4, marcador de peso molecular λ *Hin* dIII.

A)



B)

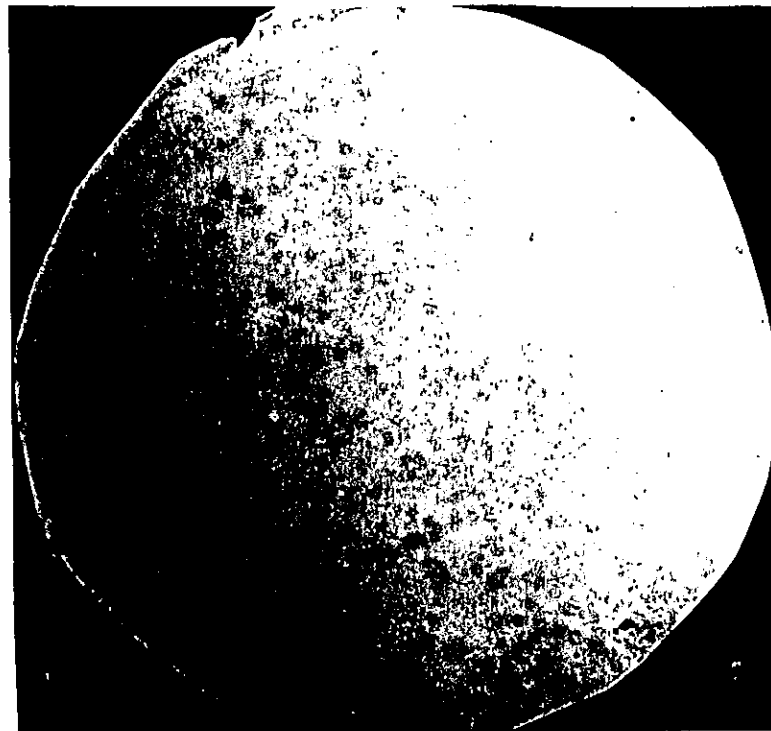


Figura 5. Clonas recombinantes de *M. bovis* seleccionadas mediante inmunoafinidad y detectadas por proteína G conjugada a peroxidasa con señal de color de alta intensidad en análisis de Western blot. A) Tamizado primario; B) Tamizado final.

