



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ANALISIS PRELIMINAR DEL PROCESAMIENTO DE TRANSCRITOS EN *Trichomonas vaginalis*”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

VANESSA FUENTES MORALES



MÉXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2005

m.349032



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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. José Cordero Hernández
Secretario	Dra. María Imelda López Villaseñor
1er. Suplente	Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez
2do. Suplente	M. en C. Antonio Ulises López Gutiérrez

Sitio en donde se desarrolló el tema:  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Asesor:  
Dra. María Imelda López Villaseñor



Maria Imelda Lopez Villaseñor

Supervisor Técnico:  
Biol. Lorena López Griego



Lorena Lopez Griego

Sustentante:  
Vanessa Fuentes Morales

Vanessa F.M.

---

---

DEDICATORIAS.

*A Dios*

*Por haberme permitido dar un paso tan grande el día de hoy.*

*A mis Padres*

*Miguel Fuentes S. y Ondina Morales V. por siempre estar conmigo apoyándome, por darme su cariño y que gracias a ellos hoy puedo concluir una etapa muy importante en mi vida.*

*Muchas gracias, los quiero mucho.*

*A mis hermanos*

*Rodrigo y Hugo Rogelio que siempre me han apoyado en todo y me han brindado su cariño, y son un ejemplo para mí por lo fuertes que son.*

*A Jorge*

*Por haberme dado su amor, apoyo y comprensión. Por haberme levantado el ánimo cuando más lo necesitaba y siempre estar ahí cuando más lo necesitaba. Te amo.*

*A Johann por ser tan alegre y estar ahí siempre recordándome que debo seguir adelante.*

*A mis amigas y amigos de la facultad de química, que me brindaron una hermosa amistad y estuvieron conmigo a lo largo de la carrera apoyándome.*

*A Lorena por ser una amiga invaluable, y estar siempre apoyándome en todos los aspectos*

*A los integrantes del laboratorio Lupita, Ana Lilia, Pablo ya que siempre me ayudaron durante todo este tiempo e hicieron que me sintiera como en mi casa. A la señora Tere por mantener nuestra área de trabajo limpia.*

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.  
NOMBRE: Fuentes Morales Varela  
FECHA: 3/10/05  
FIRMA: Varela F.M.

---

---

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de estudiar en la Facultad de Química, la cual llegó a convertirse en mi casa durante toda la carrera, en donde aprendí muchas cosas, lo que me permitió crecer en todos los aspectos como persona.*

*A la Dra. María Imelda López Villaseñor por su excelente guía, consejos y apoyo durante esta tesis. Además por haberme aceptado en su grupo que llegó a convertirse en una familia para mí.*

*Al Dr. Roberto Hernández y a la Dra. Ana María Cevallos por sus valiosos comentarios y sugerencias que me permitieron mejorar esta tesis.*

*A la Biol. Lorena López Griego, técnico académico del laboratorio, por sus enseñanzas y colaboración durante el desarrollo experimental de esta tesis.*

*A los integrantes del laboratorio: Juliana, Mariana, Elisa, Yayoí, Lupita, Pablo, Ana Lilia, Norma, Sr. Miguel, por su invaluable apoyo en el desarrollo de esta tesis.*

*A los miembros del jurado les agradezco por la revisión del manuscrito de tesis y por sus valiosas observaciones y comentarios.*

*Agradezco el apoyo económico por la beca otorgada por DGAPA No. Proyecto IN209302-3 durante la realización de esta tesis.*

---

---

## ÍNDICE

### 1. Introducción

1.1. Clasificación taxonómica de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	1
1.2 Aspectos biológicos de <i>T. vaginalis</i>	
1.2.1 Morfología general.....	1
1.2.2 Núcleo y citoplasma.....	2
1.2.3 Reproducción y ciclo de vida.....	2
1.2.4 Número cromosómico.....	3
1.2.5 Metabolismo.....	3
1.2.6 Patogenicidad.....	4
1.3 Aspectos clínicos de la tricomonosis	
1.3.1 Manifestaciones clínicas .....	4
1.3.2 Importancia médica.....	6
1.4 Tricomonosis en México.....	7
1.5 Biología molecular de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	8

### 2. Antecedentes

2.1 Procesamiento de RNA mensajeros en eucariontes.....	10
2.2 Procesamiento y poliadenilación en <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	12
2.3 Genes reporteros.....	13
2.4 Vectores para la expresión de genes reporteros en <i>T. vaginalis</i> .....	14

---

---

3. Planteamiento del problema .....	16
4. Hipótesis y Objetivos.....	17
4.1 Hipótesis	
4.2 Objetivo general.	
4.3 Objetivos particulares	
5. Metodología	
5.1 Cultivo de <i>Trichomonas vaginalis</i> .....	19
5.2 Mini-preparación de DNA plasmídico (MINIPREPS).....	19
5.3 Mutagénesis.....	20
5.4 Maxipreparación de DNA plasmídico (MAXIPREP).....	21
5.5 Transfección de <i>T. vaginalis</i> .....	22
5.6 Preparación del extracto proteico.....	23
5.7 Extracción de RNA total a partir de células transfectadas.....	24
5.8 Ensayo para medir la actividad enzimática de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT).....	25
5.9 Cuantificación de proteínas.....	27
5.10 Purificación de RNA poly A+.....	27
5.11 Amplificación rápida de los extremos 3' de cDNA (3' RACE).....	28
5.12 Ligación de los productos del ensayo 3' RACE en el vector TOPO .....	29
5.13 Southern Blot.....	30
5.14 Midipreparación de DNA plasmídico (MIDIPREP) .....	32

---

---

6. Resultados y Discusión	
6.1 Mutagénesis dirigida a la señal de procesamiento de los RNAm de <i>T. vaginalis</i> .....	34
6.2 Funcionalidad de la señal mínima CAAUU en el procesamiento del RNAm de <i>cat</i> .....	39
7. Conclusiones y Perspectivas.....	45
8. Bibliografía.....	46
9. Apéndice I.....	49
10. Apéndice II.....	53
11. Apéndice III.....	54



---

---

## Abreviaturas

° C	Grados centígrados
<i>cat</i>	Gen que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA complementario al RNA mensajero
DEPC	Dietilpirocarbonato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Fig.	Figura
kb	kilobases
min.	Minuto
µg	Microgramo
µL	Microlitro
mL	Mililitro
nm	Nanómetro
pb	Pares de bases
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensajero
rpm	Revoluciones por minuto

---

# **1. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 Clasificación taxonómica de *Trichomonas vaginalis*

Reino:	Protista.
Phylum:	Protozoa.
Subphylum:	Sarcomastigophora.
Clase:	Zoomastigia.
Orden:	Trichomonadida.
Familia:	Trichomonadidae.
Género:	Trichomonas.
Especie:	<i>Trichomonas vaginalis</i>

## 1.2 Aspectos biológicos de *T. vaginalis*

### 1.2.1 Morfología general

*Trichomonas vaginalis* es uno de los eucariontes de divergencia evolutiva más temprana que carece de mitocondria. Es un parásito protozoario que posee cuatro flagelos localizados en la porción anterior y un quinto flagelo recurrente adosado a la membrana ondulante. También posee una estructura hialina llamada axostilo que comienza en el núcleo y bisecta longitudinalmente al protozoario (Petrin y col., 1998). Bajo condiciones de cultivo este parásito puede variar de forma y tamaño, pero las medidas promedio son de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de largo por 7  $\mu\text{m}$  de diámetro (Fig. 1A). Biopsias de pacientes con tricomonosis han mostrado que *in vivo* este parásito tiene una forma ameboide. Se ha visto que este parásito puede transformarse de una forma ovoide a una ameboide al entrar en contacto con células del epitelio vaginal: se forman filopodia y pseudopodia que interdigitan con la membrana de las células blanco. El cambio en la forma de ovoide a ameboide le confiere al parásito un aumento en la superficie de unión a la célula del epitelio vaginal, lo cual puede ser necesario para llevar a cabo una parasitosis más estable y eficiente (Arroyo y col., 1993), y puede ser un factor de virulencia (Fig. 1A y B).

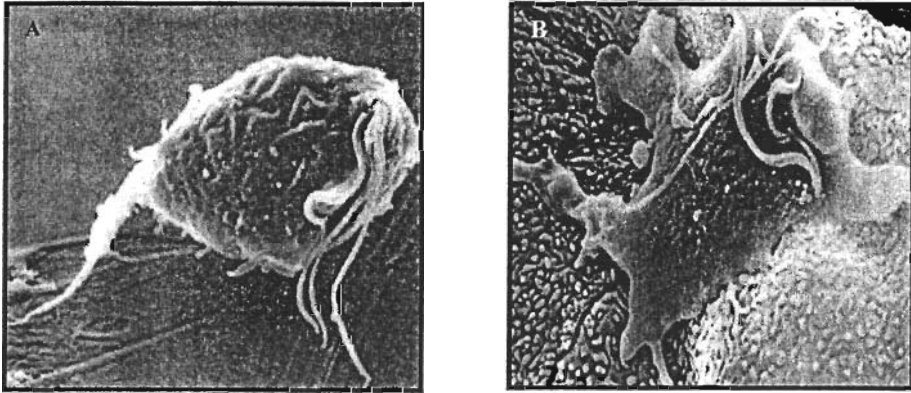


Fig. 1 A) Típica forma ovoide del parásito *T. vaginalis*, B) Transformación morfológica del parásito a una forma ameboide. (Tomado de Arroyo R. y col., 1993).

### 1.2.2 Núcleo y citoplasma

El núcleo en *Trichomonas vaginalis* se encuentra localizado en la porción anterior del parásito, éste es piriforme en la interfase y está rodeado de poros nucleares.

El citoplasma de este parásito está compuesto por: tubulina, fibras de actina, un aparato de golgi, dos tipos de gránulos: paracostal y paraxostilar, gránulos de glucógeno y fagosomas. Este parásito carece de mitocondria y peroxisomas, en su lugar posee otro organelo llamado hidrogenosoma en donde se lleva a cabo la generación de ATP (Petrin y col., 1998).

### 1.2.3 Reproducción y ciclo de vida

El ciclo de vida de este parásito incluye una sola fase, el trofozoito, y es transmitido sexualmente por contacto directo de persona a persona, ya que éste reside en el tracto urogenital. *In vitro*, *T. vaginalis* crece óptimamente a pH de 6 a 6.3, aunque puede crecer en un rango de pH, especialmente en la vagina.

La reproducción de *T. vaginalis* es asexual por fisión binaria; se ha demostrado la presencia de cinco fases mitóticas: profase; metafase; anafase: cercana y lejana; telofase: cercana y lejana; y citocinesis. La duración de la mitosis en este parásito es de 45 min. (Gómez-Conde y col., 2000). El axostilo de este parásito interviene en la mitosis ya que participa en los cambios de forma y contorsión de la región anterior de la célula y cariocinesis ocurrida durante este proceso. Por otra parte se ha observado que el flagelo facilita la citocinesis. La propulsión generada por el flagelo en cada extremidad del cuerpo celular contribuye a la elongación y consecuente división de la célula (Fig. 2) (Ribeiro y col. 2000).

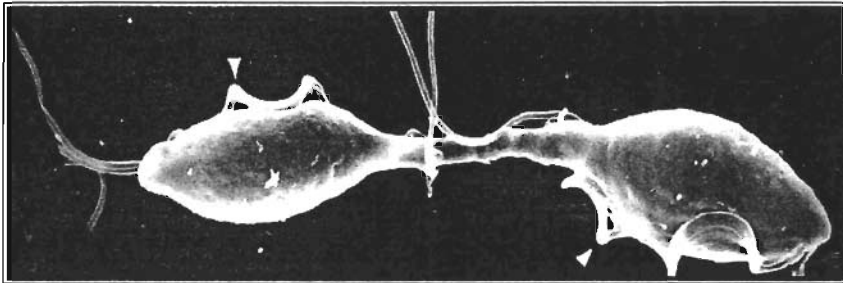


Fig. 2 Mitosis de *T. vaginalis*. Se muestran las células hijas de este parásito las cuales se encuentran en direcciones opuestas, pero todavía están unidas. (Tomada de Ribeiro y col. 2000).

#### 1.2.4 Número cromosómico

*T. vaginalis* posee seis pares de cromosomas monocéntricos y es un organismo diploide (Yeong-Seng y col. 1997; Yeong-Seng y col. 1998). El tamaño del genoma de este parásito se estima en  $2.5 \times 10^7$  pb y posee un alto contenido de G + C (Wang, A. y col., 1985).

#### 1.2.5 Metabolismo

*Trichomonas vaginalis* es un organismo anaerobio facultativo, que carece de mitocondria. El metabolismo de carbohidratos se lleva a cabo en un organelo llamado

hidrogenosoma, el cual es análogo a la mitocondria de eucariontes superiores; está rodeado por una doble membrana y tiene un diámetro de 0.5 a 1.0  $\mu\text{m}$ , éste se divide de manera autónoma por fisión binaria. El hidrogenosoma carece de citocromos y DNA y es el sitio de producción de ATP.

En este organelo se identificó y analizó la  $\beta$ -SCS, una proteína típicamente localizada en la mitocondria de eucariontes superiores. Otros estudios realizados en este parásito han mostrado que en el hidrogenosoma se encuentran proteínas relacionadas con la mitocondria, lo cual sugiere que este podría ser antecesor de la mitocondria de eucariontes (Lahti y col., 1992; Roger y col., 1996; Germot y col., 1996).

*T. vaginalis* es un parásito obligado que carece de la habilidad de sintetizar muchas macromoléculas *de novo*, particularmente purinas, pirimidinas y lípidos. Estos nutrientes son adquiridos de las secreciones vaginales o mediante fagocitosis de células del huésped y células bacterianas. El suero es esencial para el crecimiento de tricomonátidos *in vitro* ya que provee de lípidos, ácidos grasos, aminoácidos y trazas de metales (Petrin y col., 1998).

### 1.2.6 Patogenicidad

La adhesión del parásito a las células del epitelio vaginal es un paso crítico en la patogénesis, ya que este contacto inicia la transformación a una forma ameboide seguida con la producción de adhesinas. Este parásito tiene la capacidad de obtener nutrientes vía lisis de eritrocitos y puede evadir al sistema inmune ya que degrada inmunoglobulinas G y A. También puede tener efectos citopáticos por su capacidad para secretar citotoxinas (Petrin y col., 1998).

