

00524
13

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

**"CARACTERIZACION DE LOS TRANSCRITOS DE
EL GEN REPORTERO *cat* EN *Trichomonas vaginalis*
USANDO EL VECTOR DE EXPRESION**

Envío a la Dirección de Publicaciones y
Difusión de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso
con el fin de recibir la autorización para la impresión y
distribución de mi trabajo recepción
NOMBRE: M^a Guadalupe
Barrera Andrade
FECHA: 7 de Julio 2003
FIRMA: [Firma]

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARIA GUADALUPE BARRERA ANDRADE



MEXICO D.F. EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003

A



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.

Jurado asignado:

Presidente	Dra.	Marisol López López.
Vocal	Q.F.B.	Abel Gutiérrez Ramos.
Secretario	Dra.	María Imelda López Villaseñor.
1er Suplente	Q.F.B.	Alicia Cervantes Peredo.
2do. Suplente	Q.F.B.	José Cordero Hernández.

Se desarrolló el tema en:
Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM.

Asesor.
Dra. María Imelda López Villaseñor

Supervisor Técnico.
Biol. Lorena López Griego.

Sustentante.
María Guadalupe Barrera Andrade.

Ma. Imelda López
Lorena López Griego
Barrera Andrade

DEDICATORIAS.

A Dios

Por permitirme hoy dar este primer paso de un largo camino que junto a él recorreré.

A mis Padres

Guadalupe Andrade A. y Manuel Barrera A. porque gracias a su amor, apoyo y ejemplo han hecho de mí lo que soy.

Los Amo.

A mis hermanos

Manuel, José, Luci y Toño que siempre me han brindado su cariño y son para mí la razón por la cuál seguir adelante pues soy su ejemplo a seguir y deseo que todos sean triunfadores.

A mi tío Salvador Andrade, por su cariño, y ánimos para que siga adelante.

A mis amigas y amigos del maravilloso grupo 17 (Gen. 97) por que juntos comenzamos este camino, en el que nació una hermosa amistad, que hemos cultivado a lo largo del tiempo y a la que no dejaremos morir.

A las chicas del club por enriquecer mi vida con su cariño y apoyo. Estoy segura que así como hoy cumplimos el objetivo de titularnos, conseguiremos muy pronto el objetivo principal de nuestro club.

A las personas que conocí a lo largo de este camino, que fueron y seguirán siendo parte importante de mí.

AGRADECIMIENTOS.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme estudiar en la Facultad de Química que fue mi casa durante cinco años y de la que me llevo una gran herencia; el conocimiento no sólo académico sino un conocimiento que me permitió crecer como persona.

A la Dra. Imelda López Villaseñor por guiar este trabajo con su cariño, apoyo y consejos y por darme la oportunidad de pertenecer a la gran familia que es su grupo de trabajo.

A los Doctores Roberto Hernández y Ana María Cevallos, por los consejos y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.

A la Dra. Norma Espinosa por su invaluable apoyo en el desarrollo de esta tesis.

A la Bióloga Lorena López Griego, técnico académico de nuestro laboratorio, quien siempre estuvo cerca colaborando intensamente durante la realización de este proyecto y quien además es una gran amiga.

A los integrantes del laboratorio: Liz, Julianita, Mariana, Elisa y Pablo por brindarme su amistad y ayuda constante en el desarrollo de este trabajo..

D

Índice.	Página.
1. Introducción.	
1.1 Importancia biológica de <i>Trichomonas vaginalis</i> .	2
1.2 Importancia médica de <i>T. vaginalis</i> .	3
1.3 Tricomonosis en México.	3
1.4 Descripción de la enfermedad.	4
1.5 Biología de <i>T. vaginalis</i> .	4
1.5.1 Clasificación taxonómica.	4
1.5.2 Características generales.	5
1.5.2.1 Ciclo de vida.	5
1.5.2.2 Forma y tamaño.	5
1.5.2.3 Citoplasma.	8
1.5.2.4 Núcleo.	8
1.5.2.5 Número cromosómico.	8
1.5.2.6 Metabolismo.	8
1.5.2.7 Tipo de reproducción y mitosis.	9
1.6 Patogenicidad de <i>T. vaginalis</i> .	9
1.7 Aspectos moleculares de <i>T. vaginalis</i> .	10
2. Antecedentes.	
2.1 Poliadenilación en eucariontes superiores.	13
2.1.1 Señales de poliadenilación en mamíferos.	14
2.2 Proceso de poliadenilación en protistas.	15
2.3 Señales de poliadenilación en <i>T. vaginalis</i> .	15
2.4 Genes reporteros.	16
2.5 Vector de expresión pAC22CAT-1.	19
3. Hipótesis y Objetivos.	
3.1 Hipótesis.	23
3.2 Objetivo general.	23
3.3 Objetivos particulares.	23
4. Metodología.	
4.1 Cultivo de <i>T. vaginalis</i> .	25
4.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i> .	25
4.3 Obtención de DNA plasmídico (mini-preparación).	26
4.4 Preparación de DNA de plásmidos (midi-preparación).	27
4.5 Transfección de <i>T. vaginalis</i> .	28
4.6 Preparación de extractos proteicos de <i>T. vaginalis</i> .	29
4.7 Ensayo para medir la actividad enzimática de la Cloranfenicol acetil transferasa (CAT).	29
4.8 Cuantificación de proteínas.	31
4.9 Extracción de RNA total.	32

4.9.1 Purificación de RNA poli A +	32
4.10 Amplificación rápida de extremos 3' de cDNA (3' RACE).	34
4.11 Selección de clonas positivas mediante hibridación.	36
4.12 Reacción en cadena de la DNA polimerasa (Polymerase Chain Reaction ,PCR)	38
4.13 Secuenciación de DNA.	39
5. Resultados.	
5.1 Funcionalidad del vector de expresión pAC22CAT-1.	42
5.1.1 Optimización de las condiciones de electroporación de <i>T. vaginalis</i> .	42
5.1.2 Detección de la actividad enzimática de CAT.	43
5.2 Determinación del sitio de poliadenilación de los transcritos del gen Reportero <i>cat</i> expresado en <i>T. vaginalis</i> .	45
5.2.1 Amplificación de la región 3' de los transcritos del gen <i>cat</i> .	45
5.2.2 Clonación de los productos amplificados por 3'RACE y análisis de las clonas.	48
5.2.3 Secuenciación de clonas TOPO3'-CAT.	50
5.2.4 Secuenciación y análisis de las clonas TOPO3'-CAT.	52
6. Conclusiones y perspectivas.	59
7. Bibliografía.	61
8. Apéndices.	
8.1 Apéndice A.	65
8.2 Apéndice B.	66
8.3 Apéndice C.	67
8.4 Apéndice D.	68

ABREVIATURAS.

°C	Grados centígrados.
cDNA	DNA complementario al RNA _m .
DEPC	Dietilpírocarbonato.
dNTP	Dinucleótido trifosfato.
DSE	Elemento río abajo (downstream).
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ETS	Enfermedades de transmisión sexual.
Fig	Figura.
Inr	Elemento iniciador de la transcripción.
kb	Kilobases.
min	Minuto.
µg	Microgramo.
µl	Microlitro.
ml	Mililitro.
RNA _m	RNA mensajero.
nm	Nanometro.
pb	Pares de bases.
PBS	Amortiguador salino de fosfatos.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
Poli(A)	Cola de poliadeninas.
rpm	Revoluciones por minuto.
TAE	Amortiguador de Tris-acetato-EDTA.
TE	Amortiguador de Tris-EDTA.
u	Unidades.
<i>cat</i>	Gen que codifica para la cloranfenicol acetil transferasa.
CAT	Cloranfenicol Acetil Transferasa.
RNA	Ácido ribonucleico
DNA	Ácido desoxirribonucleico.

GFP

Proteina fluorescente verde (Green fluorescent protein).

11

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia biológica de *Trichomonas vaginalis*.

Trichomonas vaginalis es un protozoario flagelado de evolución temprana.

Este parásito representa una de las primeras ramificaciones de linajes eucarióticos según estudios comparativos tanto de secuencias de la subunidad grande de RNA ribosomal (Baroin, y col. 1988) como de secuencias de la subunidad pequeña de RNA ribosomal (16s-like rRNA) (Sogin, 1991) (Fig 1). Por lo tanto el conocimiento de la biología de *T. vaginalis* puede proporcionar información acerca de la evolución molecular y celular en organismos de evolución temprana.

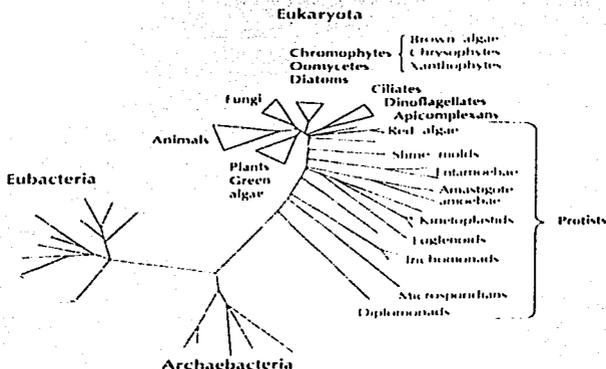


Figura 1 Árbol filogenético construido con base en la similitud de las secuencias de la subunidad pequeña de RNA ribosomal (16s like). Se muestran tres ramas principales: eubacterias, arqueobacterias y eucariontes. *Trichomonas vaginalis* se ubica entre los organismos amitocnariados que divergieron muy tempranamente de la rama de los eucariontes. Tomado de: Sogin, 1991.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.2 Importancia médica de *T. vaginalis*.

T. vaginalis es el agente infeccioso responsable de la tricomonosis, una de las enfermedades más comunes transmitida por vía sexual. Esta enfermedad produce daño en los tejidos del tracto urogenital provocando embarazos de alto riesgo (Cotch, y col. 1997), una mayor susceptibilidad a la infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (Sorvillo, y Kerndt, 1998) y predisposición de algunas pacientes con tricomonosis al cáncer cérvico-uterino (Vikki, y col. 2000). La tricomonosis es considerada como una de las enfermedades de transmisión sexual de mayor frecuencia en el mundo, afectando aproximadamente a 170 millones de personas anualmente (WHO, 1996).

1.3 Tricomonosis en México.

Las enfermedades de transmisión sexual (ETS) representan un problema de salud pública, en todo el mundo. A nivel nacional son una de las primeras causas de morbilidad, con un promedio de 220,000 casos anuales. Por su comportamiento epidemiológico ascendente la tricomonosis y candidiasis urogenital han sido incorporadas a las enfermedades de transmisión sexual denominadas de nueva generación como el herpes genital, las infecciones por el virus del papiloma, etc. En México, como en otros países en desarrollo, el conocimiento de la situación epidemiológica de las ETS se dificulta por existir un subregistro de los casos. La tricomonosis en la República Mexicana se encuentra distribuida principalmente en las zonas centro y sur del país, con la mayor incidencia en Veracruz y el Estado de México.

1.4 Descripción de la enfermedad.

La tricomonosis humana es una enfermedad crónica no mortal, causada por el protozoario *Trichomonas vaginalis*. En la mujer, el parásito coloniza principalmente el epitelio de la vagina y del exocérvix. Los síntomas principales de la enfermedad son: flujo vaginal purulento verde amarillento y de olor fétido e irritación vulvo-vaginal, en algunos casos se presenta dolor en el vientre, en la espalda y al contacto sexual. También se puede presentar eritema vaginal y enrojecimiento cervical causado por dilatación capilar y puntos hemorrágicos, conocidos como "cérvix de fresa". Los síntomas varían durante el ciclo menstrual y se exacerbaban durante la menstruación y el embarazo. Sin embargo, del 25 al 50% de las mujeres infectadas son asintomáticas. La tricomonosis se ha identificado como un factor de riesgo en el embarazo, ya que puede provocar parto prematuro, bajo peso neonatal e incremento en la incidencia de endometritis postparto. En el hombre el parásito se aloja principalmente en la uretra, aunque en algunas ocasiones también en la próstata y vesículas seminales, originando una tricomonosis asintomática. Ocasionalmente la enfermedad presenta inflamación de la uretra y puede llegar a ser causa de esterilidad (Arroyo, 2000; Meysich, 1995).

Para el tratamiento de la tricomonosis se utiliza el metronidazol que se activa en los hidrogenosomas del parásito: aquí se lleva a cabo la reducción del grupo nitro del metronidazol catalizada por la enzima piruvato ferredoxina oxidoreductasa, formándose un intermediario citotóxico para el parásito.

1.5 Biología de *T. vaginalis*.

1.5.1 Clasificación Taxonómica.

Reino:	Protista.
Phylum:	Protozoa.
Subphylum:	Sarcamastigophora.
Clase:	Zoomastigia.
Orden:	Trichomonadida.
Familia:	Trichomonadidae.

Género: Trichomonas.
Especie: *Trichomonas vaginalis*.

1.5.2 Características Generales.

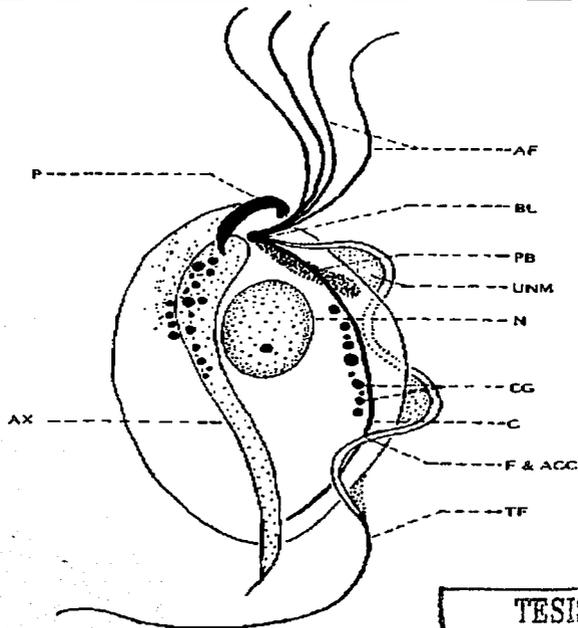
1.5.2.1 Ciclo de vida:

El ciclo de vida de *T. vaginalis* solo presenta un estadio, el trofozoito uninucleado (Fig 2) y no tiene huéspedes intermediarios ni vectores. La transmisión de la tricomonosis humana es de persona a persona mediante el contacto sexual con personas infectadas.

1.5.2.2 Forma y Tamaño.

Este protozoo presenta cuatro flagelos anteriores, un flagelo recurrente adosado a la membrana ondulante y un axostilo que es una estructura especializada del citoesqueleto formada por microtúbulos (Fig 2).

Los parásitos en cultivo presentan formas y tamaños variables, miden en promedio de 10 a 20 μm de largo por 7 μm de diámetro. Las formas ovoides y redondas son las que predominan en cultivo líquido y en las secreciones vaginales. Las formas ameboides aplanadas se encuentran en biopsias de pacientes, aunque algunas veces se les encuentra también en cultivos, adheridos a las paredes de los tubos; estos parásitos ameboides se desplazan lentamente sobre el sustrato al que se adhieren. En su interacción con células del epitelio vaginal *in vitro*, los microorganismos de forma ovoide se transforman morfológicamente en formas ameboides en menos de tres minutos: forman lamelipodios y son capaces de emitir pseudópodos que se interdigitan en diferentes sitios con la membrana plasmática de las células blanco, reduciendo el espacio intercelular en las áreas de contacto (Arroyo y col., 1993; Arroyo, 2000) (Fig 3).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 2 Esquema del trofozoito de *Trichomonas vaginalis* donde se muestran varias estructuras del parásito. Pelta (P), axostilo (AX), flagelos anteriores (AF), costa (C), flagelo y filamento accesorio (F y ACC), flagelo recurrente (TF), membrana ondulante (UNM), cuerpo basal (BL), cuerpo parabasal o golgi (PB) núcleo (N), granulos costales (hidrogenosomas, CG). Tomado de: Marquardt, y col. 2000.