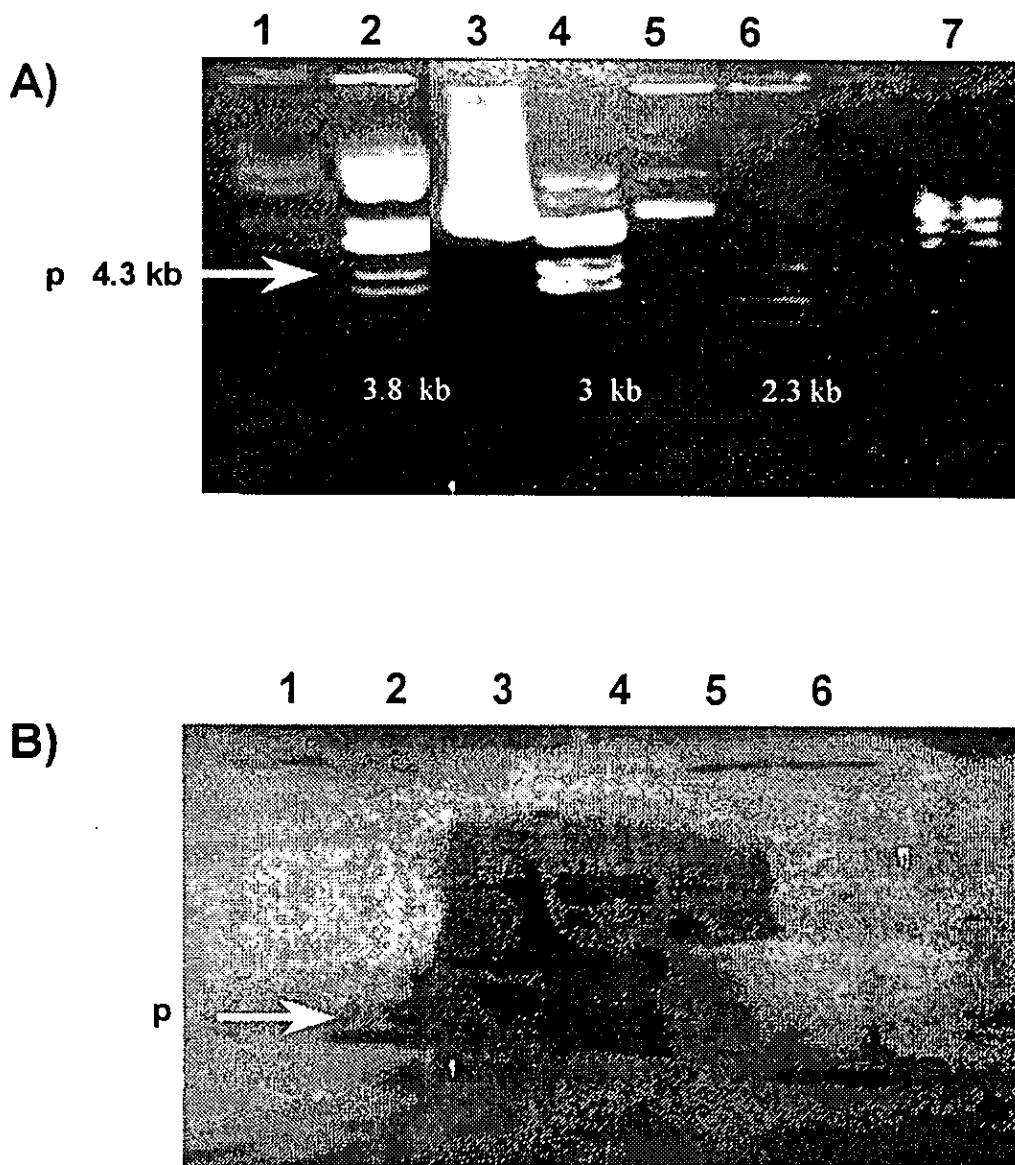


Figura 6. Clonas recombinantes seleccionadas con sueros de bovinos positivos a PPD bovino. Plásmido pBK-CMV digerido con *EcoRI* mostrando las fracciones clonadas de *M. bovis* y la hibridación Southern blot . A) Carriles 1, 3, y 5, plásmidos sin digerir. Carriles 2, 4 y 6, plásmidos digeridos mostrando las fracciones clonadas. B) Suthern blot mostrando las fracciones que hibridan específicamente con una sonda marcada *M. bovis* y el plásmido pBK-CMV (p) que no hibrida. Carril 5 marcador de peso molecular λ *Hin* dIII. Plásmidos: pMb-I (1 y 2), pMb-II (3 y 4), pMb-III (5 y 6), pMb-IV (4), pMb-V (5).

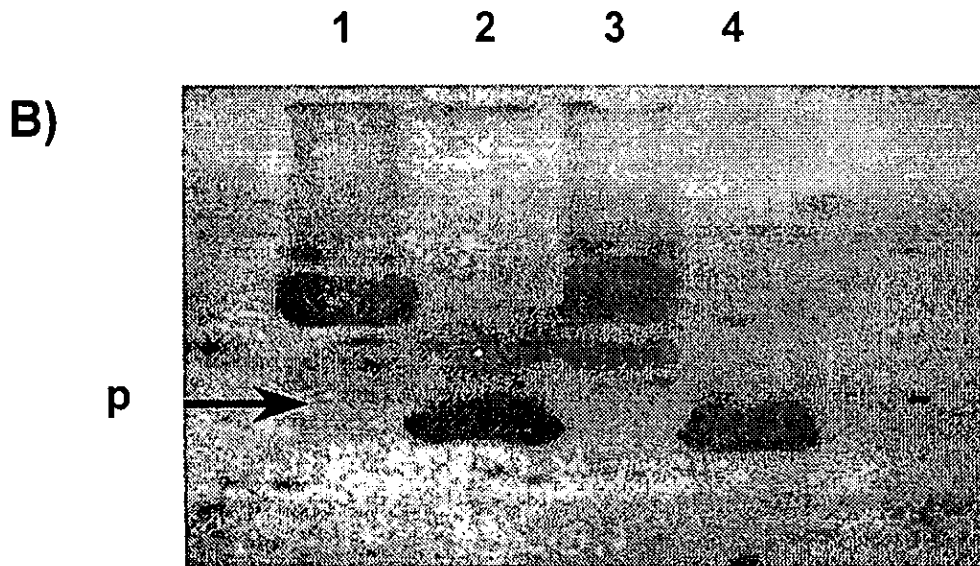
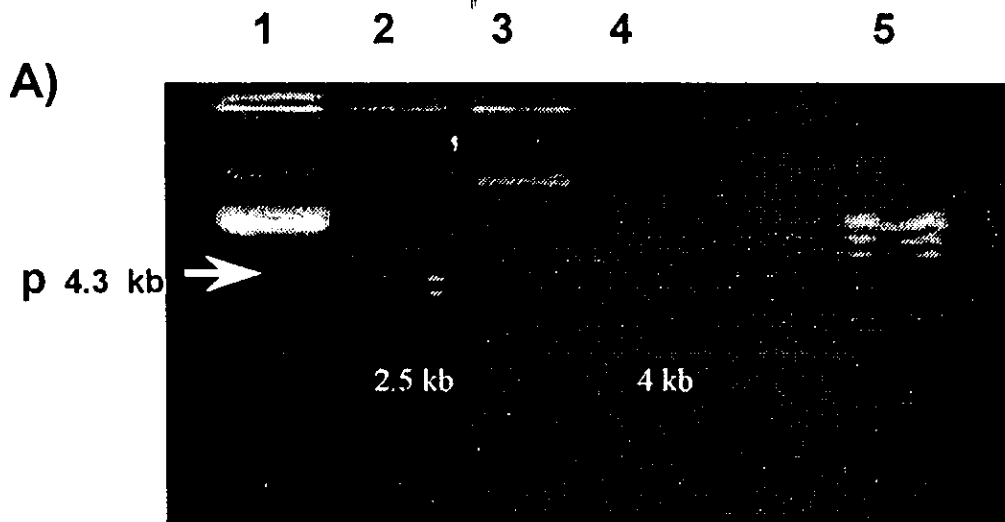


