



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

**"DESARROLLO DE UN METODO MOLECULAR (RT-PCR)
COMO UNA HERRAMIENTA EN LA CARACTERIZACION
DEL VIRUS DE LA RABIA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

AIDA GARCIA MARTINEZ

ASESOR DE TESIS: M. EN C. JOSE ERNESTO RAMIREZ GONZALEZ

COASESOR: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMENEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2005



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
 UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
 DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Desarrollo de un método molecular (RT-PCR) como una herramienta en la caracterización del virus de la Rabia".

que presenta La pasante: Aida García Martínez
 con número de cuenta: 9427554-8 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 8 de Octubre de 2004

PRESIDENTE MVZ. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL QFI. Andrea Becerra Osnaya Andrea A. Becerra

SECRETARIO QFB. Juan Chiu Chan

PRIMER SUPLENTE QFB. Gabriela Escalante Reynoso

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Ma. Guadalupe Aviles Robles

Sé que la vida esta llena de cosas bellas y que Dios no te da más ni menos de lo que te toca y también sabe cuando te tocan, así que le doy gracias por haber dado este paso y porque sé que por algo lo doy ahora....

Este trabajo lo dedico a todas y cada una de las personas que siempre han estado conmigo:

*A Ivan: Porque aunque a veces el camino se torna difícil, juntos no parece así.
También agradezco tu amor y comprensión porque esa es la fuerza que
necesito para alcanzar nuestras metas.*

*A José Rodolfo: Por ser la luz de mi vida, por ser el motivo para seguir luchando,
por darme fuerza para seguir creciendo, por darme amor para ser feliz;
pero sobre todo por reír como lo haces, por el brillo de tus ojos y por
siempre decirme Mami Te Quiero Much!!!*

A mis Padres: Por su incansable ejemplo de lucha y amor.

A mis hermanas Leonor y Azucena: Por su cariño y compañía.

A Alfonso, Constantino y Valeria (mi muñeca hermosa).

*A mis Suegros: Por su apoyo incondicional y por todos sus consejos tan
acertados.*

A Naomi (mi princesa), Rosa, Omar y David : Mi otra familia.

A Gaby, Vero, Martha, Silvia, Xochitl y Erika: Mis inolvidables amigas.

A Charo: Por tu valiosa amistad y por tu esfuerzo tenaz y contagiador.

*A Juan Carlos, Lolita, Lidia, Ernesto, José Carmen y a todo el Laboratorio de
Genoma de Patógenos del InDRE por su amistad y confianza.*

ÍNDICE

Página

Resumen	4
Capítulo I	
Marco teórico.....	5
Introducción.....	5
1.1 Antecedentes históricos de la Rabia.....	5
1.2 Clasificación del virus de la Rabia.....	6
1.3 Patogenia.....	7
1.4 Ciclos de transmisión.....	8
1.5 Características del Virus de la Rabia.....	9
1.5.1 Morfología.....	9
1.5.2 Componentes de la membrana.....	10
1.5.3 Organización genómica.....	11
1.6 Proteínas virales.....	12
1.6.1 Glicoproteína (G).....	12
1.6.2 Fosfoproteína (P).....	12
1.6.3 Proteína L.....	13
1.6.4 Proteína Matriz (M).....	13
1.6.5 Pseudogen.....	13
1.6.6 Nucleoproteína (N).....	14
1.7 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	14
1.7.1 PCR anidada.....	17
1.7.2 Transcripción reversa (RT-PCR).....	18
1.8 Electroforesis.....	19
1.9 Secuenciación.....	19
1.10 Importancia en el diagnóstico, estudio bioquímico y epidemiológico de la Proteína N.....	20

Capítulo II

Justificación y Objetivos

Justificación.....	22
Objetivos.....	22

Capítulo III

Desarrollo experimental

3.1 Material.....	25
Equipo.....	25
Reactivos.....	25
3.2 Métodos.....	27
3.2.1 Extracción con trizol del RNA del virus sobrenadante de Cultivo Celular infectado con el virus de la rabia.....	27
3.2.2 Transcripción reversa acoplada a la Reacción en cadena de la polimerasa del RNA viral (RT-PCR).....	28
3.2.2.1 Enzima M-MLV de Promega.....	28
3.2.2.2 Enzima M-MLV de Expand.....	29
3.2.2.3 Enzima AMV de Titan.....	31
3.2.3 PCR anidada.....	32
3.2.4 Purificación del cDNA a partir de productos de RT-PCR.....	33
3.2.4.1 Purificación por columnas de intercambio iónico de Quiagen.....	33
3.2.4.2 Purificación con la técnica de precipitación con Isopropanol-Etanol.....	34
3.2.5 Electroforesis en geles de agarosa.....	35
3.2.6 Secuenciación Nucleotídica.....	36

Capítulo IV

Resultados y Discusión.....	38
------------------------------------	-----------

Capítulo V

Conclusiones.....60

Referencia.....62

Apéndice

***Abreviaturas.....64**

***Preparación de soluciones.....66**

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

FIGURAS

Página

Figura 1.1 Morfología del virus de la rabia.....	10
Figura 1.2 Genoma viral del virus de la rabia.....	11
Figura 1.3 Técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	15
Figura 4.1 Producto de 1353 pb correspondientes al gen N del virus de la rabia.....	41
Figura 4.2 PCR anidado para el amplicón de 562 pb.....	42
Figura 4.3 Curva de Magnesio.....	44
Figura 4.4 Secuencia del producto de 1353 pb con los iniciadores A5, A6, A7 y A8.....	45
Figura 4.5 Ubicación de los iniciadores en el gen N y productos esperados con la combinación de los mismos.....	47
Figura 4.6 Productos de amplificación del PCR anidado a partir del producto de 1353 pb.....	48
Figura 4.7 Esquema de la secuencia de los productos del PCR anidado con los iniciadores correspondientes.....	49
Figura 4.8 Técnicas de purificación para los productos de amplificación de PCR.....	50
Figura 4.9 Purificación de los productos de amplificación por columnas de intercambio iónico.....	51
Figura 4.10 Esquema de la secuencia del producto de 777 pb con los iniciadores A5 y A8.....	52
Figura 4.11 Productos de amplificación de RT-PCR a partir de diferentes fuentes virales.....	58
Figura 4.12 Productos de amplificación de PCR anidado a partir de diferentes fuentes virales.....	59

TABLAS

Tabla 4.1 Curva de Magnesio.....	43
Tabla 4.2 Combinación de los iniciadores externos e internos.....	46

GRÁFICOS

Gráfico 4.1 Secuencia del producto de 777 pb con el iniciador A5.....	53
Gráfico 4.2 Secuencia del producto de 777 pb con el iniciador A8.....	54

RESUMEN

Esta tesis es el resultado de una serie de experimentos con extractos de RNA del virus de la rabia de diferentes fuentes (sobrenadante de cultivo celular, liofilizado del sobrenadante de cultivo celular, vacuna y cerebro de ratón lactante infectado con el virus de la rabia). Los extractos se obtuvieron mediante la extracción con trizol, después se amplificaron por RT-PCR para luego obtener la secuencia nucleotídica de los amplicones.

Con los extractos de RNA se realizaron distintos protocolos de RT-PCR empleando enzimas de diferentes casas comerciales. Se optimizó una metodología de RT-PCR para el virus de la rabia en la que con la menor cantidad de reactivos se obtienen los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y tiempo de realización.

El paso siguiente en el procedimiento experimental fue realizar PCR anidado para generar fragmentos de menor tamaño, más fáciles de secuenciar.

Para la purificación de los productos se realizaron dos técnicas: la purificación mediante columnas de intercambio iónico y la otra fue la técnica de precipitación con Isopropanol-Etanol; obteniéndose mejores resultados en la primera ya que la cantidad de producto rescatado fue mayor.

Una vez purificados los productos se secuenciaron y se analizaron con programas computacionales (Blast N del Gene Bank, Clustal X, BioEdit, Chromas) para determinar la identidad de los amplicones.

Con los datos obtenidos de estos experimentos se logró establecer un protocolo para la detección y la caracterización del virus de la rabia mediante la RT-PCR en un solo paso tanto para el sobrenadante de cultivo celular como para las diferentes fuentes de RNA para la comprobación de esta prueba.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista de salud pública el perro y otras especies cánidas son los principales transmisores importantes de rabia para el humano, y los principales responsables de la mayoría de las infecciones en Asia, África y Latinoamérica, sin embargo se ha observado en los países desarrollados que la transmisión por animales silvestres, incluyendo a los murciélagos, se ha incrementado. [1]

Debido a esto, la aplicación de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sirve como prueba de diagnóstico de dicha enfermedad y seguida de un análisis de secuenciación del DNA, han servido para estudiar la epidemiología del virus.

La tipificación molecular del virus de la rabia en los programas de control de la enfermedad, contribuye enormemente al monitoreo y a la evaluación de las medidas de control que deben ser aplicadas a nivel nacional e internacional. [1]

1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA RABIA

La rabia tiene una historia larga e interesante, los griegos la denominaron *Lyssa* o *Lytta*, lo cual significa locura; la enfermedad en el hombre fue descrita como hidrofobia por el temor de las personas afectadas al agua, la palabra "rabia" proviene del latín "*rhabas*" que significa hacerse violento, Demócrito fue el primero en describir la rabia canina 500 años A.C. Posteriormente en la época de los romanos, Cardanus describió la infectividad de la saliva en perros rabiosos. [1] [2]

La rabia es una enfermedad muy vieja, tal vez tan vieja como la propia humanidad. La primera descripción de la enfermedad se remonta al siglo XXIII antes de Jesucristo, en el Código Eshuma en Babilonia. Desde la antigüedad ya se había establecido la relación entre la rabia humana y la rabia debida a mordeduras de los animales (especialmente perros). Girolamo Fracastoro, sabio italiano nacido en Verona, describió la enfermedad (que había podido observar en numerosos

pacientes) y sus modos de contaminación, y esto en 1530, es decir 350 años antes de Luis Pasteur. [1]

Durante el siglo XIX la rabia canina o rabia de la calle representaba por donde quiera un verdadero problema, particularmente en Europa. El miedo a la rabia, debido a su modo de transmisión y a la ausencia de tratamiento eficaz, se había vuelto irracional. Las personas mordidas por un perro sospechoso de rabia se suicidaban o eran sacrificadas. [1]

En 1884 el niño Joseph Meister una vez expuesto al virus, ya que había sido mordido por un perro rabioso en las manos, piernas y muslos fue el primer ser humano en recibir inmunización gracias a los exitosos trabajos de Louis Pasteur, que desde 1880 era público y notorio que estaba buscando una vacuna antirrábica, pero hasta entonces todos los experimentos se habían realizado en animales, pero la convicción de que el niño acabaría contrayendo la rabia precipitaron la experimentación de la vacuna en humanos marcando una nueva etapa en la prevención no solo de la rabia, sino de las enfermedades transmisibles. [1]

1.2 CLASIFICACIÓN DE LA RABIA

El virus de la rabia pertenece a la familia *Rhabdoviridae* (del orden de los Mononegavirales) es considerada una de las familias con distribución más amplia en la naturaleza. Además de los rhabdovirus que afectan a las plantas, en los vertebrados más de 70 rhabdovirus han sido identificados y clasificados. La familia *Rhabdoviridae* incluye dos géneros que afectan a mamíferos: el *Vesiculovirus* representado por el virus de la estomatitis vesicular (VSV) y el *Lyssavirus* representado por el virus de la rabia y virus asociados a la rabia. Aunque este género comprende alrededor de 80 miembros, los más importantes para el ser humano están incluidos dentro de los serotipos del 1 al 4. El serotipo 1 que incluye a la mayoría de las cepas del virus rábico aisladas de diferentes mamíferos en todo el mundo; el serotipo 2 o Lagos bat, aislado originalmente de los murciélagos rabiosos de Lagos en África y que no se ha visto asociado a infecciones en seres humanos; serotipo 3 o Mokola, aislado también solo en África y que se ha visto

asociado a infecciones en seres humanos, musarañas, gatos, perros y algunos roedores; serotipo 4 o Duvenhage el cual es aislado de murciélagos insectívoros y de seres humanos en África. [1] [2]

Se desconoce si algún serotipo en particular del virus está asociado con alguna forma específica de la enfermedad. Sin embargo, el virus Mokola se distingue del serotipo 1 por producir una inusual meningoencefalitis, con la presencia de pocos cuerpos de Negri en los cerebros de animales infectados, que han podido multiplicar en cultivos celulares de *Aedes albopictus*. Además, la tipificación antigénica con anticuerpos monoclonales y experimentos de reacción cruzada han demostrado que el virus Mokola es el más divergente con respecto a la cepa vacunal del serotipo 1, seguido por el serotipo 2 Lagos bat. [1] [2] [3]

1.3 PATOGENIA

La rabia es una enfermedad siempre mortal que ataca el sistema nervioso y provoca encefalitis en los mamíferos. El principal modo de transmisión es la mordedura de un animal rabioso y en un grado menor los arañazos y el lamido. [1] En los animales, existe una forma paralítica de los roedores y una forma furiosa en los carnívoros. El cuadro clínico de la rabia en los humanos empieza con dolor en la zona de la mordedura. Luego, el virus va escalando por el sistema nervioso en dirección al cerebro. Empieza la fiebre, el malestar, la garganta se inflama y se paraliza. Finalmente, el virus llega al cerebro y provoca una encefalitis. Entonces es cuando se desarrollan la parálisis, los dolores y la agresividad. Después de aparecer los primeros síntomas, la muerte ya es inevitable. [1]

El virus se multiplica en el sitio de la mordedura, invade fibras nerviosas, y viaja al cerebro. El período de incubación (el tiempo entre la mordedura y el inicio de síntomas) depende de la distancia de la herida a la cabeza y el cuello: cuanto más cercana es la herida a la cabeza, más corta es la incubación. Las mordeduras a la cabeza y al cuello implican el riesgo más alto. Esto tiene importancia para la eficacia de la terapia de post-exposición o contacto. La producción del virus en el cerebro causa severa degeneración nerviosa y, eventualmente, la muerte. El virus

también se propaga del cerebro a lo largo de los nervios a otros órganos, incluyendo las glándulas salivales, donde el virus se excreta en la saliva. [1]

En los animales como el perro el período promedio de incubación de esta enfermedad está entre los 5 días y los 4 meses, donde dichos animales cambian de carácter tornándose muy cariñosos o muy agresivos, en la zona de la mordedura el animal siente una gran picazón, el perro tiene muchas ganas de ladrar y de morder, busca esconderse y escaparse, roe o mastica elementos indigeribles (hierro, madera, trapos etc.), presenta una salivación profusa, sus ladridos son roncós y prolongados, tiende a correr y a morder a otros animales, muestra signos importantes de paresia, debilidad en la cola y en los miembros posteriores, dificultad para tragar, párpados y mandíbula inferior caídos, las mucosas se hallan enrojecidas, los ojos estrábicos. [1]

1.4 CICLOS DE TRANSMISIÓN

La rabia es una de las zoonosis de mayor importancia en México, la gran mayoría de los casos de rabia humana son provocados por mordedura de perros rabiosos, durante el periodo de 1990-1996 se reportaron en México un total de 255 casos de rabia humana, donde los principales transmisores fueron: perros 80.4%, quirópteros 13.3%, gatos 2.8% y otros animales incluyendo especies silvestres 3.5%. [4] [5]

La enfermedad se mantiene en la naturaleza a través de diferentes especies de animales que sirven como reservorios naturales del virus. Existen dos ciclos epidemiológicos que permiten la transmisión y permanencia enzoótica de la enfermedad.