## 1.3 Aspectos clínicos de la tricomonosis

### 1.3.1 Manifestaciones clínicas

La tricomonosis es una enfermedad de transmisión sexual de importancia mundial causada por el parásito *T. vaginalis*. De acuerdo a la severidad de la infección ésta se puede clasificar en: aguda, crónica y asintomática. El periodo de incubación varía de 4 a 28 días. La

infección una vez establecida persiste durante largos periodos en mujeres y en los hombres sólo está presente durante cortos periodos.

En la infección aguda, los síntomas principales en mujeres incluyen emisiones vaginales amarillo-verdosas mucopurulentas. En el 2% de las pacientes infectadas se observa el llamado “cérvix de fresa”, esto es la vagina y el cervix eritromatosos y edematosos con una erosión general del epitelio cervical y puntos hemorrágicos. En la infección crónica, los síntomas son más leves, con prurito y disparenia, las secreciones vaginales son escasas y pueden ser mucosas, esta etapa de la infección es importante a nivel epidemiológico, ya que es cuando las personas infectadas transmiten la enfermedad.

Se ha estimado que el 25-50% de las mujeres infectadas son asintomáticas, presentando un pH vaginal y una flora normal, y por lo tanto son portadoras del parásito y una fuente de diseminación de la infección aproximadamente el 50% de estas mujeres comienza con síntomas después de seis meses de la infección, comenzando con emisiones vaginales.

La tricomonosis urogenital en hombres puede ser clasificada dentro de tres grupos: estado de portador asintomático, identificado por investigación de contacto sexual con mujeres infectadas; tricomonosis aguda, caracterizada por uretritis purulenta profusa; y enfermedad sintomática leve, la cual es clínicamente indistinguible de otras causas de uretritis no-gonococal. La duración de la infección es de 10 días o menos en la mayoría de los pacientes hombres. Los hombres sintomáticos, comúnmente presentan una escasa emisión mucopurulenta, disuria y leve prurito o sensación de quemazón inmediatamente después de las relaciones sexuales.

El tratamiento primario utilizado para la tricomonosis es el 5-nitroimidazol (metronidazol), el cual es activado en los hidrogenosomas del parásito en donde ocurre la reducción del grupo nitro del fármaco por la piruvato:ferredoxín oxidoreductasa resultando en la producción de intermediarios citotóxicos que reaccionen con el DNA del parásito, lo cual provoca que la división celular y la movilidad cesen y ocurra la muerte de la célula (Petrin y col., 1998; Meysick y col., 1995; Leherker y col., 2000).

### 1.3.2 Importancia médica

La tricomonosis es una de las enfermedades más comunes de transmisión sexual que afecta a 170 millones de personas en el mundo cada año, siendo la mayoría (92%) de los pacientes infectados mujeres (WHO, 2001).

Las mujeres que son portadoras de *T. vaginalis* en la mitad de la gestación se asocia con el término prematuro del embarazo, bajo peso del bebé al nacer e incremento de la incidencia de endometritis post-parto. Otras complicaciones asociadas con la tricomonosis incluyen: endometritis, infertilidad, erosión cervical, incremento de la transmisión del VIH, cáncer cervical y enfermedad inflamatoria pélvica (Cotch y col., 1997; Sorvillo y col., 1998; Viikki y col., 2000).

Las complicaciones asociadas a la tricomonosis en hombres son: prostatitis, balanopostitis, epididimitis, enfermedad uretral e infertilidad (Meysick y col., 1995; Leherker y col., 2000).



#### 1.4 Tricomonosis en México

La tricomonosis se encuentra dentro de las veinte enfermedades más frecuentes a nivel nacional. Los estados que se encuentran más afectados por esta enfermedad son: Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Puebla, y como se muestra en la Fig. 3A el grupo de edad más afectado son las personas entre 25 y 44 años.

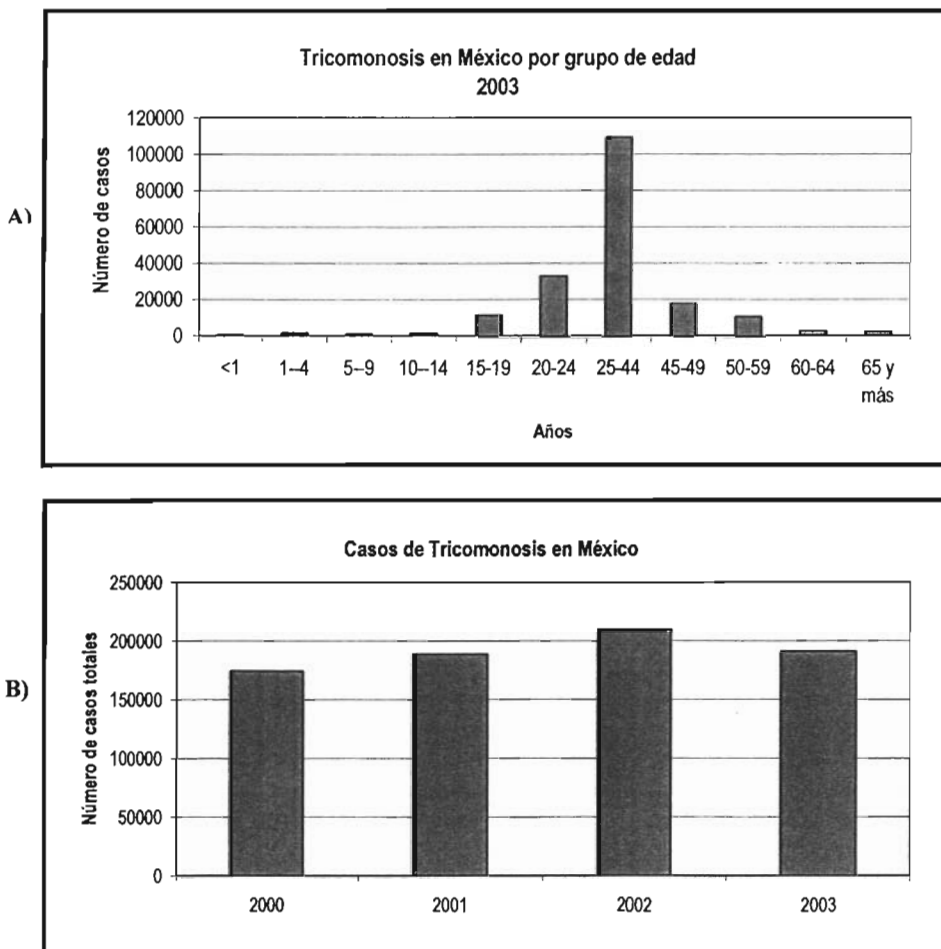


Fig. 3 Gráficas de casos reportados de tricomonosis en México. A) Gráfica tomando en cuenta los grupos de edad que son afectados, B) Número de casos reportados totales en los últimos años.

Como se puede observar en la Fig. 3B, la tricomonosis en nuestro país aun representa un serio problema de salud, ya que esta enfermedad ha mantenido un número de casos similares durante el periodo 2000-2003 (Vigilancia Epidemiológica, SSA).

### 1.5 Biología molecular de *Trichomonas vaginalis*

Los eucariontes unicelulares tienen un papel muy importante en la historia de la vida, ya que al parecer son los intermediarios entre los organismos procariontes y eucariontes. Se ha encontrado que *T. vaginalis* es un organismo de divergencia evolutiva temprana, mediante el análisis de una porción de la subunidad grande (Baroin y col. 1988), o de la subunidad pequeña (Sogin M., 1991) del RNA ribosomal (Fig. 4).

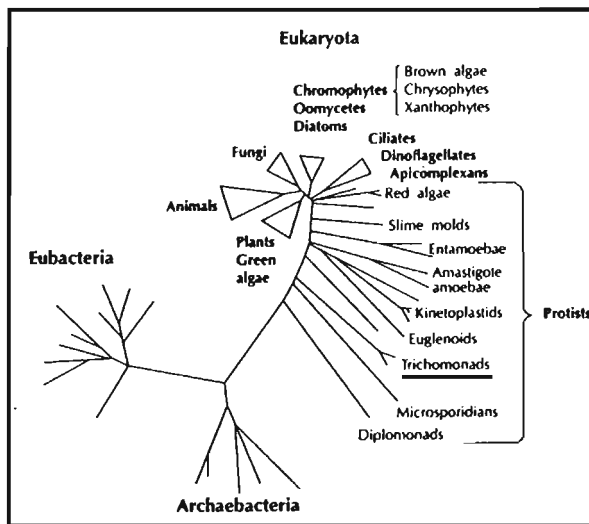


Fig. 4 Árbol filogenético inferido del análisis de la secuencia de la subunidad pequeña del RNA ribosomal de organismos de 3 diferentes reinos. (Tomado de Sogin M., 1991).

Estudios acerca de la estructura y expresión de varios genes de *T. vaginalis* han mostrado que están organizados en una sencilla unidad de transcripción. Anteriormente se pensaba que este parásito carecía de intrones, hasta que recientemente se demostró la presencia de intrones y de la maquinaria de corte y empalme (“splicing”) en este protozoario.

La posición de los intrones encontrados está conservada en genes ortólogos (Vanacova y col., 2005).

Los promotores de *T. vaginalis* tienen una estructura similar a la de los eucariontes superiores. Los promotores de los genes que codifican para proteínas consisten de un elemento regulador gen-específico y un promotor central (*core*) que contiene el sitio de inicio de la transcripción. Estos promotores contienen un elemento altamente conservado llamado iniciador (Inr), el cual tiene la secuencia consenso TCA<sub>+1</sub>Py(T/A) muy parecida al Inr de metazoarios PyPyA<sub>+1</sub>N(T/A)PyPy. El Inr en *T. vaginalis* es responsable de la selección del sitio de inicio de la transcripción (Liston y col., 1998).

La transcripción en eucariontes es llevada a cabo por tres distintas RNA polimerasas. Las RNA polimerasas son clasificadas como I, II o III y son responsables de las síntesis de RNA ribosomal, RNAs mensajeros que codifican proteínas y RNAs pequeños, respectivamente. Para poder diferenciar entre las tres RNA polimerasas, se usa su resistencia a  $\alpha$ -amanitina. En *T. vaginalis* se ha observado que la RNA polimerasa II es resistente a altas concentraciones de esta toxina, con un 50% de inhibición observado a 250  $\mu$ g/mL. Esto contrasta con lo reportado para otros eucariontes, donde la RNA polimerasa exhibe un 50% de inhibición a una concentración de 2-20  $\mu$ g/mL de  $\alpha$ -amanitina. La RNA polimerasa II es más resistente a la  $\alpha$ -amanitina en este protozooario debido a que los aminoácidos involucrados en la sensibilidad a esta toxina no están conservados (Quon y col., 1994; Liston y col., 1999).

---

## **2. ANTECEDENTES**

## 2.1 Procesamiento de RNA mensajeros en eucariontes

La transcripción de los genes que codifican para RNA mensajeros (RNAm) se lleva a cabo por la RNA polimerasa II (RNA pol II).

El procesamiento post-transcripcional que sufren los transcritos primarios es un paso esencial para la maduración del RNAm. Dentro de las modificaciones que sufren los RNAm tenemos las reacciones de adición del cap, el “splicing” y la poliadenilación en el extremo 3'. Todas estas reacciones se llevan a cabo en el núcleo (Proudfoot y col., 2002).

El proceso de poliadenilación ocurre en dos pasos: primero un corte endonucleolítico al precursor del RNAm y la subsecuente adición del poli(A) al extremo 3', es decir, la adición de 150-200 residuos de adenilato (Proudfoot N., 1989) (Fig. 5). La cola de poli(A) es importante porque le brinda estabilidad al RNAm e interviene en el transporte de esta molécula del núcleo al citoplasma. La única excepción conocida a esta regla son los RNAm de histonas en metazoarios; éstos son cortados endonucleolíticamente pero no son poliadenilados después del corte (Wahle y col. 1999; Eckner y col., 1991).

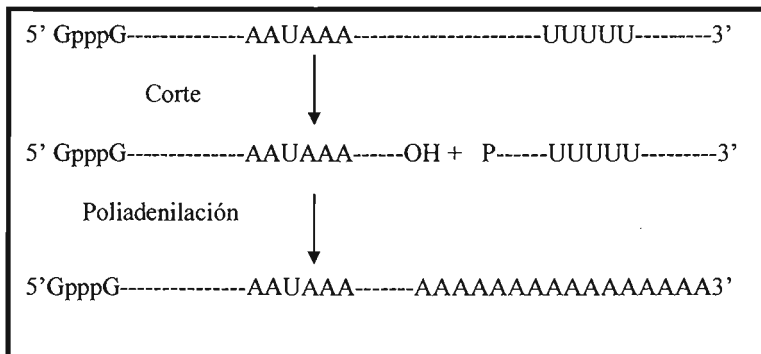


Figura 5: Pasos en el proceso de poliadenilación del RNAm en eucariontes superiores (Tomado de Wahle y col. 1999)

Se ha encontrado que defectos en la formación de los extremos 3' de los RNAm pueden alterar el desarrollo, crecimiento y viabilidad de la célula (Zhao y col. 1999).

Se ha reportado que en mamíferos las señales para que se lleve a cabo la poliadenilación incluye tres elementos: 1) la secuencia altamente conservada AAUAAA, localizada de 10 a 30 nucleótidos río arriba del sitio de corte, 2) un elemento río abajo (DSE, por sus siglas en inglés) rico en U- o GU- localizado más o menos a 30 nucleótidos río abajo del sitio de corte y 3) un sitio de corte que usualmente es el dinucleótido CA en el cual ocurre la adición del poli(A) (Colgan, 1997; Zhao, 1999; Wahle, 1999).