Figura 7. Clonas recombinantes seleccionadas con sueros de bovinos positivos a PPD bovino. Plásmido pBK-CMV digerido con *EcoRI* mostrando las fracciones clonadas de *M. bovis* y la hibridación Southern blot . A) Carriles 1 y 3, plásmidos sin digerir. Carriles 2 y 4, plásmidos digeridos mostrando las fracciones clonadas. B) Southern blot mostrando las fracciones que hibridan específicamente con una sonda marcada *M. bovis* y el plásmido pBK-CMV (p) que no hibrida. Carril 5 marcador de peso molecular λ *Hin* dIII. Plásmidos: pMb-IV (1 y 2), pMb-V (3 y 4).

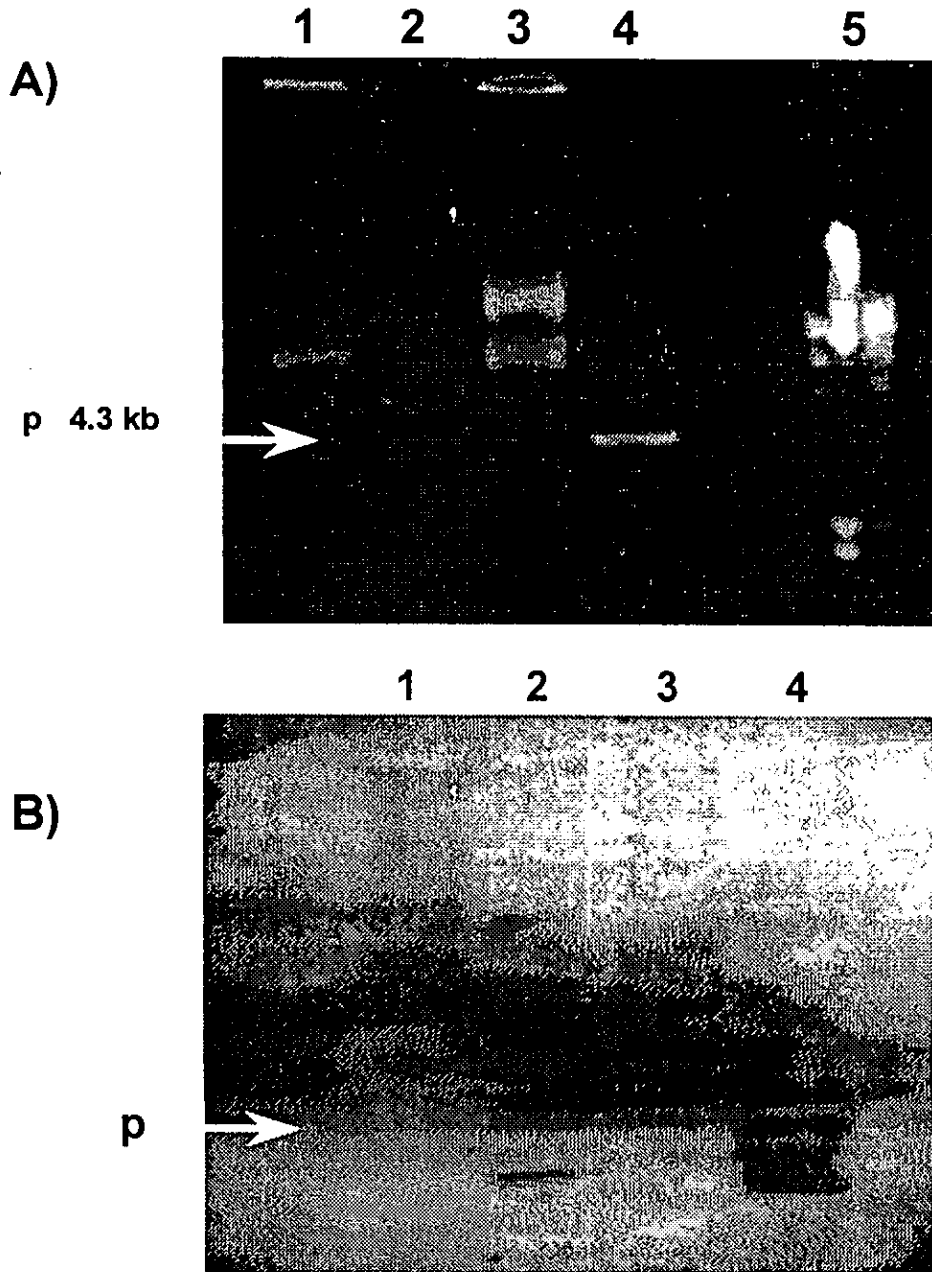


Figura 8. Clonas recombinantes seleccionadas con sueros de conejo anti-PPD bovis. Plásmidos pBK-CMV digerido con *Eco*RI mostrando las fracciones clonadas de *M. bovis* y la hibridación Southern blot. A) Carriles 1 y 3, plásmidos sin digerir. Carriles 2 y 4, plásmidos digeridos mostrando las fracciones clonadas. B) Suthern blot mostrando las fracciones que hibridan específicamente con una sonda marcada *M. bovis* y el plásmido pBK-CMV (p) que no hibrida. Carril 5 marcador de peso molecular λ *Hin* dIII. Plásmidos: pMb-VI (1 y 2), pMb-VII (3 y 4).