El ciclo aéreo involucra el mantenimiento y difusión de la enfermedad en mamíferos voladores como murciélagos insectívoros, hematófagos y frugívoros ya que pueden ser reservorios independientes de diferentes variantes del virus de la rabia, lo cual hace más compleja la epizootiología de la enfermedad.

El ciclo terrestre involucra a la rabia urbana y silvestre, incluye a los reservorios responsables del mantenimiento enzoótico y transmisión de la enfermedad; sin

embargo cabe hacer notar en un contexto amplio el ciclo aéreo también se considera parte del ciclo silvestre. [6]

La rabia urbana se mantiene debido a la infección enzoótica en perros, los cuales son reservorios y pueden transmitir la enfermedad a otras especies domésticas como gato, vacas, porcinos y caprinos, denominados especies susceptibles. Los animales que son reservorios, una vez que están infectados con el virus rábico también mueren de rabia. En áreas urbanas de países en desarrollo, existe una estrecha convivencia entre la familia y los perros, los que gozan de libertad para deambular en la vía pública convirtiéndose así en un animal de alto riesgo, ya que pueden contraer la infección de otro perro infectado cuando no están vacunados. [7]

La rabia silvestre es mantenida de manera enzoótica por varias especies de carnívoros pequeños como los zorrillos, coyotes, zorros y mapaches, entre otros, que a su vez pueden transmitir la enfermedad a cualquier otro mamífero susceptible que habite en su ecosistema, generándose la transmisión interespecie. Sin embargo la principal responsable del mantenimiento enzoótico de la enfermedad es la transmisión intraespecie en la cual el animal que está fungiendo como reservorio una vez rabioso transmite por mordedura la enfermedad a otro individuo sano de su misma especie. Los mecanismos de transmisión inter e intraespecie no son exclusivos del ciclo de transmisión silvestre sino están implícitos en todos los ciclos de transmisión descritos. [1]

1.5 CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE LA RABIA

1.5.1 MORFOLOGÍA

El estudio del virus de la rabia a través de la microscopía electrónica ha permitido determinar que tiene forma cilíndrica (ojival truncada) semejando a una bala, con una longitud promedio de 180 nm y un diámetro de 75 nm. Posee proyecciones en su superficie en forma de espículas de 10 nm ancladas a una doble capa lipídica y presenta estrías visibles al microscopio electrónico. [1] [3]

Tal y como se muestra en la figura 1.1, el núcleo incluye el genoma ARN viral, el cual está fuertemente asociado con la abundante proteína N de la nucleocápside. El núcleo del virus contiene además otras proteínas en menor cantidad, la fosfoproteína (P) y la polimerasa ARN viral (L). La abundancia relativa de éstas proteínas, por virión es como sigue: aproximadamente 1250 moléculas de N, 500 moléculas de P y solamente 50 moléculas de L. (No es sorprendente, ya que L es una enzima y las otras son por naturaleza proteínas estructurales). [3]

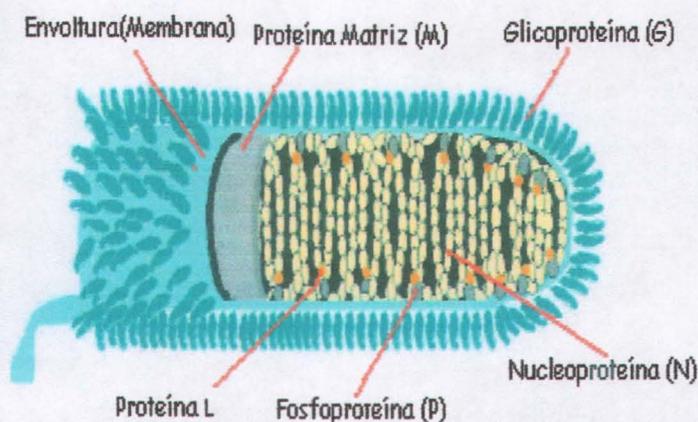


Figura 1.1 Morfología del virus de la Rabia

1.5.2 COMPONENTES DE LA MEMBRANA

La membrana está compuesta de 50% de lípidos y 50% de proteína, los lípidos son derivados de la membrana del huésped, el principal lípido es el colesterol y entre los fosfolípidos están la fosfatidilcolina, la esfingomiélin y grandes cantidades de aminofosfolípidos. Esta composición de lípidos contribuye a un incremento en la viscosidad de la membrana; la disminución del colesterol resulta en una baja infectividad del virus además de una deficiente fusión de su membrana.

El genoma del virus de la rabia está constituido por una estructura helicoidal interna de ácido ribonucleico (RNA) monocatenario no segmentado y de polaridad negativa. Esta constituido por 5 proteínas codificadas por el RNA viral, distribuidas en dos componentes principales: la nucleocápside (NC) y la envoltura. [3]

En el género *Lyssavirus* existe un orden conservado en la disposición de los genes que codifican a las proteínas estructurales: nucleoproteína > proteína matriz > glicoproteína > fosfoproteína, similar a la observada en el género *Vesiculovirus*. [3] [8]

1.5.3 ORGANIZACIÓN GENÓMICA

El RNA está constituido aproximadamente por 12,000 nucleótidos (nt), la información genética esta codificada en cinco genes monocistrónicos; donde la RNA polimerasa dependiente de RNA sintetiza su cadena complementaria a través de un RNA líder de 56 a 58 nt, la cual precede la primera secuencia de tetranucleótidos (UUGU) localizada en la primer parte del gen N, no se ha establecido aún la función de este RNA líder en la infección por el virus de la rabia. [1] [3]

Dentro del virus de la rabia existen regiones intergénicas que varían tanto en longitud como en composición: N-NS, NS-M, M-G y G-L con 2,5,5 y 423 nt de longitud respectivamente, tal y como aparece en la figura 1.2. [9]

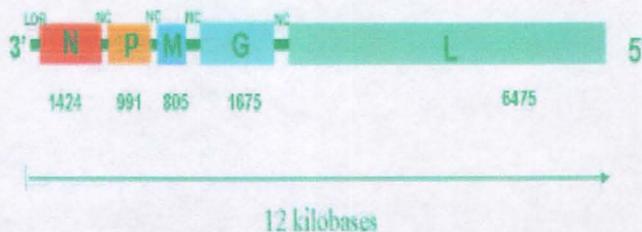


Figura 1.2 Genoma viral del virus de la Rabia

1.6 PROTEÍNAS VIRALES

1.6.1 GLICOPROTEÍNA (G)

La proteína G consta de 505 aminoácidos, es la única proteína glicosilada y es el antígeno de superficie más importante del virus. Hasta el momento es la proteína más estudiada del virus de la rabia, forma trímeros de 10nm de longitud en la superficie externa de la membrana del virus, es la responsable de la inducción y unión de anticuerpos neutralizantes.

Se ha observado que la capacidad de fusión de la proteína G es dependiente de un bajo pH y que es responsable de la diseminación más eficiente del virus dentro del sistema nervioso central, por su facilidad de transporte de célula a célula. [3] [10]

1.6.2 FOSFOPROTEÍNA (P)

Se conoce que la proteína P consiste de 297 residuos, con extensas regiones hidrofílicas tanto en la parte central como en la región amino-terminal de la molécula y es una proteína no estructural fosforilada.

En el virus de la rabia, la fosfoproteína (también denominada NS o P) asociada a la nucleocápside interactúa con la transcriptasa (proteína L) y con la ribonucleoproteína para formar el complejo activo responsable de la transcripción y replicación del virus. Esta proteína es de las últimas en incorporarse dentro del virión, se especula que algunas funciones de la NS son compartidas por la nucleoproteína fosforilada. Las proteínas P y L representan <10% de las proteínas del virus; la molécula transcriptasa se encuentra entre 30 y 60 copias por partícula y la proteína no estructural fosforilada (fosfoproteína, proteína NS) está presente con 950 copias por partícula.

La proteína P es fosforilada en varios grados, la forma más fosforilada aparentemente coadyuva a la función de la transcripción. [3] [11]

1.6.3 PROTEÍNA L

La proteína L es un polipéptido de 2142 aminoácidos, con un peso molecular de aproximadamente 190 kDa; esta proteína contiene un elevado porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, esta asociada al RNA del virus y prevalecen los residuos básicos sobre los residuos ácidos. Esta proteína por ser la enzima tiene actividades enzimáticas en la transcripción del virus de la rabia, además de la replicación y llevar a cabo la metilación y la poliadenilación. [3]

1.6.4 PROTEÍNA MATRIZ (M)

La proteína M, es la proteína estructural más pequeña, consta de 202 aminoácidos, es una proteína fosforilada en los residuos de serina y treonina entre los aminoácidos 20 y 35, esta localizada en la cara interna de la membrana viral. La proteína matriz actúa como un puente entre la envoltura viral y la nucleocápside, rodea a esta última e interactúa con ella a través de sus extremos, existen resultados que sugieren que la función del ensamblaje viral es debida a la capacidad de la proteína M de unirse y condensar la nucleocápside. Además se ha observado que la proteína M tiene una función reguladora dentro del proceso de transcripción.[3] [12]

1.6.5 PSEUDOGEN

El virus de la rabia posee una región de aproximadamente 423 nucleótidos no codificante entre los genes G y L, que se sugiere puede representar un gen remanente o pseudogen (Ψ) que alguna vez pudo tener una función y del cual solo quedan vestigios, ya que se han determinado dos pautas de lecturas, una localizada 40 a 50 nucleótidos río abajo del codón de terminación de traducción del mRNA de la proteína G y el otro de 20 a 24 nucleótidos río arriba del codón de inicio del mRNA de la proteína L. [3]

1.6.6 NUCLEOPROTEÍNA (PROTEÍNA N)

La proteína N consta de 450 aminoácidos, la nucleoproteína de este virus es fosforilada únicamente en la posición 389 donde se encuentra una serina. El núcleo incluye al genoma RNA viral, el cual esta fuertemente asociado con la abundante proteína N de la nucleocápside. La nucleocápside tiene forma de hélice de 30 a 35 espirales extendiéndose por todo el virión, de esta manera protege el RNA de la digestión de las ribonucleasas y mantiene al genoma en una configuración apropiada para la transcripción.

Una de las funciones de la nucleoproteína es evitar la exposición de los nucleótidos a los solventes y el desenrollamiento de la estructura secundaria del RNA, para que la polimerasa pueda interactuar con los nucleótidos directamente después de la penetración celular.

A través de la microscopia electrónica se observa que la proteína N es una molécula larga y delgada de 80 Å (1 Å = 0.1 nm) y 53 Å. En términos generales la fosfoproteína (P) mantiene a la proteína N en forma soluble para favorecer la replicación. Además se observa que la proteína N mantiene uniones no covalentes con el RNA, siendo sensible esta unión a cambios de temperatura.

La proteína N juega un papel importante en los roles de transcripción y replicación de los rhabdovirus; la fosforilación de la proteína N modula la transcripción, mientras que su desfosforilación favorece la replicación del virus a través de la encapsidación del RNA líder. [3] [11]

1.7 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) consiste en un proceso bioquímico *in vitro*, que amplifica un fragmento de DNA que se encuentra flanqueado por dos iniciadores o "primers" de secuencia conocida en forma ilimitada en unas cuantas horas, mediante el cual las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por la enzima Taq polimerasa en cada uno de los ciclos (generalmente entre 20 y hasta 40 ciclos) que integran la reacción, al final de cada uno de los cuales las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima, lográndose una

producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de DNA específico, como se muestra en la figura 1.3. [13] [14]

La técnica de PCR ha tenido un impacto muy grande en el diagnóstico pues tiene una gran sensibilidad (puede detectar la presencia de hasta dos o tres copias de la secuencia buscada) y especificidad (si se escogen adecuadamente los iniciadores puede reconocer género especie y variedad); además de que nos permiten tener los resultados en unas cuantas horas. [13] [14]

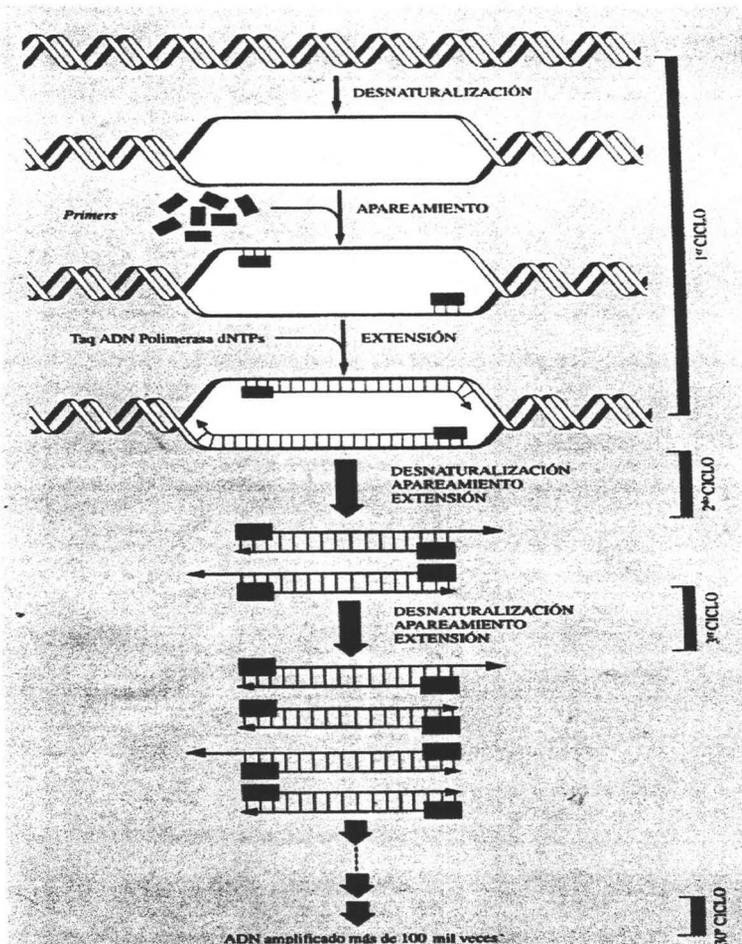


Figura 1.3 Técnica de PCR

Cada uno de los ciclos consta de tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos, que son :

1) Desnaturalización (92-98 °C, 30 a 90 segundos), en el cual se separan o desnaturalizan las dos cadenas complementarias del DNA blanco para que la enzima Taq polimerasa funcione, se necesita que ambas cadenas de DNA se separen o desnaturalicen para lo cual se emplean altas temperaturas. [14] [15]

2) Alineamiento o Hibridación (50-60 °C, 30-60 segundos), en el que se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de DNA blanco desnaturalizado. Para que la Taq polimerasa inicie la síntesis de una nueva cadena de DNA , se requiere que un pequeño fragmento de DNA con secuencia antisentido se hibride a la cadena molde y sirva como sitio iniciador o de anclaje para la DNA polimerasa (de ahí el término iniciadores). Para una reacción de PCR se utilizan dos iniciadores. Uno que se hibridará con la hebra del DNA molde que tiene sentido 5´ a 3´, y el otro con la hebra complementaria o antisentido 3´ a 5´. El tamaño del fragmento obtenido en la PCR será del número de bases que queden entre ambos iniciadores. El iniciador puede variar en el número de nucleótidos (de 18 a 22) porque con este tamaño se considera poco probable que el iniciador encuentre dos sitios de unión en el genoma. El contenido de guaninas (G) y citocinas (C) oscile entre 40-60%. La temperatura de fusión (T_m), debe ser la adecuada ya que a esta temperatura se hibrida el iniciador y de ello depende obtener al final un producto más específico. Comprobar que estos no contengan zonas de más de 2 bases complementarias entre sí ya que podría dar lugar a la formación de un producto secundario denominado dímero de primer o iniciador. [14] [15]

3) Extensión o Polimerización (70-74 °C, 30-90 segundos), en el que la Taq DNA polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al DNA blanco e ir polimerizando los desoxinucleótidos (dNTP´ s) libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas de DNA blanco que el anterior y finaliza convirtiendo éstas en cadenas dobles de DNA. [14] [15]

El proceso se repite y en cada nuevo ciclo las cadenas sintetizadas en el ciclo anterior sirven de molde para la síntesis de nuevas cadenas obteniéndose un incremento exponencial en el número de cadenas presentes.[13] [14] [15]

Los dNTP's son una mezcla de desoxinucleótidos (dGTP, dATP, dTTP y dCTP), los cuales deben estar a una concentración inicial de 200 μ M cada uno para la mejor incorporación de estas bases. A concentraciones mayores de mezcla de dNTP's se puede inhibir a la enzima Taq polimerasa hasta un 20-30 %. La disolución del buffer se prepara con agua destilada estéril.