1.5.2.3 Citoplasma.

En el citoplasma de *T. vaginalis* se encuentran las siguientes estructuras: 1) aparato de Golgi muy bien definido, 2) retículo endoplásmico, 3) sistema vacuolar rico en fagosomas y fagolisosomas, 4) gránulos paraxostilares y paracostales (hidrogenosomas), 5) granulos de glucógeno, 6) ribosomas libres y asociados al retículo endoplásmico y 7) un citoesqueleto muy complejo. Este organismo no posee mitocondrias ni peroxisomas. En algunos parásitos se pueden encontrar partículas virales que poseen un genoma de RNA de doble cadena.

1.5.2.4 Núcleo.

El núcleo de *T. vaginalis* en interfase es piriforme, mide aproximadamente 4 x 5 µm, se encuentra limitado por una envoltura nuclear con poros típicos y contiene gránulos dispersos de cromatina. Se localiza en la porción anterior y ventral izquierda de la expansión capitular del axostilo. El núcleo contiene un nucleolo esférico pequeño, rodeado de un área libre de cromatina.

1.5.2.5 Número Cromosómico.

T. vaginalis es un organismo diploide y posee seis pares de cromosomas (Yeong-Seng y col. 1997; Yeong-Seng y col. 1998). El tamaño del genoma de *T. vaginalis* se estima en 2.5×10^7 pb (Wang, y Wang, 1985).

1.5.2.6 Metabolismo.

T. vaginalis es un microorganismo anaerobio facultativo o aerotolerante que carece de mitocondrias pero contiene un organelo rodeado por doble membrana denominado hidrogenosoma, en donde se lleva a cabo el metabolismo de los carbohidratos. Los hidrogenosomas se dividen de manera autónoma por fisión binaria, importan proteínas postraduccionalmente y producen ATP. Estos organelos difieren de las mitocondrias ya que carecen de genoma, de citocromos, del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y de la reacción de fosforilación oxidativa; en su lugar usan enzimas (piruvato-ferredoxina oxidorreductasa

e hidrogenasa) típicamente restringidas a organismos anaerobios (Müller, 1993). Datos recientes indican que los trichomonádidos poseen proteínas de tipo mitocondrial cuyo mecanismo de importación al organelo blanco es similar al de las mitocondrias (Roger, y col. 1996; Germot, y col. 1996), lo que sugiere que los hidrogenosomas y las mitocondrias están relacionados y que los primeros podrían haber evolucionado a partir de mitocondrias (Biangini, y col. 1997).

1.5.2.7 Tipo de reproducción y mitosis.

T. vaginalis presenta una reproducción asexual por medio de fisión binaria longitudinal. De acuerdo con Heath (Heath, 1980), este parásito presenta una clase de mitosis primitiva, ya que tiene un aparato mitótico extranuclear que no tiene contacto directo con los cromosomas y no ocurre rompimiento de la envoltura nuclear durante la división celular. El tiempo de duración aproximado de la mitosis en este organismo es de 45 minutos y puede ser dividido en cinco fases: profase, metafase, anafase temprana y tardía, telofase temprana y tardía y citocinesis (Gómez-Conde, y col. 2000). Ribeiro y colaboradores han propuesto recientemente que el axostilo y los flagelos de *T. vaginalis* contribuyen de manera importante en la mitosis cerrada que presentan estos organismos: sugieren que estas estructuras participan en los cambios de forma del parásito durante este proceso, en la contorsión de la región anterior, en la cariocinesis y en la citocinesis. (Ribeiro, y col. 2000).

1.6 Patogenicidad.

En el mecanismo de patogenicidad de *T. vaginalis* se han distinguido tres etapas principales: 1) adhesión (citoadherencia) de los parásitos a las células blanco (células epiteliales y eritrocitos), 2) efecto citopático dependiente del contacto y mediado por la secreción de sustancias citoactivas y 3) fagocitosis de las células blanco.

1.7 Aspectos moleculares de *T. vaginalis*.

Organización génica.

Estudios realizados acerca de la estructura y expresión de algunos genes de *T. vaginalis* han mostrado que los genes de este organismo no parecen estar arreglados en agrupamientos (clusters), sino que se encuentran arreglados en unidades de transcripción sencillas. Las secuencias de cDNA estudiadas hasta la fecha son colineares con copias genómicas de los genes correspondientes, revelando la ausencia de trans-splicing o de cis-splicing. Todos los genes reportados hasta el momento carecen de intrones (Liston, y Johnson, 1998; datos de nuestro laboratorio).

1.7.2 Regulación de la expresión génica.

El estudio de la expresión génica en *T. vaginalis* es aún incipiente y se ha enfocado principalmente a la región 5' no traducida, en donde se localizan los elementos promotores de la transcripción. Hasta el momento solo una secuencia con actividad promotora de la transcripción ha sido caracterizada en *T. vaginalis*. Este elemento rico en pirimidinas, conocido como elemento iniciador (Inr), rodea al sitio de inicio de la transcripción de todos los genes de *T. vaginalis* examinados y se localiza de 6 a 20 nucleótidos río arriba del codón de inicio de la traducción (ATG). El Inr de *T. vaginalis* posee una secuencia altamente conservada: TCA₊1T/CT/A que comparte un fuerte parecido con el Inr de metazoarios (T/CT/CA₊1NT/AT/CT/C). El análisis del elemento Inr de *T. vaginalis* ha mostrado que es esencial para la transcripción. No se han encontrado cajas TATA típicas de eucariontes a 25-30 nucleótidos río arriba a los sitios de inicio de la transcripción (Quon, y col., 1994; Liston, y Johnson, 1999).

La transcripción de los genes proteicos en *T. vaginalis* parece estar dirigida por una RNA polimerasa II inusual, que presenta características diferentes a las RNA polimerasas de eucariontes superiores. Estudios de transcripción *in vitro* han mostrado que la RNA polimerasa II de *T. vaginalis* es resistente a altas concentraciones de α -amanitina (50% inhibición con 250 μ g/ml), a diferencia de lo observado con otras RNA pol II que son inhibidas 2-20 μ g/ml. Esta resistencia parece deberse a cambios en el sitio probable de

unión a α -amanitina encontrados en la subunidad grande de la RNA polimerasa II de *T. vaginalis*. Uno de los hallazgos que apoyan la idea de que la RNA polimerasa II de *T. vaginalis* lleva a cabo la transcripción de genes proteicos, es la presencia de un cap en los extremos 5' de los mRNAs, lo cual no sucede típicamente en el proceso de transcripción dirigido por las RNA polimerasas I y III (Liston. y Johnson, 1998)

Con respecto al procesamiento de los transcritos de *T. vaginalis*, el proceso de poliadenilación ha sido poco estudiado en este parásito. Algunos reportes han sugerido que los motivos AAUAAA y AAUAA (utilizados en eucariontes superiores) podrían funcionar como señales de poliadenilación en este organismo, debido a que estas secuencias se encontraron en las regiones 3' no traducidas de los genes de ferredoxina y β -succinil coenzima A sintetasa (Lahti, y col. 1992). Sin embargo, estas propuestas no presentan datos experimentales que las apoyen.

Recientemente, el grupo de investigación de la Dra. López-Villaseñor ha propuesto que la secuencia UAAA es la señal de poliadenilación para los RNAm de *T. vaginalis* (Espinosa y col, 2002) (ver sección de antecedentes).

2. ANTECEDENTES

2.1 Poliadenilación de los mRNAs en eucariontes superiores.

La biosíntesis de los RNA mensajeros (RNAm) de organismos eucariontes es un proceso que requiere de varias etapas de procesamiento. Un paso crítico común en virtualmente todos los transcritos primarios es la generación de los extremos 3' maduros y su subsecuente poliadenilación. Las señales de poliadenilación son requeridas para la terminación de la transcripción por la RNA polimerasa II y para la adición de residuos de adenilato en el extremo 3'OH (Whitelaw, y Proudfoot, 1986; Proudfoot, 1989; McCracken, y col., 1997). Esta cola de poli (A) es importante en el transporte del RNAm del núcleo al citoplasma (Eckner, y col., 1991) y en el control de la estabilidad del mRNA (Beelman, y Parker, 1995). La elección del sitio de poliadenilación puede influenciar la expresión génica, como en el caso de las células B, en donde la diferenciación de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en su forma membranal o en su forma secretada, es gobernado en parte a través del uso de sitios alternativos de poliadenilación (Wahle, y Kühn, 1997).

El proceso de poliadenilación se lleva a cabo en dos reacciones: en la primera el transcrito es cortado endonucleolíticamente, generándose dos moléculas; en la segunda reacción el sitio 3'OH generado en el corte es poliadenilado, es decir se agregan de 150 a 200 residuos de adenilato de manera independiente de templado.

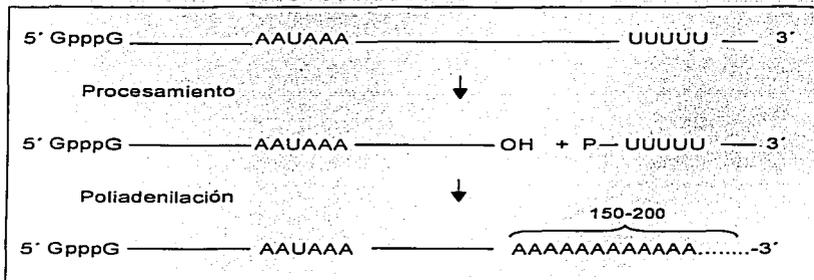


Figura 4. Esquema del proceso de poliadenilación en eucariontes superiores (Wahle; y Walter, 1996)

2.1.1 Señales de poliadenilación en mamíferos.

El hexanucleótido AAUAAA, localizado en la mayoría de los transcritos a una distancia de 10 a 30 nucleótidos río arriba al sitio de procesamiento, es una señal altamente conservada para la poliadenilación en mamíferos y es esencial para el procesamiento de los extremos 3' de los RNAsm. Se ha reportado que la delección del elemento AAUAAA suprime el procesamiento y poliadenilación de transcritos y las mutaciones puntuales en su secuencia reducen en gran medida la eficiencia del procesamiento en el extremo 3' (Sheets, 1990).

Sin embargo, la señal AAUAAA por si sola no es suficiente para inducir el procesamiento y la poliadenilación de transcritos. Un segundo elemento que juega un papel importante en este proceso ha sido denominado elemento "downstream" (DSE) y está situado río abajo del sitio de corte de los transcritos, a una distancia no mayor de 30 nucleótidos; su secuencia es pobremente conservada, pero han sido descritos dos tipos de elementos: uno que consiste en una secuencia de por lo menos cuatro o cinco uridinas y otro que es una secuencia rica en GU (Wahle, y Kühn, 1997). Se ha visto que en algunos casos solo uno de estos elementos es suficiente para la poliadenilación; sin embargo, también se ha observado que si están presentes los dos tipos de elementos se presenta un efecto de sinergismo (Gil, y Proudfoot, 1987).

La distancia que existe entre la señal AAUAAA y el elemento "río abajo" en el transcrito determina una región dentro de la cual puede tener lugar el corte. Dentro de esta región, existe preferencia para cortar en el extremo 3' después de un residuo de A, frecuentemente después del dinucleótido CA, sugiriendo que este podría jugar un papel en la selección del sitio de procesamiento (Chen, y col. 1995).

Por otra parte, secuencias denominadas elementos "upstream" (USE) localizadas río arriba de la señal AAUAAA pueden incrementar la eficiencia del procesamiento; estas secuencias son ricas en Us y su mecanismo de acción es todavía controversial (Wahle, y Kühn, 1997).

2.2 Proceso de poliadenilación en protistas.

Los estudios sobre el proceso de poliadenilación en protistas son aun incipientes y esta reacción sólo se ha estudiado en algunas especies. Los datos que se tienen hasta el momento sugieren que los protistas no utilizan necesariamente la señal de poliadenilación descrita en eucariontes superiores (AAUAAA) y se han reportado distintas secuencias que podrían funcionar como señales de poliadenilación en estos organismos.

2.3 Señales de poliadenilación en *T. vaginalis*.

En el trabajo de tesis de la Dra. Norma Espinosa, realizado en el laboratorio de la Dra. Imelda López Villaseñor, se analizaron de manera detallada las regiones adyacentes al sitio de poliadenilación en algunos transcritos de *T. vaginalis*. Se estudiaron las regiones 3' no traducidas de 10 cDNAs de actina y de otros siete cDNAs de diversos genes de *T. vaginalis*. Con base en este trabajo se ha propuesto que el motivo UAAA es la secuencia que actúa como señal de poliadenilación y se ubica a una distancia entre 11 y 30 nucleótidos río arriba del sitio de procesamiento del transcrito. Se destaca que el codón de terminación de la traducción UAA casi siempre forma parte de este motivo. El motivo UAAA no es suficiente para dirigir el proceso de poliadenilación de este organismo y es necesaria la secuencia $Py^{\downarrow}(A)_{0..3}AAUU$ para señalar el sitio de procesamiento del transcrito; en esta secuencia la flecha indica el sitio de corte del transcrito por lo que el elemento AAUU se localiza río abajo y adyacente al sitio de corte y poliadenilación. Otra región rica en Us, localizada río abajo del sitio de procesamiento del transcrito, podría estar implicada en este proceso. Se propone también que en *T. vaginalis* el motivo UAAA se seleccionó evolutivamente para señalar tanto el fin de la traducción como el procesamiento de transcritos en el extremo 3', acoplando así los dos procesos en este organismo de evolución temprana; se sugiere también que esta secuencia pudo haber originado la señal AAUAAA utilizada como señal de poliadenilación en eucariontes superiores (Espinosa y col. 2002).

Si bien en el trabajo de la Dra. Espinosa se proponen las secuencias que pudieran actuar como señales para el procesamiento y poliadenilación de los RNAsm de *T. vaginalis*,

hace falta probar la funcionalidad de estas secuencias para demostrar su papel en el proceso de poliadenilación.

2.4 Genes Reporteros.

Los genes reporteros, también llamados marcadores, son una excelente herramienta utilizada para identificar y analizar elementos regulatorios de los genes en un organismo de interés.

La metodología de DNA recombinante permite unir la secuencia regulatoria de interés a un gen reportero o marcador, para ser acoplado en un vector de expresión. Dicho vector se introduce en las células apropiadas, donde la expresión del gen reportero es detectada por la identificación de RNAm, o bien por la actividad catalítica de la proteína reportera. Una característica de los genes reporteros es que la actividad de la proteína reportera debe diferenciarse de la actividad de las proteínas propias del hospedero. La mayoría de los métodos de detección son sensibles, específicos, cuantitativos, reproducibles y rápidos.

La estructura de una región regulatoria puede ser analizada utilizando promotores en los cuales se introducen mutaciones particulares dentro de la secuencia en estudio; la capacidad de las mutantes para expresar al reportero es medida y comparada contra la actividad nativa (es decir, la secuencia original no mutada).