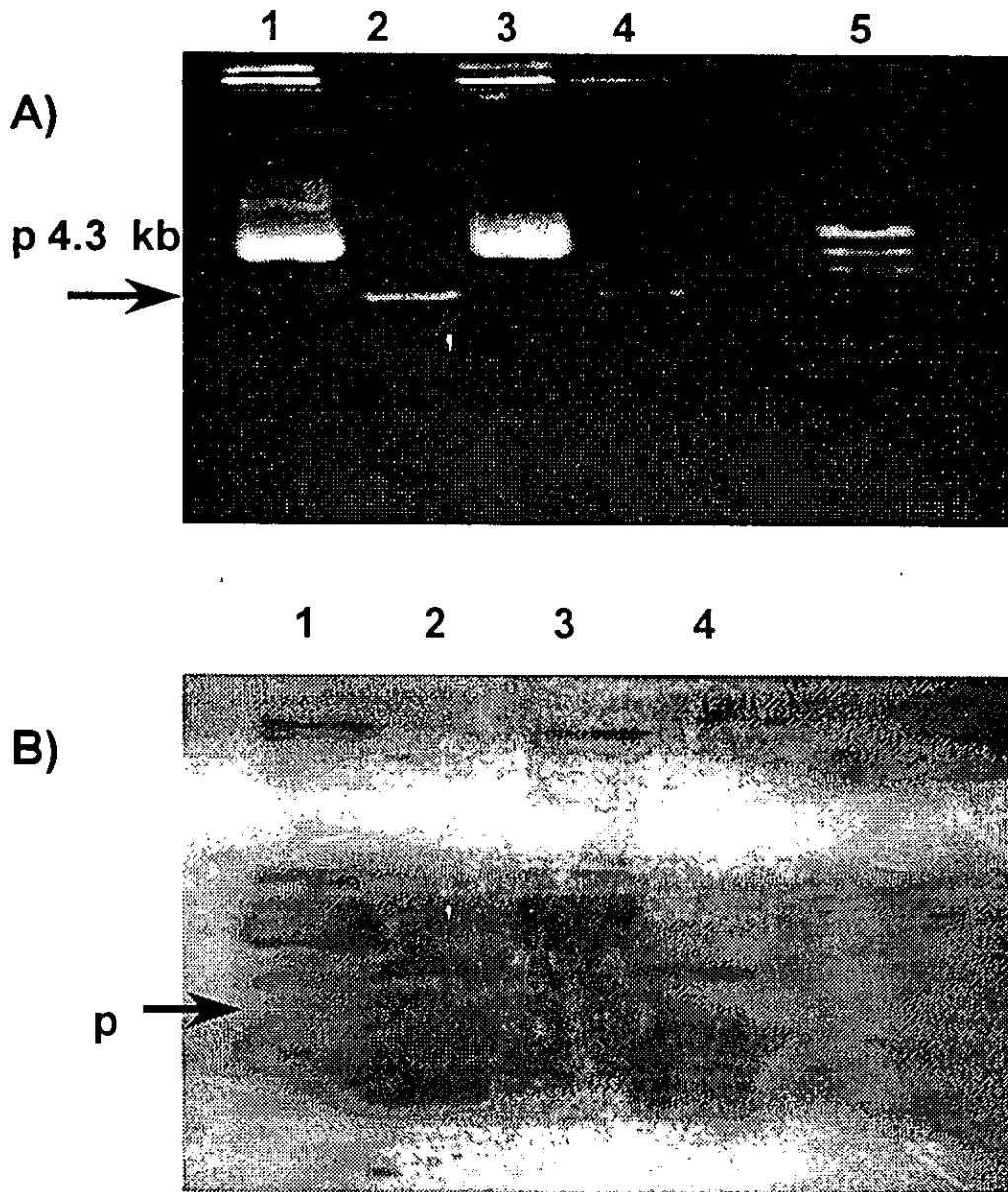


Figura 9. Clonas recombinantes seleccionadas con sueros de conejo anti-PPD bovis. Plásmidos pBK-CMV digerido con *EcoRI* mostrando las fracciones clonadas de *M. bovis* y la hibridación Southern blot. A) Carriles 1 y 3, plásmidos sin digerir. Carriles 2 y 4, plásmidos digeridos mostrando las fracciones clonadas. B) Suthern blot mostrando las fracciones que hibridan específicamente con una sonda marcada *M. bovis* y el plásmido pBK-CMV (p) que no hibrida. Carril 5 marcador de peso molecular λ *Hin* dIII. Plásmidos: pMb-VIII (1 y 2), pMb-IX (3 y 4).