El buffer de PCR suele estar formado por: 500 mM de cloruro de potasio, 100 mM de Tris HCl (pH = 8.3), 15 mM de Cloruro de magnesio y 0.1 % w/v de gelatina. [14] [15] [16]

La enzima Taq polimerasa es una polimerasa termoestable (procedente de *Thermus aquaticus*); esto tiene dos ventajas: por un lado las temperaturas de desnaturalización del DNA no inactivan a la enzima; y por otro lado su elevada temperatura óptima de síntesis (72 °C) reduce la posibilidad de que los iniciadores formen híbridos débiles con otras regiones del DNA, o formación de inespecíficos. [14] [15] [16]

Para optimizar la técnica de PCR los protocolos han evolucionado favoreciendo tanto el aumento de la especificidad y sensibilidad de la reacción así como la eficiencia y el aumento en el tamaño de los productos amplificados. Esto se ha logrado a través del control de ciertos parámetros como tiempo, temperatura y número de ciclos de amplificación. A su vez la estandarización de concentraciones de reactivos (oligonucleotidos, ión magnesio, DNA molde y dNTP's) permite la disminución de la formación de dímeros de iniciadores (apareamiento entre sus extremos, creando un DNA blanco artificial que será también amplificado) evitando la incorporación errónea, aumentando por consecuencia la fidelidad. [14]

1.7.1 PCR ANIDADA

Para incrementar la sensibilidad de detección de un producto de PCR, muchos investigadores utilizan lo que se conoce como PCR anidada en el que se utilizan

dos pares de iniciadores: un par denominado externo que sirve para una primera reacción en que se genera un fragmento de PCR, y un segundo par, denominado interno, que toma como molde al fragmento generado en la primera reacción y que tiene secuencias complementarias a una región interna de dicho fragmento. Por lo tanto, el producto final es un fragmento de PCR de menor tamaño que el inicial que, a fin de cuentas, requirió de cuatro iniciadores para su generación: dos externos y dos internos. La temperatura para la fase de hibridación varía según la longitud y secuencia de los iniciadores; en general esta temperatura se fija entre 42 y 60 °C. Es importante utilizar la temperatura óptima para cada par de iniciadores para evitar la posibilidad de que se hibriden en lugares no específicos. [15]

1.7.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR)

Existen algunos virus patógenos cuyo material genético está constituido por RNA, en estos casos se requiere utilizar un procedimiento conocido como transcripción reversa que consiste en tomar como molde una secuencia de RNA y sintetizar una cadena complementaria de DNA (cDNA); este proceso es realizado por enzimas conocidas como reverso-transcriptasa (RT). Una vez obtenida la copia de DNA complementario, este puede amplificarse por PCR como cualquier otro DNA. [13]

Al finalizar la reacción existen millones de copias del fragmento de interés, por lo que es suficiente con colocar en un gel de agarosa una décima parte (incluso menos) del volumen total de la reacción, correr la electroforesis y teñir con bromuro de etidio, para poder verificar la amplificación o si se requiere de un análisis más fino se puede realizar la electroforesis en geles de poliacrilamida así como la confirmación de la identidad del producto de PCR mediante secuenciación. [14]

1.8 ELECTROFORESIS

Los ácidos nucleicos pueden ser analizados por electroforesis en geles de agarosa o acrilamida según se requiera, debido a que cuando está en solución a pH neutro, los grupos fosfato les confieren una carga neta negativa. Esta carga eléctrica hace que cuando se ponen moléculas de DNA o RNA en un campo eléctrico éstas tiendan a moverse en dirección al polo positivo del campo. Si las moléculas en movimiento por el campo eléctrico se ponen en una matriz gelificada, las moléculas más pequeñas pueden moverse más rápido que las más grandes y esto nos permite separar fragmentos de diferente tamaño. [13]

Los geles de agarosa se emplean cuando se quiere analizar moléculas de DNA que van desde 100 pares de bases (pb), hasta 10 000 pb dependiendo la concentración utilizada. Mientras que los geles de acrilamida se emplean para analizar fragmentos pequeños de DNA que van de 35 a 1 500 pb.

Una vez realizada la electroforesis, el o los fragmentos de DNA separados pueden ser visualizados tiñendo los geles con bromuro de etidio. Las moléculas de bromuro de etidio se intercalan en los nucleótidos del DNA y producen fluorescencia color naranja al ser iluminadas con luz ultravioleta (UV), señalando así los sitios del gel donde están los fragmentos de DNA. [13]

1.9 SECUENCIACIÓN

La PCR se ha convertido en una vía rápida para obtener y secuenciar fragmentos de DNA o RNAm. La secuenciación de los productos de PCR ha permitido obtener secuencias desconocidas de genes conocidos e inclusive ha permitido la obtención de secuencias de genes desconocidos, y con esto, la identificación y clonación de genes que codifican para proteínas desconocidas. [15]

El análisis de las secuencias nucleotídicas de algunos genes se ha constituido en el estándar de oro para la clasificación y tipificación, pues permite establecer desde árboles filogenéticos hasta relaciones genéticas entre cepas y aislamientos de una misma especie.

La metodología utiliza un iniciador, los cuatro desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's), una DNA polimerasa (puede usarse incluso la Taq polimerasa) y unos nucleótidos que carecen de oxígeno en las posiciones 3' y 4' de la ribosa (3'4'-dideoxirribosa o dideoxinucleótidos ddNTP's). [14]

El método más común actualmente es el de Sanger, se basa en la terminación prematura de síntesis de DNA por incorporación de dideoxinucleótido. La síntesis de DNA es iniciada por un oligonucleótido marcado; en tubos donde se preparan cuatro reacciones, una para cada uno de los dideoxinucleótidos A, T, G y C. Estos ddNTP's se incorporan en la cadena igual que los dNTP's, pero como estos carecen del grupo hidroxilo (-OH) en la posición 3' de la desoxirribosa no pueden ser atacados por el fosfato (evitando la formación de un enlace fosfodiéster) del siguiente nucleótido (dNTP) y por lo tanto detienen el crecimiento de la cadena a la que se incorporaron, para esto se requiere que en la reacción se adicionen cantidades mayores de ddNTP's que de los dNTP's. [14]

Estos productos son separados por electroforesis en un soporte que puede ser de agarosa, acrilamida u otros polímeros. La secuencia del DNA es determinada por el orden de fragmentos.

1.10 IMPORTANCIA EN EL DIAGNOSTICO, ESTUDIO BIOQUÍMICO Y EPIDEMIOLOGICO DE LA PROTEÍNA N

Con el uso de un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos contra la ribonucleoproteína se determinó la presencia de los sitios antigénicos de la proteína N; la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) utilizada para el diagnóstico de la rabia, identifica principalmente a ésta proteína por estar presente en gran cantidad dentro del virus, los conglomerados pueden tener diferentes formas y tamaños observando "cuerpos obloides" intracelulares (cuerpos de Negri) o extracelulares, "polvo antigénico" e "hilos. [2] [3]

Se ha demostrado *in vitro* que la nucleocápside del virus de la rabia es capaz de estimular las células B de especificidad heteróloga para producir anticuerpos neutralizantes Ac-G. Debido a esto se sugiere que no sea ignorada la resistencia a

la infección por parte de los anticuerpos Ac-N, ya sea incluida junto con la proteína G en el desarrollo de las vacunas recombinantes. Se ha reportado que la mezcla de anticuerpos producidos por estas dos proteínas que puede ser útil en la seroterapia del virus de la rabia. [3]

Las construcciones de vacunas recombinantes incluyendo únicamente a la proteína N, no han demostrado la misma protección que aquellas producidas con la proteína G ó con la mezcla de G y N.

La protección que induce la proteína N contra la rabia es aparentemente mediada por una compleja interacción de varios mecanismos inmunes, incluyendo a los linfocitos B y los T y al unirse a la superficie celular de la cadena α de las MHC clase II, y posiblemente a los macrófagos. También se ha reportado que la proteína N funciona como superantígeno como un potente activador de los linfocitos de la sangre periférica, lo cual explica algunos fenómenos asociados con la inmunoprotección. [3]

La proteína N es la segunda más conservada en la secuencia de aminoácidos dentro del genoma del virus, por lo que se ha visto la conveniencia de su estudio a nivel de secuencia de nucleótidos para comparar aislamientos a través de la evolución entre los serotipos. Además se ha elegido a esta proteína para estudios epidemiológicos por su importante papel en la inducción de la inmunidad contra *Lyssavirus* heterologos. La transcripción reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) es útil como técnica de diagnóstico para detectar y amplificar el gen que codifica para la proteína N del virus y además permite determinar posteriormente la secuencia nucleotídica. La secuencia de la proteína N permite la identificación de los seis genotipos de los *Lyssavirus* y desde un punto de vista comparativo es importante la información que genera por las funciones estructurales e inmunológicas que tienen las proteínas de la cápside, así como su utilidad para identificar los aislamientos de rabia relacionados con el brote de un lugar y tiempo específico. [8] [3] [20]

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico del virus de la rabia se lleva a cabo por medio de la técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD) y por RT-PCR detectando el material genético del virus. En los últimos años se ha desarrollado la secuenciación del genoma viral siendo una herramienta útil en la caracterización molecular de este virus para conocer más a cerca de su epidemiología molecular, de tal forma que nosotros proponemos desarrollar una metodología que nos permita conocer la secuencia nucleotídica de uno de los genes de mayor importancia del virus.

OBJETIVOS

General:

Desarrollar un método molecular (RT-PCR) para la amplificación del gen que codifica para la nucleoproteína (Proteína N) del virus de la rabia como una herramienta para la secuenciación nucleotídica útil en la caracterización molecular de este virus.

Particulares:

- 1.- Obtener el material genético (RNA) del virus rábico a partir del sobrenadante de cultivo celular infectado con el virus rábico.
- 2.- Comprobar que el material genético extraído corresponde al virus rábico por medio de un RT-PCR con iniciadores específicos a una región interna del gen N del virus de la rabia.
- 3.- Evaluar diferentes enzimas transcriptasa reversa para obtener la amplificación del gen completo de la proteína N del virus rábico (1353 pb) que sirva como blanco para la secuenciación nucleotídica y optimizar las condiciones de reacción de amplificación.

4.- Combinar diferentes iniciadores específicos y por medio de un PCR anidado, a partir del producto de la amplificación del gen N del virus de la rabia, obtener amplicones de diferente longitud (1.1 kb, 0.7 kb y 0.5 kb) que cubran la región completa del gen que sirvan como blanco para la secuenciación nucleotídica.

5.- Evaluar diferentes técnicas de purificación de productos de PCR.

6.- Secuenciar los productos de PCR purificados por medio de secuencia automatizada.

7.- Desarrollar el método molecular a partir de los extractos obtenidos de diferentes fuentes del virus de la rabia:

- liofilizado del sobrenadante del cultivo celular infectado con el virus rábico
- vacuna rábica
- cerebro de ratón lactante infectado con el virus de la rabia.

CAPÍTULO III

DESARROLLO EXPERIMENTAL

PROCEDIMIENTO

Del concentrado inactivado del sobrenadante de cultivo celular infectado con el virus de la rabia se extrajo el RNA por medio de la técnica de extracción con trizol, dicha muestra fue donada por el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Virología (BIRMEX).

Una vez extraídas dichas muestras se probaron tres protocolos para estandarizar el método que mejor se ajustará al producto de RT-PCR de 1353 pb de la proteína N, comprobando la presencia del producto por medio de Electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio; después se llevó a cabo un PCR anidado de ese producto obteniendo así 3 productos más pequeños, analizados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, después, estos productos se purificaron con la técnica de precipitación con Etanol-Isopropanol y por medio de las Columnas para extracción de RNA de Quiagen comprobando además de su presencia que no se perdieron durante la purificación por medio de la electroforesis con agarosa para luego mandar a secuenciar dichos productos obteniendo así la secuencia nucleotídica de la proteína N.

Finalmente para probar el protocolo elegido se realizó la misma metodología para cada una de las muestras de RNA extraídas de diferentes fuentes virales de dicho virus (liofilizado del sobrenadante de cultivo celular infectado con el virus rábico, vacuna rábica; las cuales fueron donadas por el Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Virología (BIRMEX) y muestra de RNA de cerebro de ratón lactante infectado con el virus de la rabia; el cual fue donado por el Laboratorio de Rabia del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE).