El hexanucleótido AAUAAA es la principal señal de poliadenilación. Deleciones en este elemento abaten el corte y la poliadenilación, y mutaciones puntuales en esta secuencia reducen la eficiencia del corte. El elemento río abajo (DSE) cuando es rico en U- presenta corridas cortas de residuos de U y si es rico en GU- tiene la secuencia consenso YGUGUUY (Y=pirimidina). Deleciones en el DSE disminuyen la eficiencia del procesamiento en el extremo 3' y la disminución de la distancia entre el DSE y el sitio de corte puede afectar el procesamiento del transcrito. Cuando se lleva a cabo el corte en el transcrito primario la cola de poli(A) es añadida en el extremo 3'. Se ha visto que en aproximadamente el 70 % de los RNAm de vertebrados, el poli(A) es añadido en una A, por lo tanto el primer nucleótido de la cola de poli(A) es derivado del precursor del RNAm. La preferencia en el sitio de corte sigue el orden A>U>C>>>G, mientras que en la posición -1 en el 59% de las señales de poliadenilación contiene una C, por lo cual esto hace sugerir que el dinucleótido CA es reconocido por la maquinaria de corte (Sheets, 1990; Chen, 1995).

Las señales de poliadenilación son elementos esenciales para la terminación de la transcripción por la RNA pol II (Dye y col., 2001), ya que intervienen en la eficiencia de la terminación (Yonaha y col., 2000).

Una secuencia auxiliar localizada río arriba de la secuencia AAUAAA conocida como (USE, por sus siglas en inglés), con frecuencia son ricas en U- y se piensa que estas secuencias son sitios de reconocimiento para factores que pueden estabilizar el complejo de poliadenilación (Zhao y col. 1999).

2.2 Procesamiento y poliadenilación en *Trichomonas vaginalis*

Uno de los proyectos que se realizan en el laboratorio de la Dra. Imelda López es el estudio de las señales involucradas en el procesamiento de los RNAm de *T. vaginalis*, el cual se inició con el trabajo de tesis doctoral de la Dra. Norma Espinosa. En este trabajo se compararon las regiones 3' no traducidas de varias clonas de cDNA de distintos genes y se compararon con las secuencias genómicas. Al ser alineadas estas secuencias por el sitio de corte, se encontraron señales consenso de las cuales se propuso al tetranucleótido UAAA (que generalmente contiene el codón de término de la traducción UAA) como la señal de poliadenilación; esta señal se localiza de 11 a 30 nucleótidos río arriba del sitio de corte.

También se encontró una secuencia descrita como rica en U río abajo del sitio de poliadenilación. Así mismo se propuso la secuencia  $Y\downarrow(A)_{0-3}AAUU$  como el sitio para que se lleve a cabo la poliadenilación de los RNA mensajeros. En la Fig. 6 se hace una comparación de las señales propuestas para la poliadenilación en *T. vaginalis* y las señales descritas para este proceso en animales y levaduras (Espinosa y col., 2002).

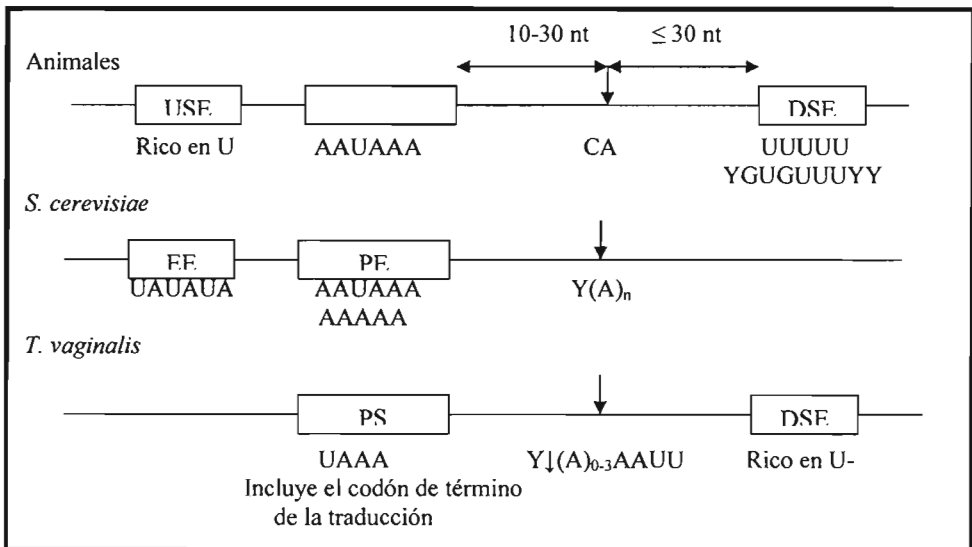


Fig. 6 Comparación de las señales de poliadenilación de animales, *S. cerevisiae* y propuestas para *T. vaginalis*. USE, elemento río arriba; DSE, elemento río abajo; EE, elemento de eficiencia; PE, elemento de posicionamiento; PS, señal de poliadenilación y nt, nucleótido.

Las señales descritas para la poliadenilación de mensajeros en *T. vaginalis* se han propuesto con base en la comparación de varios cDNAs y sus secuencias genómicas. Sin embargo, hace falta la demostración funcional de cada uno de estos elementos. Una manera de abordar experimentalmente este problema es mediante el uso de vectores de expresión de genes reporteros en donde se puedan modificar las señales propuestas para la poliadenilación y evaluar su efecto.

### 2.3 Genes reporteros

Un gen reportero es una herramienta que permite cuantificar de manera rápida y sensible los cambios transcripcionales. Un gen reportero debe poseer varias características: el producto del gen reportero no debe encontrarse en la célula huésped, el análisis del producto debe de poder hacerse de manera rápida y sencilla, los resultados deben ser reproducibles y el producto no debe afectar a la célula. Generalmente cuando se usa un gen reportero se utiliza bajo el promotor de una célula eucariótica.

Uno de los genes reporteros más comúnmente utilizado es el gen *cat*, que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), la cual es una enzima procariótica. Esta proteína no se encuentra de forma endógena en la célula de mamíferos y es una enzima totalmente estable. La enzima CAT modifica covalentemente al cloranfenicol transfiriéndole un grupo acetilo del acetylCoA 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. La actividad de CAT es calculada con base en el porcentaje de cloranfenicol (marcado radiactivamente), que es convertido a productos mono y diacetilados, esto se puede hacer en un contador de líquido de centelleo. Existen otros genes reporteros entre los cuales están: la luciferasa en la cual se mide su capacidad de actuar sobre la luciferina y producir un destello de luz, el gen *lacZ*, cuya enzima reacciona con el sustrato X-gal produciendo un color azul oscuro y la proteína verde fluorescente (GFP).



**2.4 Vectores para la expresión de genes reporteros en *T. vaginalis***

Se ha reportado la expresión de un gen reportero (CAT) en *T. vaginalis* en un vector de expresión que utiliza las regiones promotoras del gen endógeno  $\alpha$ -succinil CoA sintetasa ( $\alpha$ -SCSB) (Delgadillo y col., 1997).

En el laboratorio de la Dra. López Villaseñor se han construido vectores para la expresión de genes reporteros en *T. vaginalis* (trabajo desarrollado por LIBB. Jessica Guzmán). Uno de estos vectores es el pAC22CAT-1 el cual contiene al gen *cat* (que codifica para la enzima CAT) flanqueado por las regiones 5' y 3' intergénicas de un gen de actina. Por mutagénesis dirigida se cambió el codón de término de la traducción del gen *cat* de TAA a TAG, a este vector se le llamó Ambar (realizado por QFB. Guadalupe Barrera) (Fig. 7). Dicho vector fue utilizado como vector parental en esta tesis.

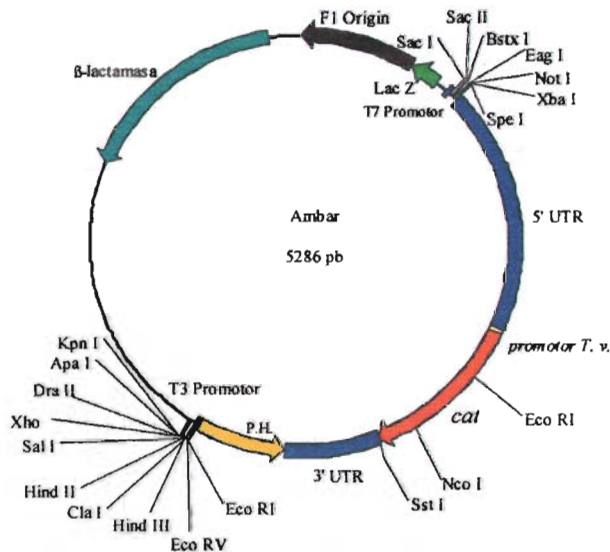


Fig. 7 Vector de expresión Ambar que contiene al gen *cat* flanqueado por las regiones 5' y 3' de actina de *T. vaginalis*.

En la Fig. 8 se muestra la secuencia nucleotídica del gen reportero *cat*, flanqueado con parte de las regiones intergénicas de actina.

Secuencia del gen Ambar

```

1      TTTGAGGAAA ATATTCCGGA AACCACATAT ATATGTATAA TATCGAAAGA TTAAAAAAT
61     TAAGAAGGGA CTTAGATGTC CTGGTTATAA ATTTGAGGA CTCTAACCGT TGTCTAAAGA
121    AGTGAAATGA TTGGAATGTT AACTTCATTT CATTTTCTGC CATGAACAAA AAAATCACTG
181    GATATAACCAC CGTTGATATA TCCCAATGGC ATCGTAAAGA ACATTTTGAG GCATTTTCAGT
241    CAGTTGCTCA ATGTACCTAT AACCAGACCG TTCAGCTGGA TATTACGGCC TTTTAAAGA
301    CCGTAAAGAA AAATAAGCAC AAGTTTTATC CGGCCTTTAT TCACATTCTT GCCCGCCTGA
361    TGAATGCTCA TCCGGAATTC CGTATGGCAA TGAAAGACGG TGAGCTGGTG ATATGGGATA
421    GTGTTCACCC TTGTTACACC GTTTTCCATG AGCAAAGTGA AACGTTTTCA TCGCTCTGGA
481    GTGAATACCA CGACGATTC CGGCAGTTC TACACATATA TTCGCAAGAT GTGGCGTGTT
541    ACGGTGAAAA CCTGGCCTAT TTCCCTAAAG GGTTTATTGA GAATATGTTT TTCGTCTCAG
601    CCAATCCCTG GGTGAGTTTC ACCAGTTTGT ATTTAAACGT GGCCAATATG GACAACCTCT
661    TCGCCCCCGT TTTCACCATG GGCAAATATT ATACGCAAGG CGACAAGGTG CTGATGCCGC
721    TGGCGATTCA GGTTTCATCAT GCCGTTTGTG ATGGCTTCCA TGTCGGCAGA ATGCTTAATG
781    AATTACAACA GTACTGCGAT GAGTGGCAGG GCGGGGCGTA GGAGCTCACT TAAACAATTT
841    CGGTATAATA TATTTCAAAA TTAACTAACC TTTTCTTTT AGTGAACCTA TTTTGAAAT
901    CACTTCATTA ATATTGTGTT TTAATGGTTT ATATGTGA
  
```

Fig. 8. Secuencia del vector Ambar. En color negro se muestra parte de la región intergénica 5' y 3' de actina, en azul el gen *cat*, en verde la señal propuesta para el procesamiento ( $Y\downarrow(A)_{0-3}AAUU$ ) de los transcritos y en rojo la señal de poliadenilación (UAAA).

---

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

---

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La poliadenilación de RNA mensajeros en *T. vaginalis* es un campo aun sin estudiar a fondo. Aunque en el grupo de trabajo de Dra. Imelda López se propusieron las señales para este proceso aun falta demostrar su funcionalidad. En especial la señal donde se lleva a cabo el procesamiento del transcrito primario, ya que esta señal es más grande que la reportada en otros organismos eucariontes.

---

## **4. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

---

## 4.1 Hipótesis

La secuencia CAATT es la señal mínima para definir el sitio de procesamiento de los RNA mensajeros en *Trichomonas vaginalis*.

## 4.2 Objetivo general

- ☞ Analizar la señal de procesamiento para la poliadenilación de los transcritos primarios en *Trichomonas vaginalis*.

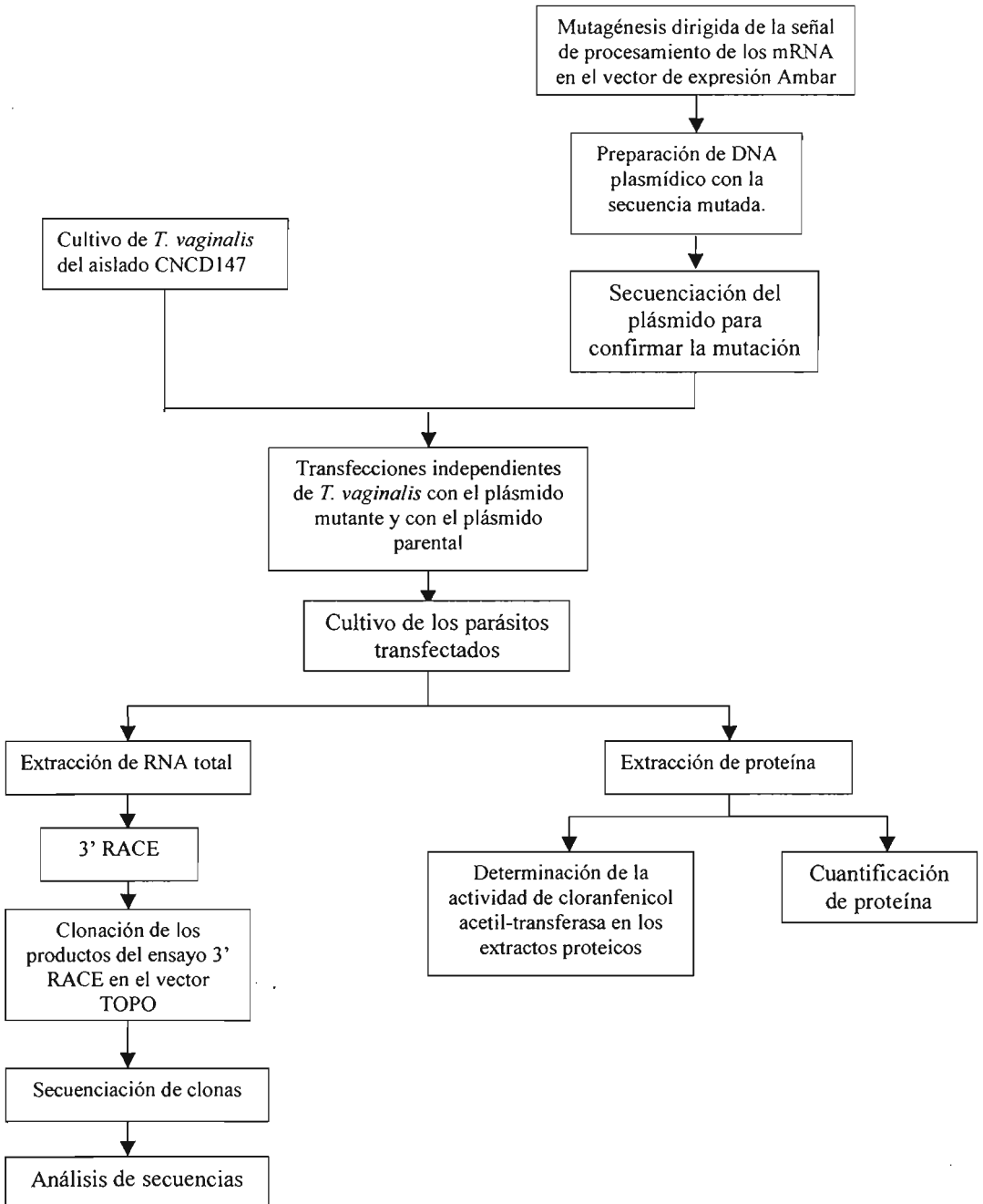
## 4.3 Objetivos particulares

- ☞ Mediante mutagénesis dirigida, cambiar la secuencia CAAAATT (sitio de procesamiento y poliadenilación) del vector parental Ambar, por la secuencia CAATT (propuesta como señal mínima necesaria para definir el sitio de procesamiento).
- ☞ Determinar si la señal CAAUU dirige la poliadenilación en el mismo sitio que en el vector parental.
- ☞ Mutagenizar el tetranucleótido AATT de la señal mínima por CCGG, y determinar el efecto de dicho cambio.