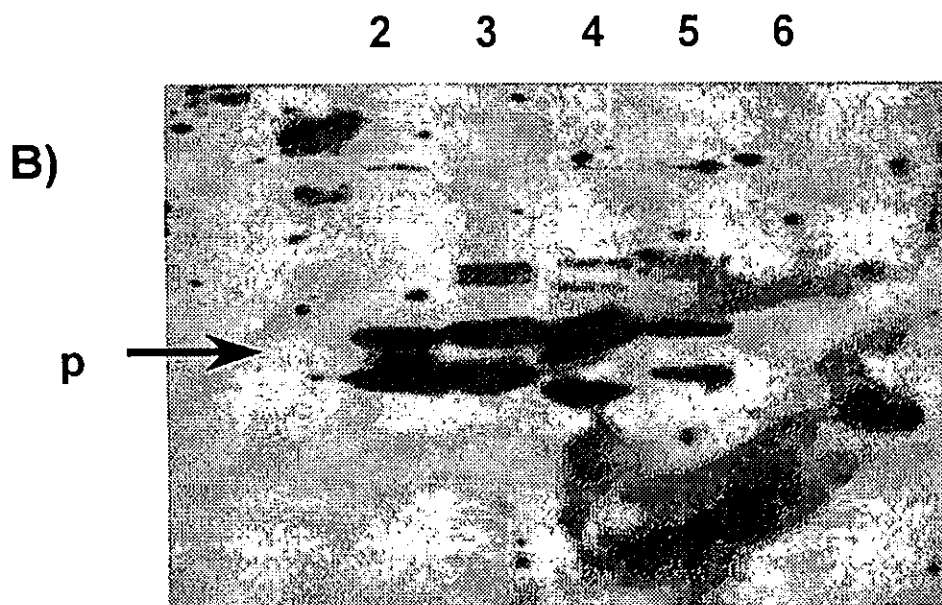
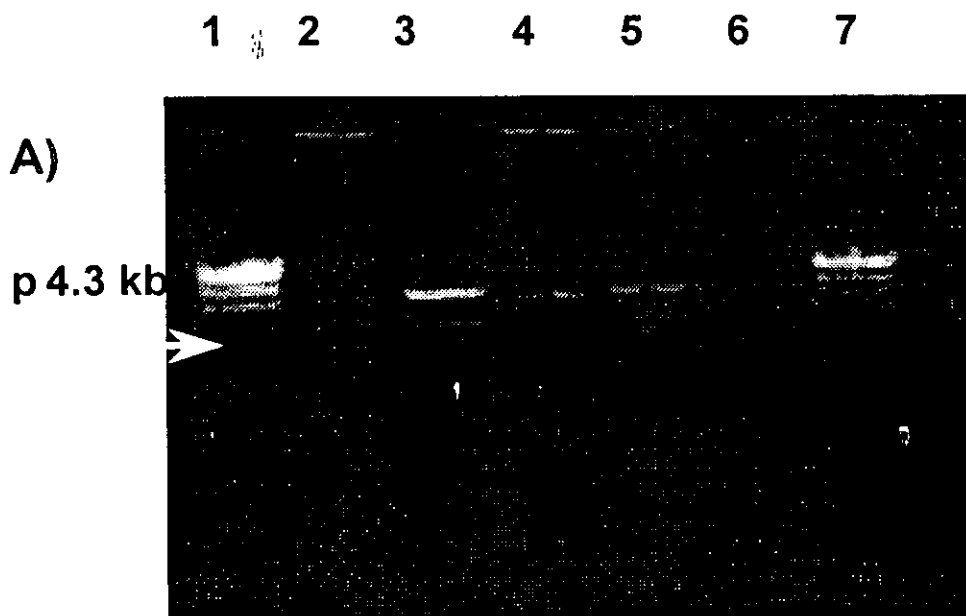


Figura 10. Clonas recombinantes digerido con *EcoRI* mostrando sus pesos moleculares. A) Clonas selectas con sueros de bovinos positivos a PPD; Carriles 2, 3, 4, 5 y 6 plásmidos pMb-I, pMb-II, pMb-III, pMb-IV y pMb-V respectivamente, carriles 1 y 7 marcador de peso molecular λ *Hin* dIII; B) Radiografía del Southern blot correspondiente a parte A..