3.1 MATERIAL

EQUIPO

Termociclador PE 2700

Secuenciador ABI PRISM 310

Digitalizador de imágenes Eagle Eye

Cámara de Electroforesis

Fuente de Poder

Equipo de cómputo

Columnas de intercambio iónico para productos de PCR (Quiagen)

REACTIVOS

Isopropanol al 99%

Etanol al 70%

Estuche para RT-PCR:

PROMEGA

-Buffer 5X AMV

-dTT 100 mM

-DNA Polimerasa 5 U/ μ L

-M-MLV Reversa Transcriptasa 50 U/ μ L

-dNTP's 10 mM

EXPAND RT:

-Expand Reversa Transcriptasa Buffer 5X

-dTT 100 mM

-M-MuLV Expand Reversa Transcriptasa 50 U/ μ L

-dNTP's 10 mM

-Inhibidor de RNAsa 40 U/ μ L

PCR:

- Buffer 10X Taq Pol Altaenzymes
- Taq Pol 5 U/μL Altaenzymes
- MgCl₂ 50 mM Altaenzymes

TITAN

- Buffer RT-PCR 5X
- MIX Enzimas 50 μL (1 reacción /μL)
- dTT 100 mM
- dNTP´s 10 mM
- Inhibidor RNAsa 5 U/μL

Agarosa al 2%

Regulador de Tris-acetatos (TAE 10X) y (TAE 1X)

Regulador de Tris-boratos (TBE 10X) y (TBE 1X)

Bromuro de etidio 10 mg/mL

Acrilamida al 30%

Persulfato de amonio al 10%

Marcador de peso molecular φX174 (1 μg/μL)

Iniciador A5: 5' CTA CAA TGG ATG CCG AC 3'

Iniciador A6: 5' GAG TCA CTC GAA TAT GTC 3' RC 3' GAC ATA TTC GAG TGA
CTC 5'

Iniciador A7: 5' GAC ATG TCC GGA AGA CTG G 3'

Iniciador A8: 5' GTA TTG CCT CTC TAG CGG TG 3' RC 3' CA CCG CTA GAG AGG
CAA TAC 5'

3.2 MÉTODOS

3.2.1 EXTRACCIÓN CON TRIZOL DEL RNA DEL SOBRENADANTE DE CULTIVO CELULAR INFECTADO CON EL VIRUS DE LA RABIA

1.-Rotular un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, para la identificación de la muestra. Tomar 250 μ L del concentrado de rabia con una punta estéril de 1 mL y transferirlo al tubo de microcentrífuga.

2.-Adicionar 750 μ L de Trizol LS Reagent (fenol + tiocianato de guanidina), Homogenizar con vórtex durante 10 seg y dejar incubar a temperatura ambiente por 10 min, con el fin de que se complete la disociación de los complejos de ribonucleoproteína.

3.-Añadir 200 μ L de cloroformo, agitar vigorosamente en vórtex por 15 seg e incubar de 2 a 3 min a temperatura ambiente.

4.-Centrifugar a 12 000 g durante 15 min, transferir la fase acuosa a otro tubo de microcentrífuga nuevo de 1.5 mL, agregar 500 μ L de isopropanol y mezclar por inversión incubando a temperatura ambiente durante 10 min.

5.-Centrifugar a 12 000 g durante 10 min.

6.-Decantar la solución de isopropanol evitando desprender la pastilla del fondo. Agregar 250 μ L de etanol al 70%, mezclar en vórtex por 10 seg y centrifugar a 7500 g durante 5 min.

7.-Decantar el etanol con mucho cuidado y secar la pastilla a 80 °C durante 5 min.

8.-Agregar 30 μ L de agua inyectable o estéril, incubar la muestra a 56 °C durante 10 minutos para facilitar la disolución del RNA.

3.2.2 TRANSCRIPCIÓN REVERSA ACOPLADA A LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA DEL RNA VIRAL (RT-PCR)

Para elegir el mejor protocolo de RT-PCR se evaluaron tres enzimas transcriptasa reversa de diferentes casas comerciales (Promega, Expand y Titan). A continuación se presentan las condiciones para cada una de ellas.

3.2.2.1 ENZIMA M-MLV DE PROMEGA

1.-Preparar la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
Buffer PCR 5X	10 μ L	1 X
Dithiothreitol (DTT) 100mM	5 μ L	10 mM
Mezcla de dNTP's 10 mM	1 μ L	0.2 mM
Enzima transcriptasa reversa M-MuLV 50U/ μ L	0.2 μ L	0.2 U/ μ L
Taq DNA polimerasa 5 U/ μ L	0.2 μ L	0.02 U/ μ L
Iniciador A5 (50 pmol/ μ L)	1 μ L	50 pmol/ μ L
Iniciador A6 (50 pmol/ μ L)	1 μ L	50 pmol/ μ L
Agua estéril	26.6 μ L	
Volumen final		50 μ L

2.-Colocar en un tubo de PCR 45 μ L de la mezcla de reacción y 5 μ L del extracto viral.

3.-Colocar las muestras en el termociclador con el siguiente protocolo de amplificación: [21]

Fases	Temperatura	Tiempo
Ciclo único de:	48°C	30 minutos
Ciclo único de:	94 °C	2 minutos
40 ciclos:		
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Alineación	55 °C	15 segundos
Extensión	72 °C	45 segundos
Ciclo único de:	72 °C	7 minutos

3.2.2.2 ENZIMA M-MLV DE EXPAND

1.-En un tubo de microcentrífuga colocar; 1 µL del iniciador A5 y A6 a una concentración de 50 pmoles/µL, 5 µL de RNA, calentar a 65 °C durante 10 minutos y enfriar en hielo.

2.-Mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
Buffer para la transcripasa reversa 5X	4 µL	1 X
DTT (Dithiothreitol) 100mM	2 µL	10 mM
Mezcla de dNTP 's 10 mM	2 µL	1 mM
Enzima transcriptasa reversa M-MuLV 50 U/µL	0.2 µL	0.5 U/µL
Inhibidor de RNAsas 40 U/µL	0.5 µL	1 U/µL
Agua estéril	4.3 µL	
Volumen final		20 µL

3.-Agregar los 13 μL de ésta mezcla al tubo que contiene el iniciador y el RNA, para tener un volumen total o final de 20 μL .

4.-Incubar en el termociclador a 42 °C durante 45 minutos.

5.-Una vez obtenido el cDNA a partir de la transcripción reversa (RT) se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), para lo cual se empleo la enzima Taq Polimerasa y buffer de Altaenzimes. Las condiciones de reacción son las siguientes:

Reactivos	Volumen por reacción	Concentración final
Solución amortiguadora para la Taq polimerasa (Buffer 10 X)	10 μL	1 X
Enzima Taq polimerasa 5 U/ μL	1 μL	0.05 U/ μL
MgCl ₂ 50 mM	2 μL	1 mM
Aqua estéril	67 μL	
Volumen final	100 μL	

6.-Agregar los 80 μL de la mezcla de PCR a los 20 μL de la reacción de la transcriptasa reversa.

7.-Mezclar por inversión de 3 a 4 veces, y colocar de nuevo en el termociclador.

8.-El protocolo de amplificación fue el siguiente, según las condiciones de la casa comercial: [18]

Fases	Temperatura	Tiempo
Ciclo único de:	94 °C	2 minutos
40 ciclos:		
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Alineación	62 °C	15 segundos

Extensión	72 °C	90 segundos
Ciclo único de:	72 °C	5 minutos

3.2.2.3 ENZIMA AMV DE TITAN DE ROCHE

Este ensayo se llevó a cabo con los iniciadores A5 y A6 con una concentración de 10 pmoles/ μ L de cada uno.

1.-Mezcla de reacción:

Reactivos	Volumen por reacción	Concentración final
Buffer de PCR 5X	10 μ L	1 X
DTT (Dithiothreitol) 100 mM	2.5 μ L	5 mM
MIX de Enzimas 50 μ L (1 reacción/ μ L)	0.5 μ L	
Mezcla de dNTP's 10 mM	2 μ L	0.4 mM
Iniciador A5 (50 pmol/ μ L)	0.5 μ L	0.5 pmol/ μ L
Iniciador A6 (50 pmol/ μ L)	0.5 μ L	0.5 pmol/ μ L
MgCl ₂ 25 Mm	3 μ L	1.5 mM
Inhibidor de RNAsa 5 U/ μ L	1.0 μ L	0.1 U/ μ L
Agua grado PCR	25 μ L	
Volumen final	45 μ L	

2.-Adicionar a un tubo eppendorff de 200 μ L 45 μ L de la mezcla de reacción y 5 μ L del extracto viral.

3.-Colocar las muestras en el termociclador con el siguiente protocolo de amplificación: [18]

Fases	Temperatura	Tiempo
Ciclo único de:	50 °C	30 minutos
Ciclo único de:	94 °C	2 minutos
PCR durante 40 ciclos:		
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Alineación	55 °C	15 segundos
Extensión	72 °C	90 segundos
Ciclo único de:	72 °C	7 minutos

3.2.3 PCR ANIDADA

En este ensayo se utiliza el producto de PCR de 1353 pb como molde utilizando la combinación de dos iniciadores internos (A7 y A8) con los iniciadores utilizados en la RT-PCR (A5 y A6) esperando tres productos de diferente peso molecular.

1.-Mezcla de reacción:

Reactivos	Volumen por reacción	Concentración final
Buffer para PCR 10X	2.5 µL	1 X
Enzima Taq polimerasa 5 U/µL (Roche)	0.5 µL	0.1 U/µL
Mezcla de dNTP´s 10 mM	1 µL	0.4 mM
Mg ²⁺ 25 mM	1 µL	1 mM
Agua estéril	14 µL	
Volumen final	19 µL	

- 2.-Adicionar a cada tubo de microcentrífuga 19 μL de la mezcla de reacción.
- 3.-Agregar a cada tubo de microcentrífuga 0.5 μL de los iniciadores con las siguientes combinaciones: A7/A8, A5/A8, A6/A7, a una concentración de 50 pmoles/ μL cada uno y 5 μL del producto de PCR con dilución 1:10.
- 4.-Las condiciones de reacción son las siguientes:

Fases	Temperatura	Tiempo
Ciclo único de:	94 °C	2 minutos
PCR durante 40 ciclos:		
Desnaturalización	94 °C	15 segundos
Alineación	62 °C	45 segundos
Ciclo único de:	72 °C	5 minutos

3.2.4 PURIFICACIÓN DEL cDNA A PARTIR DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR

3.2.4.1 PURIFICACIÓN POR COLUMNAS DE INTERCAMBIO IONICO DE QUIAGEN

La purificación del amplicón obtenido por RT-PCR se hizo con columnas de intercambio iónico de Quiagen de la siguiente manera:

- 1.-En un tubo de 1.5 mL transferir los 20 μL de producto de RT-PCR, adicionar 50 μL de agua estéril y 230 μL de Buffer de lisis (con la previa disolución de los cristales), lo que le dará carga al producto para que se quede pegado a la sílica de la columna para que no se arrastre con los lavados siguientes; como ya no se tiene que lisar nada, solo agitar por inversión de 4 a 5 veces.
- 2.-Adicionar 230 μL de etanol absoluto al tubo de microcentrífuga para precipitar el material genético, agitar por inversión de 3 a 4 veces para homogenizar el etanol.

- 3.-Transferir 630 μ L de la muestra a una columna con fuerza, manteniendo la columna y la pipeta recta para humedecer por completo la sílica de la columna.
- 4.-Centrifugar a 8 000 rpm/ 2 minutos.
- 5.-El sobrenadante se deshecha quitando la parte externa de la columna y poner otro tubo nuevo a la columna.
- 6-Adicionar 250 μ L del buffer AW1 (el cual estabiliza o regula la muestra ofreciendo las condiciones para conservar al RNA una vez que se pega a la sílica).
- 7.-Centrifugar a 8 000 rpm/ 2 minutos y retirar el sobrenadante.
- 8.-Adicionar 250 μ L del buffer AW2 (éste va ha purificar el material genético quitando todo lo que no se logró pegar a la sílica).
- 9.-Centrifugar a 10 000 rpm/ 6minutos.
- 10.-Tirar el sobrenadante y colocar un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio para eluir el material genético.
- 11.-Eluir con agua estéril o inyectable el material genético. Pasar 50 μ L de agua estéril con una punta limpia lo más cerca de la sílica pero sin tocarla y manteniendo la columna recta para que se hidrate por completo, adicionar el agua poco a poco tratando de humedecer el contorno y la parte central de la sílica.
- 12.-Centrifugar a 8 000 rpm/ 10minutos. [22]

3.2.4.2 PURIFICACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON ISOPROPANOL/ETANOL

- 1.-Adicionar 80 μ L de isopropanol al 75 % a 20 μ L de producto de RT-PCR.
- 2.-Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos (no más) para precipitar el producto.
- 3.-Centrifugar a 10 000 rpm/ 30 minutos.
- 4.-Retirar el sobrenadante decantando el líquido y sin voltear el tubo retirar el exceso con una punta estéril para poder ahora si voltear el tubo de microcentrífuga.

- 5.-Adicionar 250 μL de etanol al 70 % y agitar con vórtex de 2 a 5 segundos.
- 6.-Centrifugar a 10 000 rpm/ 5 minutos.
- 7.-Retirar el sobrenadante decantando el líquido y sin voltear el tubo retirar el exceso con una punta estéril para poder ahora si voltear el tubo de microcentrífuga.
- 8.-Dejar el o los tubos abiertos de 1 a 2 minutos a 80 °C para evaporar todo el etanol.
- 9.-Resuspender la pastilla con 30 μL de agua inyectable o estéril.

3.2.5 ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Para preparar un gel de agarosa al 2% (para analizar moléculas entre 100 y 1,600 pb) de 10 x 6 cm se necesitan 0.6 g de agarosa y 30 mL de amortiguador TAE 1X.

- 1.-Hervir la mezcla en horno de microondas hasta que se disuelva completamente.
- 2.-Dejar enfriar un poco para adicionar 1 μL de bromuro de etidio 10 mg/mL.
- 3.-Poner la cámara de electroforesis en una superficie nivelada y colocar el peine procurando que quede cuando menos a 0.5 mm entre los dientes y el fondo de la charola y orientado de tal manera que los pozos queden del lado del electrodo negativo (negro).
- 4.-Vertir la mezcla en la cámara evitando hacer burbujas y dejar solidificar el gel a temperatura ambiente.
- 5.-Retirar el peine y adicionar a la cámara de electroforesis la misma solución amortiguadora que se uso para hacer el gel (TAE 1X).
- 6.-El gel debe quedar ligeramente sumergido en la solución de TAE 1X.
- 7.-Sobre un pedazo de papel parafilm limpio poner gotitas de 1 μL de colorante de electroforesis (tantas como muestras van a ponerse en el gel), el colorante empleado es naranja de acridina.
- 8.-Tomar con una pipeta automática 5 μL del DNA que se va a analizar. Mezclarlos con una de las gotas de colorante de electroforesis (naranja de

acridina) del parafilm subiendo y bajando la mezcla en la punta de la micropipeta y poner toda la mezcla en uno de los pozos del gel.

9.-Repetir el paso anterior con todas las muestras y con un marcador de peso molecular (Φ X 174/Hae III), adicionar 3 μ L de éste al primer pozo.

10.-Aplicar una corriente de 120 V, hasta que el colorante haya corrido tres cuartas partes del gel (aproximadamente 45 minutos).

11.-Sacar el gel de la cámara con cuidado de no romperlo.