Uno de los genes reporteros más usados en el análisis de elementos regulatorios es el gen *cat*, que codifica por la enzima Cloranfenicol acetil transferasa (CAT) (fig 4). Esta enzima modifica de manera covalente al cloranfenicol transfiriéndole un grupo acetilo del acetil CoA en la posición C3 donde se encuentra el grupo hidroxilo primario del cloranfenicol. El producto de esta reacción, 3-acetil cloranfenicol, sufre un rearrreglo en el cual el grupo acetilo se transfiere al C1 formando el 1-acetil cloranfenicol; este rearrreglo permite que se lleve a cabo un segundo ciclo de acetilación al C3, dando como resultado el 1,3-diacetil cloranfenicol. El cloranfenicol modificado de esta manera carece de actividad bactericida ya que es incapaz de unirse a la peptidil transferasa en el centro de los ribosomas procarióticos e inhibir el proceso de traducción. Se puede medir la actividad de CAT mediante varios ensayos usando procedimientos y equipo de uso común en los

laboratorios (ver material y métodos). La actividad de CAT es muy estable; su vida media es de 50 horas y se mantiene su actividad después de que la transcripción se ha reducido. CAT es una enzima procariótica, por lo tanto no tiene actividad competitiva endógena en células de mamíferos; además esta enzima es muy estable lo que representa una gran ventaja para ser utilizada como molécula reportero. En este trabajo de tesis se utilizó a *cat* como reportero molecular.

Además de *cat*, se han desarrollado otros sistemas reporteros para incrementar la sensibilidad de detección y expandir el rango de líneas celulares que pueden ser usados como hospederos. Cada uno de los sistemas reporteros utiliza un método diferente de detección y tiene diferente tiempo de vida media. Dentro de estos genes reporteros podemos encontrar los siguientes :

El gen *luc* codifica por la proteína luciferasa, que produce luz de luciferina en presencia de ATP. Para medir la actividad de este gen se requiere un luminómetro o un contador líquido de centelleo con un contador simple de fotones. La vida media de la luciferasa en células transfectadas es corta, de aproximadamente 3 horas.

La proteína fluorescente verde (GFP, green fluorescent protein) y sus variantes obtenidas por ingeniería genética, son un buen sistema reportero no enzimático. GFP es única entre varias proteínas emisoras de luz, autofluorescentes, que no requieren cofactores exógenos o sustratos independientes para su actividad. Su presencia es detectada mediante la medición de la absorbancia en la longitud de onda apropiada; el sistema utiliza un método de medición no invasivo para monitorear la expresión del gen reportero en las células transformadas. Sin embargo la señal fluorescente no es amplificada por lo tanto la detección requiere que la expresión de GFP sea dirigida por promotores o elementos regulatorios muy fuertes. GFP es muy utilizado en el seguimiento del transporte, localización y destino de las proteínas blanco.

Secuencia del gen *cat*

1 ATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCARTCGCATCGTAAAGAA
1 M E K K K I T G Y T T V D I S Q S H R K E
61 CATTTTGAGGCATTTCAGTCAGTTGGCTCAATGTACCTAATPAACCGACCGTTTCAGCTGGAT
21 H F E E A F Q S V A Q C T Y N Q T V Q L D
121 ATTACGGCCTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTATCCGGCCTTTATT
41 I T A F L K T V K K N K H K F Y P A F I
181 CACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCATCCGGAATCCGATGGAATGAAAGACGGT
61 H I L A R L M N A H P E F R M A M K D G
241 GAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTACACCGTTTTCCATGAGCAACTGAA
81 E L V I W D S V H P C Y T V F H E Q T E
301 ACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATATAT
101 T F S S L W S E Y H D D F R Q F L H I Y
361 TCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAG
121 S Q D V A C Y G E N L A Y F P K G F I E
421 AATATGTTTTTCGCTCAGCCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTCATTTAAACGTC
141 N M F F V S A N P W V S F T S F D L N V
481 GCCAATATGGACAACCTTCTCGCCCCCGTTTCCACCATGGGCAATATTATACGCCAAGCG
161 A N M D N F F A P V F T M G K Y Y T Q G
541 GACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCCTCTGTGATGGCTCCAT
181 D K V L M P L A I Q V H H A V C D G F H
601 GTCGCCAGAACTGCTTAATGAATTACAAACAGTACTCGGATGAGTGGCAGGCGGGCGGTAA
201 V G R M L N E L Q Q Y C D E W Q G G A *

Oligo CAT 10 5'3'
Oligo CAT 11 5'3'
Oligo CAT 20 3'5'

Figura 4. Secuencia del gen *cat* donde se muestra la ubicación de los oligos específicos CAT10, CAT11 y CAT 20 utilizados en la parte experimental.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2.5 El vector de expresión pAC22CAT-1.

En el laboratorio de la Dra. López Villaseñor se han construido vectores para la expresión de genes reporteros en *T. vaginalis* (trabajo desarrollado por Jessica Guzmán). Uno de estos vectores es el pAC22CAT-1: contiene el gen *cat* (que codifica para la enzima CAT) flanqueado por las regiones 5' y 3' intergénicas de un gen de actina (Fig. 6)

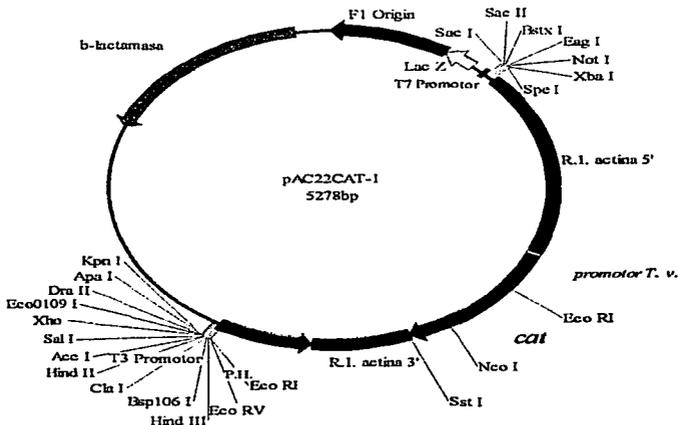


Figura 6. Vector de expresión pAC22CAT-1 contiene al gen *cat* flanqueado por las regiones 5' y 3' de actina de *T. vaginalis*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Secuencia del vector pAC22CAT-1.

CTGACGGCC	CTGTAGCGCC	GCATTAAGCC	CGCGGGTGT	GGTGTTCAG	CGCAGCTGA
CCGCTACACT	TGGCAGCGCC	CTAGGGCCCG	CTCCTTTCCG	TTTCTTCCCT	TCCTTTCTCG
CCGCTTCGCT	CGCCTTCCG	CGTCAAGCTC	TAAATCGGGG	GCCTCCCTTA	GGGTTCCGAT
TTAGTGCCTT	ACGGCCACFC	GACCCGARA	ACCTGATTA	CGCTGATGCT	TCAGGTACTG
GGCCATCGCC	CTGATPAGAC	GTTTTTCGCC	CTTTAGCTT	GGAGTCCAGC	TTCTTTAATA
GTGGACTCTT	GTTCCAACT	GGARACAAC	TCAACCCTAT	CTCCGCTCAT	TCTTTTGATT
TATAPAGGGAT	TTTGGCCATT	TGGGCCATT	GGTTAAAAAA	TGAGGTGATT	TAACAAAAAT
TTAACGGCAA	TTTTAACAAA	ATATTAACGC	TTACAATTC	CATTCCGCAT	TCAGGCTGCG
CAACTGTGG	GAAAGGCCAT	CGGTGGCCGC	CTCTTCGTA	TTACCCAGC	TGGCGAAGG
GGGATGTCT	GCAAGGCCAT	TAAGTTGGGT	AACCCAGGCG	TTTTCCCAT	CACGACGTTG
TAAACGAGCT	CGCCAGTGAGC	GGCGGTAAAT	CGACTCACTA	TAGGGCCAGT	TGGCCACCGC
GGTGGCGGCC	GCTCTAGAAAC	TAGTGTTTTT	ATATATAAAT	ATCTTCGACG	AGCTTAGCGAA
ATGAGGAGG	TAGCGAATG	AATCTATCAG	AATATCTCAG	GCAGCGCTTAT	TGGCGGCTAT
TTTGTGTGAT	GTGCGCAATA	TGCTAAAAAA	GTAAAAAAT	TCGTATTGGA	CACITTTAGA
TGTTCAATAT	TGATGTAAAC	ATAAAAACAA	TATATAACAG	TAAACAATCA	ATAGTGTGTA
TGAAAGGATA	GACCAACTAT	CITTTGGGTT	ACATATAATC	GAATATPAC	ATATTTTTTA
ACTTTTTTAG	CGAAGAGATA	GTTTTCCGAC	ATAAATTTTT	TGAATTAACA	TATAGTTTTCT
CCAAAAATT	ATGTAATTGG	GAACTTAAAC	GAATGTCAAC	ATATTTGGAA	AAAAAATPAG
AGGACATTTT	CTTAATCAAA	TAAACAGATT	GTAACTTATA	TGTACGTTTA	ATTCGAAAT
CAAGCGTAAT	TTCCGAATGG	GTAAAGTAAT	ATCGTGATGT	CTGATGTGAA	ATPAGTAAAA
AGAAATAAAA	TTTTATGATP	GGTTCITTTGA	TATGAAATACC	ATTTGATGATA	ATCGTTATAA
TTTATATAAC	ATTTTGTACT	TGCGTGGAAAT	CAATATTTCT	GATTTGTCAA	ATTTATTTCT
AAATTTTTGA	GAGGATTTGA	TTGGAATAAA	GATATAGAAA	ATATATTTAT	TGATAGAAAT
AGCAAAATG	GGCCAGATATA	ATATCGGAAA	TAAAAATGACA	TCACTTACA	TTTTGCCTTT
GAATAATTTGA	TCTTTGAGGA	AAATATTCG	GAAACACACT	ATATATGATAT	AATATCGAAA
GATTAATAAA	ATTAAGAAAG	GACTTAGAAT	TCCCTGGTAT	AAATTTTGAG	GACTCTAAC
GTGTCTAAA	GAGCTGAATG	GATTTGAATG	TTAACCTCAT	TTCAATTTCT	GCCATGAACA
AAAAAATCC	TGGATATACC	ACCGTTGATA	TATCCCAATC	GCATCGTAAA	GAACATTTTT
AGGCATTTCA	GTCAGTTGCT	CAATGTACCT	ATAACAGAC	CGTTCCGAG	GATATTACGG
CCTTTTTAAA	GACCGTAAAG	AAAAAATAAG	ACAAGTTTTA	TCCGGCCCTT	ATTCACATG
TTCCCGCCCT	GATGAATGCT	ACTCCGGAAT	TCCGTTATGG	AAATGAAGAC	GGTGAAGTCC
TGATATGGCT	TAGGTCTCAG	CGTGTACACA	CGCTTTTCCA	TGACCAAGCT	GAACCTTTT
CATCGCTCTG	GAGTGAATAC	CACGAGGATT	TCCGGCAGTT	TCTACACATA	TATTTCCGAG
ATGTTGGCGT	TTACGGTAAA	AACCTGGCCT	ATTTCCCTAA	AGGCTTTTAT	GAGAAATATG
TTTTCGCTCT	CGCCCAATCCC	TGGGTGAGTT	TCCAGCAATT	TGATTTAAAC	TGGGCCAATA
TGGCAACTTT	CTTCCGCCCC	GTTTTCCACA	TGCGCAAATA	TATATCCGAA	GGCCACAAGG
TGCTGATGCC	GCTGGCGGAT	CAGGTTCACT	ATGGCGCTG	TGATGGCTCT	CATGTCGGCA
GAAATGCTAA	TGAATTACAA	CAGTACTGCC	ATGAGTGGCA	GGCGGGGGCG	TAAAGACTCA
CTTAAACAAT	TTCGGTATAA	TATATTTCAA	TAAATAACTA	CCTTTTTTCT	TTAGTGAACC
TATTTTGGAA	ATGACTTTGAT	TAAATTTGTG	TTTTTAATGT	TATATATGTA	CCAATACGAT
GTACCTGAAA	CATCTCTTTT	CGATATGAT	TTTTACTCTT	CACCAARAAG	AGATATGATG
CAACTTAAAG	TGCGTGAATT	GCATTTGAT	CTTATAGTAT	ACATATTTGA	ATCATCAAT
GAACATTTGAT	AATTTGTGAT	TATTCCTTGT	TGATTTAAAA	GAATATCTTT	TGATTTTTTG
AAGTAATATP	AATTTTCTT	CATCAATCA	TAGAGATAAA	GTAAACAAG	ACATTTATAG
TAAGTAAATC	AATTTATPAA	TAAAAATACA	RAATTTAAATA	ATAACAAATA	CTAATTTGAT
TACTCGTTGA	CGATTTCAAAT	CTTCTTPAGA	ACATTTGAGAA	GTTGAGGACT	AATTCCTTCA
TCCAAGTCTT	GCTAGTGAAG	AATCTGTGAG	GAGGACTAG	ATGCTGTCAG	CTTATTGTCA
TCTCTATCCA	AAGAACTTGA	AATTCCTTAA	GGAAITGCGAG	AAACATCAAT	AGGAACGATG
TTTTGCATTT	GGCAATCTCT	CATCATATAA	TCATTTTCGT	GGCTCAATCT	ATCATCGGTT
ATCTCAACGA	ATGACAGGAA	TCTCTTTGAT	TCCCTCGTAG	ATCTCTTGTA	GCTCAACCTG
TCTGCTGCT	CGTCTGATT	GCGGCTGTT	TGATTTGAGC	TGAATTCGAT	ATCAAGCTTA
TCTGATGCT	GGACTCGAG	GGCGCTCGC	TGATCCAGCT	TTGTTCCGAG	TTGTTCCGAG
TTAATTTGCC	GCTTGGCGTA	ATCATGCTCA	TAGCTTTTTT	CTGTTGTAAA	TTGTTATCCG