---

# **5. METODOLOGÍA**

Esquema del procedimiento que se utilizó durante el trabajo experimental:





### 5.1 Cultivo de *Trichomonas vaginalis*

El cultivo se realizó a partir de parásitos del aislado CNCD147 (donado por la Dra. Rossana Arroyo, CINVESTAV, IPN). Los parásitos se cultivaron en tubos con tapa de rosca estériles con 6 mL de medio TYM pH=6.2 (trypticase-yeast extract-maltose, apéndice I) suplementado con 0.6 mL (10% v/v) de suero de caballo inactivado (GIBCO) y se incubaron a 37 °C. Se utilizó como inóculo inicial aprox. 500,000 parásitos, para mantener los parásitos se realizaron subcultivos cada dos días.

### 5.2 Mini-Preparación de DNA plasmídico (MINIPREPS)

Se tomó con un palillo estéril una colonia de bacterias transformantes de interés y se creció un cultivo en 5 mL de LB (apéndice I) (con el antibiótico adecuado) a 37°C toda la noche con agitación constante. Se colocó 1.5 mL del cultivo en un microtubo de 1.5 mL, se centrifugó durante 30 segundos a 12,000 rpm. El sobrenadante se desechó y se agregó en el mismo tubo 1.5 mL del mismo cultivo y se centrifugó durante 30 segundos a 12,000 rpm.

Se decantó el sobrenadante y se mezcló en el vortex para suavizar la pastilla. Se agregó 100 µL de la solución I fría (apéndice I) y se mezcló en el vortex, se agregó 200 µL de la solución II (apéndice I) recién preparada (a temperatura ambiente) y se mezcló por medio de inversión 6 veces.

Se colocaron los tubos en hielo y se agregó 150 µL de la solución III fría (apéndice I), se mezcló por inversión 6 veces y se incubaron en hielo durante 5 minutos.

Los tubos se centrifugaron por 5 minutos a 12,000 rpm, se recuperó el sobrenadante en otro microtubo de 1.5 mL y se desechó la pastilla. Al tubo con el sobrenadante se le añadió 250 µL de fenol frío y 250 µL de cloroformo frío, se mezcló en el vortex durante 30 segundos y se centrifugó por 3 minutos a 12,000 rpm. La fase superior se recuperó en otro microtubo de 1.5 mL y se le agregó 500 µL de cloroformo frío, se mezcló en el vortex durante 30 segundos y se centrifugó a 12,000 rpm durante 3 minutos. Se recuperó la fase superior en otro microtubo de

1.5 mL y se le agregó 1000  $\mu$ L de etanol absoluto a temperatura ambiente, se mezcló en el vortex por 30 segundos.

Se incubaron a temperatura ambiente al menos durante 10 minutos. Terminada la incubación se centrifugaron por 10 min. a 14,000 rpm, el sobrenadante se desechó y se lavó el botón de DNA con 700  $\mu$ L de etanol al 70% frío e inmediatamente se desechó el líquido. El botón de DNA se dejó secar a temperatura ambiente.

Se resuspendió el botón de DNA con 50  $\mu$ L de RNasa (20 $\mu$ g/mL), se mezcló en el vortex a velocidad máxima y se centrifugó por 30 segundos a 14,000 rpm.

Los tubos se incubaron a 37 °C al menos durante 20 min. Los minipreps se verificaron en un gel de agarosa 0.8% en TAE IX (apéndice I).

### 5.3 Mutagénesis

Para la mutagénesis dirigida se utilizó el QuikChange site-directed mutagénesis kit (Stratagene). Este método de mutación consta de 4 pasos: 1) Diseño de los oligonucleótidos conteniendo la mutación deseada, 2) Replicación del DNA plasmídico a partir de los oligonucleótidos con la mutación, usando DNA polimerasa *PfuTurbo* 3) Digestión del DNA parental usando la endonucleasa *Dpn* I la cual es específica para DNA metilado y hemimetilado 4) Transformación de células XL1-Blue supercompetentes, con el DNA conteniendo la mutación deseada.

Para hacer la reacción de mutagénesis se puso en un microtubo lo siguiente:

5  $\mu$ L de Amortiguador reacción 10X, 2.5  $\mu$ L del DNA templado (20 ng/  $\mu$ L), 1.25  $\mu$ L Oligonucleotido # 1(100 ng/  $\mu$ L), 1.25  $\mu$ L Oligonucleotido # 2 (100 ng/  $\mu$ L), 1  $\mu$ L dNTP's mix, 38  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.

Se añadió 1  $\mu$ L DNA polimerasa *PfuTurbo*. Se utilizó el programa de PCR "CAT-CAAUU" (apéndice III).

Transcurrido el tiempo del programa de PCR se agregó 1  $\mu\text{L}$  de la enzima *Dpn* I (10U/ $\mu\text{L}$ ). Se incubó la reacción a 37°C durante 1 hora. Terminada la incubación se llevó a cabo la transformación de las células XL1-Blue.

Se tomó un tubo con 50  $\mu\text{L}$  de células XL1-Blue competentes y se agregaron 2  $\mu\text{L}$  de la reacción de mutagénesis. Se mezcló e incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente la reacción se incubó a 42°C durante 45 segundos y se puso en hielo durante 2 minutos.

Se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de medio NZY<sup>+</sup> (apéndice I) precalentado a 42°C para la recuperación. Se pasaron las células transformantes a un tubo cónico de 15 mL y se incubó la reacción a 37°C durante 1 hora con agitación ~200-250 rpm.

Transcurrido el tiempo se platearon las células en dos cajas de LB+ Ampicilina, y se incubaron a 37°C durante por lo menos 16 horas.

#### **5.4 Maxipreparación de DNA plasmídico (MAXIPREP)**

Para la realización de esta técnica se utilizó el kit comercial de QIAGEN. Se inoculó medio LB+ antibiótico (100 mL para plásmidos de alta copia y 500 mL para plásmidos de baja copia) con una colonia de interés. Se crecieron a 37°C durante 12-16 h con agitación vigorosa (~300 rpm).

Las bacterias se bajaron por centrifugación a 6000 rpm en una centrifuga SORVALL con rotor GSA durante 15 min. a 4°C. El sobrenadante se desechó y se resuspendió la pastilla en 10 mL de amortiguador P1. Se añadió 10 mL de amortiguador P2, se mezcló ligeramente invirtiendo de 4-6 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadió 10 mL de amortiguador P3 frío y se mezcló inmediatamente por inversión 4-6 veces y se incubó en hielo durante 20 min.

Se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 min. a 4°C en una centrifuga SORVALL con rotor SS-34. Se decantó el sobrenadante en otro tubo estéril para rotor SS-34 y se recentrifugó durante 15 min. a 13,000 rpm a 4°C. Mientras tanto se equilibraron las columnas QIAGEN-tip 500 aplicando 10 mL de amortiguador QBT y dejando que se vaciara la columna por gravedad. Se aplicó el sobrenadante recentrifugado y se filtró por gravedad (guardar este filtrado

(Sobrenadante)). Se lavó la columna con 2x30 mL de Amortiguador QC (lavado 1 y 2). El DNA se eluyó con 15 mL de Amortiguador QF y se recuperó en un tubo estéril para rotor SS-34. El DNA se precipitó añadiendo 10.5 mL de Isopropanol (0.7 vol.) a temperatura ambiente. Se mezcló y centrifugó inmediatamente a 11,000 rpm en una centrifuga SORVALL con rotor SS-34 durante 30 min. a 4°C.

Se lavó el botón de DNA con 5 mL de Etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 min. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante, se dejó secar el botón de DNA y se resuspendió en 150 µL de TE. El plásmido se verificó en un gel de agarosa 0.8 % en TAE IX

### 5.5 Transfección de *T. vaginalis*

En un tubo de vidrio con tapa de rosca estéril se colocaron 6 mL de medio TYM pH= 6.2 con 0.6 mL de suero de caballo inactivado (GIBCO) y se puso como inóculo inicial ~500,000 células; se incubó a 37°C durante 24 horas. En una caja de cultivo Nunc con capacidad de 260 mL se pusieron 50 mL de medio TYM pH = 6.2 suplementado con 5 mL de suero de caballo inactivado (GIBCO) y se inocularon con  $3.7 \times 10^6$  parásitos. Se incubó a 37 °C por 24 horas. Si se van a realizar varias transfecciones los cultivos se ponen en varias cajas de cultivo ya que para cada transfección se necesitan  $240 \times 10^6$  parásitos.

Las células se resuspendieron y se tomó 100 µL de éstas para contar. Los cultivos se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C en una centrifuga SORVALL con rotor GSA. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió suavemente en 20 mL de solución Zimmerman (apéndice I) fría. Las células resuspendidas se transfirieron a un tubo para rotor SS-34, y se centrifugaron nuevamente a 3,000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Se desechó el sobrenadante y se adicionó la solución Zimmerman fría para obtener una concentración de  $240 \times 10^6$  parásitos en un volumen de 400 µL para cada electroporación. Se adicionaron 200 µL más de solución Zimmerman fría al volumen final, se resuspendió la pastilla suavemente y se dejó en hielo. En cada celda de electroporación se puso la mezcla

hecha de 400  $\mu$ L de células + 50  $\mu$ g del plásmido con el que se realizó la transfección (en un volumen máximo de 50  $\mu$ L) y se incubaron en hielo por 5 minutos.

La electroporación se llevó a cabo en el BTX electroporation system, electro cell manipulator 600. Las condiciones iniciales del pulso fueron 1,500  $\mu$ F, 360 Volts y 13 Ohms. Después de la electroporación de las células estas se dejaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las células electroporadas se recuperaron en cajas de cultivo Nunc con capacidad de 260 mL con 30 mL de medio TYM pH= 6.2 suplementado con 3 mL de suero de caballo inactivado (GIBCO) las cuales deben de encontrarse a 37°C, y se incubaron durante 22 horas.

## 5.6 Preparación del extracto proteico

Del volumen total del cultivo electroporado de *T. vaginalis* se transfirieron 15 mL a un tubo cónico de 15 mL. Este se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de solución TEN (apéndice I), subiendo y bajando con una micropipeta.

La pastilla resuspendida de cada muestra se transfirió a un microtubo nuevo de 1.5 mL y se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 segundos a 4°C. Se retiró el sobrenadante con una pipeta y se resuspendió cada pastilla con 500  $\mu$ L de solución TEN. Se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 segundos a 4°C y se desechó el sobrenadante.

Se resuspendió la pastilla con 75  $\mu$ L de Tris 25 mM pH=8, subiendo y bajando con una pipeta. Se lisaron las células con 3 ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido. Inmediatamente después de cada ciclo de congelación-descongelación los tubos se incubaron a 37°C durante 5 minutos. El lisado se incubó a 65°C durante 10 minutos y se mezcló con la punta de una pipeta. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se tomaron 50  $\mu$ L totales del sobrenadante de cada muestra de extracto proteico y se alicuotaron en 2 tubos con 25  $\mu$ L cada uno. Los extractos proteicos se guardaron a -70°C.

## 5.7 Extracción de RNA total a partir de células transfectadas

Cuidados para el manejo de RNA: Siempre utilizar guantes nuevos y cubrebocas, se utiliza material estéril y para la preparación de soluciones se utiliza H<sub>2</sub>O DEPC.

15 mL del cultivo electroporado se colocaron en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugó a 3,000 rpm durante 10 min. a 4°C. Se desechó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS/DEPC estéril (apéndice 1), se transfirió a un microtubo de 1.5 mL. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min. a 4°C y se desechó la solución de lavado. La pastilla se resuspendió con 1 mL de trizol (Invitrogen) y por pipeteo repetitivo se lisaron las células. Las muestras se incubaron durante 5 min. a temperatura ambiente para permitir una disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Se agregaron 200 µL de cloroformo y se mezcló durante 15 segundos por medio de inversión, se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras 15 minutos a 14,000 rpm a 4°C.

La fase acuosa se transfirió a un microtubo de 1.5 mL y se precipitó el RNA con 0.5 mL de alcohol isopropílico, se incubó la muestra 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó la muestra precipitada a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y se lavó el botón de RNA con 1 mL de Etanol/H<sub>2</sub>O DEPC 75%(v/v). Se mezcló ligeramente la muestra en el vortex y se centrifugó a 10,000 rpm durante 5 min. a 4°C.