12.-Colocar el gel en el transiluminador de luz UV y tomar fotografías con filtro color amarillo o naranja. [13]

3.2.6 SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA

Este procedimiento experimental lo realizo el personal del Laboratorio de Genoma de Patógenos, a continuación se describe la metodología empleada.

La secuenciación nucleotídica se realiza mediante el sistema automatizado ABI PRISM 310 con el estuche DNA Sequencing Kit (Big Dye).

1.-Los productos una vez purificados se cuantifican por densitometría de imagen, en geles de acrilamida al 7.5%, tomando como referencia al marcador de peso molecular Φ X 174/Hae III, de los cuales se utilizaran aproximadamente de 5 a 20 ng de cDNA por secuenciación de 500 a 1000 pb.

2.-La reacción de secuencia se prepara de la siguiente manera: En un tubo eppendorff de 200 μ L, agregar 8 μ L de la mezcla de reacción "Terminador ready", de 5 a 20 ng de producto de PCR purificado, 3.2 pmol de iniciador y aforar con agua estéril hasta 20 μ L.

3.-Las condiciones de reacción son las siguientes:

Fases	Temperatura	Tiempo
PCR durante 26 ciclos:		
Desnaturalización	96 °C	10 segundos
Alineación	50 °C	5 segundos
Extensión Ciclo único hasta su purificación:	60 °C	4 minutos

5.-La purificación se realiza por columnas de intercambio iónico, el producto se resuspende en 15 µL de reactivo TSR (Template Supresión Reagent).

6.-Mezclar y centrifugar rápidamente la muestra, calentar a 95 °C/2min., colocar en hielo, mezclar y centrifugar rápidamente una vez mas y colocar en hielo hasta su uso.

7.-Colocar las muestras en el secuenciador ABI PRISM.

Para analizar las secuencias se usa el programa Chromas en la computadora. [23]

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los procedimientos para analizar el DNA o RNA de una muestra biológica inician generalmente con el aislamiento de los ácidos nucleicos de dicha muestra, el cual se divide en tres etapas:

- a) **Lisis:** en la cual se procura liberar el material genético contenido en el patógeno de interés.
- b) **Extracción:** en la que se procura eliminar la mayor parte de las proteínas y otro tipo de macromoléculas.
- c) **Precipitación:** en la que se purifica los ácidos nucleicos y se concentra el material genético al mínimo volúmen.

Se extrajo el RNA del virus de la rabia con trizol LS Reagent a partir del sobrenadante de Cultivo Celular infectado con el virus de la Rabia, el cual está a una concentración de $10^{6.8}$ dL₅₀/mL, de aquí se tomaron 250 μ L, obteniéndose un volumen de 50 μ L de material genético (RNA) al final. De este se toman 5 μ L para llevar a cabo la Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Generalmente, para amplificar alguna región genómica de interés se requiere que la información este codificada en un molde de DNA, ya que la enzima que realiza el proceso (Taq polimerasa) usa como sustrato este ácido nucleico. En el caso del virus rábico como su genoma es de RNA, se requiere un proceso que transforme, al menos la región de interés, en DNA. Este paso se logra mediante un proceso de transcripción reversa, ejecutado por la enzima transcriptasa reversa (RT). Una vez obtenida la copia de DNA complementario (cDNA), éste puede amplificarse por PCR como cualquier otro DNA.

Por medio de la técnica de PCR se amplifica un segmento de DNA que se encuentra entre dos regiones conocidas. Se utilizan dos diferentes iniciadores cuya

secuencia es complementaria a la región por amplificar, ésta es una reacción exponencial muy sensible y específica.

El fragmento de cDNA obtenido a partir de la técnica de RT es sometido al ensayo de PCR, donde se utilizan los iniciadores A5: 5' CTA CAA TGG ATG CCG AC 3' y A6: 5' GAG TCA CTC GAA TAT GTC 3', y se logra amplificar un fragmento de 1353 pb, correspondientes a la región N del genoma del virus.

Para llevar a cabo la técnica de RT-PCR se probaron diferentes ensayos con tres distintas enzimas transcriptasa reversa de diferentes casas comerciales:

M-MuLV (Virus de la Leucemia Murina Moloney) de Promega. Esta reacción se llevó a cabo en un solo paso, obteniéndose resultados positivos con 10 U de la enzima M-MLV por reacción; en esta prueba se utilizó el buffer de la Taq polimerasa y se adicionaron al sistema reactivos externos como el DTT y el inhibidor de RNAsas para proporcionar las condiciones óptimas a la enzima RT. Se obtiene una buena cantidad de producto como se observa en la figura 4.1A, sin embargo la casa comercial recomienda utilizar cada enzima con su respectivo buffer para mejorar el rendimiento y los resultados de la reacción, para lo cual se tendría que trabajar por separado la RT y la PCR. La M-MLV es una enzima DNA polimerasa dependiente de DNA que usa productos de cadena sencilla de RNA o DNA en la presencia de un iniciador para la síntesis de cDNA, carece de actividad endonucleasa y tiene una muy baja actividad de RNAsa H, pero se puede obtener la longitud completa de grandes copias de RNAm. [21] [24]

M-MuLV de Expand. En este ensayo primero se realiza la RT, el estuche contiene la enzima M-MLV (descrita en el párrafo anterior) con su respectivo buffer, utilizando 10 U por reacción; una vez obtenido el fragmento de cDNA a partir de la RT, se realizó la PCR, logrando amplificar un fragmento de 1353 pb, correspondientes a la región N del genoma del virus. Para dicho ensayo se empleo la enzima Taq Polimerasa de la casa comercial "Altaenzimes" con su respectivo buffer. Como se muestra en la figura 4.1B en este ensayo se logra obtener una buena

concentración del producto de PCR, sin embargo, el tiempo empleado es muy largo ya que se realiza en dos pasos, el tiempo en el que se realiza la RT es de 45 minutos y por otro lado la manipulación al abrir y cerrar los tubos para adicionar las mezclas de reacción puede generar contaminación. [18] [24]

AMV (Virus de la Mieloblastosis Aviar) de Titan. El estuche comercial "One Step RT-PCR TITAN" contiene la enzima AMV para la Transcripción Reversa (RT) y en la parte de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se emplea la enzima combinada Expand de alta fidelidad, la cual consiste de Taq DNA polimerasa y Tgo DNA polimerasa, esta enzima tiene una reactividad de edición polimerasa, que al detectar un error en la ejecución a lo largo de la reacción lo corrige siguiendo luego su actividad, además cuenta con todos los reactivos que se emplean en la reacción por lo que es más sensible y se reduce la posibilidad de presentar contaminación en la manipulación de los tubos. [17]

La enzima AMV comparada con la M-MLV tiene mayor procesividad y por lo tanto se requiere de menor cantidad de enzima en la reacción, se recomienda utilizar 25 U de AMV en comparación con 200 U de M-MLV (ocho veces menos). A diferencia de las reacciones con M-MLV en este ensayo se utilizaron 2.5 U de la RT (4 veces menos que la M-MLV donde se adicionaron 10 U al sistema) obteniendo un producto de PCR de 1353 pb correspondientes al gen N del virus de la rabia. Figura 4.1C. Por otra parte esta reacción se llevó a cabo en un solo paso reduciendo así el tiempo de amplificación, además de que la manipulación de los tubos fue menor evitando la contaminación y finalmente se obtiene una buena concentración del producto. [21]

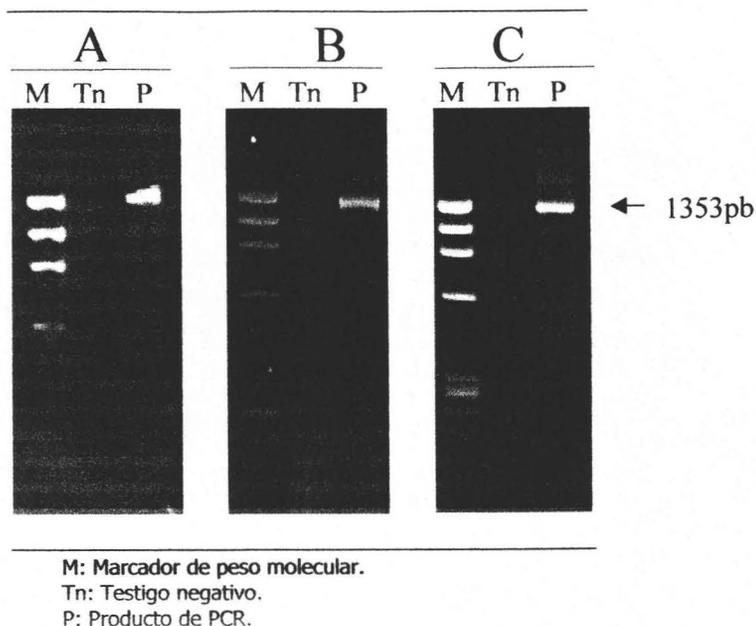


Figura 4.1 Productos de 1353 pb correspondientes al gen N del virus rábico. Panel A, amplificación con la enzima M-MLV de Promega. Panel B, amplificación con la enzima M-MLV de Expand. Panel C amplificación con la enzima AMV de Titán. Se utilizó el marcador ØX 174 digerido con HaeIII.

Con la finalidad de aumentar la especificidad y verificar que estos productos de PCR corresponden al gen N del virus de la rabia, se realizó un PCR anidado utilizando los iniciadores internos A7 y A8 para generar un amplicón de 562 pb utilizando como molde 2 µL de los productos de 1353 pb obtenidos con cada una de las enzimas, como se muestra en la figura 4.2.

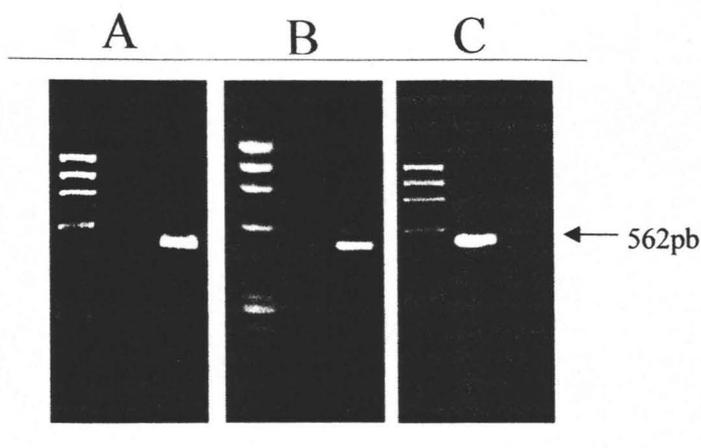


Figura 4.2 PCR anidado, productos de amplificación de 562 pb. a partir de los amplicones de 1353 pb obtenidos por RT-PCR con las enzimas M-MLV de Promega (panel A), M-MLV de Expand (panel B) y AMV de Titán (panel C). Se utilizó el marcador ØX 174 digerido con HaeIII.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las amplificaciones con las diferentes enzimas, se eligió la enzima AMV del estuche de Titan para optimizar el RT-PCR y obtener productos en una buena concentración y de buena calidad que sean útiles para la secuenciación. La optimización se realizó considerando los siguientes parámetros:

a) Temperatura de alineación de los iniciadores: La cual depende de la temperatura de fusión o (T_m) de cada iniciador. Los iniciadores se aparean a la temperatura de alineación por complementariedad al DNA blanco. El estuche elegido recomienda que el intervalo de temperatura para la alineación debe ser entre 45-65 °C (dependiendo de la T_m de los iniciadores). Se utilizó un programa apropiado (OligoDos) para calcular la T_m óptima de los iniciadores la cual fue de 52 °C para los iniciadores A5 y A6. Se realizaron ensayos con dos temperaturas de alineación: 55 °C y 58 °C; con la temperatura de 58 °C no se logró la alineación de

los iniciadores mientras que con la temperatura de 55 °C se obtienen los mejores resultados para la prueba.

Cuando la temperatura de alineación es muy baja existe mayor probabilidad de que los iniciadores se alinen en regiones no específicas del DNA blanco y pueden ser extendidos por la Taq polimerasa ya que esta posee actividad aun a bajas temperaturas. Por lo que utilizando temperaturas de alineación entre 55 a 65 °C se reducen los apareamientos inespecíficos. [14] [17]

b) Concentración óptima del Ión Mg^{2+} : La concentración del ión magnesio debe ser ajustada específicamente para cada reacción de PCR experimentalmente. La concentración óptima de magnesio suele oscilar entre 1 y 10 mM. Para determinar dicha concentración se realizó una curva de magnesio en la cual se varió la concentración de este ión entre 1.5 mM hasta 3.5 mM. El buffer 5X para la mezcla de enzimas contiene una concentración inicial de $MgCl_2$ de 7.5 mM y aporta una concentración inicial por reacción de 1.5mM, a cada reacción se le adicionó cantidades crecientes de 0.5 mM de $MgCl_2$ hasta obtener una concentración final de 3.5 mM. Al efectuar la reacción de PCR y analizar los resultados de todas las reacciones simultáneamente se determinó que la concentración de magnesio que produce el mejor rendimiento fue de 2 mM. Como se muestra en la Tabla 4.1.

Al tener en la reacción una cantidad elevada de magnesio libre se observarán una gran cantidad de productos secundarios mientras que al tener poca cantidad de magnesio libre no se obtendrá ningún producto de PCR. [16][17][18]

Tabla 4.1 Curva de Magnesio

Muestras	Concentración Final
Testigo Negativo	1.5 mM*
Tubo 1	1.5 mM*
Tubo 2	2.0 mM
Tubo 3	2.5 mM
Tubo 4	3.0 mM
Tubo 5	3.5 mM

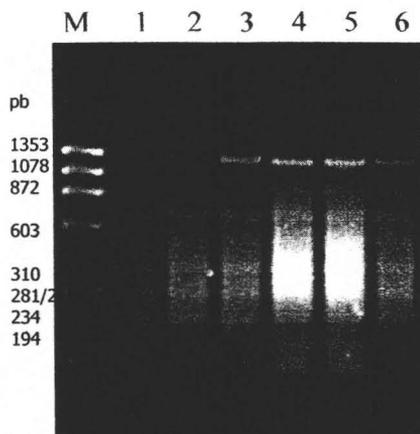


Figura 4.3 Curva de Mg^{2+} . Carril 1, testigo negativo; carril 2, 1.5 mM del ión Mg^{2+} ; carril 3, 2.0 mM del ión Mg^{2+} ; carril 4, 2.5 mM del ión Mg^{2+} ; carril 5, 3.0 mM del ión Mg^{2+} ; carril 6, 3.5 mM del ión Mg^{2+} . Se utilizó el marcador $\emptyset X$ 174 digerido con HaeIII.