CTCACAAATTC	CACACAACAT	ACGAGCCGGA	AGCATAAAGT	GTAAAAGCCTG	GGGTGCCTAA
TGAGTGAGCT	AACTCACATT	AATTGCGTTG	CGCTCACTGC	CCGCTTTCCA	GTCCGGGAAAC
CTGTGCGTGCC	AGCTGCATTA	ATGAATCGGC	CAACCGCGGG	GGAGAGCGGG	TTTGCGTATT
GGCGCGCTTT	CCGCTTCCCT	GCTCACTGAC	TCGCTGCGCT	CGGTCTGCG	GCTCGCGCGGA
CGCGTATCAG	CTCACTCAAA	GGCGGTAATA	CGGTTATCCA	CAGAATCAGG	GGATAACGGCA
GCAGAAGACA	TTGTGAGCAA	AGCCAGACAA	RAGCCAGGA	ACCGTAAAA	GGCGCGCTG
CTPGCGCTTTT	TCCATAGGCT	CCGCCCCCTC	GACGAGCATC	ACAAAAATCG	ACGCTCAAGT
CAGAGTGCGGC	GAAACCCGAC	AGGACTATAA	AGATACCAGG	CGTTTCCCCC	TGGAAAGCTCC
CTGTGCGCCT	CTCCTGTTCC	GACCCTGCGC	CTTACCCGAT	ACCTGTCCGC	GTTTCTCCCT
TCCGGGAAGCG	TGGCGCTTTC	TCATAGCTCA	CGCTGTAGGT	ATCTCAGTTC	GGTGTAGGTC
GTTTCCGCTCA	AGCTGGGCTC	TGTGCCACGAA	CCCCCGTTCC	AGCCCGACCCG	CTCGCGCTTA
TCCCGTAACT	ATCGTCTTGA	GTCCAACCCG	GTAAGACACG	ACTTATCGCC	ACTGGCAGCA
GCCCGTGGTA	ACAGGATTAG	CAGAGCGAGG	TATGTAGGCG	GTGTACAGCA	GTTCTTGAAG
TGGTGGCGTA	ACTACGGCTA	CACTAGAAGG	ACAGTATTTG	GTATCTGGCC	TCTGCTGAAG
CCAGTTACCT	TCGGAAAAAG	AGTTGGTAGC	TCTTGGATCCG	GCAACAACAC	ACCAGCTGGT
AGCGGTGGTT	TTTTTGTTTG	CAAGCAGCAG	ATTACCGCGCA	GAIAAAAAAG	ATCTCAAGAA
GATCCTTTGA	TCTTTTCTAC	GGGCTCGAC	GCTCAGTGGA	ACGAJAATCT	ACGTTAAGGG
ATTTTGGTCA	TSAGATTATC	AAAAAGGATC	TTCACCTAGA	TCTTTTAAA	TTAAAAATGA
AGTTTAAAT	CAATCTAAAG	TATATATGAG	TAAACTTGGT	CTGACAGTTA	CAAATGTTA
ATCAGTGAGG	ACCCTAATCTC	AGCGATCTGT	CTATTTCCGT	CATCCATAGT	TGCCCTACTC
CCCCFCGTGT	AGATACTAC	GATACGGGAG	GGCTTACCAT	CTGGCCCCAG	TGCTGCAATG
ATACGCGGAG	ACCCACGCTC	ACCGGCTCCA	GATTTATCAG	CAATAAACCA	GCCAGCCGGA
AGGGCCGAGC	GCAGAAGTGG	TCCTGCAACT	TTATCCGCGT	CCATCCAGCT	TATTAATTGT
TGCCCGGAAG	CTAGAGTAGC	TAGTTCCGCCA	GTTAATATGC	TGCGCAACGT	TGTTGCCATT
GCTACAGCTA	TCGTGGTGTG	ACGCTCGTGC	TTTGGTATGG	CTTCATTCC	CTCCGCTTCC
CAACGATCAA	GGCGAGTTAC	ATGATCCCCC	ATGTTGTGCA	AAAAAGCGGT	TAGCTCTCTC
GGTCCCTCGA	TCGTTGTFCAG	AAGTAAAGTTG	CGCCGAGTGT	TATCACTCAT	GGTATGGCA
CGACTGCATA	ATTCTCTTAC	TGTCATGGCA	TCCGTAGAT	GCTTTTCTGT	CAGTGGTSG
TACTGAACGA	ATTCATTCTG	AGAATAGTGT	ATCGCGGCAC	CGAGTTGCTC	TTGGCCGCG
TCAATACGGG	ATAATACCCG	GCCACATAGC	AGAACTTAA	ARGTGCATC	CATTGGAAAA
GCTTCTTCGG	CTCAAAGGATC	TTACGGCGCT	TGAGATCCAG	TTCGATGTA	
CCCACCTGTC	CACCCAACCTG	ATCTTCAGCA	TCFTTTACTT	TCACCAGGCT	TTCTGGGTGA
GCAAAAACAG	GAAGGCCAAA	TGCCGCAAAA	AAGGGAAATA	GGGCCACAGC	GAATGTGTA
ATACTCATAC	TCTTCCCTTT	TCAATATTAT	TGAAGCATT	ATCAGGGTTA	TGTCTCATG
AGCGGATACA	TATTTGAAATG	TATTTAGAAA	AATAAACAAA	TAGGGGTTC	GCCACATTT
CCCCGAAAAG	TGCCAC				

Figura 7. Secuencia del vector pAC22CAT-1. En color negro se muestra el vector p-bluescript II, en rosa las regiones 3' (inicia con el codón de paro de actina (TAA) y 5' de actina, en azul el gen *cat*, en verde las señales propuestas para dirigir el procesamiento (Py↓ (A) ...AAUU), de los transcritos y la poliadenilación de los mismos (TAAA), y en rojo la secuencia que une al gen *cat* con la región 3' de actina, esta secuencia involucra el sitio de corte para la enzima Sst I (rojo subrayado).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis.

La región 3'UTR de un gen de actina contiene las señales que dirigen el procesamiento y poliadenilación del transcrito.

3.2 Objetivo general.

- Determinar el sitio de poliadenilación de los transcritos del gen reportero *cat*, expresado bajo el control de las regiones 5' y 3' de un gen de actina, en *Trichomonas vaginalis*.

3.3 Particulares.

- Establecer las condiciones óptimas para la expresión de la enzima cloranfenicol acetil transferasa en células de *T. vaginalis* transfectadas con el plásmido pAC22CAT-1.
- Determinar el (los) sitios de poliadenilación de los transcritos del gen reportero *cat* en *T. vaginalis*.
- Comparar los sitios de poliadenilación de los transcritos del gen reportero *cat* con los sitios de poliadenilación de los transcritos de actina de *T. vaginalis*.

4. ΜΕΤΟΔΟΛΟΓΙΑ

4.1 Cultivo de *Trichomonas vaginalis*.

Los parásitos del aislado CNC147 (donado por la Dra. Rossana Arroyo del CINVESTAV, IPN), se cultivarán en tubos de vidrio de 10 ml con tapa de rosca a 37°C, en medio TYM (trypticase-yeast extract-maltose) (Apéndice A), suplementado con 10% de suero de caballo (GIBCO) previamente inactivado a 56°C por 30 min. Para el mantenimiento del cultivo se realizan subcultivos cada 2 días, tomando como inóculo inicial 0.5×10^6 parásitos por ml.

4.2 Transformación de *Escherichia coli*.

Se creció un cultivo de la cepa *E. coli* JM109 en 30 ml de medio LB a 37°C durante toda la noche con agitación (5,000 rpm). Al día siguiente se inocularon 30 ml de medio LB con 1/100 del cultivo anterior, se incubaron a 37°C con agitación (5,000 rpm) hasta que alcanzó una densidad óptica de 0.5 a 550 nm; en este punto las células se mantuvieron en hielo durante 10 minutos, para después centrifugarse a 5,000 rpm en un rotor Sorvall SS34 durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en la mitad del volumen original (15 ml) de una solución fría de CaCl_2 100mM y se incubaron en hielo por 15 minutos. Terminada la incubación se centrifugaron las células a 5,000 rpm (Sorvall SS34) por 5 minutos. Las células se resuspendieron en 1/15 del volumen original (2 ml) de una solución fría de CaCl_2 100mM y se incubaron en hielo por lo menos 30 minutos o más; terminada esta incubación se tomaron 200 μl de células en un microtubo de 1.5 ml y se agregaron aproximadamente 50 ng del DNA que se desea transformar en un volumen no mayor a 10 μl , se incubaron en hielo durante 30 minutos. Terminada la incubación se les dio a las células un choque térmico a 42 °C por 45 segundos y se regresaron a hielo, para agregarles 800 μl de medio LB e incubarlos a 37 °C por 45 minutos.

En cajas de LB + ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) se siembran 1/10 (100 μl) y 9/10 de las bacterias transformadas, para sembrar 9/10 se centrifugaron los 900 μl de bacterias durante 20 segundos a 14,000 rpm en una microfuga y el botón celular se resuspendió en la gota residual de medio después de desechar el sobrenadante. Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

4.3 Obtención de DNA plasmídico (mini- preparación).

Se tomó con un palillo estéril una colonia de las bacterias transformantes, se colocó en tubos de vidrio estériles con tapa, que contenían 3 ml de medio LB con el antibiótico apropiado y se incubaron a 37°C durante toda la noche con agitación (5,000 rpm). Se transfirió 1.5 ml del cultivo bacteriano a microtubos de 1.5 ml, se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 seg., se retiró el sobrenadante y se colocó el cultivo restante en el mismo tubo y se volvió a centrifugar en la misma forma. Se retiró el sobrenadante, el botón celular se suavizó mediante agitación en vortex, se agregaron 100 µl de solución I fría (50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) y se mezcló en vortex nuevamente. Se agregaron 200 µl de solución II recién preparada (0.2 N NaOH, 1% SDS), se mezcló el contenido invirtiendo el tubo en 5 ocasiones y se incubó en hielo durante 5 min. Se agregaron 150 µl de solución III fría (6 ml de acetato de potasio 5M, 1.1 ml de ácido acético glacial y 2.85 ml de agua bidestilada estéril), se mezcló en vortex suavemente y se incubó en hielo durante 5 min. Después se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min., se transfirió el sobrenadante a un microtubo limpio y se agregaron 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo, se mezcló en vortex, y se centrifugó a 12,000 rpm durante 2 min. Se transfirió la fase superior, sin tomar la interfase, a un tubo limpio y se agregaron 500 µl de cloroformo, se mezcló en vortex y se centrifugó igual que en el paso anterior. Se transfirió nuevamente la fase superior a un tubo limpio y el DNA se precipitó con 1 ml de etanol absoluto, se mezcló en vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min., se retiró el sobrenadante y se lavó el botón de DNA con etanol al 70% frío, se volvió a centrifugar, se retiró la solución de lavado y el botón de DNA se secó al aire durante 5 min. El DNA plasmídico se resuspendió en 50 µl de amortiguador TE [Tris 10 mM, EDTA 0.2 mM] con RNAasa (20 µg/ml), se incubó a 37°C durante 30 min. y se guardó a -20°C.

4.4 Preparación de DNA de plásmidos (midi-prep).

Se realizó un cultivo del plásmido pAC22CAT-1 con 75 ml de medio LB más ampicilina (100µg/ml) y se incubó a 37°C toda la noche. Al siguiente día el cultivo se centrifugó a 6000 rpm (Sorvall GSA) por 15 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 4 ml del amortiguador P1 (plasmid midi kit QIAGEN), posteriormente se le agregaron 4 ml del amortiguador P2 (plasmid midi kit QIAGEN) mezclándolo por inversión 4 ó 5 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Terminada la incubación se adicionaron 4 ml del amortiguador P3 (plasmid midi kit QIAGEN) frío, se mezcló inmediatamente por inversión 4 ó 5 veces y se incubó en hielo por 15 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm (Sorvall SS-34) durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se colocó en otro tubo y se centrifugó nuevamente por 15 minutos en las condiciones anteriores, terminada la centrifugación se tomó una muestra de 240 µl del sobrenadante que se guardó para analizar posteriormente una alícuota de éste en un gel de agarosa al 1%.

Cinco minutos antes de que terminara la centrifugación se equilibró la columna (QUIAGEN-tip 100) agregándole 4 ml del amortiguador QBT (plasmid midi kit QIAGEN) vaciándose la columna por gravedad. El sobrenadante ya centrifugado por segunda vez se pasó a través de la columna; se recibió el eluido en un tubo cónico de 50 ml, de este eluido se tomó una muestra de 240 µl que se guardó para su análisis posterior en un gel de agarosa al 1%.

Se lavó la columna con 10 ml del amortiguador QC (plasmid midi kit QIAGEN) dos veces, cada eluido se recibió en un tubo cónico de 50 ml y se tomó una muestra de 400 µl que se analizó en un gel de agarosa al 1%. El DNA se eluyó de la columna con 5 ml del amortiguador QF (plasmid midi kit QIAGEN) y se recibió el eluido en un tubo para rotor SS-34, se guardó también una muestra de 100 µl de este eluido para analizar. El DNA eluido de la columna se precipitó con 3.5 ml de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 11,000 rpm (Sorvall SS-34) a 4°C por 30 minutos. Terminada la centrifugación se eliminó el sobrenadante que se guardó en un tubo cónico de 50 ml; el botón se lavó con 2 ml de etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifugó inmediatamente a 11,000 rpm (Sorvall SS-34) por 10 minutos a 4°C, el

sobrenadante se decantó con mucho cuidado para no perder el botón de DNA, este se secó al aire por 5 ó 10

minutos y se resuspendió en 250 µl de H₂O bidestilada estéril. El DNA se guardó en un tubo microtubo de 1.5 ml a -20 °C.

4.5 Transfección de *Trichomonas vaginalis*.

Para el cultivo inicial de *T. vaginalis*, se preparó un tubo de cultivo que contenía 6 ml de medio TYM, 0.6 ml de suero de caballo inactivado por calentamiento (GIBCO BRL), y un inóculo de 4 millones de células; se incubó a 37°C durante 24 horas. A partir de este cultivo se inocularon dos botellas con capacidad de 200 ml; en cada botella se colocaron 50 ml de medio TYM, 5ml de suero de caballo (GIBCO BRL), y 20 millones de células; se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Pasado el tiempo de incubación, los cultivos se juntaron en un frasco estéril de 500 ml, se mezclaron perfectamente y se tomó una alícuota del cultivo para contar el número de parásitos. El resto del cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C en un rotor GSA. Se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió suavemente en 20 ml de solución Zimmerman fría. Las células se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, en un rotor SS-34. El paquete celular se resuspende en solución de Zimmerman suficiente para llevar a una concentración final de 600,000 células/µl. Las células de *T. vaginalis* se transfectaron mediante electroporación. Para la electroporación se utilizaron celdas (electroporation cuvette plus, 2 mm Gap, BTX) con 400 µl de células preparadas como ya se describió, 50 µg del plásmido pAC22CAT-1 en un volumen no mayor a 15 µls. Como control negativo se realizó otra electroporación en iguales condiciones, pero utilizando el plásmido pACT22GFP. Las celdas se incubaron en hielo por 5 minutos.

La electroporación se llevó a cabo con el equipo BTX electroporation system, electro cell manipulator 600. Las condiciones iniciales fueron un pulso a 1,500 µF, 360 V y 13 Ohms. Después de electroporadas las células se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos; a continuación cada electroporación se transfirió a una botella de cultivo de 50 ml de capacidad que contenía 15 ml de medio TYM y 1.5 ml de suero de caballo, preincubada a 37°C. Las botellas se incubaron a 37°C durante los distintos tiempos a ensayar (ver sección 5.1 de resultados).

4.6 Preparación de extractos proteicos de *Trichomonas vaginalis*.

Los extractos proteicos se obtuvieron de los cultivos de *T. vaginalis* transfectados por electroporación (secc.4.5) de la siguiente manera: Se transfirieron 3 ml de cultivo a 2 microtubos de 1.5 ml y se centrifugaron a 3,000 rpm por 5 minutos a 4°C en una microcentrifuga. El sobrenadante se eliminó y las dos pastillas se resuspendieron en un volumen total de 1 ml de solución TEN (Tris 40 mM pH=8, EDTA 1 mM pH=8 y NaCl 15 mM, estéril); las células se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 segundos a 4°C y se eliminó el sobrenadante con una pipeta; este último paso se repitió una vez más. Finalmente el paquete celular se resuspendió suavemente en 75 µl de Tris 25 mM pH=8, únicamente con la pipeta. Las células se lisaron con 3 ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido. Inmediatamente después del último ciclo, los tubos se incubaron a 37°C durante 5 minutos, y se repitieron dos ciclos mas de congelación-descongelación. A continuación los tubos se incubaron a 65°C por 10 minutos, se mezcló el lisado con la punta de una pipeta y se centrifugó en una microcentrifuga a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Los tubos se mantuvieron en hielo, los extractos proteicos se alicotaron en microtubos con 25 µl de extracto cada uno y se guardaron a -70°C hasta ser utilizados.

4.7 Ensayo para medir la actividad enzimática de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT).

En este ensayo se tomaron en cuenta todos los lineamientos para el manejo de material radioactivo.

Se preparó una solución de [³H]-cloranfenicol 0,2µCi/µl (ver apéndice D) y se diluyó a una concentración de 0,01µCi/µl. También se preparó N-Butiril-CoA 2.5mM en acetato de sodio 10 mM pH=5.

Para el ensayo CAT se utilizaron los extractos proteicos de *T. vaginalis* (secc.4.6) y se incluyeron los siguientes controles negativos y positivos

Controles negativos:

- 1.-Tris 25 mM
- 2.-Extracto proteico de células transfectadas con pAC22GFP

Controles positivos:

1.-Enzima CAT 0.016 U/ml

2.-Enzima CAT 0.008 U/ml

Todos los reactivos y las muestras se colocaron en hielo antes de comenzar el ensayo.