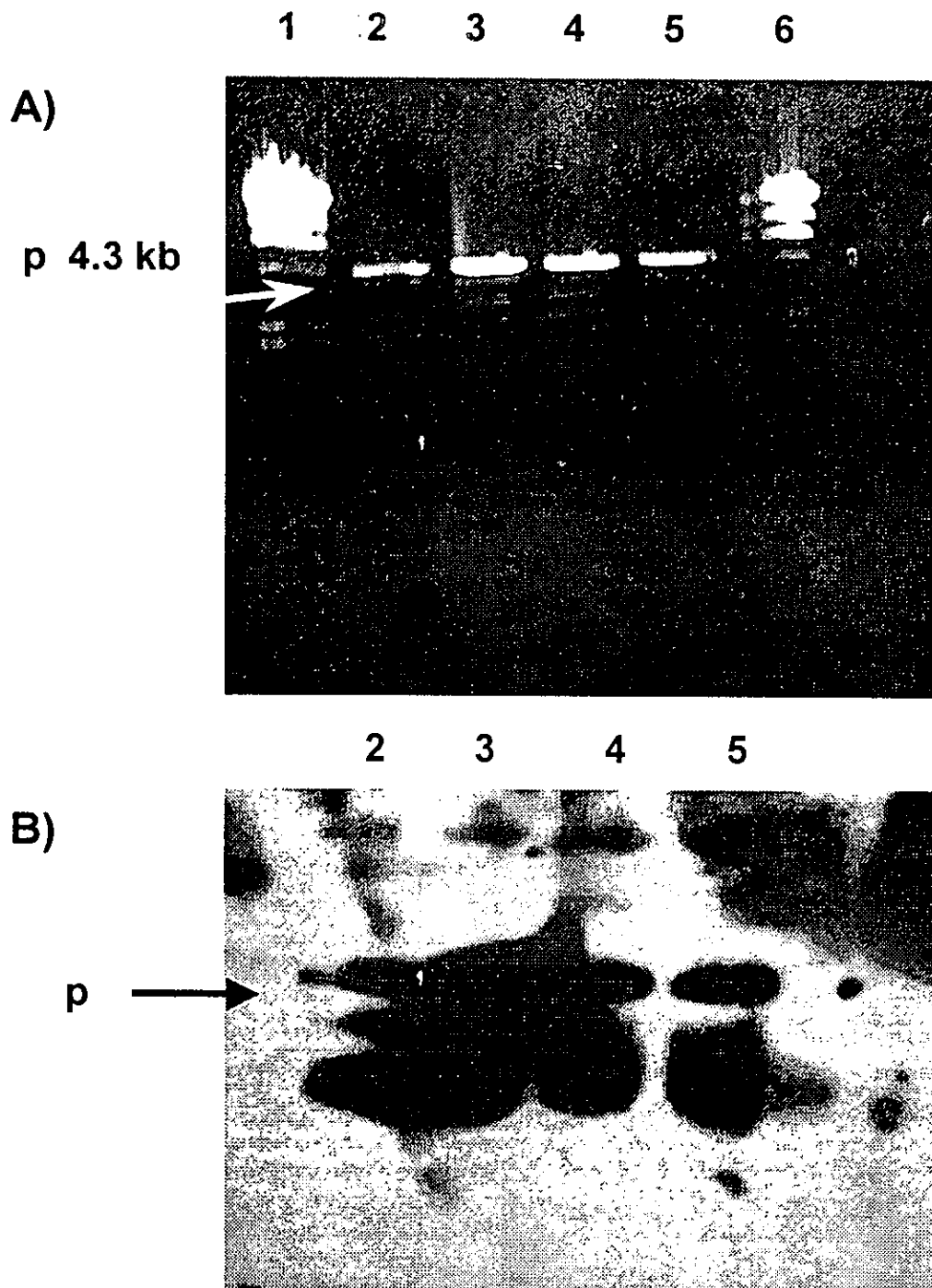


Figura 11. Clonas recombinantes digerido con *Eco*RI mostrando sus pesos moleculares. A) Clonas selectas con sueros de conejo anti-PPD bovino; Carriles 2, 3, 4 y 5 , plásmidos pmB-VI, pMb-VII, pMb-VIII y pMb-IX, carriles 1 y 6 marcador de peso molecular λ *Hin* dIII. B) Radiografía del Southern blot correspondiente a parte A.

6. LITERATURA CITADA

1. Mateos-Poumian, A. 1996. Situación epizootiológica de la tuberculosis bovina en México. Memoria de la 5ª. Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal 1996. Secretaría de Agricultura Ganadería Recursos Hidraulicos, México D. F., México, pp. 146-155.
2. Perumaalla, V. S., L. G. Adams, J. B. Payeur, J. L. Jarnagin, D. R. Baca, F. Suarez-Güemes, and T. A. Ficht. 1996. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* in Texas and Mexico. *Jour. Clin. Microbiol.* 34:2066-2071
3. Levison, W.E. , Jawetz E., 1992. Microbiología e Inmunología. México: Ed. *Manual Moderno* , p 96,179,179.
4. Robbins S. L., Cotran R. S., 1985. Patología funcional y estructural. 2ª. ed; México. Ed. *Interamericana*. p 793, 794, 795.
5. Freeman, B.A., 1991. Microbiología de Burrows. 22a. ed., México: Ed. *Interamericana* , p 691-693, 700, 703.
6. Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg E.A., 1987. Microbiología Médica. 12a. ed., México: Ed. *Manual Moderno.*, 215-217
7. Brock T.D., Smith D.W., Nadrigan M.T., 1987. Microbiología. 4a. ed., México: Ed. *Prentice Hall.*, p 127-129
8. Acha P. N., Szyfres B., 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. 2a. ed., U.S.A.: *Publicación Científica, Organización Panamericana de la Salud.* , 174-177.
9. Koneman E.W, Allen S.D, Dowell V.R, Janda W.M, Sommers H.M, Winn W.C, 1992. Diagnóstico Microbiológico. 3a. ed., Argentina: Ed. *Panamericana*, p 418, 433-435.