Hasta el momento tenemos listo el producto de 1353 pb correspondiente al gen que codifica para la proteína N, el cual puede ser secuenciado de manera automática. Es de nuestro interés establecer las condiciones necesarias para poder secuenciar en su totalidad el producto obtenido ya que consideramos nos puede brindar mayor y mejor información con relación a la caracterización molecular de este virus. En estudios anteriores se secuenció una región de 200 pb en el extremo 3' del gen, la cual representa la región semivariable, ya que la secuencia de esta zona es de gran utilidad en el establecimiento de relaciones filogenéticas entre diferentes aislamientos[19][20]; por otra parte, en un estudio realizado en Francia en 1995, se determinó el polimorfismo genético del gen de la nucleoproteína del virus de la rabia a partir de 69 aislamientos de diferentes partes del mundo, comparándolos con 13 aislamientos representativos de los seis genotipos de *Lyssavirus*. Estos análisis fueron realizados en una región altamente variable de 400 bases de la región amino terminal de la proteína N y en una región no codificante de 93 bases en el extremo 3' del mRNA del gen N, concluyendo que esta proteína es muy útil para relacionar los aislamientos en tiempo y espacio. Sin

embargo los autores sugieren aumentar la longitud de dichas secuencias para tener información más robusta en el contexto filogenético. [20]

Por lo anterior proponemos dos alternativas para llevar a cabo la secuencia completa del producto de 1353 pb del gen N del virus rábico:

- a) Secuenciar el producto (1353 pb) utilizando los iniciadores A5, A6, A7 y A8 en forma individual, de tal forma que se generarían cuatro secuencias diferentes que se pueden empalmar y construir la secuencia completa de dicho gen, como se muestra en la figura 4.4:

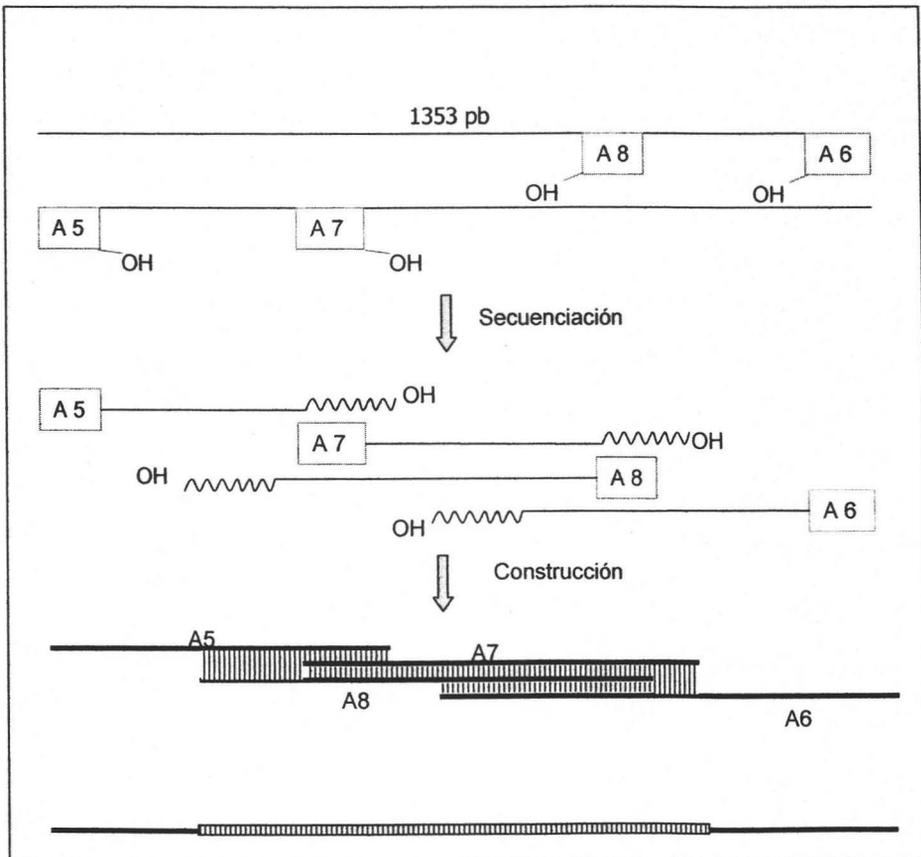


Figura 4.4 Secuencia del producto de 1353 pb con los iniciadores A5, A6, A7 y A8.

b) Obtener tres productos de menor peso molecular a partir de un PCR anidado utilizando diferentes combinaciones de los iniciadores internos A7 y A8, tabla 4.2, tomando como molde al fragmento generado en la primera reacción (producto de 1353 pb) los cuales también pueden ser útiles como molde para la secuenciación automática.

Iniciadores	Producto esperado (pb)
A6 – A7	1101
A5 – A8	777
A7 – A8	562

Tabla 4.2 Combinaciones de los iniciadores externos e internos.

En la figura 4.5 se esquematiza un mapa con la ubicación de cada iniciador dentro del genoma viral de la proteína N del virus de la rabia y los productos esperados de las diferentes combinaciones.

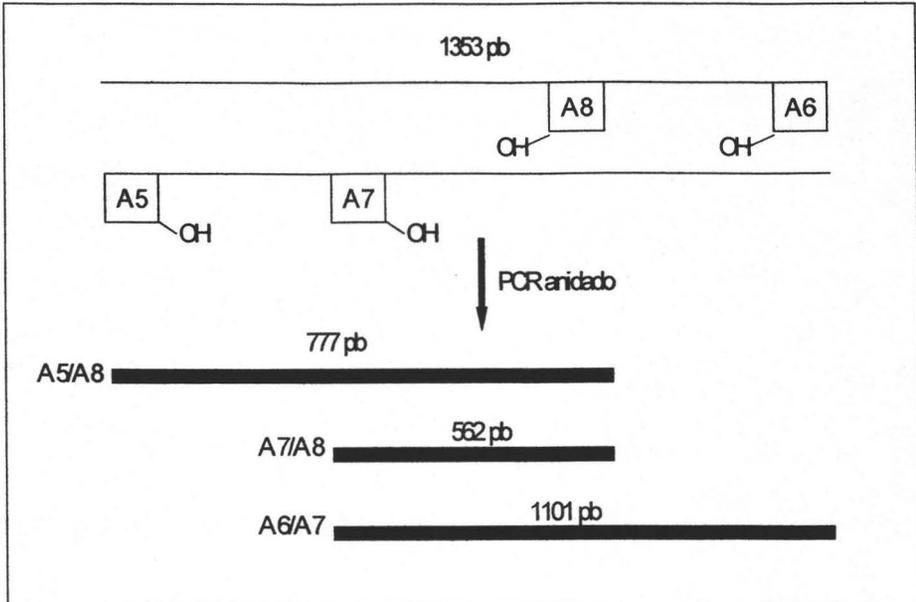


Figura 4.5 Ubicación de los iniciadores en el gen N y productos esperados con la combinación de los mismos.

Para la primera propuesta ya obtuvimos el producto de 1353 pb, por lo tanto decidimos obtener por medio de un PCR anidado los amplicones de menor tamaño realizando la combinación de iniciadores sugerida en la segunda propuesta, como se muestra en la tabla 4.2 y en la figura 4.5. En la figura 4.6 se muestran los diferentes productos de PCR anidado utilizando como molde el producto de 1353 pb de la reacción de RT-PCR.

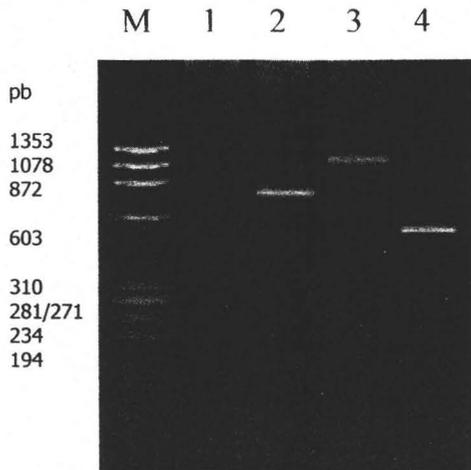


Figura 4.6 Productos de amplificación del PCR anidado a partir del producto de 1353 pb. Carril 1, testigo negativo; carril 2, producto de 777 pb; carril 3, producto de 1101 pb; carril 4, producto de 562 pb. Se utilizó el marcador ØX 174 digerido con HaeIII.

Una vez obtenidos los productos del PCR anidado se pueden secuenciar de manera directa con cada uno de los iniciadores específicos para cada producto de manera individual como se esquematiza en la figura 4.7:

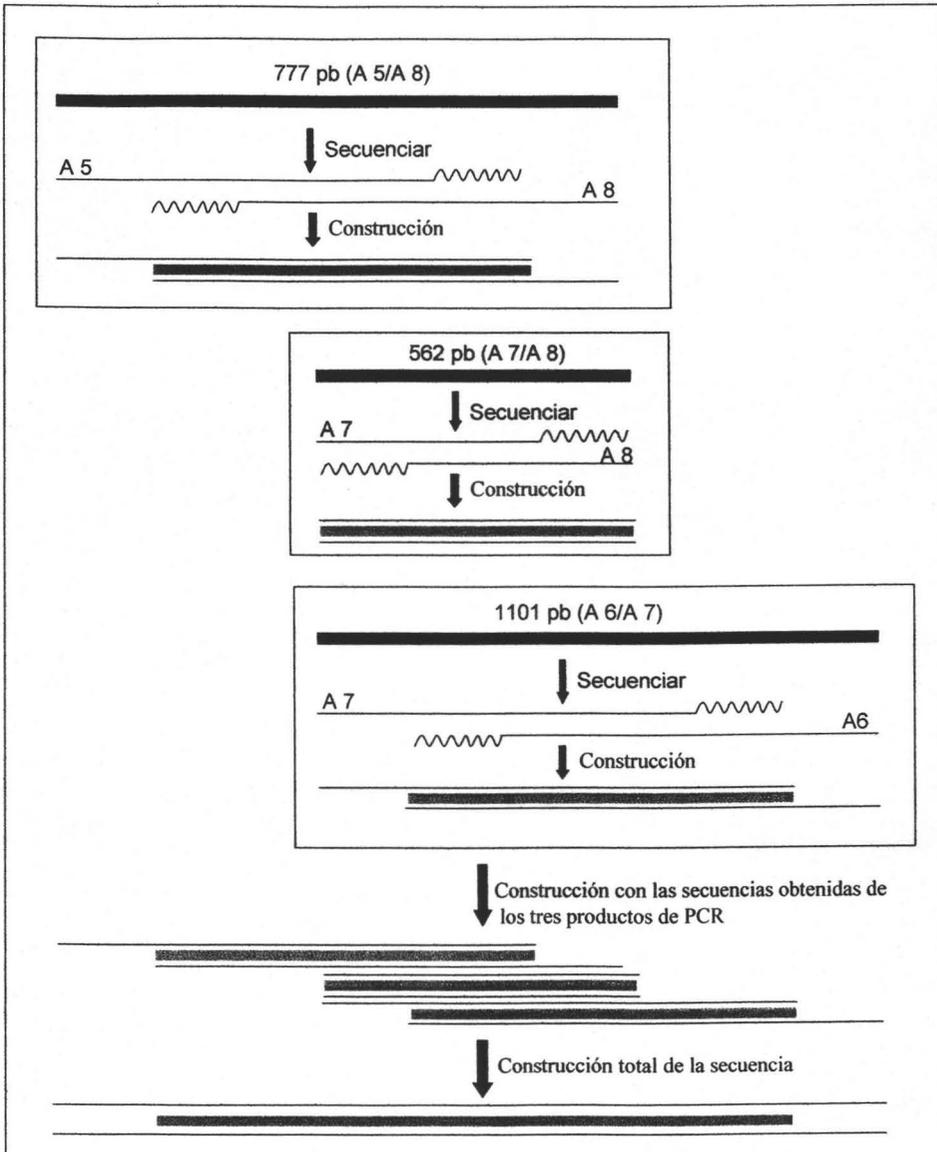


Figura 4.7 Esquema de la secuenciación de los productos obtenidos del PCR anidado (1101 pb, 777 pb, 562 pb) con cada uno de los iniciadores correspondientes.

Para llevar a cabo la reacción de secuencia fue necesario purificar los productos de amplificación, de tal forma que se probaron dos técnicas; una con Columnas de extracción de RNA viral de Quiagen (de intercambio iónico) y la otra por precipitación con Isopropanol-Etanol. Como se muestra en la figura 4.8 la técnica que ofrece mejores resultados para el producto de PCR de 562 pb es la de columnas de Quiagen, ya que con esta solo se manipula el producto de PCR al inicio al colocarlo dentro de la columna y el tubo colector no se cambia sino hasta el último paso cuando se cambia por un tubo ependorf de 2 mL para eluir el producto ya purificado, mientras que con la precipitación con Isopropanol-Etanol se debe de tener cuidado de no arrastrar el botón o pellet de producto en cada lavado, lo cual se deberá hacer con mucho cuidado al adicionar cada alcohol y lavar con mucho cuidado para que el producto no se pierda en alguno de estos pasos.

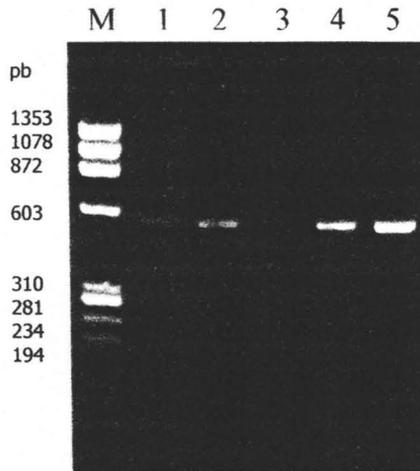


Figura 4.8 Técnicas de purificación para los productos de amplificación de PCR. Carril 1 y 2, purificación con columnas de intercambio iónico de Quiagen; carril 3, testigo negativo; carril 4 y 5, purificación por precipitación con Isopropanol-Etanol. Se utilizó el marcador ØX 174 digerido con HaeIII.

Una vez elegida la técnica de purificación, se purificaron los productos de 1353 pb y los productos de PCR anidado, como se muestra en la figura 4.9:



Figura 4.9 Purificación de los productos de amplificación por columnas de intercambio iónico. Carril 1 y 2, producto de 1353 pb; carril 3, testigo negativo; carril 4, producto de 777 pb; carril 5, producto de 1101 pb; carril 6, producto de 562 pb. Se utilizó el marcador de peso molecular ØX 174 digerido con Hae III.

Para secuenciar un producto de PCR, el método más común actualmente es el de Sanger, el cual se basa en la terminación prematura de síntesis de DNA. Los métodos de secuenciación automatizada de mayor éxito se fundamentan en este método y en las técnicas modernas como la PCR acoplada a la reacción de Sanger. Una vez purificados los productos de PCR, se eligió el producto anidado de 777 pb para realizar su secuenciación automática con el equipo ABI prism 310 utilizando los iniciadores A5 (sentido) y A8 (antisentido) de manera independiente, como se muestra en la figura 4.10.