La mezcla maestra para 8 reacciones se preparó de la siguiente forma:

Solución.	[] final en la reacción
-160 μ l [3 H] Cloranfenicol (0.01 μ Ci/ μ l)	0.2 μ Ci
- 80 μ l N-Butiril-CoA 2.5 mM	0.25 mM
- 80 μ l Tris 1M, pH=8	100 mM
- 80 μ l Agua bidestilada estéril.	

- 400 μ l Volumen final.

Se prepararon las siguientes reacciones:

1. 50 μ l de Tris 25 mM pH=8 (control negativo de la reacción).
2. 48.9 μ l de Tris 25 mM pH=8 + 1.12 μ l de la enzima CAT dilución 1:1000 en Tris 25mM (0.008U) [control positivo de la reacción].
3. 47.8 μ l de Tris 25 mM pH=8 + 2.24 μ l de la enzima CAT dilución 1:1000 en Tris 25 mM (0.016U) [control positivo de la reacción].
4. 45 μ l de Tris 25 mM pH=8 + 5 μ l del extracto proteico de pAC22GFP(control negativo de transfección)
5. 45 μ l de Tris 25 mM pH=8 + 5 μ l del duplicado del extracto proteico de pAC22GFP (control negativo de la transfección)[duplicado].
6. 45 μ l de Tris 25 mM pH=8 + 5 μ l del extracto proteico de pAC22CAT-1.
7. 45 μ l de Tris 25 mM pH=8 + 5 μ l del extracto proteico de pAC22CAT-1 (duplicado).

A cada tubo se le agregaron 50 μ l de la mezcla maestra para tener un volumen final de 100 μ l. Se incubaron los tubos a 37°C durante 2.5 horas. Terminado el tiempo de incubación se extrajo el cloranfenicol diacetilado mediante una extracción con xileno; para esto se agregaron a los tubos 240 μ l de xileno, se vortexearon muy bien y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 minutos, se tomaron 180 μ l de la fase orgánica (superior) y se colocaron en un nuevo tubo marcado con un asterisco. Se realizó otra extracción, agregándole 210 μ l de xileno a los tubos con la reacción original y se realizó el mismo procedimiento anterior, ahora se tomaron 200 μ l de la fase orgánica y se colocaron en los tubos marcados con un asterisco para un volumen final de 380 μ ls. A los tubos con 380 μ l de xileno se les agregaron 250 μ l de Tris 25 mM pH=8, se vortexearon por 30 segundos y se centrifugaron 2 minutos a 14,000 rpm; se tomaron 330 μ l de la fase orgánica y se colocaron en nuevos microtubos, a estos tubos se les agregaron 300 μ l de Tris 25 mM pH=8 se mezclaron en vortex muy bien y se centrifugaron a 14,000 rpm por dos minutos, se tomaron 300 μ l de la fase orgánica y se colocaron en viales que contenían líquido de centelleo. Las muestras se leyeron en un contador de centelleo en el canal de tritio (ver resultados).

4.8 Cuantificación de Proteína.

Para reportar la actividad de CAT / μ g de proteína se cuantificó la cantidad de proteína en los extractos mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8 y 10 μ g /ml).

En un microtubo de 1.5 ml se colocaron 5 μ l de la muestra a cuantificar + 795 μ l de agua bidestilada estéril. A estos tubos se les agregó 200 μ l del reactivo Azul de Coomassie (Biorad), se vortexearon vigorosamente por 30 segundos, y se incubaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a 595 nm, antes de que transcurra una hora de realizada la reacción. Los datos de la curva patrón se graficaron para interpolar las lecturas de las muestras.

4.9 Extracción de RNA total.

Se extrajo RNA total de parásitos transfectados de acuerdo al siguiente procedimiento:

Se utilizó un cultivo con 120,000,000 de parásitos los cuales se centrifugaron en un tubo cónico (Nalgene) de 15 ml a 3,000 rpm por 10 minutos a 4°C en una centrifuga clínica. El paquete celular se resuspendió en 6 ml de PBS(amortiguador salino de fosfatos) preparado con H₂O DEPC. Se tomaron alícuotas de 1 ml en microtubos de 1.5 ml y se trataron de la siguiente forma: se centrifugaron 1 min. a 14,000 rpm a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de TRIZOL (GIBCO BRL). Las células se lisaron mediante pipeteo y el lisado se incubó 5 minutos a temperatura ambiente para disociar complejos nucleoprotéicos. Se agregó a cada tubo 0.2 ml de cloroformo, se mezcló por inversión 15 segundos, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El RNA se precipitó de la fase acuosa con 0.5 ml de alcohol isopropílico, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante se eliminó y se lavó el botón de RNA con 1 ml de etanol al 75% (H₂O DEPC). El botón de RNA se secó y se resuspendió en 30 µl de H₂O/DEPC.

Se valoró la integridad del RNA en un gel de agarosa al 0.8% en TBE 1X preparado con H₂O tratada con DEPC, el gel se corrió a 80 volts durante 1 hora.

4.9.1 Purificación del RNA poli A+.

A partir del RNA total de *T. vaginalis* se purificó el RNA poli A+ utilizando el Quick Prep Micro mRNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech). En este procedimiento se utilizó una resina [oligo(dT) celulosa] para separar el RNA poli A+. Se partió de 2.2 µg de RNA total de *T. vaginalis* resuspendidos en 30 µls de H₂O DEPC; se adicionó 0.4 ml del amortiguador de extracción [Quick Prep Micro mRNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech)], 0.8 ml del amortiguador de elución [Quick Prep Micro mRNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech)] 1 µl de oligo (dT) celulosa, se mezcló suavemente por inversión durante 3 minutos, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 segundos y se eliminó el sobrenadante. La resina se lavó cinco veces de la siguiente

manera: se resuspendió en 1 ml del amortiguador de alta sal [10mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.5 mM NaCl] se centrifugó a 14,000 rpm por 10 segundos y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente la resina se resuspendió en 1 ml del amortiguador de baja sal [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 0.1 M NaCl] por inversión, se centrifugó a velocidad máxima por 10 segundos y se eliminó el sobrenadante; este procedimiento se repitió 2 veces.

La resina se resuspendió en 0.3 ml del amortiguador de baja sal, se transfirió a la columna (microspin column) que se coloca dentro de un microtubo y se centrifugó a velocidad máxima (14,000 rpm) durante 5 segundos. Este proceso se realizó dos veces mas, utilizando 0.5 ml del amortiguador de baja sal y tubos nuevos.

El RNA poli A(+) se eluyó de la resina de la siguiente manera: La columna se colocó en un microtubo de rosca, y se le agregó 0.2 ml del amortiguador de elución a 65°C, la columna se centrifugó a velocidad máxima durante 5 segundos, y se guardó el eluato que contiene el RNA poli A+. La columna se lavó con 0.2 ml del amortiguador de elución a 65°C y se repitió el procedimiento anterior.

El RNA se cuantificó por espectrofotometría de la siguiente manera: el RNA se diluyó 1:100 en amortiguador de elución, en un volumen total de 500 μ ls. En una celda de cuarzo se leyó la absorbancia a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm. La concentración de RNA se calculó utilizando la fórmula:

$$1 \text{ D.O.}_{260} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$$

4.10 Amplificación rápida de extremos 3' de cDNA (3'RACE).

La técnica de 3' RACE incluye los procesos de: a) síntesis de cDNA a partir de RNA poli A+, b) amplificación del extremo 3' del cDNA del gen a estudiar mediante PCR y c) clonación del producto de PCR purificado.

a) Síntesis de cDNA de *T. vaginalis*.

Se utilizaron 500 ng de RNA polia A+ de *T. vaginalis* en un volumen de 25 µls; se agregó 1 µl (10 picomoles) del oligonucleótido AP (*adapter primer*):

[5'GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'], se incubó a 70°C durante 10 min y se colocó en hielo durante 1 min. Se agregaron 4 µl de amortiguador 10X Expand HF (Boehringer Mannheim), 2 µl de dNTPs 10 mM (Gibco BRL), 4 µl de MgCl₂ 25 mM (Boehringer Mannheim) y 4 µl de DTT 0.1M (Amersham Life Science), se mezcló y se preincubó durante 5 min a 42°C; se adicionó 1 µl de enzima transcriptasa reversa (200u/µl, Superscript II BRL) y se incubó durante 50 min a 42°C. La enzima se inactivó durante 15 min a 70°C. Posteriormente el RNA se degradó con 1 µl de RNasa H (1.5 u/µl, Stratagene) a 37°C durante 10 min.

b) Amplificación de los extremos 3' de cDNAs de CAT por medio de PCR.

En un microtubo de 0.5 ml para PCR se colocaron 4 µl de cDNA de *T. vaginalis* (inciso a) 5µl del amortiguador Expand HF 10X, 3 µl de dNTPs 10 mM (Gibco, BRL), 6 µl de MgCl₂ 25 mM, 27.5 µl de agua bidestilada, 2 µl (40 picomoles) del oligonucleótido AUAP-B [5'-GGATCCGGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'], 2 µl (40 picomoles) del oligonucleótido CAT10 [5'-CACATTCTTGCCCGCTG-3'], 0.5 µl de la enzima Expand High fidelity PCR system (3.5x10³ u/ml). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 µl y consistió de 30 ciclos de 1 min. de desnaturalización a 94°C, 2 min. de acoplamiento a 42°C y 3 min. de extensión a 72°C, seguidos por 5 min. de extensión a 72°C.

Para realizar una segunda amplificación del cDNA de CAT (PCR anidado, o "nested"), se colocaron 0.5 µl del producto de PCR de la primera amplificación, 5 µl de

amortiguador Expand HF 10X (Boehringer Mannheim), 3 μ l de dNTPs 10 mM (Gibco, BRL), 6 μ l de $MgCl_2$ 25 mM (Boehringer Mannheim), 31 μ l de agua bidestilada, 2 μ l (40 picomoles) del oligonucleótido AUAP-B [5'-GGATCCGGCCACGCGTCTCGACTAGTAC-3'], 2 μ l (40 picomoles) del oligonucleótido CAT 11 [5'-GAGCTGGTGATATGGGAT-3'] y 0.5 μ l de la enzima Expand High fidelity PCR system (3.5×10^3 u/ml). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 50 μ l y consistió de 35 ciclos de 1 min de desnaturación a 94°C, 1 min de acoplamiento a 55 °C y 1 min de extensión a 72 °C, seguidos por 5 min de extensión a 72 °C.

El producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X pH= 8 (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA). La banda del tamaño esperado se cortó y se purificó mediante un kit comercial (Quiagen), de la siguiente manera: Se pesó el fragmento de gel y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se le agregó 30 μ l del amortiguador solubilizador de gel L1 por cada 10 mg de gel, y 1 μ l de la resina de sílica por cada 10 mg de gel. Se incubaron a 50°C por 15 minutos mezclándose en vortex cada 3 minutos hasta la disolución del gel; a continuación se incubó 5 minutos mas sin mezclar en vortex. Se centrifugó a 12,000 rpm por 30 segundos, se descartó el sobrenadante, y la resina se resuspendió en 30 μ l del amortiguador L1 por cada 10 mg de gel. Se centrifugó a 12,000 rpm por 30 segundos y el sobrenadante se descartó. La resina se resuspendió en 30 μ l del amortiguador L2 (que contiene etanol) por cada 10 mg de gel, se centrifugó a 12,000 rpm, durante 30 segundos, y el sobrenadante se descartó. Se repitió el último paso, se removieron los restos de etanol que pudieran quedar y la resina se dejó secar al aire. Finalmente la resina se resuspendió en 20 μ l de solución TE y se incubó a 50°C durante 5 minutos, mezclandolo una vez durante la incubación; se centrifugó a 12,000 rpm durante 30 segundos y se recuperó el sobrenadante que contiene el DNA.

C) Ligación del producto de PCR en el vector TOPO (Invitrogen).

La clonación en el vector TOPO se basa en la reacción que se lleva a cabo entre la enzima topoisomerasa I del virus de la *Vaccinia* y el DNA del vector plasmídico, la enzima corta después de la secuencia 5'- CCCCTT de cada una de las cadenas del DNA (en este sitio se ligará el producto de PCR) y se forma un enlace covalente entre el grupo 3' fosfato del sitio

de corte y el residuo de tirosina (Tyr 274) de la topoisomerasa. Este enlace es atacado por el grupo 5' hidroxilo de la cadena de DNA liberando a la enzima, haciendo eficiente la clonación del producto de PCR con el vector. Se puede transformar en células químicamente competentes o bien en células electrocompetentes. El vector TOPO tiene en su genoma al gen *ccdB* que es un gen letal de *E. coli*, este gen esta unido al C terminal del fragmento *LacZ α* y al ligarse el producto de PCR se inhibe la expresión de dicho gen, permitiendo crecer únicamente a las colonias recombinantes representando de esta forma una gran alternativa para la clonación de productos.

Se clonaron de manera independiente tanto el producto de PCR anidado, como la banda de 500 pb purificada, de la siguiente manera: En un microtubo de 0.5 ml se colocaron 2 μ l del producto de PCR (completo o purificado por gel), 0.5 μ l de la solución diluida de sal (Zero Blunt TOPO PCR Cloning, Invitrogen), y 0.5 μ l del vector TOPO. La mezcla se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente para que se llevara a cabo la ligación. Posteriormente se agregaron 2 μ l de la reacción anterior a un vial de células competentes (*E. coli*, ya incluidas en el kit) mezclándose ligeramente. Las células se transfirieron a una celda para electroporación de 0.1 cm de diámetro, se electroporaron a 2.46 kvolts, y se recuperaron inmediatamente en 250 μ l de medio SOC. La mezcla se transfirió a un tubo cónico (Falcon) de 15 ml y se incubó a 37 °C por una hora con agitación a 500 rpm.

Después de la incubación se sembró 1/10 (30 μ l) y 9/10 (270 μ l) de cada electroporación en cajas de medio LB sólido + kanamicina (50 μ g/ml) y las cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

4.11 Selección de clonas positivas mediante hibridación.

Las colonias que se obtuvieron en las cajas de medio LB + kanamicina se parcharon por duplicado en cajas de medio LB + kanamicina (50 μ g/ml) de la siguiente manera: se colocó una plantilla cuadrículada y numerada bajo la caja petri y en cada uno de los cuadros se sembró una colonia distinta, mediante el uso de palillos estériles. Las cajas se incubaron a 37°C por 24 horas. El duplicado de cada caja se guardó a 4°C para recuperar

las clonas positivas. La transferencia de colonias a filtros para hibridación se hizo de la siguiente manera:

Se cortaron filtros de nitrocelulosa del tamaño de la base de la caja petri : se colocó un filtro sobre una caja petri, evitando que quedaran burbujas de aire, durante un minuto sobre las colonias parchadas; se marcaron los filtros con tinta para saber su orientación. Los filtros se transfirieron sucesivamente en las siguientes soluciones: SDS al 10% (5 min), NaOH 0.5 M (5min), NaCl 1.5 M (5 min). Los filtros se dejaron secar a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente se fijó el DNA utilizando una energía de 120,000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ de energía UV en un equipo UV crosslinker (Stratagene). A continuación los filtros se lavaron con una solución 5XSSC, 0.5%SDS y 1mM EDTA, para eliminar completamente los restos celulares. Se dejan secar los filtros por aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente.

Se prepararon 15 ml de la solución de prehibridación de la siguiente forma:

- 1ml de Tris 50 mM pH=7.4
- 2ml de solución Denhardt's 5X (ver apéndice D)
- 10 ml de formamida 50%
- 2 ml SDS 1%
- 5 ml SSC 5X (partiendo de una solución SSC 20X ver apéndice D)

Los filtros se prehibridaron durante dos horas en 10 ml de la solución de prehibridación, en un horno de hibridación (Amersham Life Science).