10. Lenette E.M, Spaulding A, Truant W.J, 1974. Manual of Clinical Microbiology. 2a. ed., U.S.A.: *Edited by American Society for Microbiology.* p 216, 217, 236
11. Barón E., Fineguid S., 1990. Diagnostic Microbiology. 8a. ed., U.S.A.: *Ed. Mosby Company.* P 127 - 129
12. Carter, Chengappa, 1994. Bacteriología y Micología Veterinaria. 2a. ed., México: *Ed. Manual Moderno,* p 202-206
13. Buchanan R. E., Gibbons N. E., 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8a. ed., U.S.A.: *Ed. Board,* p 1127 - 1129
14. Washington J. A., 1981. Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. 1a. ed., U.S.A.: *Ed. Springer- Verlag,* p. 199-201.
15. Wistreich G. A., Lechnam M. D., 1989. Prácticas de laboratorio en Microbiología. 2a. ed., México: *Ed. Limusa* p 78 - 82
16. Bruck G. E., O'Hara L., Summers J. T., 1992. Rapid, Simple Method for Treating Clinical Specimens Containing Mycobacterium tuberculosis to Remove DNA for Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology.* V 30, No. 5: p 1331 - 1334.
17. Kochi A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the world health organization. *Tuberculosis.* 1991; 72: 1 - 6
18. Norman E., Dellagosti O., Mc. Fadden., Dale J., 1995. Gene Replacement by homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG; *Molecular Microbiology.* 16(4), 755-760.
19. Arruda S., Bomfin G., Knights R., Huima-Byron T., Riley L. W., 1993. Cloning of an *Mycobacterium tuberculosis* DNA fragment Associates with Entry and Survival Inside Cells. *Science.* Vol. 261, 1454-1457.
20. Salyer A., Whitt D., 1994. Bacterial Pathogenesis. 1a. ed; U.S.A., American Society for Microbiology Press; pp 307-319.

21. Szewzyk R., Svenson S. B., Hoffner S.E., Bolske G., Wahlstrom H., Englund L., Engvall A. & Kallenius G. 1995. Molecular epidemiological studies of *Mycobacterium bovis* infections in human and animals in Sweden. *J. Clin. Microbiol* 33: 3183-3185
22. Las condiciones de salud en las Américas. 1994. *Organización Panamericana de la Salud*. Vol. I, No. 549.
23. O'Reilly, L.M., Daborn, C. J. 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *The official journal of the international union against tuberculosis and lung disease. INTERVET*. 76:1-46.
24. Cotral G. E., 1986. Manual de Métodos Estandarizados en Microbiología Veterinaria. 1a. ed., México: *Ediciones científicas la prensa mexicana*. p 86, 87
25. Hermans W, Soolingen D., Dale W., Schuttema A., McAdam R., Catty D., Embden J., 1990. Insertion Element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis* : a Useful Tool for Diagnosis and Epidemiology of Tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 28, No. 9, 2051-2058.
26. McFadden Johnjoe, 1990. Molecular Biology of the Mycobacteria, U.S.A. , *Academic Press Inc.* , p 78,121-127.
27. Bellanti J. A., 1988. Inmunología. 3ª. Ed., México. *Ed. Interamericana*,_p 271.
28. Tizard Ian, 1987. Inmunología Veterinaria, 3a. ed., México: *Ed. Interamericana*. p 336-337.
29. Radford A. J., Duffield B. J. & Plackett P. 1988. Cloning of a species-specific antigen of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Immun.* 56:921-5
30. Silver R. F., Wallis R. S., Ellner J.J. 1995 . Mapping of T cell epitopes of the 30-KDa alfa antigen of *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette-

Guerin in purified protein derivative (PPD) positive individuals. *J. Immunol*, 154: 4665-4674

31. Collizzi V., Vismara D., D'Urso C., Mezzopreti M. F., Lombardi G., Piccolella E., Damiani G., Marelli P. & Campa M., 1989. Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* genome and production of a recombinant protein containing specific B and T cell antigenic determinants new approaches to second generation antituberculosis vaccines. *Z Erkr Atmungsorgane*, 172: 40 - 52
32. Vordermeier H. M., Harris D. P., Mehrotra P. K., Elísaghier A., Moreno C. & Ivanyi J. 1992. *M. tuberculosis*-complex specific T-cell stimulation and DTH reactions induced with a peptide from the 38-KDa protein. *Scand J. Immunol*, 35: 711-8
33. Haga S., Yamaguchi R., Nagai S., Matsuo K., Yamazaki A. & Nakamura R., 1995. Delayed-type hypersensitivity to a recombinant mycobacterial antigen, MPB64, in guinea pigs sensitized to *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol*. 57:221-225.
34. Garbe T., Barathi J., Barnini S., Zhang Y., Abou-Zeid C., Tang D., Mukherjee R., Young D., 1994. Transformation of mycobacterial species using hygromycin resistance as selectable marker. *Microbiology*. 140, p 133-138.
35. Zhang Y., Lathigra R., Garbe T., Catty D., Young D., 1991. Genetic analysis of superoxide dismutase, the 23 kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*. 5(2), 381-391.
36. Zhang Y., Garbe T., Young D., 1993. Transformation with KatG isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Molecular Microbiology*, 8(3), 521-524.
37. Stover C. K., Cruz V.F., Fuerst T.R., Burlein J.E., Benson L.A., Bennett L.T., Bansal G.P., Young M.H., Hatfull G.F., Snapper S.B., Barleta R.G., Jacobs W.R., Bloom B.R., 1991. New use of BCG for recombinant vaccines; *Nature*, V 361 (6), 456-460.