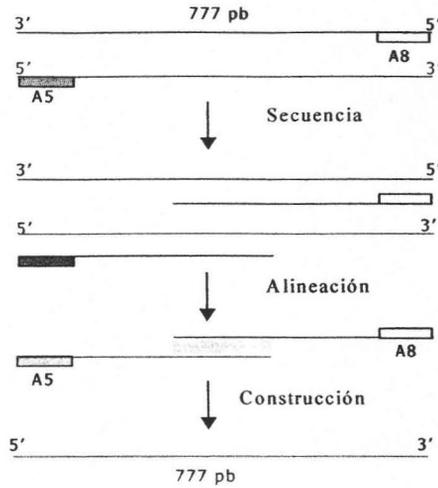


Figura 4.10 Esquema de la secuenciación del producto anidado de 777 pb con los iniciadores A5 y A8.

Se obtuvieron los gráficos de las dos reacciones de secuencia (gráfico 4.1 y gráfico 4.2) y se transcribió en formato de texto para conocer la secuencia nucleotídica. Cabe mencionar que la secuencia obtenida con el iniciador antisentido (A8) se transcribió en forma de reversa complementaria, para tener ambas secuencias en el mismo sentido 5'-3' y poder realizar los análisis pertinentes.

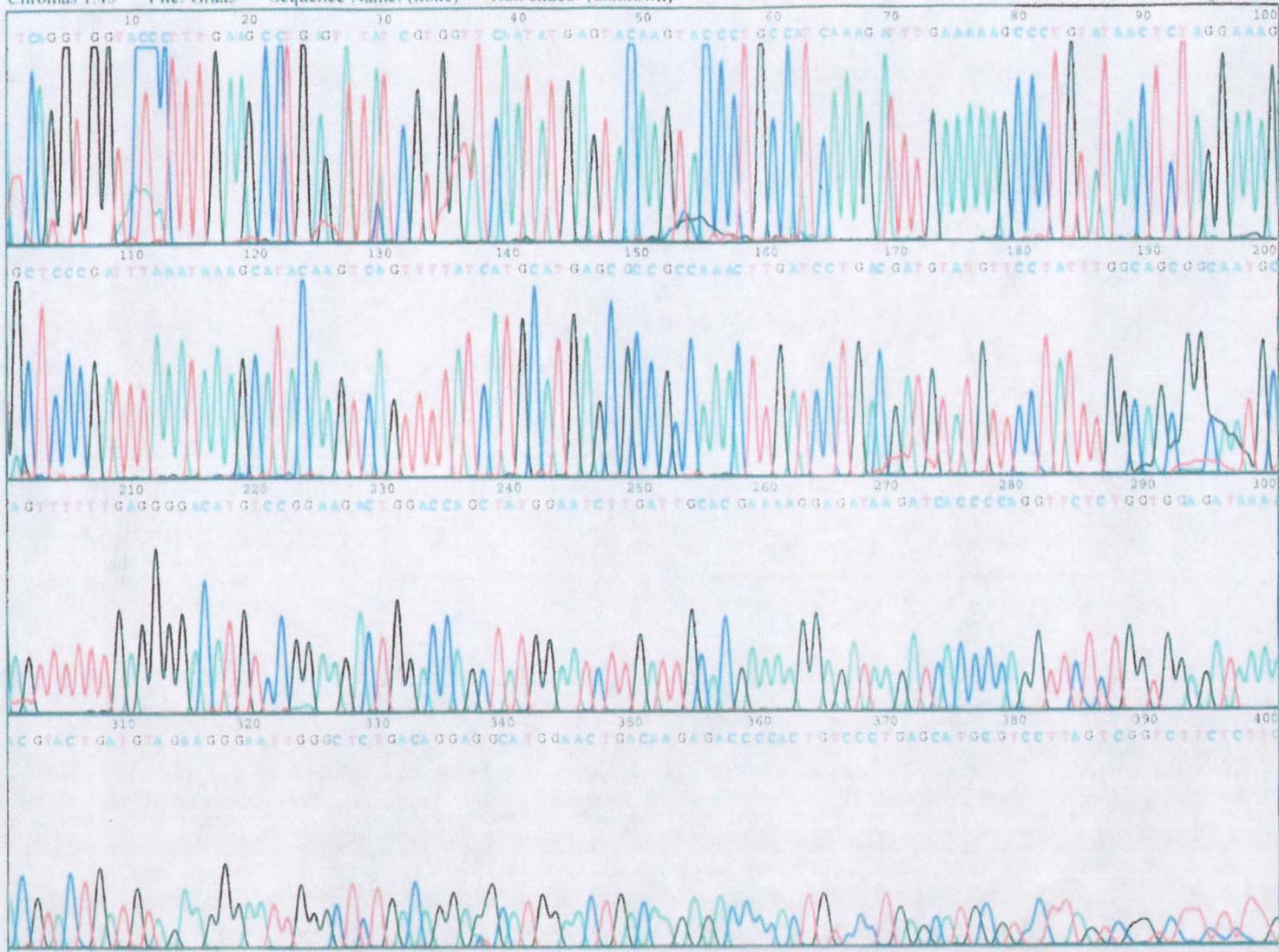


Gráfico 4.1 Secuencia del producto de 777 pb con el iniciador A5

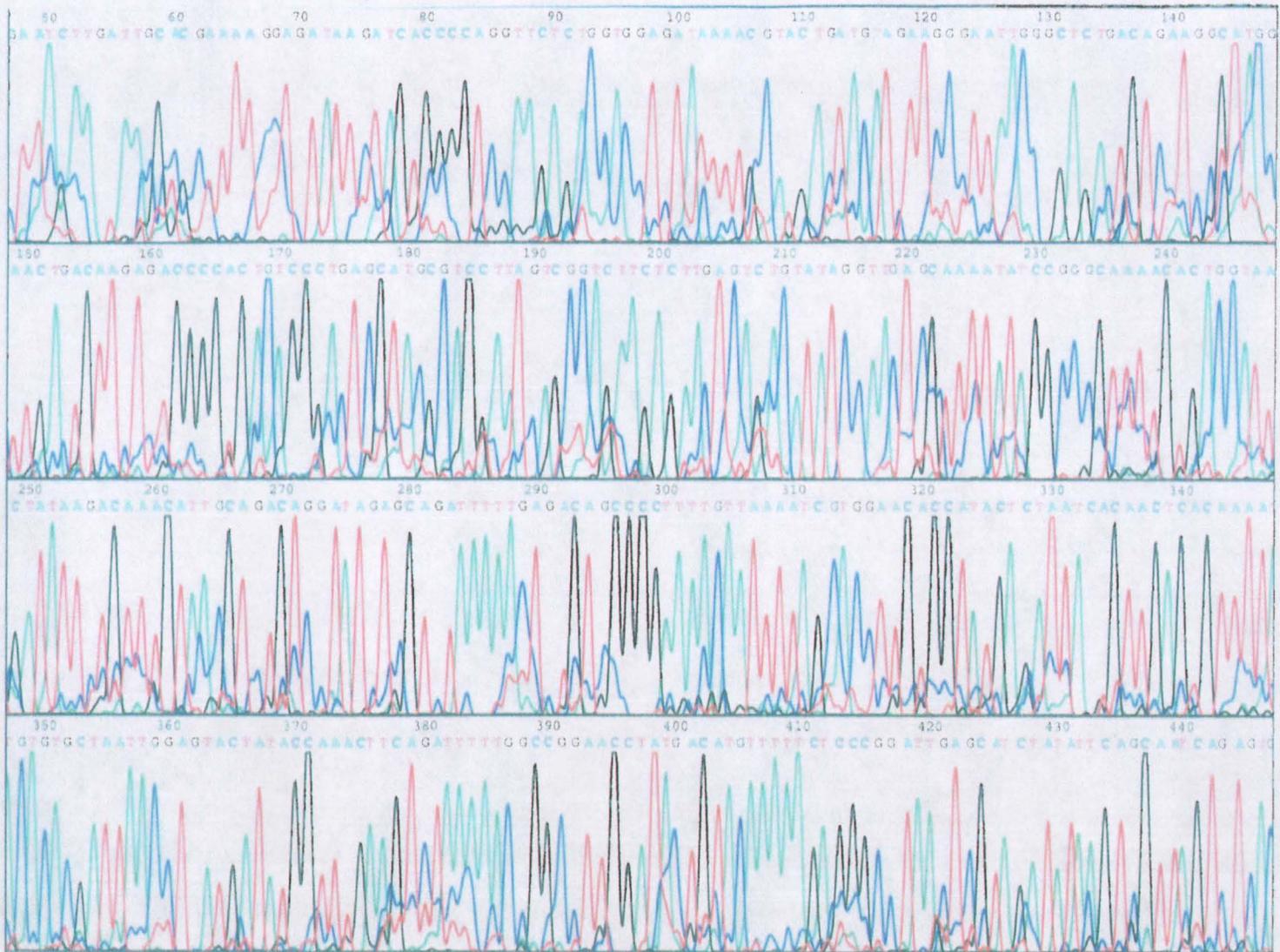


Gráfico 4.2 Secuencia del producto de 777 pb con el iniciador A8

Secuencia parcial del gen N del virus de la rabia obtenida con el iniciador A5:

5' TCAGGTGGTCCCTTTGAAAGCCTGAGATTATCGTGGTTCAATATGAGTACAAGTACCCTG
CCATCAAAGATTTGAAAAAGCCCTGTATAACTCTAGGAAAGGCTCCCGATTTAAATAAAGC
ATACAAGTCAGTTTTATCATGCATGAGCGCCGCCAAACTTGATCCTGACGATGTATGTTCC
TATTTGGCAGCGGCAATGCAGTTTTTTGAGGGGACATGTCCGGAAGACTGGACCAGCTATG
GAATCTTGATGACGAAAAGGAGATAAGATCACCCAGGTTCTCTGGTGGAGATAAAACG
TACTGATGTAGAAGGGAATTGGGCTCTGACAGGAGGCATGGAAGTACAAGAGACCCCACT
GTCCCTGAGCATGCGTCCCTTAGTCGGTCTTCTCTTGAGTCTGTATA3'

Secuencia parcial del gen N del virus de la rabia obtenida con el iniciador A8:

5' ATGCAGTTTTTTGAGGGGACATGTCCGGAAGACTGGACCAGCTATGGAATCTTGATTGC
ACGAAAAGGAGATAAGATCACCCAGGTTCTCTGGTGGAGATAAAACGTAAGTACTGATGTAGAA
GGGAATTTGGGCTCTGACAGGAGGCATGGAAGTACAAGAGACCCCACTGTCCCTGAGCATG
CGTCCTTAGTCGGTCTTCTCTTGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAATATCCGGGCAAAACAC
TGGTAACTATAAGACAAAACATTGCAGACAGGATAGAGCAGATTTTTGAGACAGCCCTTTT
GTTAAAATCGTGGAACACCATACTCTAATCACAACACAAAATGTGTGCTAATTGGAGTA
CTATACCAAAC TTCAGATTTTTGGCCGGAACCTATGACATGTTTTTCTCCCGGATTGAGCA
TCTATATTCAGCAATCAGAGTGGGCACAGTTGTCACTGCTTATGAAGACTGTTTCAG3'

Para comprobar que ambas secuencias corresponden al gen N del virus de la rabia se realizó un alineamiento tipo Blast N con las secuencias reportadas en el Gene Bank. Ambas secuencias presentan una homología del 99 % con las secuencias reportadas para el virus de la rabia lo que nos indica que nuestros productos de PCR son específicos para este gen.

Alineación de la secuencia obtenida con el iniciador A5 con las secuencias reportadas en el Gene Bank para el virus de la rabia:

Sequences producing significant alignments:

gi|61816|emb|X03673.1|RHRAPV3 Rabies genome (PV strain) 3' ...
gi|333585|gb|M13215.1|RAVMMGN Rabies virus M2, M1, G, N, an...
gi|32440979|gb|AF406696.1| Rabies virus strain CVS nucleopr...
gi|32440977|gb|AF406695.1| Rabies virus strain ERA nucleopr...
gi|49035250|gb|AF499686.2| Rabies virus strain SRV9, comple...

Alineación de la secuencia obtenida con el iniciador A8 con las secuencias reportadas en el Gene Bank para el virus de la rabia:

Sequences producing significant alignments:

gi|32440979|gb|AF406696.1| Rabies virus strain CVS nucleopr...
 gi|32440977|gb|AF406695.1| Rabies virus strain ERA nucleopr...
 gi|49035250|gb|AF499686.2| Rabies virus strain SRV9, comple...
 gi|61816|emb|X03673.1|RHRAPV3 Rabies genome (PV strain) 3' ...
 gi|333585|gb|M13215.1|RAVMMGN Rabies virus M2, M1, G, N, an...
 gi|333556|gb|M31046.1|RAVCGA Rabies virus (strain SAD B19),...

Una vez verificadas las secuencias se realizó una alineación entre ellas para construir de la secuencia total del fragmento de 777 bases del gen N. Se descartaron las primeras 40-50 bases de cada secuencia (región donde se alinean los iniciadores) ya que se presentó dificultad para tener una lectura correcta.

A5	TCAGGTGGTC	CCTTTGAAGC	CTGAGATTAT	CGTGGTTCAA	TATGAGTACA	AGTACCCTGC	60
A8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
C.C.							
A5	CATCAAAGAT	TTGAAAAGC	CCTGTATAAC	TCTAGGAAAG	GCTCCCGATT	TAAATAAAGC	120
A8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
C.C.							
A5	ATACAAGTCA	GTTTTATCAT	GCATGAGCGC	CGCCAAACTT	GATCCTGACG	ATGTATGTTC	180
A8	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
C.C.							
A5	CTATTTGGCA	GCGGCAATGC	AGTTTTTTGA	GGGGACATGT	CCGGAAGACT	GGACCAGCTA	240
A8	-----	-----ATGC	AGTTTTTTGA	GGGGACATGT	CCGGAAGACT	GGACCAGCTA	
C.C.		****	*****	*****	*****	*****	
A5	TGGAATCTTG	ATTGCACGAA	AAGGAGATAA	GATCACCCCA	GGTCTCTCTG	TGGAGATAAA	300
A8	TGGAATCTTG	ATTGCACGAA	AAGGAGATAA	GATCACCCCA	GGTCTCTCTG	TGGAGATAAA	
C.C.	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
A5	ACGTACTGAT	GTAGAAGGGA	ATTGGGCTCT	GACAGGAGGC	ATGGAACTGA	CAAGAGACCC	360
A8	ACGTACTGAT	GTAGAAGGGA	ATTGGGCTCT	GACAGGAGGC	ATGGAACTGA	CAAGAGACCC	
C.C.	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

```

A5      CACTGTCCCT GAGCATGCGT CCTTAGTCGG TCTTCTCTTG AGTCTGTATA ----- 420
A8      CACTGTCCCT GAGCATGCGT CCTTAGTCGG TCTTCTCTTG AGTCTGTATA GGTTGAGCAA
C.C.    *****
A5      ----- 480
A8      AATATCCGGG CAAAACACTG GTAACATAA GACAAACATT GCAGACAGGA TAGAGCAGAT
C.C.
A5      ----- 540
A8      TTTTGAGACA GCCCCTTTTG TTAAAATCGT GGAACACCAT ACTCTAATCA CAACTCACAA
C.C.
A5      ----- 600
A8      AATGTGTGCT AATTGGAGTA CTATACCAA CTTGAGATT TTGGCCGGAA CCTATGACAT
C.C.
g
A5      ----- 660
A8      GTTTTTCTCC CGGATTGAGC ATCTATATTC AGCAATCAGA GTGGGCACAG TTGTCACTGC
C.C.
A5      ----- 677
A8      TTATGAAGAC TGTTTCAG
C.C.