Se dejó secar el botón de RNA y se resuspendió en 10 µL de H<sub>2</sub>O DEPC y se guardó a -70 °C. La integridad del RNA se verificó en un gel de agarosa 0.8% en TBE IX (apéndice I). El RNA se descongeló y se calentó durante 10 min. a 60°C antes de tomar la alícuota para checkarla en el gel. Se tomó 1 µL de la muestra de RNA+ 4 µL de H<sub>2</sub>O DEPC + 2 µL de amortiguador de carga 6X para RNA, se calentaron a 75°C durante 10 minutos, se puso en hielo 5-10 min. y se cargó en el gel.

### 5.8 Ensayo para medir la actividad enzimática de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT)

Para realizar este ensayo se siguieron los lineamientos para el manejo de material radiactivo. Se preparó una solución concentrada de [<sup>3</sup>H]-cloranfenicol 0.2μCi/μL (apéndice I) y se hizo una dilución de la solución concentrada para que quedará a una concentración de 0.01 μCi/μL. Se preparó el N-butiril-CoA 2.5mM en acetato de sodio 10 mM pH=5 y se guardó a -70°C

Para realizar el ensayo CAT se utilizaron los extractos proteicos de cada electroporación (ver sección 5.6), poniendo los siguientes controles:

- Tris 25 mM (control negativo)
- T.E. 10.2 mM (control negativo de la transfección)
- CAT 0.008U (control positivo)
- CAT 0.016U (control positivo)

Todos los reactivos se pusieron en hielo y se preparó la mezcla maestra para 8 reacciones de la siguiente manera:

SOLUCIÓN:	[ ] FINAL:
160 μL [ <sup>3</sup> H] Cloranfenicol/ 0.01μCi/μL	0.2 μCi
80 μL N-Butiril-CoA 2.5 mM	0.25 mM
80 μL Tris 1M, pH=8	100 mM
<u>80 μL H<sub>2</sub>O bidestilada estéril</u>	
400 μL Volumen final	

En un microtubo de 1.5 mL se prepararon las siguientes reacciones:

- a. 50 μL de Tris 25 mM pH=8. (control negativo)
- b. 48.9 μL de Tris 25 mM pH=8 +1.12 μL de la enzima CAT dilución 1:1000 en Tris 25 mM (CAT 0.008U).

- c. 47.8  $\mu\text{L}$  de Tris 25 mM pH=8 + 2.24  $\mu\text{L}$  de la enzima CAT dilución 1:1000 en Tris 25 mM (CAT 0.016U).
- d. 45  $\mu\text{L}$  de Tris 25 mM pH=8 + 5  $\mu\text{L}$  del extracto proteico de las células transfectadas con T.E.
- e. 45  $\mu\text{L}$  de Tris 25 mM pH=8 + 5  $\mu\text{L}$  del extracto proteico (se repitió dependiendo del número de muestras).

Se añadió a cada tubo 50  $\mu\text{L}$  de la mezcla maestra para tener un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ . Se incubaron los tubos a 37°C durante 2.5 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó a cada tubo 240  $\mu\text{L}$  de xileno, se mezclaron en el vortex y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 minutos. Se tomaron 180  $\mu\text{L}$  de la fase superior y se pusieron en microtubos marcados. Se hizo una reextracción de la fase acuosa a los tubos originales agregando 210  $\mu\text{L}$  de xileno. Se vortexearon 30 segundos y se centrifugaron a 14,000 rpm por 2 minutos.

Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de la fase superior y se colocaron en los tubos marcados, para tener 380  $\mu\text{L}$  en total. A cada uno de los tubos marcados se les agregó 250  $\mu\text{L}$  de Tris 25 mM pH=8, se mezclaron en el vortex durante 30 segundos y se centrifugaron 2 minutos a 14,000 rpm.

Se tomaron 330  $\mu\text{L}$  de la fase superior y se colocaron en otros microtubos de 1.5  $\mu\text{L}$ . Se agregó 250  $\mu\text{L}$  de Tris 25 mM, pH=8. Se mezclaron en el vortex durante 30 segundos y se centrifugaron 2 minutos a 14,000 rpm.

Se tomaron 300  $\mu\text{L}$  de la fase superior y se colocaron directamente en los viales que contienen 1.5 mL del líquido de centelleo. Antes de leer en el contador de centelleo líquido se normalizó, se leyó en el canal de tritio y se utilizó como blanco un vial con solo líquido de centelleo.



## 5.9 Cuantificación de proteínas

Para reportar la actividad de CAT/ $\mu\text{g}$  de proteína se cuantificó la cantidad de proteína en los extractos mediante el método de Bradford (Bradford, M.M. 1976). Se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina a diferentes concentraciones (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5...10  $\mu\text{g}$  /mL).

En un microtubo de 1.5 mL se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de cada extracto proteico a cuantificar y se agregó 795  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada estéril. Se agregaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo Azul de Coomassie (BIORAD), se mezcló en el vortex durante 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.

Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a  $\lambda = 595$  nm, antes de que transcurriera una hora de realizada la reacción. Los datos de la curva patrón se graficaron y las lecturas obtenidas de los extractos proteicos se interpolaron.

## 5.10 Purificación de RNA poly A+

A partir del RNA total de *T. vaginalis* se purificó el RNA poli A+ utilizando el Kit QuickPrep™ Micro mRNA Purification (Amersham Pharmacia Biotech), que cuenta con una resina oligo (dT) celulosa.

Al RNA total de *T. vaginalis* resuspendido en  $\text{H}_2\text{O}$  DEPC, se le agregó 0.4 mL de amortiguador de extracción y 0.8 mL del amortiguador de elusión. En un microtubo de 1.5 mL se colocó 1 mL de oligo (dT) celulosa, se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min. y se eliminó el sobrenadante. Se le agregó la mezcla hecha con el RNA total y se mezcló suavemente por inversión durante 3 minutos, se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 segundos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo ya que en este se encuentra la población RNA poly A-. La resina se lavó cinco veces de la siguiente forma: se resuspendió en 1 mL de amortiguador High-salt por inversión, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 segundos y se eliminó el sobrenadante.

Posteriormente la resina se resuspendió en 1 mL de amortiguador Low-salt por inversión, se centrifugó a velocidad máxima por 10 segundos y se eliminó el sobrenadante, este paso se repitió una vez más.

La resina se resuspendió en 300  $\mu$ L de amortiguador Low-salt, y se transfirió a una microcolumna que se colocó dentro de un microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 segundos. Se cambió la columna a un microtubo nuevo y se agregaron 500  $\mu$ L de amortiguador Low-salt y se centrifugó 5 segundos a 14,000 rpm, la columna se cambió a un tubo nuevo y se repitió el paso anterior.

El RNA poli A+ se eluyó de la resina de la siguiente manera: La columna se colocó en un microtubo de 1.5 mL y se le agregó 200  $\mu$ L del amortiguador de elusión a 65°C, la columna se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 segundos, y la elusión se guardó ya que contiene al RNA poly A+. La columna se lavó con 200  $\mu$ L de amortiguador de elusión a 65°C y se repitió el paso anterior.

El RNA poly A+ se cuantificó por espectrofotometría de la siguiente manera: el RNA se diluyó 1:100 en amortiguador de elusión, en un volumen total de 1 mL. En una celda de cuarzo pretratada con H<sub>2</sub>O DEPC se leyó la absorbancia a  $\lambda=260$  nm y  $\lambda=280$  nm. La concentración de RNA se calculó utilizando la fórmula:

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

### 5.11 Amplificación rápida de los 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 mediante PCR y c) clonación del producto de PCR purificado.

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

Se utilizaron 10-500 ng de RNA poly A+ de *T. vaginalis*, 1  $\mu$ L del oligonucleótido AP (adapter primer) (200 ng/ $\mu$ L), 0.5  $\mu$ L dNTP's mix 10 mM c/u (Invitrogen) y se agregó H<sub>2</sub>O DEPC para tener un volumen de 7  $\mu$ L.

Se calentó la mezcla a 65°C por 5 min. y se incubó 1 min. en hielo, el tubo se centrifugó para bajar y se agregó:

1  $\mu$ L Amortiguador First-Strand 5X (Invitrogen), 0.5  $\mu$ L 0.1 M DTT (Invitrogen), 0.5  $\mu$ L SuperScript™ III RT (200U/  $\mu$ L) (Invitrogen).

Se mezcló por medio de pipeteo subiendo y bajando, se incubó a 42°C durante 15 min. y a 50°C durante 30 min. Se inactivó la enzima calentando a 70°C durante 15 min. Se añadió 0.5  $\mu$ L RNAsa H (Invitrogen) (2U/  $\mu$ L). Se incubó a 37°C durante 35 minutos, se centrifugó para bajar y se guardó a -20°C.

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

En un microtubo se colocaron 1.5  $\mu$ L de cDNA de *T. vaginalis* (inciso a), 5  $\mu$ L de amortiguador PCR 10X (SIGMA), 6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (SIGMA), 3  $\mu$ L de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 30  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada estéril, 2  $\mu$ L del oligonucleótido CAT 10 (20 pmol/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L del oligonucleótido AUAP-B (20 pmol/  $\mu$ L) y 0.5  $\mu$ L de la enzima *Pfu*. Se utilizó el programa de PCR PROCE 1 (apéndice III).

Para realizar una segunda amplificación del cDNA de CAT (PCR anidado, o “nested”), se colocaron 0.5  $\mu$ L del producto de PCR de la primera amplificación, 5  $\mu$ L amortiguador PCR 10X (SIGMA), 6  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM (SIGMA), 3  $\mu$ L de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 31  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada estéril, 2  $\mu$ L del oligonucleótido CAT11 (20 pmol/ $\mu$ L), 2  $\mu$ L del oligonucleótido AUAP-B (20 pmol/  $\mu$ L) y 0.5  $\mu$ L de la enzima *Pfu*. Se utilizó el programa de PCR PROSC2 (apéndice III).

Los productos de PCR se verificaron en un gel de agarosa al 1.5 % en TAE IX

### 5.12 Ligación de los Productos del ensayo 3' RACE en el vector TOPO (Invitrogen)

La clonación en el vector TOPO (Zero Blunt TOPO PCR Cloning) 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'- CCCTT 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 I. 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. El vector TOPO tiene al gen *ccdB* que es un gen letal de *E. coli*, este gen esta unido al C terminal del fragmento LacZ $\alpha$  y si hay ligación del producto de PCR se inhibe la expresión de dicho gen, permitiendo crecer únicamente a las colonias recombinantes.

Se clonaron los productos del PCR anidado, de la siguiente manera: En un microtubo de 0.5 mL se colocaron 2  $\mu$ L del producto de PCR anidado, 0.5  $\mu$ L de la solución diluida de sal (1:4) (Invitrogen), y 0.5  $\mu$ L del vector TOPO. La mezcla se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente para que se llevara a cabo la ligación. Se agregó 2  $\mu$ L de la mezcla anterior a un vial de células competentes (*E. coli*) mezclándose ligeramente. Se transfirieron las células a una celda para electroporación fría de 0.1 cm de diámetro, se electroporaron dando un pulso de 2.46 Kvolts, inmediatamente después se recuperaron agregando 250  $\mu$ L de medio SOC. La mezcla se transfirió a un tubo cónico de 15 mL y se incubó con agitación a 37 °C durante una hora.

Después de la incubación se plateó una dilución 1:10 (30  $\mu$ L) y 9:10 (270  $\mu$ L) de cada electroporación en cajas de medio LB sólido + kanamicina (50 ng/  $\mu$ L), las cajas se incubaron a 37°C toda la noche.

### 5.13 Southern Blot

En esta técnica se hibrida el DNA (los productos de PCR de la primera amplificación y el PCR anidado) con una sonda radiactiva de una parte de la región de *cat*.

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X, con un grosor aproximado 6 mm, este se corrió a 80 volts, se utilizó como marcador de peso molecular DNA de lambda cortado con *Hind* III. El gel se tiñó con bromuro de etidio durante 10 minutos y se lavó el gel con agua bidestilada durante 20 minutos. Se puso una regla a la altura de los pozos y se tomó una fotografía para después calcular el tamaño de las bandas que den señal. Se hizo una muesca en la parte superior derecha del gel. Se transfirió a un recipiente para la preparación del gel para la transferencia siguiendo los siguientes pasos:

- a. Depurinización: se incubó el gel en 250 mL de HCl 0.25 N durante 7 minutos. Se descartó la solución y se repitió este paso una vez más.
- b. Desnaturalización: se incubó el gel en 250 mL de solución desnaturalizante durante 15 min. Se descartó la solución y se repitió este paso una vez más.
- c. Neutralización: se incubó el gel en 250 mL de solución de neutralización durante 30 minutos. Se descartó la solución y se repitió este paso.

Para transferir el DNA a una membrana de nylon Zeta probe GT (BIORAD), se cortó la membrana del tamaño del gel, se colocó sobre el gel y para permitir la transferencia se colocó sobre esta un papel whatman del mismo tamaño y una cama de toallas de papel, con un peso encima. Se utilizó la solución de transferencia (apéndice I) y se dejó transfiriendo durante al menos 16 horas.

Después de la transferencia, se marcaron los pozos del gel en la membrana, y se cortó la esquina correspondiente que ha sido marcada en el gel. La membrana se lavó con agitación suave en SSC 2X (apéndice I) durante 10 minutos, y se secó al aire durante 1 hora. Se fijó el DNA a la membrana con luz UV utilizando una energía de  $120,000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$  de energía UV en un equipo UV crosslinker; se prehibridó durante por lo menos 2 horas en solución de hibridación (apéndice I) a  $40^\circ\text{C}$ . Se desechó la solución de prehibridación y se le agregó la sonda radiactiva.

La sonda radiactiva se preparó de la siguiente manera: utilizando el kit comercial Rediprime™ II (random prime labelling system), 50-100 ng de DNA se llevaron a un volumen de 45  $\mu\text{L}$  con  $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada estéril, se desnaturalizó el DNA por calentamiento a  $95^\circ\text{C}$  durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, se centrifugó para bajar lo evaporado. El DNA desnaturalizado se agregó al tubo de labelling mix del kit comercial mezclándolo suavemente hasta que el color fuera uniforme y se agregó 2  $\mu\text{L}$  de  $\alpha[^{32}\text{P}]$  dCTP (20  $\mu\text{Ci}$ ), mezclando muy bien. La reacción se incubó durante 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Para detener la reacción se agregó 5  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.2M, posteriormente se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de solución TE 10.2 mM. Se pasó la mezcla por una columna de sephadex G50 para quitar la marca radiactiva libre, no incorporada a la reacción. La sonda se desnaturalizó con 10  $\mu\text{L}$  de NaOH 3N y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se transfirió a hielo con agua y se neutralizó

con 10  $\mu$ L de HCl 3N y 5  $\mu$ L de Tris 1M pH=7.4. La sonda desnaturalizada se mezcló con unos mililitros de la solución de hibridación.