38. Dominique T., Brisson-Noël A., Vicent L., Frébault L., Nguyen S., Guesdon J., Gicquel B., 1990. Characterization of a Mycobacterium tuberculosis Insertion Sequence, IS16110, and its Application in Diagnosis; *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 28, No. 12, p. 2668-2673.
39. Promega ; 1991, Protocols and applications guide. 2a ed., USA, *Promega Corporation*, pp 55-56.
40. Collin D. M., 1984. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Gen Microbiol.* 130:1019-1021.
41. Jacobs W., Kalpana G., Cirillo J., Pascopella L., Snapper S., Udani R., Jones W., Berlata R., Bloom B., 1991. Genetics System for Mycobacteria. *Methods in Enzymology*. V 204, No. 25, p 537-555.
42. Sambrook J, Fritsch E.S, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. 2a. ed., U.S.A.: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Tomo 1, p 1.63, 5.3, 6.3, 6.9, 6.36, Tomo 2, p 15.3, Tomo 3, p E.3.
43. Clarke, L., and J. Carbon. 1976. A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9:91.
44. Graber, A. and Zingales, B. Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques*. 19:28-30
45. Ausubel, F., Brent, R., Kingston R., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K, 1995; Short protocols in molecular biology. Third ed., U.S.A. Ed. *Wiley*. p 6.3, 6.4, 2.5.5
46. Sahagún-Ruiz, A. 1992. Isolation and partial characterization of *Babesia bovis* proteins. Master of Science Thesis, Texas A&M University, Texas, United States. Pp 68
47. Coligan J. E., Kruisbeek A. M., Margulies D. E., Shevach E. M., Strober W., 1994. Current Protocols in Immunology. , U.S.A.: *Published by John Wiley & Sons, Inc.* V. 2, p A.1.9-A.1.11, 10.13.5-10.13.6.

48. Glover D. M. and Hames B. D., 1995. DNA Cloning 3. 2^a. Ed., U:S:A., Oxford University Press; p 1, 2
49. Glover D. M. and Hames B. D., 1995. DNA Cloning 1. 2^a. Ed., U:S:A., Oxford University Press; p 37, 38
50. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrell BG, *et al.* 1998, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* , jun 11; 393 (6685): 537-544
51. Thole JE, Schooten van WC, Keulen WJ, Hermans PW, Jason AA, Vries de RR, Kolk AH, Embden JD., 1988. Use of recombinant antigens expressed in *Escherichia coli* K-12 to map B-cell and T-cell epitopes on the immunodominant 65-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.*, 56 (6): 1633 - 1640 (jun 1988).
52. Oftung F, Mustafa AS, Husson R, Young RA, Godal T., 1987. Human T cell clones recognize two abundant *Mycobacterium tuberculosis* protein antigens expressed in *Escherichia coli*. *J. Immunol* 138 (3): 927 931 (Feb 1 1987).
53. Young RA, Bloom BR, Grosskinsky CM, Ivanyi J, Thomas D, Davis RW., 1985. Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA. *Proc. Natl. Acad Sci USA.*, 82 (9): 2583 - 2587 (May 1985).
54. Andersen AB, Worsaae A, Chaparas SD., 1988. Isolation and characterization of recombinant lambda gt11 bacteriophages expressing eight different mycobacterial antigens of potential immunological relevance. *Infect Immun* , May 56(5): 1344 - 1351
55. Haeseleer , Pollet JF, Haumont M, Bollen A, Jacobs P., 1993. Stable integration and expression of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein coding sequence in mycobacteria. *Mol Biochem Parasitol* ., Jan 57(1): 117 - 126
56. Mong EL, Rauzier J, Timm J, Torrea G, Murray A, Gicquel B, Portnoi D., 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Sequence Encoding

Exported Protein by Using *phoA* Gene Fusion. *Journal of Bacteriology.*, Jan 1995 p. 59 - 65

57. Southern EM., 1975. Detection of Specific Sequence Among DNA Fragments Separated by Gel Electroforesis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503 - 517

58. Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB., 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat. Med.* , 2 (8): 888 - 892

59. Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, DeWitt CM, Orme IM, Baldwin S, D'Souza C, Drowart A, Lozes E, Vandenbussche P, Van Vooren JP, Liu MA, Ulmer JB., 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med.*, 2 (8): 893 - 898.