```

Después de realizar la alineación, se observa que las secuencias se empalman en el centro, y se obtiene un total de 678 bases:

```

5' TCAGGTGGTCCCTTTGAAGCCTGAGATTATCGTGGTTCAATATGAGTACAAGTACCCTG
CCATCAAAGATTTGAAAAAGCCCTGTATAACTCTAGGAAAGGCTCCCAGATTTAAATAAAGC
ATACAAGTCAGTTTTATCATGCATGAGCGCCGCAAACCTTGATCCTGACGATGTATGTTCC
TATTTGGCAGCGGCAATGCAGTTTTTTGAGGGGACATGTCCGGAAGACTGGACCAGCTATG
GAATCTTGATTGCACGAAAAGGAGATAAGATCACCCAGGTTCTCTGGTGGAGATAAAAACG
TACTGATGTAGAAGGGAATTGGGCTCTGACAGGAGGCATGGAACCTGACAAGAGACCCCACT
GTCCCTGAGCATGCGTCTTAGTCGGTCTTCTCTTGAGTCTGTATAGGTTGAGCAAATAT
CCGGGCAAAAACACTGGTAACTATAAGACAAACATTGCAGACAGGATAGAGCAGATTTTTGA
GACAGCCCCTTTTGTTAAAATCGTGAACACCATACTCTAATCACAACTCACAAAATGTGT
GCTAATTGGAGTACTATAACAACTTCAGATTTTTGGCCGGAACCTATGACATGTTTTTCT
CCCGGATTGAGCATCTATATTCAGCAATCAGAGTGGGCACAGTTGTCACTGCTTATGAAGA
CTGTTTCAG 3'

```

Uno de los objetivos que se planteo en este trabajo fue obtener la secuencia completa de la proteína N, así que de la misma manera en que se secuenció el producto de PCR de 777 pb se puede seguir la misma metodología para los

productos de PCR anidado de 562 pb y 1101 pb para tener la secuencia total de dicho gen.

Finalmente, para conocer si esta metodología es útil para extractos de RNA de diferentes fuentes virales (sobrenadante de cultivo celular, liofilizado de cultivo celular, vacuna y cerebro de ratón lactante infectado), se realizó un RT-PCR con los iniciadores A5 y A6 obteniendo el producto de 1353 pb, como se muestra en la figura 4.11. Después se obtuvo el producto de 562 pb con los iniciadores A7 y A8 en el PCR anidado, con lo que se muestra la efectividad y reproducibilidad del protocolo elegido para la proteína N del virus de la rabia, como se observa en la figura 4.12.

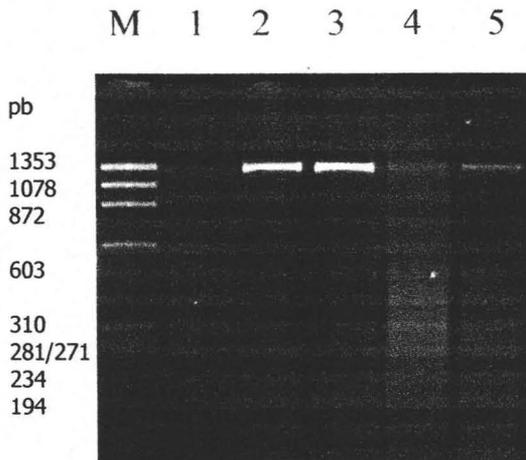


Figura 4.11 Productos de amplificación de RT-PCR a partir de diferentes fuentes virales. Carril 1; Testigo negativo, carril 2; cultivo celular, carril 3; liofilizado de cultivo celular, carril 4; vacuna, carril 5; cerebro de ratón lactante infectado. Se utilizó el marcador de peso molecular ØX 174 digerido con Hae III.

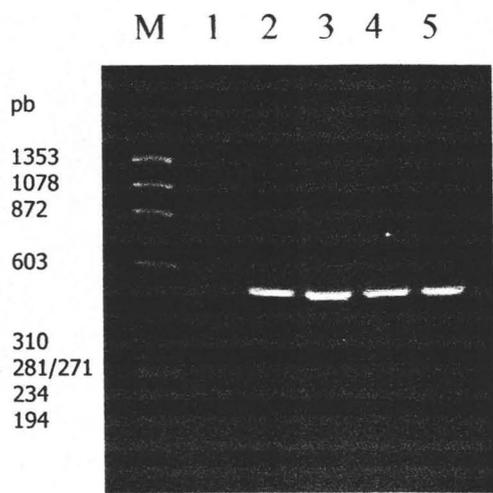


Figura 4.12 Productos de amplificación de PCR anidado a partir de los productos de 1353 pb de las diferentes fuentes virales. Carril 1; Testigo negativo, carril 2; sobrenadante de cultivo celular, carril 3; liofilizado de cultivo celular, carril 4; vacuna, carril 5; cerebro de ratón lactante infectado. Se utilizó el marcador de peso molecular ØX 174 digerido con HaeIII.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1.-Se obtuvo el material genético del virus de la rabia a partir de diferentes fuentes (cultivo celular, liofilizado de cultivo celular, Vacuna, cerebro de ratón lactante infectado).

2.-Se evaluaron tres enzimas RT por medio de un RT-PCR con iniciadores específicos para el gen de la proteína N del virus de la rabia obteniendo un producto de 1353 pb, se comprobó la presencia de este gen mediante un PCR anidado obteniendo un producto interno de 562 pb y se optimizaron las condiciones de la RT-PCR con la enzima AMV.

3.-Se realizó un PCR anidado a partir del producto de 1353 pb con tres combinaciones de iniciadores (poner las combinaciones) obteniendo productos de menor longitud (777 pb, 1101 pb y 562 pb respectivamente) útiles como molde para realizar la secuenciación automática.

4.-Se evaluaron dos técnicas de purificación ofreciendo mejores resultados la purificación por medio de columnas de intercambio iónico.

5.-Se proponen dos estrategias para realizar la secuenciación automática, a) secuenciar el producto de 1353 pb con los 4 iniciadores, b) secuenciar los tres subproductos obtenidos a partir de un PCR anidado con las diferentes combinaciones de los iniciadores internos A7 y A8.

6.-Se secuenció de forma automatizada un producto de 777 pb perteneciente a una región de la proteína N del virus de la rabia.

7.-Se comprobó que la reacción de RT-PCR es útil para cualquier fuente de RNA viral.

Finalmente proponemos para la caracterización molecular del gen N del virus de la rabia la siguiente estrategia: extracción del material genético por medio del reactivo comercial trizol, la amplificación del material genético por medio de RT-PCR utilizando la enzima RT-AMV, su posterior purificación con columnas de intercambio iónico y la secuenciación automática (del producto de 1353 pb o de los subproductos obtenidos en el PCR anidado).

La información que se genere a partir de esta estrategia experimental servirá como una herramienta en la caracterización molecular de este virus.

REFERENCIAS

- [1] G.M. Baer, *Historia Natural de la Rabia*, 2ª. Edición, Ediciones Científicas La Prensa Médica Mexicana, México, 1989. pp. 1-31, 69, 95, 131-142, 390-400.
- [2] F.X. Meslin, M.M. Kaplan, Koprowski, *Laboratory, Techniques in rabies*, 4ª. Edición, World Health Organization, Genova, 1996. pp. 3-15, 28-43, 59, 157-159, 175-178.
- [3] *Fields Virology. Section Two: Specific Virus Families. Chapter 39 "Rhabdoviruses"*, 2001.
- [4] Álvarez and Ruíz, *Análisis de los estudios de la rabia en Latinoamérica*. Washington, D.C., 1995. pp. 450-456.
- [5] Corona, Cosme y Moreno, *Situación epidemiológica de la rabia a nivel mundial y en México*. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 1996. **16**(1): 29-38.
- [6] Smith, J.S., *New aspects of rabies with emphasis on epidemiology, diagnosis, and prevention of disease in the United States*, *Clinical Microbiology*, 1996. **9**(2): 166-176.
- [7] Beran and Frith, *Domestic animal rabies control: and overview*. *Rev. Infectology Disease*, 1998. **10**(4): 672-677.
- [8] Bourthy, Kissi and Tordo, *Molecular diversity of the lyssa virus genus*, *Virology*, 1993. **194**: 70-81.
- [9] Steele, J., and Fernandez, P., *History of rabies and global aspects*. En: Baer, G.M. (Ed.) *The Natural History of Rabies*. 2ª Ed. CRC Press, Florida, EUA, 1991. pp. 1-22.
- [10] Gaudin and col. *Biological function of the low-pH, fusion inactive conformation of rabies virus glycoprotein (G): G is transported in a fusion-inactive state-like conformation*. *J. Virology*, 1995. **69** (9): 5528-5534.
- [11] Wunner, Larson, Dietzschold and Smith, *The molecular biology of rabies viruses*. *Rev. Infect. Dis.*, 1988, **10** (4): 771-782.

[12] Hiramatsu, Mannen, Mifune, Nishizono and Takita – Sonoda. Comparative sequence analysis of the M gene among rabies virus strains and its expression by recombinant vaccinia virus. *Virus genes*, 1992, **7** (1): 83-88.

[13] Olivera, Correa, Gudiño, et al, *Manual de Técnicas de Laboratorio Vol. III, Parte 2: Diagnóstico por Biología Molecular*, Secretaría de Salud, InDRE. pp: 5-59.

[14] Barrera S., Ortiz L., Rojas M., Roséndez P., *Reacción en Cadena de la Polimerasa*, *Revista Ciencia y Desarrollo*, Enero- Febrero, 1993. pp: 50-60.

[15] Bobadilla Norma, Gamba Gerardo, V: *Reacción en Cadena de la Polimerasa*, *Revista de Investigación Clínica*, Septiembre- Octubre, 1996. **48**(5): 401-406.

[16] Innis and Gelfand, *Optimization of PCR's, Part One: Basic Metodology*.

[17] Titan One Tube RT-PCR Kit, *Instruction Manual, Version 4, January 2003*, Roche Applied Science, Germany. pp. 1-18.

[18] Expand Reverse Transcriptase, *Instruction Manual, Version 4, June 2002*, Roche Applied Science, Germany.

[19] Meléndez A., *Estudio molecular de la región variable de la proteína N del virus de la rabia en México*. Departamento de Microbiología. Laboratorio de producción y control de biológicos de la ENCB del IPN, México, 2001. pp. 11-16, 45-47, 53.

[20] Kissi, Tordo, Bourhy, *Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene*, *Virology*, 1995. **209**: 526-537.

[21] Promega Reverse Transcriptase Enzyme M-MLV, *Instruction Manual*, Promega Corporation, USA, 1997-2000.

[22] Inserto Quiagen, *Extracción para RNA por Columnas de intercambio iónico*

[23] ABI-PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits *Protocolo. Original and Version 2.0*, Applied Biosystems, USA, 09/2000.

[24] *Catalogo Roche*

APENDICE

ABREVIATURAS

AMV: Virus de la Mieloblastosis Aviar

cDNA: DNA complementario

ddNTP's: Dideoxynucleotidos

DNA: Acido desoxiribunucleico

dNTP's: Desoxynucleotidos trifosfatados

dTT: Dithiotreitol

EDTA: Ácido etilendiaminotetracético

G: Proteína G o Glicoproteína

g: Gravedades

IFD: Inmuno Fluorescencia Directa

M: Proteína Matriz

mm: Milímetros

mM: Milimolar

μM: Micromolar

M-MuVL: Virus de la Leucemia Murina-Moloney

N: Proteína N o Nucleoproteína

nc: Nucleocápside

ng: Nanogramos

NS: No estructural

nt: Nucleótidos

P: Proteína P o Fosfoproteína

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pmoles: Picomoles

rpm: Revoluciones por minuto

RNA: Ácido ribonucleico

RNAm: RNA mensajero

RT: Transcriptasa reversa

RT-PCR: Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa

TAE: Regulador Tris-acetatos EDTA

TBE: Regulador Tris-boratos EDTA

Taq: *Thermus aquaticus*

Tm: Temperatura de fusión

U: Unidades

UV: Luz ultravioleta

V: Volts

VSV: Virus de la estomatitis vesicular

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

Regulador de Tris-acetatos (TAE 10X): pesar 48.4 gr de tris base, medir en una probeta 11.4 mL de ácido acético glacial al 100% y 50 mL de EDTA (200mM, pH 8.0), en un vaso de precipitados adicionar 500mL de agua destilada y adicionar los demás reactivos hasta que se incorporen bien y aforar a 1 Lt.

EDTA 200 mM: disolver 37.22 gr de EDTA (ácido etilendiaminoteracético) y aforar a 500 mL con agua destilada hasta ajustar a pH 8.0.

Regulador de Tris-acetatos (TAE 1X): agregar 100 mL de TAE 10X en una probeta y aforar a 1 Lt con agua destilada.

Regulador de Tris-boratos (TBE 10X): pesar 54.0 gr de tris base y 27.5 gr de ácido bórico, agregar 50 mL de EDTA 200 mM y aforar a 500 mL con agua destilada.

Regulador de Tris-boratos (TBE1X): agregar 100 mL de TBE 10X en una probeta y aforar a 1 Lt con agua destilada.

Bromuro de etidio 10 mg/mL: disolver 100 mg de bromuro de etidio en 10 mL de agua destilada estéril. *Usar guantes y cubrebocas.

Agarosa al 2% con bromuro de etidio: pesar 2 mg de agarosa y en una probeta aforar a 100 mL con TAE 1 X.

Persulfato de amonio al 10%: pesar 1.0 gr de persulfato de amonio y aforar a 10 mL con agua destilada.

Marcador de peso molecular Φ X174 (1 μ g/ μ L): diluir 5 μ L del marcador en 20 μ L de colorante naranja de acridina.

Iniciador A5: 5' CTA CAA TGG ATG CCG AC 3' a una concentración de 50 pmoles/ μ L.

Iniciador A6: 5' GAG TCA CTC GAA TAT GTC 3' RC 3' GAC ATA TTC GAG TGA CTC 5' a una concentración de 50 pmoles/ μ L.

Iniciador A7: 5' GAC ATG TCC GGA AGA CTG G 3' a una concentración de 50 pmoles/ μ L.

Iniciador A8: 5' GTA TTG CCT CTC TAG CGG TG 3' RC 3' CA CCG CTA GAG AGG CAA TAC 5' a una concentración de 50 pmoles/ μ L.

Solución de etanol al 70%: medir 70 mL de alcohol absoluto y aforar a 100 mL con agua destilada.

Otros: dNTP's puros (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); ditiotreitól (DTT); cloroformo al 99%; isopropanol al 99%; etanol absoluto.