La sonda para hibridar los filtros, se preparó de la siguiente manera: utilizando el kit comercial RediprimeTM II (random prime labelling system) [Amersham farmacia biotech], 105 ng de DNA se llevan a un volumen de 45 μl con TE, se desnaturalizan por calentamiento a 95°C durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, se pasan a hielo durante 3' y se centrifugan a velocidad máxima en microfuga por 30 segundos.

El DNA desnaturalizado se agregó al tubo de labelling mix mezclándolo suavemente hasta que el color fue uniforme, se centrifugó nuevamente a la misma velocidad y se agregaron 1.5 μl (15 μCi) de α [³²P] dCTP homogeneizando perfectamente. La reacción y se incubó por 10 minutos a 37°C. Se paró la reacción agregando 5 μl de EDTA 0.2M, posteriormente se le agregaron 50 μl de solución TE; se pasó esta mezcla por

una columna de sephadex G50 para quitar la marca radiactiva libre, no incorporada a la reacción.

La sonda se desnaturizó con 10 µl de NaOH 3N durante 5 minutos a temperatura ambiente, se transfirió a hielo con agua y se neutralizó con 10 µl de HCl 3N y 5 µl de Tris 1M pH=7.4. La sonda desnaturizada se mezcló los 5 ml restantes de solución de prehibridación.

La solución de prehibridación de los filtros se desechó y a los filtros se les agregó los 5 ml de la sonda radiactiva. Los filtros se hibridaron durante un tiempo equivalente a 2 Cot 1/2, donde $Cot\ 1/2 = 2(1/X)(Y/5)(Z/10)$; X= Peso en µg de la sonda, Y= tamaño en kb de la sonda, y Z= volumen de hibridación en ml.

Pasado el tiempo de hibridación, los filtros se lavaron 2 veces durante 15 minutos a temperatura ambiente con una solución 2XSSC y 0.5%SDS; los filtros se monitorean con un contador geiger y se lavan las veces necesarias para reducir el fondo radiactivo. Los filtros se expusieron durante toda la noche en película Kodak X-Omat.

4.12 Reacción en cadena de la DNA polimerasa (Polymerase chain reaction : PCR).

Para determinar la orientación de los insertos de las clonas, se llevó a cabo la amplificación de los mismos mediante una reacción de PCR, como se describe a continuación: se eligieron 6 clonas al azar (clonas 2, 8, 11, 16, 24 y 36).

Reacción Forward (F).

Para cada clona, en un microtubo de 0.5 ml se colocaron 0.2 µl de una minipreparación de plásmido, 5 µl del amortiguador PCR 10X, 3 µl dNTP's 10 mM, 6 µl MgCl₂ 25 mM, 2 µl oligo CAT 11 (20 picomoles/µl) [5' GAGCTGGTGATATGGGAT 3'], 2 µl oligo forward (20 picomoles/µl) [5' G T A A A A C G A C G C C A G T 3'], 29.8 µl de H₂O bidestilada estéril, y 2 µl de la enzima Taq polimerasa (3.5 × 10³ U/µl).

Reacción Reversa (R) para cada clona.

En un microtubo de 0.5 ml se colocaron 0.2 µl de una minipreparación de plásmido, 5 µl del amortiguador PCR 10X, 3 µl dNTP's 10 mM, 6 µl MgCl₂ 25 mM, 2 µl oligo CAT 11 (20 picomoles /µl) [5' GAGCTGGTGATATGGGAT 3'], 2 µl oligo reverse (20

picomoles/ μ l) [5' GGAACAGCTATGACCATG 3'], 29.8 μ l de H₂O bidestilada estéril, y 2 μ l de la enzima Taq polimerasa (GibcoBRL) [3.5 \times 10³ U/ μ l].

Para el control positivo se colocó en un microtubo de 0.5 ml 0.2 μ l de una minipreparación de plásmido de la clona 2, 2.5 μ l del amortiguador para PCR 10X, 1.5 μ l dNTPs 10 mM, 3 μ l MgCl₂ 25 mM, 1 μ l oligo reversa (20 picomoles/ μ l), 1 μ l del oligo forward (20 picomoles/ μ l), 15 μ l de H₂O bidestilada estéril y 1 μ l de la enzima Taq polimerasa (Gibco BRL) [3.5 \times 10³ U/ μ l], mientras que para el control negativo se colocó en un microtubo de 0.5 ml 5 μ l del amortiguador para PCR 10X, 1.5 μ l dNTPs 10 mM, 3 μ l MgCl₂ 25 mM, 1 μ l oligo CAT11 (20 picomoles/ μ l), 1 μ l del oligo forward (20 picomoles/ μ l), 15 μ l de H₂O bidestilada estéril y 1 μ l de la enzima Taq polimerasa (Gibco BRL) [3.5 \times 10³ U/ μ l].

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50 μ l y consistieron en 30 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 2 min de acoplamiento a 42°C y 3 min de extensión a 72°C, seguidos por 5 min de extensión a 72°C.

Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1%, en TAE 1X, el gel se corrió a 80 volts/ 1 hora.

4.13 Secuenciación de DNA .

Se utilizó el procedimiento de secuenciación mediante terminación de la síntesis de la cadena con dideoxinucléotidos descrito por Sanger (Sanger, y col. 1977). Se utilizó el kit comercial (T7 Sequenase versión 2.0 DNA sequencing kit) [Amersham Life Science].

En un microtubotubo de 1.5 ml, se colocaron 10 μ l de una minipreparación de DNA plasmídico, 2.5 μ l de solución desnaturalizante (1 M NaOH, 1 mM EDTA) y 2.5 μ l de agua bidestilada estéril y se incubaron a 37°C durante 15 min. Mientras transcurrió la incubación se preparó una columna para la neutralización, de la siguiente manera: a un microtubo de 0.5 ml se le hizo un orificio en la parte inferior y se le pusieron perlas de vidrio Sigma estériles, al tubo se agregaron 750 μ l aproximadamente de sepharosa CL6B (Pharmacia) y se centrifugó a 3,000 rpm durante 3 min. dentro de un microtubo de 2 ml. Se cambió el tubo donde se recibe la muestra, poniendo un microtubo limpio de 1.5 ml, enseguida se agregó la muestra de DNA desnaturalizado a la columna y se centrifugó en las mismas

condiciones. Posteriormente se procedió al acoplamiento del DNA con el oligonucleótido: en un microtubo limpio se colocaron 8 μ l del DNA neutralizado (recuperado de la columna), 1 μ l de oligonucleótido (10 μ g/ml) y 2 μ l del amortiguador de Sequenasa 5X y se incubó a 37°C durante 15 min. Mientras tanto, en un microtubo de 1.5 ml se preparó una mezcla que contenía 5.6 μ l del amortiguador TE, 1.1 μ l de 0.1 M DTT, 0.45 μ l de mezcla de marcaje (dGTP), 0.3 μ l de la enzima Sequenasa, 0.5 μ l de 35 S dATP (Amersham Pharmacia) y 1 μ l del amortiguador de dilución de la enzima. En una cajita para secuencia (Nunc) se alicuotaron 2.5 μ l de las mezclas de terminación ddNTPs (ddA, ddC, ddG, ddT), en cada pozo por separado y se incubó a 37°C. Por otra parte, a los tubos que contenían el DNA y el oligonucleótido acoplados, se agregaron 8 μ l de la mezcla que contiene la enzima Sequenasa y el 35 S dATP para que iniciará la reacción de marcaje y se incubó a temperatura ambiente durante 3 min. Para la extensión de la síntesis de las cadenas de DNA y su terminación específica se pusieron 4 μ l de la reacción anterior en cada pozo de la cajita de secuenciación (ddA, ddC, ddG, ddT) y se incubaron a 37°C durante 3 min. Finalmente cada reacción se detuvo con 4 μ l de la solución de terminación y se colocó la caja con las reacciones a -20°C para ser utilizada al día siguiente. Antes de colocar las muestras en el gel de acrilamida-urea (ver apéndice C), se desnaturalizaron colocándolas sobre un termoblock a 80°C, durante 2 min. y después se colocaron inmediatamente sobre hielo.

Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de acrilamida-urea 6% (apéndice C) y amortiguador TBE 1X a 60 watts constantes. Se utilizó un aparato de secuenciación Modelo S2, (Life Technologies, GIBCO, BRL). Las muestras (2.5 μ l) fueron colocadas en el gel en tiempos de corridas de 2 y 4 hrs. El gel se secó en el aparato Savant GDS100 Gel Drying System (Amersham) y se expuso durante 48 horas en un cassette con película Kodak.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Funcionalidad del vector de expresión pAC22CAT-1

En el laboratorio de la Dra. Imelda López se han construido vectores para la expresión de genes reporteros en *T. vaginalis*. En este trabajo se utilizó el vector pAC22CAT-1, que contiene al gen reportero *cat* flanqueado por las regiones regulatorias 5' y 3' de un gen de actina (ver fig 6).

En un reporte previo(Jonson, y col. 1997), el grupo de la Dra. P. Johnson reportó la expresión de CAT en *T. vaginalis* en un vector de expresión que utiliza las regiones promotoras del gen endógeno α -succinil CoA sintetasa (α -SCSB). Ese grupo reportó que la mayor expresión de CAT se presentó entre 8-21 horas post-electroporación.

El primer objetivo de este proyecto fue determinar las condiciones óptimas de transfección de *T. vaginalis* (mediante electroporación) así como el tiempo post-transfección en donde se pueda detectar la mayor expresión de CAT a partir del vector pAC22CAT-1.

5.1.1 Optimización de las condiciones de electroporación de *T. vaginalis*.

En el electroporador BTX (BTX electroporation system, electro cell manipulator 600) se probaron las siguientes condiciones de electroporación, según el ensayo descrito (sección 4.5):

μ g de DNA plasmídico	Volts	μ faradios
10	360	1500
25	360	1500
50	360	1500
50	300	960
50	300	1500
50	360	960

Después de la transfección, los cultivos se incubaron durante 22 horas, y se midió la actividad de CAT en el extracto proteico. Los resultados se muestran en la figura 7. Como se observa en la gráfica, la mayor eficiencia de transfección (100%) se logró con 50 μ g de

plásmido, 1500 μf y 360 volts. Estas son las condiciones que se utilizaron en los experimentos subsiguientes.

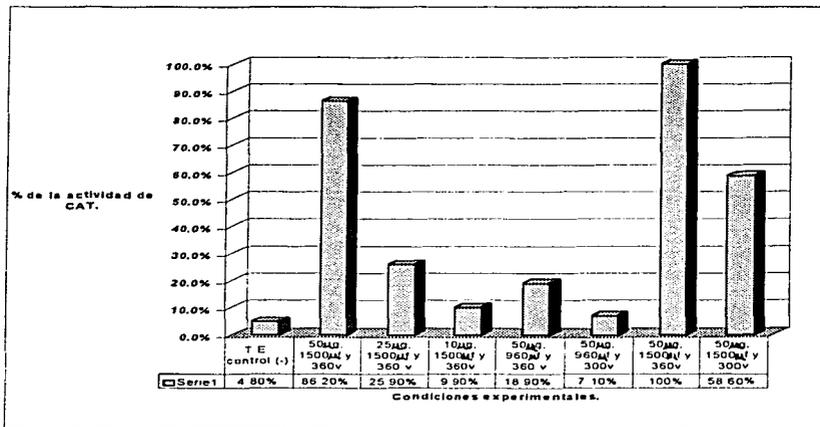
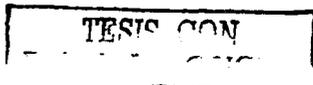


Figura 7. Actividad de CAT en extractos proteicos de cultivos de *T. vaginalis* transformados con el plásmido pAC22CAT-1 bajo distintas condiciones de electroporación.

5.1.2 Detección de la actividad enzimática de CAT.

Para determinar el tiempo post-transfección en donde se lleva a cabo la mayor expresión de CAT, se midió la actividad de esta enzima a las 3.5, 21.5, 25, 29 y 48 horas post-transfección. Los resultados se muestran en la figura 8. Se observa que el pico de expresión de CAT se da a las 21.5 horas post-transfección. Sin embargo, ya que el valor máximo observado en este análisis fue la primer medición que se realizó, se decidió llevar a cabo una cinética de la actividad de CAT tomando muestras a tiempos menores de recuperación después de la electroporación. Los resultados se muestran en la figura 9, en la que puede verse que el pico de actividad de CAT se detecta a las 22 hrs. post-transfección.



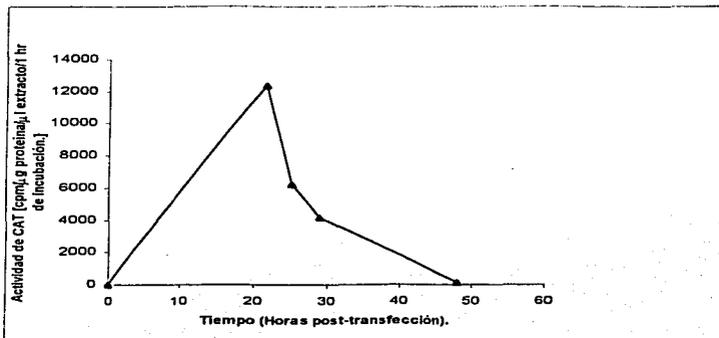


Figura 8 Ensayo de la actividad de CAT a distintos tiempos post-transfección.

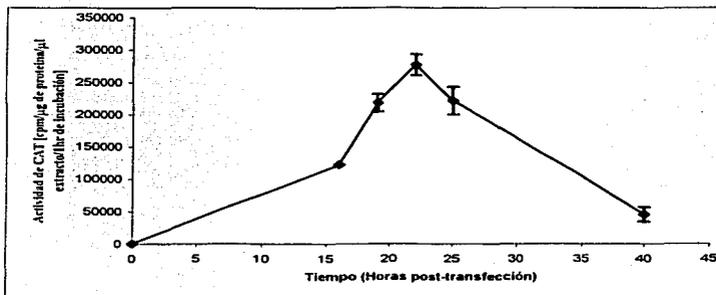


Figura 9 Ensayo de la actividad de CAT a distintos tiempos post-transfección; el error estándar se muestra para cada punto.

Con los ensayos anteriores se demostró que el vector de expresión pAC22CAT-1 es funcional; esto es, al introducir este vector en *T. vaginalis* mediante electroporación, el gen *cat* se transcribe y se traduce en este parásito y el producto proteico (CAT) posee actividad enzimática.

5.2 Determinación del sitio de poliadenilación de los transcritos del gen reportero *cat* expresado en *T. vaginalis*.

Uno de los objetivos de este trabajo es determinar el sitio de poliadenilación de los transcritos del gen reportero *cat*, expresados a partir del vector pAC22CAT-1. Este análisis permitirá determinar si la región 3'UTR de un gen de actina es capaz de dirigir el procesamiento (poliadenilación) del transcrito de un gen reportero de manera análoga al procesamiento de los transcritos de actina.

Con este fin se llevó a cabo la amplificación de los extremos 3' de cDNA de *cat*, así como la clonación y secuenciación de los mismos.

5.2.1 Amplificación de la región 3' de los transcritos del gen *cat*.

Como se describió en la sección 4.10 se realizó el procedimiento de amplificación rápida de los extremos 3' de cDNA (3'RACE). Este proceso se ilustra en la figura 10.

En la primera ronda de amplificación de los extremos 3' de cDNAs de *cat* el producto de PCR que se obtuvo muestra varias bandas; las de mayor tamaño y más nitidez corresponden a 500, 1000 y 2000 pb aproximadamente; la banda que nosotros esperábamos es de 480 pb lo que coincide con una de las bandas (figura 11 A).