Las membranas se hibridaron a 40 °C durante un tiempo equivalente a 2 Cot 1/2, donde  $Cot\ 1/2 = 2(1/X) (Y/5) (Z/10)$ ; X= Peso en  $\mu$ g de la sonda, Y= tamaño en Kb de la sonda, y Z= volumen de hibridación en mL.

Pasado el tiempo de hibridación, la membrana se lavó a temperatura ambiente con una solución 2X SSC, 0.5% SDS. La membrana se monitoreó con un contador geiger y se lavó dependiendo del fondo radiactivo. La membrana se expuso en película Hiperfilm (Amersham Biosciences).

#### 5.14 Midipreparación de DNA plasmídico (MIDIPREP)

Este método utiliza QIAGEN Plasmid Midi kit, se usó para preparar plásmido de la mutación Ambar CCCGG-11. Se inoculó 100 mL de medio LB líquido + antibiótico con una colonia de interés. Se creció a 37°C durante 12-16 h con agitación vigorosa (~300 rpm). Las bacterias se colectaron por centrifugación a 6000 rpm en una centrífuga SORVALL con rotor GSA por 15 min. a 4°C. La pastilla se resuspendió en 4 mL de amortiguador P1.

Se agregó 4 mL de amortiguador P2, se mezcló ligeramente invirtiendo de 4-6 veces y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se agregó 4 mL de amortiguador P3 frío, se mezcló inmediatamente por inversión 4-6 veces y se incubó en hielo durante 15 min. Se centrifugó a 13,000 rpm por 30 min a 4°C en una centrifuga SORVALL con rotor SS-34. El sobrenadante se decantó en otro tubo estéril y se recentrifugó el sobrenadante a 13,000 rpm durante 15 min. a 4°C.

Se equilibraron las columnas QIAGEN-tip 100 aplicando 4 mL de amortiguador QBT y se dejaron vaciar por gravedad. Se agregó el sobrenadante recentrifugado y se filtró por gravedad (Sobrenadante). Se lavó la columna con 2x10 mL Amortiguador QC (lavado 1 y 2), se eluyó el DNA con 5 mL de Amortiguador QF.

Se precipitó el DNA añadiendo 3.5 mL de Isopropanol a temperatura ambiente (0.7 vol.), se mezcló y centrifugó inmediatamente a 11,000 rpm en una centrifuga SORVALL con rotor SS-34 durante 30 min.

Se lavó el botón de DNA con 2 mL de Etanol al 70% a temperatura ambiente y se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 min. Se decantó cuidadosamente el sobrenadante.

Se dejó secar el botón de DNA y se resuspendió en 150  $\mu$ L de TE. El plásmido se verificó en un gel de agarosa 0.8% en TAE IX.

---

# **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



### 6.1 Mutagénesis dirigida a la señal de procesamiento de los RNAm de *T. vaginalis*

En nuestro grupo de trabajo se propuso el motivo  $Y(A)_{0-3}AAUU$  como señal de procesamiento para la poliadenilación de los RNA mensajeros en *T. vaginalis*.

En nuestro laboratorio se cuenta con un vector de expresión que contiene al gen reportero *cat* (que codifica para la enzima cloranfenicol acetil transferasa, ver antecedentes). Rio abajo a la región codificadora se encuentra la secuencia CAAAATT. Se ha encontrado que los transcritos precursores del RNAm de *cat* se poliadenilan después del residuo (C↓) (Espinosa y col., 2002). Para corroborar la señal mínima propuesta de poliadenilación se realizó una mutagénesis dirigida en donde se cambió la secuencia CAAAATT por CAATT (Fig. 9).

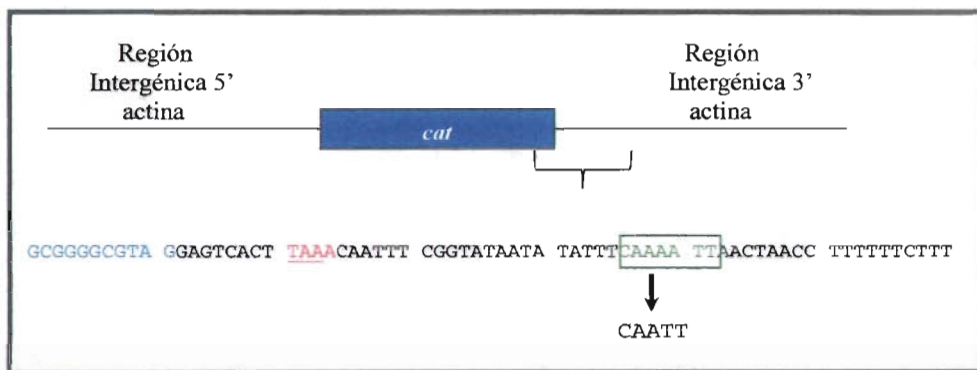


Fig. 9. Esquema del cambio realizado por mutagénesis dirigida. En color azul se muestra el gen *cat*; en color rojo se muestra la señal propuesta de poliadenilación (TAAA); en color verde y encerrado en un cuadrado se encuentra la señal de procesamiento del RNAm, la cual va a ser mutada por CAATT.

En el ensayo de mutagénesis dirigida se obtuvieron un total de 237 colonias. Para confirmar que se tiene la mutación deseada se tomaron 12 colonias al azar y se preparó plásmido (minipreps) de cada una de ellas. Los plásmidos se visualizaron en un gel de agarosa 0.8% en TAE IX; debido a que aparentemente todas las clonas eran iguales se escogió una clona al azar y se mandó secuenciar en un secuenciador automático en el

Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se seleccionó la clona CAATT-9 y ésta se secuenció con el oligonucleótido CAT 11 (4 pmol/  $\mu$ L).

La secuencia obtenida es la siguiente:

AMBAR	GTGAATACCACGACGATTTCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTT	540
CAATT9	-----	540
AMBAR	ACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAG	600
CAATT9	-----	600
AMBAR	CCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTCT	660
CAATT9	-----	660
AMBAR	TCGCCCCGTTTTCCACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGC	720
CAATT9	-----	720
AMBAR	TGGCGATT CAGGTT CATCATGCCGTTTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAAATGCTTAATG	780
CAATT9	-----	780
AMBAR	AATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAGGAGCTCACT <u>TAAACAATTT</u>	840
CAATT9	-----	840
AMBAR	CGGTATAATATATTTCAAATTAACTAACCTTTTTTCTTTAGTGAACCTATTTTGGAAAT	900
CAATT9	-----	898
AMBAR	CACTTCATTAATATTGTGTTTTAATGGTTTATATGTGA	938
CAATT9	-----	936

Fig. 10. Alineamiento de la secuencia del plásmido Ambar (parental), con parte de la secuencia del plásmido CAATT-9 (mutante). En color rojo se observa la señal propuesta de poliadenilación incluyendo el codón de término de la traducción (texto subrayado). En color verde se muestra la señal de procesamiento. Los guiones indican identidad en la secuencia. Los puntos indican la ausencia de nucleótido.

Como se puede observar en la figura 10, se obtuvo la mutación deseada: la delección de dos adenosinas en la señal de procesamiento, y no hubo ningún otro cambio en el resto de la secuencia. El plásmido obtenido se llamó pCAATT-9

Para determinar si la señal CAATT funciona igual que la presente en el plásmido parental Ambar (CAAATT), se transfeció un cultivo de *T. vaginalis* con el plásmido pCAATT-9 como se describe en la sección 5.5.

Se realizaron 3 transfecciones:

1. Células + amortiguador T.E (control sin DNA)
2. Células + plásmido Ambar (plásmido parental, control positivo de la transfección)
3. Células + plásmido pCAATT-9 (plásmido mutante)

Se hizo la extracción de proteína de los tres cultivos transfectados y se determinó la actividad de CAT (sección 5.8). Los resultados se muestran en la Fig. 11.

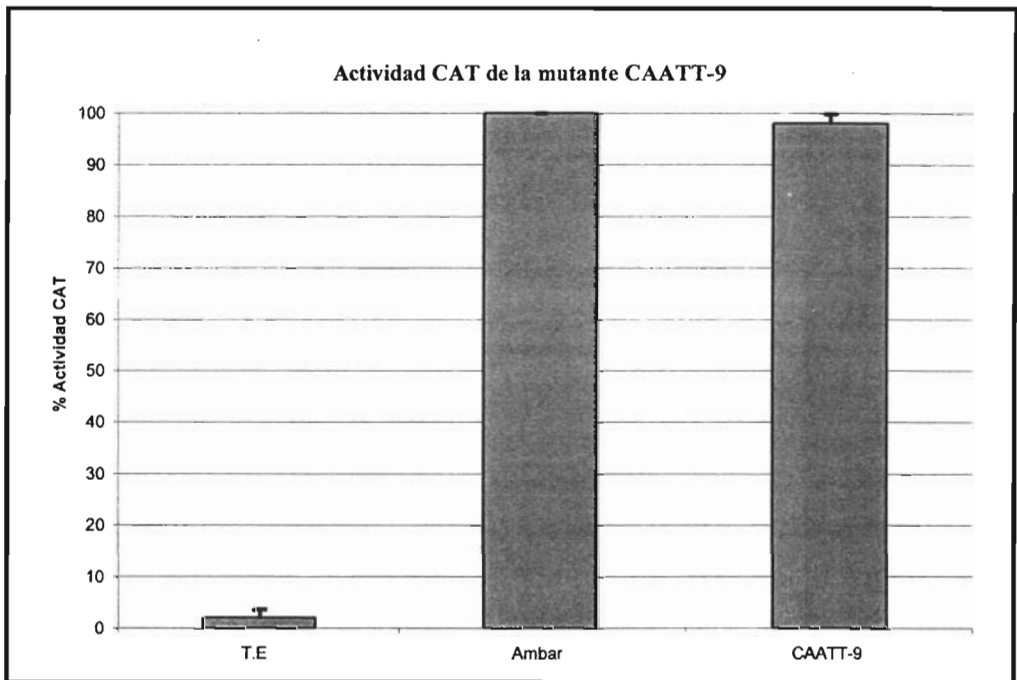


Fig. 11. Determinación de la actividad de cloranfenicol acetyl transferasa (CAT) en células transfectadas con el plásmido parental (Ambar), con el plásmido mutante pCAATT-9 y con amortiguador T.E.

La transfección y el ensayo CAT se hicieron por duplicado. En la Fig. 11 se muestra la actividad enzimática promedio con sus respectivas desviaciones estándar para cada transfección. Al comparar la actividad obtenida en la transfección con el plásmido Ambar (parental) con la actividad obtenida en la transfección con el plásmido pCAATT-9

(mutante), se ve que son muy parecidas. Esto nos sugiere que la señal de procesamiento mutada está funcionando de manera similar a la original.

Para determinar el sitio en donde se lleva a cabo la poliadenilación del RNAm de *cat* expresado en las transformantes con el plásmido mutante pCAATT-9, se realizó un ensayo de amplificación rápida de los extremos 3' del cDNA (3' RACE). Se utilizó RNA poly A+ extraído de las transfecciones hechas. El esquema de esta técnica se muestra en la Fig. 12. Para la primera amplificación se espera un producto de tamaño ~540 pb y el producto esperado para el PCR anidado es ~480 pb.

### 3' RACE

#### 1. Síntesis de cDNA



↓ Transcriptasa reversa



↓ RNAsa H

#### 2. Degradación del RNA



#### 3. PCR inicial para amplificar *cat*



↓ Taq polimerasa

#### 4. PCR Anidado (Nested PCR) para *cat*

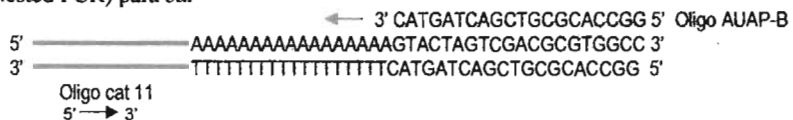


Fig. 12 Esquema de la amplificación rápida de los extremos 3' del cDNA (3' RACE)

Los resultados obtenidos del ensayo de 3' RACE se observan en la Fig. 13. Los productos de la primera amplificación y el PCR anidado se verificaron en un gel de agarosa 1% en TAE IX (Fig. 13, A).

Para comprobar que los productos amplificados correspondían a *cat*, se hizo un Southern Blot (Fig. 13, B) en donde los productos de PCR se hibridaron con una sonda homóloga para *cat*.

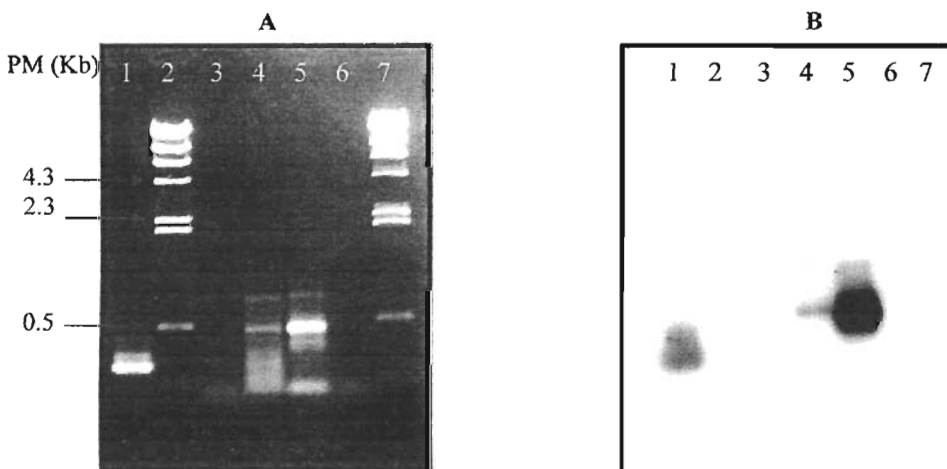


Fig. 13. A) Gel de agarosa 1 % en TAE IX. Carriles: 1) Control positivo de hibridación, 2)  $\lambda$  *Hind* III, 3) Control negativo de la primera amplificación, 4) Primera amplificación CAATT-9, 5) PCR anidado CAATT-9, 6) Control negativo del PCR anidado, 7)  $\lambda$  *Hind* III. B) Southern Blot del gel (A). Sonda: fragmento de 420 pb *Eco* RI/*Sst* I del plásmido pAC22CAT-1 (sonda homóloga para *cat*).

Como se obtuvo amplificación en el ensayo de 3' RACE esto indicaba que el transcrito está poliadenilado. Para conocer el sitio donde la poliadenilación está ocurriendo, el PCR anidado de CAATT-9 se clonó en el vector TOPO. De ahí se obtuvieron un total de 389 colonias. Se tomaron 10 colonias al azar y se preparó plásmido.

Los plásmidos se checkaron en un gel de agarosa 0.8% en TAE IX, se seleccionó la clona 6 y se mandó a secuenciar, con el oligonucleótido CAT 11 (4 pmol/  $\mu$ L).

La secuencia que se obtuvo fue la siguiente:

cDNA Ambar	5'...GCGTAGGAGCTCACTTAAACAATTCGGTATAATATATTTCAAAAAAAAAAAAA...3'
cDNA CAATT-9	5'...GCGTAGGAGCTCACTTAAACAATTCGGTATAATATATTTCAAAAAAAAAAAAA...3'
Secuencia de los plásmidos:	
Ambar	5'...GCGTAGGAGCTCACTTAAACAATTCGGTATAATATATTTCAAAATTAAC TAACC...3'
pCAAUU-9	5'...GCGTAGGAGCTCACTTAAACAATTCGGTATAATATATTTCAATTAACTAACC...3'

Fig. 14. Comparación del cDNA de *cat* expresado por células transformadas con el plásmido Ambar (parental) y el cDNA de *cat* expresado por células transformadas con el plásmido pCAATT-9 (mutante). Se muestra también la secuencia de los plásmidos. La flecha indica el sitio de procesamiento del RNAm. En color rojo se muestra la señal de poliadenilación y en color verde la señal de procesamiento.

Como se puede observar en la Fig. 14 la secuencia del cDNA de la clona CAATT-9 es igual a la del cDNA de Ambar. Lo anterior muestra que el procesamiento de los RNAm de *cat* se está llevando a cabo en el mismo sitio. Por lo tanto se puede inferir que la secuencia CAATT es suficiente para señalar el sitio de procesamiento de los RNA mensajeros en *T. vaginalis*.

## 6.2 Funcionalidad de la señal mínima CAAUU en el procesamiento del RNAm de *cat*

Para demostrar la funcionalidad de la secuencia C↓AAUU, es decir, que esta propiciando que el procesamiento del RNAm se lleve a cabo preferencialmente en esos nucleótidos, lo siguiente que se decidió hacer fue mutar el tetranucleótido de la señal AATT por CCGG. Siguiendo la misma estrategia experimental anteriormente utilizada, se obtuvieron un total de 283 colonias. Se tomaron 12 colonias independientes al azar y se hicieron minipreps. Los plásmidos se verificaron en un gel de agarosa 1% en TAE 1X, aparentemente todas las clonas eran iguales. Se escogió una clona al azar (CCCGG-11) y se mandó secuenciar el plásmido con el oligonucleótido CAT 11 (4 pmol/  $\mu$ L).

La secuencia obtenida se muestra en la Fig. 15.

CAATT9	GTGTTACCCCTTGTACACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGA	480
CCCGG11	-----	480
CAATT9	GTGAATACCACGACGATTTCGGCAGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTT	540
CCCGG11	-----	540
CAATT9	ACGGTGAAAACCTGCGCTATTTCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAG	600
CCCGG11	-----	600
CAATT9	CCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTCT	660
CCCGG11	-----	660
CAATT9	TCGCCCCGTTTTTACCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGC	720
CCCGG11	-----	720
CAATT9	TGGCGATTTCAGTTTCATCATGCCGTTTGTGATGGCTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATG	780
CCCGG11	-----	780
CAATT9	AATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAGGAGCTCACT <u>TAAA</u> CAATT	840
CCCGG11	-----	840
CAAU9	CGGTATAATATATTCAATTAACCTTTTTTCTTTAGTGAACCTATTTGGAAATCA	900
CCCGG11	-----CCGG-----	900
CAAU9	CTTCATTAATATGTGTTTTAATGGTTTATATGTGA	936
CCCGG11	-----	936

Fig. 15. Alineamiento de la secuencia del plásmido pCAATT-9, con parte de la secuencia del plásmido pCCCGG-11(mutante). En color rojo se observa la señal de poliadenilación incluyendo el codón de terminación (texto subrayado). En color verde se muestra la señal de procesamiento.

Como se puede observar en la figura 15, se obtuvo la mutación deseada y no hubo ningún otro cambio en el resto de la secuencia. Por lo tanto se evaluó la capacidad del plásmido mutante CCCGG-11 para expresar la actividad de *cat*, de manera similar a la ya descrita.

Se hizo la transfección de *T. vaginalis* (ver sección 5.5), con el plásmido mutante CCCGG-11, con el plásmido CAATT-9 (control positivo) y con el amortiguador T.E. (control negativo). Se hizo la extracción de proteína de las tres transfecciones y se realizó el ensayo CAT obteniéndose el siguiente resultado:

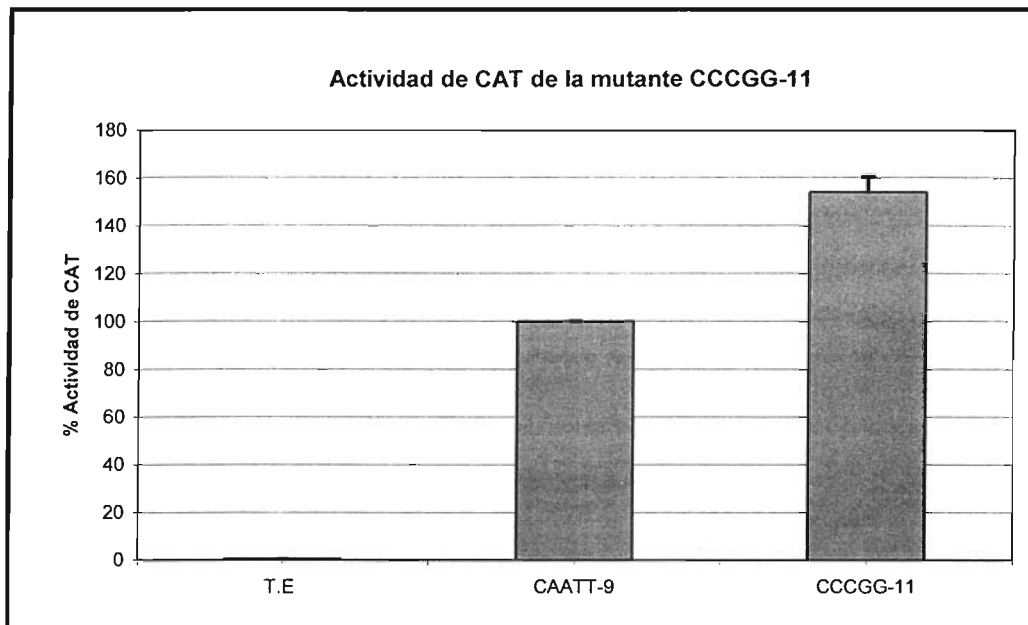


Fig. 16. Determinación de la actividad de cloranfenicol acetil transferasa (CAT) en células transfectadas con el plásmido parental (CAATT-9) y con el plásmido mutante CCCGG-11

Tanto la transfección como el ensayo CAT se hicieron por duplicado. En la Fig. 16 se muestra la actividad promedio con sus respectivas desviaciones estándar para cada transfección. Al comparar la actividad de CAT de las células transformadas con el plásmido pCAATT-9 (ahora utilizado como plásmido parental) con la actividad obtenida en las células transformadas con el plásmido pCCCGG-11 (mutante), se ve que la actividad de éste último es mayor a la actividad del control positivo.

Este resultado fue sorprendente, ya que se esperaba que al mutar la señal de procesamiento el proceso de poliadenilación se alteraría, como se ha visto al mutar la señal de poliadenilación (datos de nuestro laboratorio en donde hemos encontrado que la actividad de CAT está disminuida). Nuestros datos sugieren que la secuencia mutada está funcionando de manera similar a la original, o bien que hay alguna señal alternativa para el procesamiento del RNAm que está funcionando en lugar de la original.



Por lo tanto se decidió determinar el sitio donde se lleva a cabo la poliadenilación del RNAm de *cat* expresado en células transfectadas con pCCCGG-11. Por ello se hizo un ensayo de 3' RACE a partir de RNA poly A+ extraído de las transfecciones hechas. Si el sitio de procesamiento del RNAm se conserva se espera un producto de ~540 pb para el primer amplificado y para el PCR anidado se espera un producto de ~ 480 pb. Si hay una señal alternativa para el procesamiento, se observará una variación en el tamaño del producto de PCR.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 17. Los productos de la primera amplificación y el PCR anidado se verificaron en un gel de agarosa 1.5% en TAE IX (Fig. 17, A). Para comprobar que los productos amplificados correspondían a *cat*, se hizo un Southern Blot (Fig. 17, B) en donde los productos de PCR se hibridaron con una sonda homóloga para *cat*.

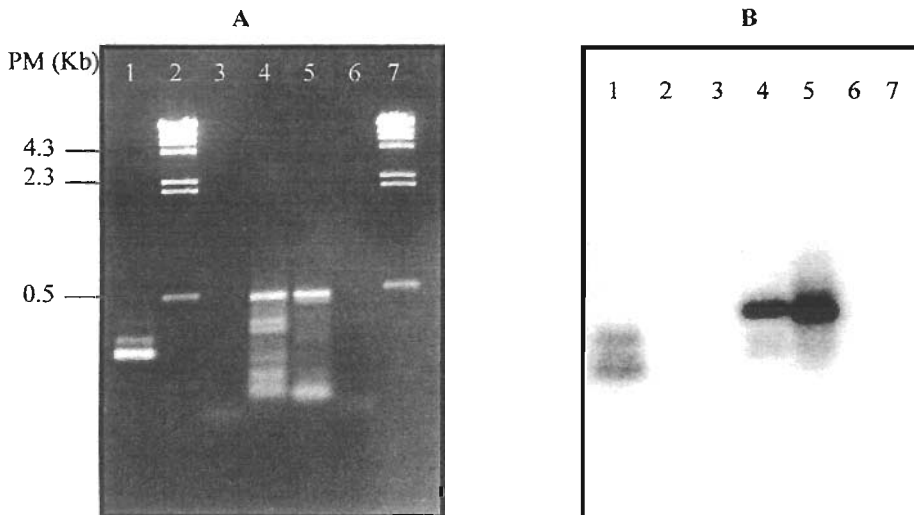


Fig. 17. A) Gel de agarosa 1.5 % en TAE IX. Carriles: 1) Control positivo de hibridación, 2)  $\lambda$  *Hind* III, 3) Control negativo de la primera amplificación, 4) Primera amplificación CCCGG-11, 5) PCR anidado CCCGG-11, 6) Control negativos del PCR anidado, 7)  $\lambda$  *Hind* III. B) Southern Blot del gel (A). Sonda: fragmento de 420 pb *Eco* RI/*Sst* I del plásmido pAC22CAT-1 (sonda homóloga para *cat*).

Como se obtuvieron productos de amplificación con la técnica de 3' RACE, esto sugería que el transcrito de *cat* se encuentra poliadenilado. La obtención de productos de PCR de tamaños similares a los esperados, hace suponer que el RNAm se está poliadenilando en el mismo sitio (o en un sitio muy cercano) al mutado.

Para poder conocer el sitio donde la poliadenilación está ocurriendo, el producto del 3' RACE de CCCGG-11 se clonó en el vector TOPO. De ahí se obtuvieron un total de 339 colonias.

Se tomaron 36 colonias al azar y se hicieron minipreps; debido a que se obtuvieron plásmidos de distinto tamaño, éstos se digirieron con *Eco* RI para determinar la presencia de insertos. De las clonas que tenían inserto del tamaño esperado, se seleccionó la clona 28 y se secuenció con el oligonucleótido CAT 11 (4 pmol/  $\mu$ L).

La secuencia que se obtuvo fue la siguiente:

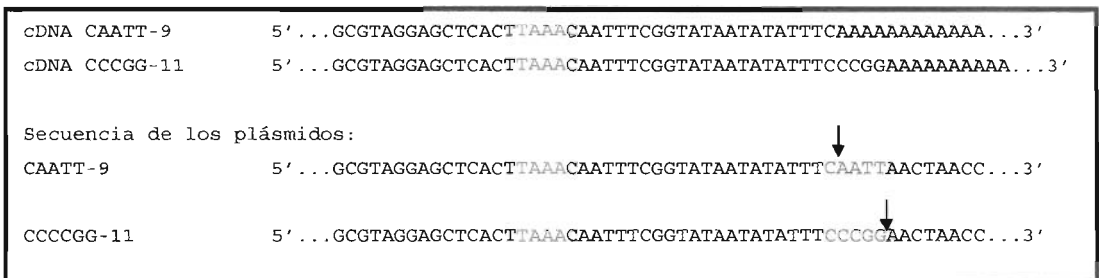


Fig. 17. Comparación del cDNA de *cat* expresado por células transformadas con el plásmido pCAATT-9 (parental) y el cDNA de *cat* expresado por células transformadas con el plásmido pCCCGG-11 (mutante). Se muestra también la secuencia de los plásmidos. La flecha indica el sitio de procesamiento del RNAm. En color rojo se muestra la señal de poliadenilación y en color verde la señal de procesamiento.

Como se puede observar en la Fig.17 en la secuencia del cDNA de CCCGG-11, al ser comparado con el cDNA de CAATT-9, se puede ver que el procesamiento de los RNAm de *cat*, se está realizando después de la mutación de la señal de procesamiento, lo cual indica

que la secuencia AACT que se encuentra río abajo de la señal de procesamiento original, podría estar funcionando como señal alternativa para el procesamiento y poliadenilación.