En la segunda ronda de amplificación (PCR nested) se obtuvieron productos de amplificación más definidos y de tamaño similar a los productos de la primera amplificación. Para saber cuales productos de amplificación corresponden a *cat*, se realizó un análisis por Southern blot en donde los productos de amplificación por PCR se hibridaron con el fragmento de 420 pb EcoRI/SstI del plásmido pAC22CAT-1 (fig 6), que contiene el fragmento 3' del gen *cat* (figura 11 B). El resultado de la hibridación mostró que las bandas de ~480 pb y ~420 pb (del primer y segundo PCR's respectivamente)

corresponden a *cat*; el resto de las bandas pueden ser el resultado de amplificación inespecífica.

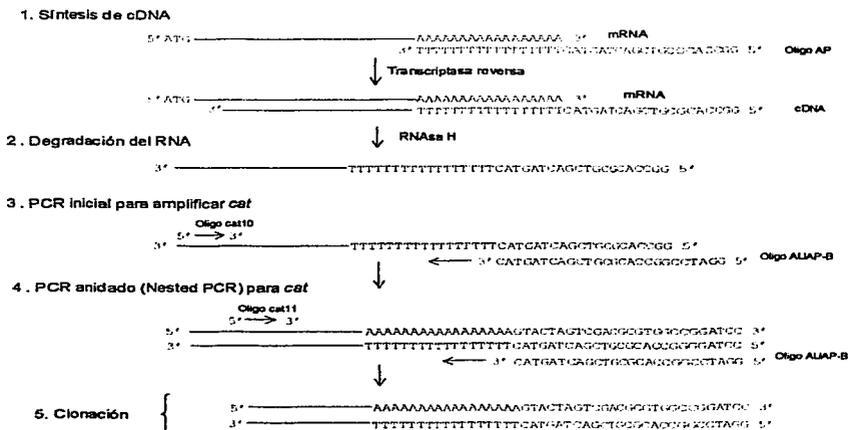


Figura 10. Esquema del proceso de amplificación rápida de los extremos 3' de cDNA (3'RACE).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

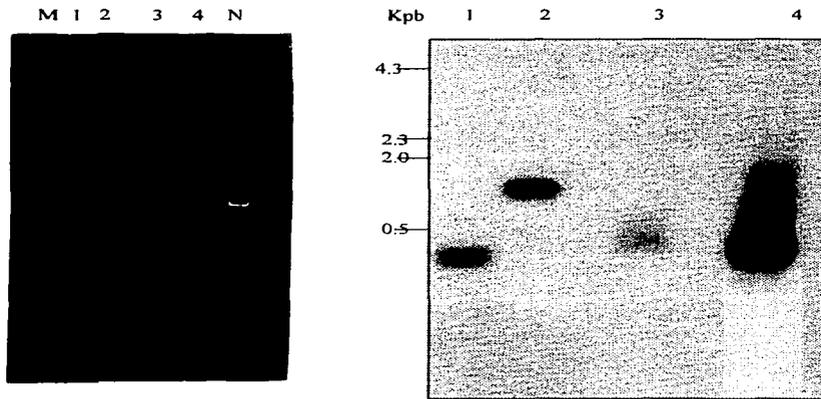


Figura 11. A) Gel de agarosa al 0.8% corrido por 1 hora a 80 volts, y teñido con bromuro de etidio. Carril M: marcador de peso molecular (λ Hind III); carril 1: fragmento de 420 pb proveniente de la digestión del vector pAC22CAT-1 con *EcoRI* y *SstI* utilizado como sonda para *cat* (muy tenue); carril 2: digestión pAC22CAT-1/*EcoRI*; carril 3: producto del PCR inicial; carril 4: producto del PCR anidado (nested). B) Southern blot del gel presentado en el panel A. Sonda: fragmento de 420 pb *EcoRI-SstI* del gen *cat*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.2 Clonación de los productos amplificados por 3' RACE y análisis de las clonas.

La banda de 500pb del PCR anidado (Nested), se purificó mediante gel de agarosa y se ligó con el vector TOPO; se obtuvieron 13 colonias. En una reacción independiente se ligó el producto completo del PCR anidado con el vecor TOPO, y se obtuvieron de esta reacción 189 colonias.

Las colonias transformantes (TOPO3'^{CAT}) se parcharon en cajas de LB + kanamicina, para posteriormente hibridarse con una sonda homóloga de *cat*, y así identificar aquellas que contenían secuencias relacionadas con *cat*. De esta hibridación se tuvieron 95 clonas positivas: 84 provenientes del PCR Nested y 11 provenientes del inserto de 500 pb. Un ejemplo de la señal de hibridación que se obtuvo se muestra en la figura 12.

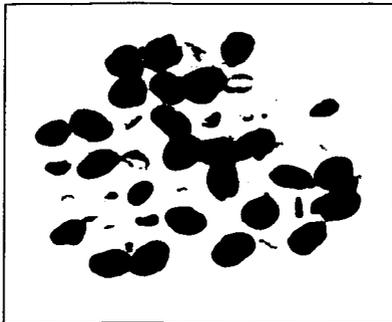


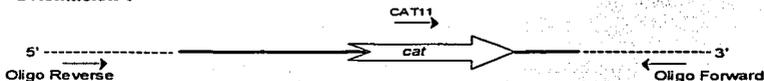
Figura 12. Señales positivas obtenidas para las clonas TOPO3'^{CAT}.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De las 95 clonas positivas se seleccionaron 6 clonas al azar para ser analizadas y posteriormente secuenciadas; se seleccionaron las siguientes clonas: 2TOPO-3'CAT, 8TOPO-3'CAT, 11TOPO-3'CAT, 16TOPO-3'CAT, 24TOPO-3'CAT, y 36TOPO-3'CAT. Las clonas 2, 8, y 11 provienen del producto de 500pb purificado y clonado en el vector TOPO. Las clonas restantes provienen del producto de PCR nested completo, clonado en TOPO.

Como primer paso se determinó la orientación del inserto en cada clona mediante amplificación por PCR: se utilizaron en reacciones independientes el oligonucleótido M13 Forward [5'CTGGCCGTCGTTTTAC3'] ó el oligonucleótido M13 Reverse [5'GCAGGAACAGGCTATGAC3'], que se anclan en el vector TOPO, y el oligonucleótido CAT11 que es un oligonucleótido interno del gen *cat* (ver figura 5). La orientación del inserto se conoce mediante el resultado de los productos de PCR ya que solamente una de las combinaciones de los oligonucleótidos generará el producto de amplificación esperado que es de ~500 pb (fig13).

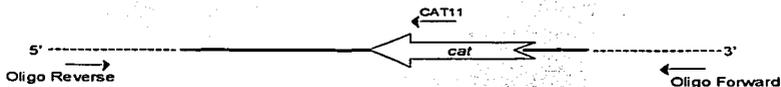
Orientación 1



CAT11 + O. Reverse = No hay amplificación

CAT11 + O. Forward = Amplificación

Orientación 2



CAT11 + O. Reverse = Amplificación

CAT11 + O. Forward = No hay amplificación.

Figura 13. Orientaciones posibles del gen *cat* en las clonas TOPO-3'CAT.

Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

CLONA	OLIGOS: M13 FORWARD + CATII	OLIGOS M13 REVERSE + CATII	ORIENTACIÓN
2TOPO-3'CAT	Varias bandas	Varias bandas	?
8TOPO-3'CAT	Varias bandas	Varias bandas, entre ellas una de 500 pb	2
11TOPO-3'CAT	No se obtuvo producto	No se obtuvo producto	?
16TOPO-3'CAT	Varias bandas	Banda de 600 pb	2
24TOPO-3'CAT	Varias bandas	No se obtuvo producto	1
36TOPO-3'CAT	Varias bandas.	Banda de 500 pb	2

5.2.3 Secuenciación de clonas TOPO3'CAT.

El hecho de conocer la orientación de los insertos (secc.5.2.2) nos permitió seleccionar el oligonucleótido apropiado para llevar a cabo la reacción de secuenciación. Cabe mencionar que debido a que con la clona 2TOPO-3'CAT se observaron varias bandas de amplificación por PCR con ambas combinaciones de oligos, se decidió secuenciarla por los dos extremos, es decir, se secuenció tanto con el oligonucleótido Forward como con el Reverse.

Las clonas se secuenciaron con los oligos que se muestran a continuación, según el protocolo descrito en la sección 4.13. La clona 11TOPO3'CAT no se secuenció debido a que no se obtuvo producto de amplificación por PCR, como se señaló en la sección anterior.

En la figura 14 se muestra un ejemplo del tipo de señal obtenida en el proceso de secuenciación.



Figura 14. Gel de secuencia obtenido para la clona I6TOPO-3'CAT.

Clona 2TOPO3'CAT: ambos oligonucleótidos (Forward y Reverse)

Clona 8TOPO3'CAT: oligonucleótido Reverse

Clona 16TOPO3'CAT: oligonucleótido Reverse

Clona 24TOPO3'CAT: oligonucleótido Forward

Clona 36TOPO3'CAT: oligonucleótido Reverse.

5.2.4 Secuenciación y análisis de las clonas TOPO3'CAT.

La secuencia de cada una de las clonas se presenta a continuación. En algunos casos se muestran bases entre paréntesis debido a que la señal en la autoradiografía no fue muy clara y no se pudo asegurar la presencia o no de esa base. Por otra parte un símbolo en diagonal significa que en esa posición no se pudo definir cuál de las dos bases está presente. Las bases subrayadas pertenecen al vector de clonación (TOPO).

1.-Clona 2TOPO-3'CAT (Forward): 158 pb.

5' AATGCTTAATGTTAAACAGTACTGCGATGAGTG (G) CAGG (G) CGGG (G) CGTAAGAGCTCACTTAAACAA
TTTCGGTATAATATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAG (T/C) CGACGCGTGCCCGGANCCAAAGGGCGNA
TCTGCAGNATCC (A/T) CACACTGGGNG3'

Esta secuencia corresponde al extremo 3' del cDNA de *cat*.

2.-Clona 2TOPO-3'CAT (Reverse): 240 pb.

5' GAACGCCGCCAGTGTGCTGGATATCTGCCCTTGTAG (C/T) GGTGTATAGGGATAGTCTTACC (C/T) TT
GACACCGTTTTCCATGAGCAAACGAAACGTTTTCATCGCTCTGGATGTGAATACCACGACGATCGCACTC (T
/A) CACA (A/T) (A/T) TCGTCAANTGTGTGCGGTACGTGAECTGC (A/T) TTC (A/T) AGGTATGAGA (A/T
TGTCGCTGCACTCCACT (C/A) CGT (G/A) TACGGCAATT (A/G) CAC (C/T) (C/T) GCGTACATGAT (A/T
) (A/T) GG (A/C) G3'

Esta secuencia corresponde al extremo 5' del cDNA de *cat*.

3.-Clona 16TOPO-3'CAT (Reverse): 166 pb.

5' ATGCTCATGCTGGCAGAATGCTATGATTACAACAGTACTGC (G/A) TGAGTGCAGGGCCGGCGTAAGAGCTC
ACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTAGTTCGACGCGTGCCCGGA
ATCCAACGCAAAATCCATGGGTGCGGCTAGTCCGCG3'

Esta secuencia corresponde al extremo 3' del cDNA de *cat*.



4.-Clona 24TOPO-3'CAT (Forward): 168 pb.

5' TCCAGCTACCTCCACAACAGCAGGATATGCACCACCACCACAGGCTATGCAGCACCTCCTCCTGGATCCCA
GCAACCACCGCCAAAATGCAATGATCTTATTTTTTCTAAGTTCAACTTCTAAACGATTTTTAATTACCACA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA3'

Esta secuencia no corresponde a *cat*; sin embargo la secuencia contiene el extremo 3' de un cDNA de *T. vaginalis*, por lo que se decidió analizar si las señales propuestas para la poliadenilación están presentes en esta secuencia.

5.-Clona 36TOPO-3'CAT (Reverse): 185 pb.

5' GTAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAACCTTCATGATGAACCTGAA
TCGCCAGGCATCAGCACCTTGTGCGCTTGGGTATAATTTGCCCATGGTAAAACGGGGCGAAGAAGTTG
TCATATTGCCACGTTTAAATCAAACCTGGTGAACCTCACCA3'

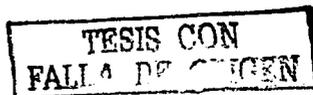
Esta secuencia corresponde a *cat*, pero el extremo 3' del cDNA no pudo ser leído y por lo tanto no se muestra la región 3'UTR.

6.-Clona 8TOPO-3'CAT (Reverse): 241 pb.

5' GCCAGTGTGCTGGAATTGCCTTGTAGCTGCTATAGGGTAAAGTGTACCTCGCATGTTACACCGTTCTAGGA
GCAAACCTGAAACGTCATCGTGCTGGAGTGAATACCACGACGATCGCGAGTCATCACAATATGCAGAGTGCCTG
TACGTCAAACCTGCATTTCTAAGGTATGAGAATTTGTTTCGNTCAGCATCTGTGAGTACAGTTGATAACGTGCAA
TTGACACTCTGCGTACATGCAATT3'

Esta secuencia corresponde al extremo 5' del cDNA de *cat*.

Las secuencias que se analizaron fueron las siguientes: Clona2TOPO-3'CAT (forward), clona 16TOPO-3'CAT (Reverse) y clona 24TOPO-3'CAT (forward) que contienen los extremos 3'UTR. Las secuencias anteriores se alinearon con la secuencia parental del plásmido pAC22CAT-1 (fig 6). En los alineamientos que se muestran en la figura 12, el codón de paro de la traducción de *cat* (TAA) se encuentra subrayado y seguido por la secuencia GAGCTCACT que une a este gen con la región 3' UTR de actina. La región 3'UTR de actina contiene el codón de paro de actina (en negritas, TAA) que forma parte de la señal de poliadenilación (TAAA). La señal propuesta como sitio de corte y procesamiento



(Py↓ (A)_n-AAUU) esta presente en la secuencia parental. El nucleótido en doble subrayado es la última base que se identifica en el cDNA antes de la cola de poliA.

```

T. actina      5'...CACCGCAAGTGCTTCTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTGAAAAAAAAAAAAAAAA...3'
pAC22CAT-1    5'...GCCTAAAGAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTGAAATTAACCTAAC...3'
Clona 2       5'...GCCTAAAGAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTGAAAAAAAAAAAAAAAA...3'
Clona16       5'...GCCTAAAGAGCTCACTTAAACAATTTCCGGTATAATATATTTGAAAAAAAAAAAAAAAA...3'
Clona24       5'...TCTAAGTCAACTTCTAAACGATTTTTTAATTACCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA...3'
  
```

Figura 12. Secuencias TOPO3'-CAT alineadas y comparadas con la secuencia de un transcrito de actina y con la secuencia del plásmido pAC22CAT-1 donde se observa subrayado el codón de fin de la traducción de *cat*, en negritas se muestra la señal de poliadenilación propuesta en *T. vaginalis* (TAAA) que incluye al codón de paro de actina, y con doble subrayado se muestra el último nucleótido antes de la cola de poli A's.

Al comparar las secuencias de cDNA de las clonas 2 y 16 de cDNA de *cat*, se observa que éstas alinean exactamente con la secuencia parental del plásmido pAC22CAT-1, y se poliadenilan en el mismo sitio que actina. Este resultado indica que la secuencia 3'UTR del gen de actina contiene los elementos necesarios para dirigir el procesamiento y la poliadenilación del transcrito de un gen exógeno, y que la región codificadora del transcrito no está involucrada con el procesamiento del mismo.