Esto se apoya en el trabajo previo de nuestro grupo (Espinosa y col., 2002) donde se observa que la secuencia AACT, es un tetranucleótido que se encuentra en el sitio de procesamiento de uno de los genes estudiados (gen de la ATPasa del retículo sarcoplásmico-endoplásmico dependiente de calcio de *T. vaginalis*).

Los resultados encontrados son muy interesantes, ya que aunque la señal original de procesamiento fue alterada, los RNAm siguieron siendo poliadenilados en lo que podría ser un sitio alternativo de poliadenilación (AACT).

También es interesante el encontrar en este caso una actividad de la enzima CAT más alta a la del plásmido parental, lo que sugiere que por alguna razón hay más producción de enzima. Esto podría deberse a que sean un poco más estables los RNAs mensajeros producidos, quizás por la presencia de una pequeña zona rica en GC (generada por la mutación), siendo que la región original 3' UTR donde se hizo esta modificación es rica en AT.

---

# **7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

### CONCLUSIONES

- ☞ La señal CAAUU funciona de la misma manera que la señal CAAAAUU, ya que permite que se lleve a cabo la poliadenilación en el mismo sitio, (C↓).
- ☞ Si la señal CAAUU es mutada a CCCGG, el sitio de procesamiento del RNAm se altera y se utiliza el sitio alternativo CAACU.
- ☞ El tener transcritos poliadenilados con el plásmido mutante pCCCGG-11, demuestra que existe una señal que funciona de manera alternativa en el procesamiento del RNAm.

### PERSPECTIVAS

- ☞ Secuenciar otras clonas de cDNA obtenidas por 3' RACE de células transfectadas con el plásmido pCCCGG-11.
- ☞ Mutagenizar la posible señal alternativa de procesamiento (AACT) y evaluar su efecto.
- ☞ Realizar una mutagénesis dirigida a la señal mínima de procesamiento de los transcritos primarios (CAATT), de una manera menos drástica, tan solo invirtiendo el tetranucleótido y analizar el efecto producido, (CTTAA).
- ☞ Realizar la delección de toda la secuencia CAATT y evaluar su efecto.

---

# **8. BIBLIOGRAFÍA**

- Arroyo R., González-Robles A., Martínez-Palomo A., Alderete J.F. "Signalling of *Trichomonas vaginalis* for ameboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence" *Mol. Microbiol.* 1993, 7(2):299-309
- Baroin A., Perasso R., Qu L.H., Brugerolle G., Bachelletie J.P., Adoutte A. "Partial phylogeny of the unicellular eukaryotes based on rapid sequencing of a portion of 28S ribosomal RNA". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85:3474-3478
- Chen F., MacDonald C. Wilusz Jeffrey. "Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal". *Nucleic Acids Res.* 1995, 23(14):2614-2620
- Colgan D., Manley J. "Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation". *Genes Dev.* 1997, 11:2755-2766
- Cotch M., Pastorek J, Nugent R., Hillier S., Gibbs R., Martin D., Eschenbach D., Edelman R., Carey J., Regan J, Krohn M., Klebanoff M., Rao A., Rhoads G. "*Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. The vaginal infections and prematurity study group". *Sex. Transm. Dis.* 1997, 24(6):353-360.
- Delgadillo M., Liston D., Niazi K., Johnson P. "Transient and selectable transformation of the parasitic protist *Trichomonas vaginalis*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94:4716-4720
- Dye M., Proudfoot N. "Multiple transcript cleavage precedes polymerase release in termination by RNA polymerase II". *Cell* 2001, 105:669-681
- Eckner R., Ellmeier W., Birnstiel M. "Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from de nucleus". *EMBO J.* 1991, 10(11):3513-3522.
- Espinosa N., Hernández R., López-Griego L., López-Villaseñor I. "Separable putative polyadenylation and cleavage motifs in *Trichomonas vaginalis* mRNAs". *Gene* 2002, 289:81-86.
- Germot A., Philippe H., Le Guyader H. "Presence of a mitochondrial-type 70-kDa heat shock protein in *Trichomonas vaginalis* suggest a very early mitochondrial endosymbiosis in eukaryotes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93:14614-14617
- Gómez-Conde E., Mena-López R., Hernández-Jauregui P., González-Camacho M., Arroyo R. "*Trichomonas vaginalis*: Chromatin and mitotic spindle during mitosis". *Exp. Parasitol.* 2000, 96:130-138
- Lahti C., D'Oliveira C., Johnson P. "13-Succinyl-Coenzyme A Synthetase from *Trichomonas vaginalis* is a soluble hydrogenosomal protein with an amino-terminal sequence that resembles mitochondrial presequences". *J. Bacteriol.* 1992, 174(21):6822-6830
- Lehker M., Alderete J. "Biology of trichomonosis". *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2000, 13:37-45

- Liston D., Johnson P. "Gene Transcription in *Trichomonas vaginalis*" Parasitol. Today 1998, 14(7):261-265
- Liston D., Johnson P. "Analysis of a ubiquitous promoter element in a primitive eukaryote: early evolution of the initiator element". Mol. Cell. Biol. 1999, 19(3):2380-2388.
- Meysick K. and Garber G. E. "*Trichomonas vaginalis*", Curr. Opin. Infect. Dis. 8:22-25.
- Petrin D., Delgaty K., Bhatt R., Garber G. "Clinical and Microbiological Aspects of *Trichomonas vaginalis*". Clin. Microbiol. Rev. 1998, 11(2):300-317
- Proudfoot N. "How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes". Trends in Biochemical Sciences 1989, 14:105-110.
- Proudfoot N., Furger A., Dye M. "Integrating mRNA Processing with Transcription". Cell 2002, 108:501-512
- Quon D., Delgadillo M., Johnson P. "Transcription in the early diverging eukaryote *Trichomonas vaginalis*: an usual RNA polymerase II and  $\alpha$ -amanitin-resistant transcription of protein-coding genes". J. Mol. Evol. 1996, 43:253-262
- Roger A., Clark G., Doolittle F. "A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93:14618-14622
- Ribeiro K., Monteiro-Leal L., Benchimol M. "Contributions of the axostyle and flagella to closed mitosis in the protists *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*". J. Eukaryot. Microbiol. 2000, 47(5):481-492.
- Sheets M., Ogg S., Wickens M. "Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation *in vitro*". Nucleic Acids Res. 1990, 18(19):5799-5805
- Sogin M. "Early evolution and the origin of eukaryotes". Curr. Opin. Genet. Dev. 1991, 1:457-463
- Sorvillo F., Kerndt P. "*Trichomonas vaginalis* and amplification of HIV-1 transmission". Lancet 1998, 351:213-214.
- Vanacova S., Yan W., Carlton J., Jonson P. "Spliceosomal introns in the deep-branching eukaryote *Trichomonas vaginalis*". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2005, 102(12):4430-4435
- Viikki M., Pukkala E., Nieminen P., Hakama M. "Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia". Acta Oncologica 2000, 39(1):71-75.



Yonaha M., Proudfoot N. "Transcriptional termination and coupled polyadenylation *in vitro*". EMBO J. 2000, 19(14):3770-3777

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

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

Wahle E., Rügsegger U. "3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes". FEMS Microbiol. Rev. 1999, 23:277-295.

Zhao J., Hyman L., Moore C. "Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis". Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999, 63(2):405-445

---

# **9. APENDICES**

APENDICE I (SOLUCIONES)

Solución concentrada de ampicilina: 100mg/mL, concentración final en las cajas 100 µg/mL.

Medio SOC

- 10 mL de medio SOB
- 200 µL de glucosa 1M

Medio SOB

- Triptona 2 %
- Extracto de Levadura 0.5 %
- Cloruro de Sodio 10 mM
- Cloruro de Potasio 2.5 mM
- Cloruro de Magnesio 10mM
- Sulfato de Magnesio 10 mM

Medio LB sólido (para 1 Litro)

- Triptona-----10 g
- Extracto de Levadura-----5 g
- NaCl-----5 g
- NaOH 10M-----0.3 mL
- Tris 1M pH = 8-----10 mL
- Bacto agar-----15 g

Medio LB líquido (para 1 Litro):

- Triptona-----10 g
- Extracto de Levadura-----5 g
- NaCl-----5 g
- NaOH 10M-----0.3 mL
- Tris 1M pH = 8-----10 mL

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

Solución I: (Preparar 100ml).

-Glucosa-----50mM

-Tris/HCl pH=8-----25mM

-EDTA pH=8-----10mM

Nota: Preparar a partir de las soluciones concentradas ya estériles y ponerlo en un frasco estéril.

Solución II: (Preparar 5ml)

-NaOH 0.2N

-SDS 1%

Nota: Preparar a partir de las soluciones concentradas ya estériles y ponerlos en un matraz estéril.

Solución III: (Preparar 100mL)

-Acetato de potasio 5M-----60mL

-Ácido acético glacial concentrado -----11.5mL

-Agua bidestilada estéril-----28.5mL

Nota: Preparar a partir de las soluciones concentradas ya estériles y ponerlos en un frasco estéril.

TAE 50X (para 500 mL)

- Tris base -----121g
- Acido acético glacial -----28.55 mL
- EDTA 0.5 M pH= 8 ----- 50 mL

TAE 1X (para 1 Litro):

- 20 mL TAE 50 X
- 980 mL H<sub>2</sub>O bidestilada

TBE 5X en H<sub>2</sub>O DEPC (para 1 L):

- Tris ----- 54 g
- Acido bórico -----27.4 g
- EDTA 0.5 M pH = 8 -- 20 mL

TE 10.2 mM

- Tris pH =7.4 ----- 10 mM
- EDTA ----- 0.2 mM

TBE 1X/ H<sub>2</sub>O DEPC

- 200 mL TBE 5X/ H<sub>2</sub>O DEPC
- 800 mL H<sub>2</sub>O DEPC

PBS/DEPC pH = 8 (para 1L):

- NaCl -----8 g
- KCl -----0.2 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -----1.44 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -----0.24 g

Medio TYM pH= 6.2 (para 500 mL):

- Peptona ----- 10 g
- Extracto de Levadura --- 5 g
- Maltosa ----- 2.5 g
- L-cisteína ----- 0.5 g
- Acido ascórbico----- 0.1 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ----- 0.4 g

Solución TEN

- Tris----- 40 mM pH=8
- EDTA----- 1mN pH=8
- NaCl -----15mM

Esterilizarlo por autoclave y consérvalo a temperatura ambiente

Medio NZY+

- NZ amina-----10 g
- Extracto de levadura-----5g
- NaCl-----5g

Ajustar el pH= 7.5 con NaOH, esterilizar por autoclave

Suplementar el medio NZY+ antes de usar con:

- MgCl<sub>2</sub> 1M-----12.5 mL
- MgSO<sub>4</sub>-----12.5 mL
- Glucosa 2M----- 10 mL

Esterilizar por filtración

Solución desnaturalizante (para 500 mL)

- NaCl-----43.83 g
- NaOH 10N-----25 mL

Solución de neutralización (para 500 mL)

- Tris/HCl 2M pH=7.5-----125 mL
- NaCl-----87.66 g

Solución de transferencia:

- NH<sub>4</sub>Ac -----1M
- NH<sub>4</sub>OH-----1M
- NaOH.-----0.02 N

Solución de hibridación

- Formamida----- 50%
- SSC----- 5X
- Tris -----50 mM pH=7.4
- Denhardt's -----5X
- SDS----- 1%

SSC 20 X (Sodium Chloridal Sodium Citrate) en H<sub>2</sub>O DEPC

- NaCl-----3M
- Citrato de Sodio dihidratado-----0.3 M

Ajustar el pH= 7 con 1M HCl

Solución concentrada de cloranfenicol tritiado 0.2 $\mu$ Ci/ $\mu$ L

Tomar 125 $\mu$ L del vial original de cloranfenicol-H3 (250  $\mu$ Ci en 250 $\mu$ L de etanol). Agregar 480  $\mu$ L de etanol absoluto y 40  $\mu$ L de solución de cloranfenicol sin marcar 50 mg/mL para lo cual se pesan 100 mg de cloranfenicol y se disuelven en 2 mL de etanol al 50%. Se mezclan y se guarda a -20°C.

## APENDICE II

Secuencias de Oligonucleótidos

Oligonucleótidos	Secuencia
CAT-CAAUU	5'-CGGTATAATATATTTCAATTAACCTTTTTTC-3'
RC-CAAUU	5'-GAAAAAAGGTTAGTTAATTGAAATATATTATACCG-3'
Ambar-CCGG	5'-CGGTATAATATATTTCCCGGAACCTTTTTTC-3'
BLV-CCGG	5'-GAAAAAAGGTTAGTTCCGGGAAATATATTATACCG-3'
AP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
AUAP-B	5'-GGATCCGGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
CAT 10	5'-CACATTCTTGCCCGCCTG-3'
CAT 11	5'-GAGCTGGTGATATGGGAT-3'

**APENDICE III**

Programas de PCR

Programa PCR “CAT-CAAUU” (mutación)

Oligos utilizados: CAT-CAAUU y RC-CAAUU

Paso #	Tiempo	Temperatura
1	30 s	95°C
2	30 s	95°C
3	1'	55°C
4	10' 40s	68°C
5	Repetir desde el paso #2 , 18 veces	
6	20 h	4°C
7	END	

← Agregar la enzima *PfuTurbo*

Programa PCR “CAT-CCGG” (mutación)

Oligos utilizados: Ambar-CCGG y BLV-CCGG

Paso #	Tiempo	Temperatura
1	30 s	95°C
2	30 s	95°C
3	1'	55°C
4	10' 40s	68°C
5	Repetir desde el paso #2 , 16 veces	
6	20 h	4°C
7	END	

← Agregar la enzima *PfuTurbo*

Programa PROCE1 (1er PCR)

Paso #	Tiempo	Temperatura
1	2'	80°C
2	1'	94°C
3	2'	45°C
4	3'	72°C
5	Repetir desde el paso #2 , 30 veces	
6	5'	72°C
7	24 h	4°C
8	END	

← Agregar la enzima *Pfu*

Programa PROSC2 (PCR Anidado)

Paso #	Tiempo	Temperatura
1	2'	80°C
2	1'	94°C
3	2'	43°C
4	3'	72°C
5	Repetir desde el paso #2 , 30 veces	
6	10'	72°C
7	20 h	4°C
8	END	

← Agregar la enzima *Pfu*