En cuanto a la secuencia de la clona 24TOPO3'-CAT encontramos que este cDNA no corresponde al gen *cat*. Esta secuencia se analizó con el programa BLAST, y no se encontró similitud significativa con alguna proteína reportada. Ya que esta clona pertenece a un cDNA de *T. vaginalis*, se decidió analizar la región 3'UTR. En la secuencia existe una cola de poli A y están presentes dos codones de paro de la traducción, cada uno en un marco de lectura distinto, por lo que analizamos los tres marcos de lectura con el resultado siguiente:

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

El primer marco de lectura no es el utilizado pues no hay codón de término de la traducción (fig 13).

```

5' TCCAGCTACCTCCACAACAGCAGGATATGCACCACCACCACAGGCTATGCAGCACCTCCTCCTGGATCC
  S S Y L H N S R I C T T T T G Y A A P P P G S
CAGCAACCACCGCCCAAATGCAATGATCTATTTTTTTCTAAGTTCAACTTCTAAAGGATTTTAATTACCA
Q Q P P P K M Q W S Y F F L S S T S K R F L I T
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'
T K K K K K K K K

```

Figura 13. Traducción del primer marco de lectura de la clona 24TOPO3'-CAT.

En el segundo marco de lectura está presente el codón de paro TAA y río abajo encontramos al tetranucleótido **TAAA**, propuesto como señal de poliadenilación en *T. vaginalis*, y se encuentra 16 nucleótidos río arriba del sitio de corte y poliadenilación (fig 14).

```

5' TCCAGCTACCTCCACAACAGCAGGATATGCACCACCACCACAGGCTATGCAGCACCTCCTCCTGGATCC
  P A T S T T A G Y A P P P Q A M Q H L L L D P
CAGCAACCACCGCCCAAATGCAATGATCTATTTTTTTCTAAGTTCAACTTCTTAAAAGGATTTTAATTACCA
  S N H R P K C N D L I F F * -----3'UTR-----
CAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

```

Figura 14. Segundo marco de lectura de la clona 24TOPO3'-CAT. Se muestra subrayado el codón de término de la traducción, en negritas la señal de poliadenilación propuesta y con doble subrayado el nucleótido (pirimidina) antes de la cola de poliadenilación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el tercer marco de lectura encontramos el codón de paro de la traducción (**TAA**) que forma parte del tetranucleótido **TAAA** propuesto como señal de poliadenilación en *T. vaginalis*, y se encuentra a una distancia de 16 nucleótidos del sitio de corte; esto concuerda con la propuesta de que la señal de poliadenilación se encuentra de 11 a 30 nt río arriba del sitio de corte (fig 15).

5' TCCAGCTACCTCCACAACAGCAGGATATGCACCACCACCACAGGCTATGCAGCACCTCCTCCTGGATCCCA
 Q L P P Q Q Q D M H H H H R L C S T S S W I P
 GCAACCACCGCCAAAATGCAATGATCTTATTTTTTTCTAAGTTCAACTTCT**TAAA**CGATTTTTTAATTACCACA
 A T T A Q N A M I L F F S K F N F *-----3'UTR-----
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

Figura 15. Traducción del tercer marco de lectura de la clona 24TOPO3'-CAT. Se muestra la señal de poliadenilación propuesta en *T. vaginalis* TAAA en negritas, el codón de término de la traducción subrayado, y con doble subrayado el nucleótido (pirimidina) antes de la cola de poliA.

Para tratar de determinar si el segundo o el tercer marco de lectura es el utilizado, se analizó la frecuencia de uso de codones preferentes para *T. vaginalis* en cada uno de los tres marcos de lectura. El resultado se muestra en la siguiente tabla:

Marco de lectura	# de codones preferentes de <i>T. vaginalis</i>	# de codones totales leídos en la secuencia.	Relación. Preferentes/ totales.
Primero	17	51	0.33
Segundo	36	47	0.76
Tercero	38	50	0.76

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

El segundo y tercer marco de lectura tienen la misma frecuencia de uso de codones preferentes para *T. vaginalis*, por lo tanto con los datos anteriores no puede determinarse el marco de lectura de esta secuencia, y se debe secuenciar la clona en su totalidad para determinarlo.

Sin embargo es interesante encontrar que la señal propuesta de poliadenilación podría ser funcional en los dos casos anteriores.

6. Conclusiones y Perspectivas.

1.-Se establecieron las condiciones experimentales para la transfección y expresión óptima de la enzima Cloranfenicol acetil transferasa en *T. vaginalis*. Estas condiciones son: 50 µg de DNA plasmídico (pAC22CAT-1), 1500 µf y 360 volts, y un tiempo de recuperación de 22 horas post-transfección.

2.- Para determinar si la región 3'UTR de un gen de actina contiene las señales que dirigen el procesamiento y poliadenilación de los transcritos, se fusionó dicha región con el gen reportero *cat*. Los resultados muestran que la región 3'UTR es capaz de dirigir el procesamiento y poliadenilación de los transcritos de *cat*, y este procesamiento se lleva a cabo en los mismos sitios en donde se procesan los RNAs mensajeros de actina. Por lo tanto, la región codificadora no parece estar involucrada en el procesamiento de los transcritos.

Perspectivas.

Ahora que se cuenta con el modelo de el gen reportero *cat* fusionado a las regiones 5' y 3' de un gen de actina, será necesario realizar el análisis funcional de las señales propuestas para la poliadenilación y el procesamiento de transcritos en *T. vaginalis*. Se contempla mutagenizar estas señales y evaluar la actividad del reportero, el procesamiento de los transcritos y el sitio de poliadenilación de los mismos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7. BIBLIOGRAFÍA

Arroyo, R. 2000. *Biología molecular de la trichomonosis. Genética y Biomedicina Molecular*. Edit. Limusa, Noriega. Cap. 19. P.p. 287-304.

Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A. and Alderete, J.F. 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for ameboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Mol. Microbiol.* 7(2):299-309.

Baroin, A., Perasso, R., Qu, L.H., Brugerolle, G., Bachelieric, J.P. and Adoutte, A. 1988. Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 3474-3478.

Beelman, C.A. and Parker, R. 1995. Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell.* 81:179-183

Biangini, G.A., Finlay, B.J., and Lloyd, D. 1997. Evolution of the hydrogenosome. *FEMS Microbiology Letters.* 155:133-140.

Chen, F., MacDonald, C.C. and Wilusz, J. 1995. Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Research.* 23(14):2614-2620.

Cotch, M.F., Patorek, J.G., Nugent R.P., Hillier, S.L., Gibbs, R.S., Martin, D.H., Eschenbach, D.A., Edelman, R., Carey, J.C., Regan, J.A., Krohn, M.A., Klebanoff, M.A., Rao, A.V. and Rhoads, G.G. 1997. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group. *Sex. Trans. Dis.* 24(6):353-360.

Delgadillo María G., Liston D., Niazí K., Johnson P. 1997. Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.* 94, pp. 4716-4720, April 1997 *Microbiology*

Eckner, R., Ellmeier, W. And Birnstiel, M.L. 1991. Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from de nucleus. *The EMBO Journal.* 10(11):3513-3522.

Espinosa Norma, Hernández R., López-Griego L., Arroyo R., López-Villaseñor I. 2001. Differences between coding and non-coding regions in the *Trichomonas vaginalis* genome: an actin gene as a locus model. *Acta Tropica* (2001) 147-154.

Espinosa Norma, Hernández R., López-Griego L., López-Villaseñor I. 2002. Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs. *Gene* 289 (2002) 81-86.

Germot, A. Philipe, H. and Le Guyeader, H. 1996. Presence of a mitochondrial type 70 kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggests a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14614-14617.

Gil, A. and Proudfoot, N.J. 1987. Position-dependent sequence elements downstream of AAUAAA are required for efficient rabbit b-globin mRNA 3' end formation. *Cell*. 49:399-406.

Gómez-Conde, E., Mena-López, R., Hernández-Jauregui, P., Gozález-Camacho, M. and Arroyo, R. 2000. *Trichomonas vaginalis*: Chromatin and mitotic spindle during mitosis. *Experimental Parasitology*. 96:130-138.

Guo, Z. And Sherman, F. 1995. 3' end-forming signals of yeast mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 15(11):5983-5990.

Lahti, C.J., D'Oliveira, C.E. and Johndon, P.J. 1992. β -Succinyl-coenzyme A synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences. *Journal of Bacteriology*. 174(21):6822-6830.

Liston, D.R. and Johnson, P.J. 1998. Gene transcription in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology Today*. 14 (7):261-265.

Liston, D.R. and Johnson, P.J. 1999. Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element. *Molecular and cellular Biology*. 19(3):2380-2388.

Marquardt, W.C., Demaree, R.S. and Grieve, R.B. 2000. *Parasitology Vector Biology*. Second Edition. Harcourt. Academic Press. 74 pp.

McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballentyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M. and Bentley, D.L. 1997. The C-terminal domain of RNA processing to transcription. *Nature*. 385:357-361.

Mc Ewan, N.F., Eschenlauer, S.C.P., Calza, R.E., Wallace, R.J. and Newbold, J. 2000. The 3' untranslated region of messages in the rumen protozoan *Entodinium caudatum*. *Protist*. 151:139-146.

Meade, J.C., Shah, P.H. and Lushbaugh, W.B. 1997. *Trichomonas vaginalis* : Analysis of Codon Usage. *Experimental Parasitology*. 87:73-74.

Meysich, K. and Garber, G. E. 1995. *Trichomonas vaginalis*. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 8:22-25

Molecular Cloning - a Laboratory Manual. Third Edition, Sambrook and Russell. Sambrook Joseph, Russell David W. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America.

-
- Müller, M. 1993. The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology*. 139:2879-2889.
- Proudfoot, N.J. 1989. How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*. 14:105-110.
- Quon, V.K.D., Delgadillo, M.G., Khachi, A., Smale, S.T. and Jonson, P.J. 1994. Similarity between a ubiquitous promotor element in an ancient eukaryote and mammalian initiator elements. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:4579-4583.
- Rendón-Maldonado, J.G., Espinosa-Castellano, M., González-Robles, A. and Martínez-Palomo, A. 1998. *Trichomonas vaginalis*: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes and erythrocytes. *Experimental Parasitology*. 89:241-250.
- Ribeiro, K.C., Monteiro-Leal, L.H. and Benchimol, M. 2000. Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47(5):481-492.
- Roger, A.J., Clark, C.G., and Doolittle, W.F. 1996. A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:14618-14622.
- Sarkar, N. 1997. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 66:173-197.
- Sheets, M.D., Ogg, S. C., and Wickens, M. P. 1990. Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Reserch.* 18 (19):5799-5805.
- Sogin, M. L. 1991. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current Opinion in Genetics and Development*. 1:457-463.
- Sorvillo, F. and Kerndt, P. 1998. *Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission. *The Lancet*. 351:213-214.
- Viikki, M. Pukkala, E., Nieminen, P. and Hakama M. 2000. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol.* 39(1):71-75.
- Wahle, E. and Keller, W. 1996. The biochemistry of polyadenylation. *TIBS*. 21:247-250.
- Wahle, E. And U. Kühn. 1997. The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 57: 41-71.

Wang, A. and Wang C. 1985. Isolation and characterization of DNA from *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. Mol. Biochem. Parasitol. 14:323-335.

Weiss, E.A. , Gilmartin, G.M. and Nevins, J.R. 1991. Poly(A) site efficiency reflects the stability of complex formation involving the downstream element. 10(1):215-219.

Whitelaw, E. and Proudfoot, N. 1986. α -thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human $\alpha 2$ globin gene. The EMBO Journal. 5(11):2915-2922.

Yeong-Seng, Y., Jah-Yao, L., d Men-Fang, S. 1997. Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. Journal of Parasitology 83:551-553.

Yeong-Seng, Y., Jah-Yao, L., d Men-Fang, S. 1998. Chromosome number of *Trichomonas vaginalis*. Journal of Parasitology 84:28.

8. APÉNDICES.

APENDICE A.

MEDIO DE CULTIVO PARA *Trichomonas vaginalis*.

MEDIO TYM (Trypticase-yeast extract-maltose).

Composición:

Triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Maltosa	2.5 g
L-cisteina	0.5 g
Ácido ascórbico	0.1 g
Fosfato de potasio dibásico (KH ₂ PO ₄)	0.4 g
Fosfato de potasio monobásico (K ₂ HPO ₄)	0.4 g

Se disuelven los componentes en agua bidestilada, se ajusta el pH a 6.2, se afora a 500ml y se esteriliza a 15 psi durante 15 minutos. Antes de usarse se suplementa con 10% de suero de caballo inactivado.

APENDICE B.

MEDIO LB-AGAR.

Triptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
NaOH 10M	0.3 ml
Tris 1M pH 8	10.0 ml
Select agar	15.0 g

Disolver en 800 ml de agua bidestilada, ajustar el volumen a 1 litro y esterilizar.

APENDICE C.

PREPARACIÓN DE LOS GELES DE ACRILAMIDA-UREA

SECUENCIACIÓN.

ACRILAMIDA 40%

Acrilamida	190 g
Bisacrilamida	10 g
Agua bidestilada	300 ml

Disolver en 300 ml de agua bidestilada, ajustar el volumen a 500 ml con agua bidestilada y filtrar.

MEZCLA ACRILAMIDA-UREA.

Acrilamida	37.5 ml
Urea	115.0 g
TBE 5X	50.0 ml
Agua bidestilada	75.0 ml

Disolver en baño maría y filtrar.

BUFFER TBE 5X.

Tris-HCl	54.0 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M	20.0 ml

Disolver en 750 ml de agua bidestilada y ajustar el volumen a 1 litro.

PREPARACIÓN DEL GEL DE ACRILAMIDA-UREA AL 6%.

Acrilamida-urea	60.0 ml
Persulfato de amonio al 10%	0.5 ml
TEMED	25.0 μ l

Mezclar e inmediatamente agregar a los vidrios, dejar polimerizar mínimo 2 horas.

APENDICE D

TAE 50X

121.0 g Tris base

28.55 ml de ácido acético glacial

50 ml EDTA 0.5 M pH=8

Se ajusta el volumen a 500 ml.

20X SSC

NaCl, Citrato de sodio, pH 7.0

Disolver

175.3 g de NaCl

88.2 g Citrato de sodio

800 ml de H₂O

Se ajusta el pH con HCl.

Solución Denhart's

1% Ficoll 400

1% Polivinilpirrolidona

1% albumina sérica bovina.

PBS (Buffer Salino de Fosfatos). pH= 7.4

4 g de NaCl

0.1 g de KCl

7.2 g de Na₂HPO₄

0.12 g de KH₂PO₄

Se afora con agua destilada a 500 ml y se ajusta el pH a 7.4

Solución TEN

Tris 40 mM, EDTA 1 mM, NaCl 15 mM se puede preparar a partir de los stocks con los que se cuente en el laboratorio de manera que las concentraciones citadas sean las que prevalezcan en la solución final.

T.E [10-0.2 mM] (Tris- EDTA)

Se debe tener una concentración final en la solución de 10 mM de Tris pH= 7.4 y 0.2 mM de EDTA.

Solución Zimmerman

Para preparar 1 litro

0.2040 g KH_2PO_4

7.7100 g NaCl

0.5900 g KCl

1.1300 g Na_2HPO_4

0.1070 g $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$

0.0142 g $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$

Se ajusta el volumen a 1 litro y el pH= 7.4 y se esteriliza.

Stock de cloranfenicol ^3H .

Cloranfenicol tritiado (^3H .) 0.2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$

Se toman con mucho cuidado 125 μl del vial original de cloranfenicol ^3H (250 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) y se agregan a 480 μl de etanol absoluto, además de 40 μl de cloranfenicol sin marcar (50 mg/ μl).

Cloranfenicol 50 mg/ μl sin marcar.

Pesar 100mg de cloranfenicol y se disuelven en 2 ml de etanol al 50%, se mezclan y se guarda a - 20°C.