

0056243



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

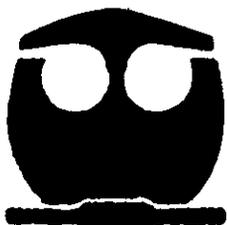
**FACULTAD DE QUIMICA**  
*División de Estudios de Posgrado*

**CLONACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LOS GENES DEL  
DOMINIO F<sub>0</sub> DEL OPERÓN ATP SINTASA Y DE LA  
RIBONUCLEASA HII DE *Brucella melitensis***

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**  
P R E S E N T A  
**RIGOBERTO HERNANDEZ CASTRO**

TUTOR PRINCIPAL: DR. ANTONIO VERDUGO RODRIGUEZ  
CO-TUTORES: DRA. CLARA INES ESPITIA PINZON  
DR. JOSE LUIS PUENTE GARCIA  
DR. LUIS SERVIN GONZALEZ

ASESOR TECNICO: ALFREDO SAHAGUN RUIZ



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D.F.

263970

1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Molecular del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, y en el Laboratorio del Grupo de Investigación en Brucelosis del Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad de Texas A&M.

El proyecto de investigación fue parcialmente financiado por los proyectos : PAPIIT-UNAM IN504695, CONACYT 3347PB, UNIVERSITY DEVELOPMENT LINKAGE PROJECT (UDLP) UNAM-Texas A&M University, CONACYT 3348PB.

Durante el desarrollo del trabajo el autor fue becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

## AGRADECIMIENTOS

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Microbiología Molecular,  
por todo su apoyo y ayuda incondicional.

A mi comité tutorial por todos sus consejos y sugerencias en el trayecto de esta  
investigación.

A mi jurado por todas sus críticas y tiempo dedicado en revisar este trabajo.

A la Dra. Amelia Farrés González-Saravia, por todo su tiempo, paciencia y  
consejos en esta etapa de mi formación.

To Faculty and staff of The Brucellosis Research Group, with special  
appreciation to Drs. Gary Adams, José A. Gutiérrez Pabello and Claire Kolenda  
for their invaluable guidance for the successful conclusion of my work.

## DEDICATORIA

### Tesis dedicada

A Oswaldo Hernández Castro, por que se que algún día nos volveremos a encontrar, descansa en paz hermano.

A mis padres y hermanos, por ser un ejemplo a seguir.

## RESUMEN

La brucelosis es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico que puede afectar a los animales domésticos y en el humano se constituye como una de las zoonosis bacterianas más importante en el mundo. Con el objetivo de aislar e identificar genes de *Brucella melitensis*, se construyó un banco genómico de *Brucella melitensis* 133, en el vector de expresión  $\lambda$  ZAP Express, en donde se utilizó un grupo de sueros de cabra positivos a *Brucella melitensis*, como sonda para seleccionar a las clonas recombinantes.

Se seleccionaron seis clonas y se subclonaron directamente mediante escisión *in vivo* en el plásmido pBK-CMV. Los plásmidos recombinantes fueron identificados como 41, 73, 101, 101C, 122 y 132.

Se secuenció el plásmido 101, que contenía un fragmento *EcoRI* de 4069 pares de bases. El análisis de secuencia reveló la presencia de seis marcos abiertos de lectura (MAL), los MAL I y V se encontraron en forma incompleta.

En dirección 3' se localizaron los MAL I, II, y III, los cuales mostraron una identidad del 48%, 36% y 36% respectivamente, con las subunidades a, b' y b del dominio F<sub>0</sub> del operón ATPsintasa de *Rhodospirillum rubrum* y el MAL IV, con una identidad del 51% con la subunidad c del dominio F<sub>0</sub> de *Rhodobacter capsulatus*.

El orden de las subunidades del dominio F<sub>0</sub> del operón ATPsintasa, mostró similitud con el de las equivalentes en *R. rubrum*, *R. capsulatus*, y *Synechococcus*, sin embargo, esta disposición fue diferente al compararla con la de *E. coli* y *B. subtilis*, en donde solo se encuentra un gene correspondiente a la subunidad b.

Por otra parte, se encontraron diferencias en relación al orden de los dominios presentes en el operón, debido a que los genes del dominio F<sub>0</sub> son precedidos por los genes del dominio F<sub>1</sub>, y en *Brucella melitensis*, solo se encontraron los genes del dominio F<sub>0</sub>, situación parecida a la de *Rhodopseudomonas blastica*, en donde el dominio F<sub>1</sub> se encuentra separado del dominio F<sub>0</sub>.

Por otra parte, en dirección 5', el MAL V mostró una identidad del 36% con una proteína hipotética de *Mycobacterium tuberculosis* y *Archaeoglobus fulgidus*. El perfil hidropático de este MAL, reveló 4 posibles regiones transmembranales.

En la misma dirección 5', el MAL VI, mostró una similitud del 42% con la ribonucleasa HII de *M. tuberculosis*.

La ribonucleasa HII se ha descrito en bacterias, parásitos y células de humano y de ratón, aunque existe poca información acerca de la estructura molecular y funciones de esta enzima.

## INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	9
III. OBJETIVOS	10
IV. MATERIALES Y METODOS	11
• Cepas bacterianas	11
• Extracción de ADN	12
• Construcción del Banco genómico	13
• Titulación del Banco genómico	13
• Sueros	14
• Selección de clonas	14
• Escisión <i>in vivo</i> del plásmido pBK-CMV	16
• Extracción de ADN de plásmidos	16
• Análisis de restricción	17
• Expresión de productos recombinantes	17
• Separación electroforética de proteínas	18
• Caracterización de productos recombinantes	18
• Purificación de plásmidos	19
• Secuencia de nucleótidos	20
V. RESULTADOS	23
• Construcción del banco genómico	23
• Titulación del banco genómico	27
• Selección de clonas recombinantes	27
• Escisión <i>in vivo</i> del fagémido pBK-CMV	28
• Expresión de productos recombinantes	33
• Análisis de secuencia de nucleótidos	33
• Número de acceso a la secuencia de nucleótidos	43
VI. DISCUSIÓN	44
VII. CONCLUSIONES	49
VIII. LITERATURA CITADA	50

## INTRODUCCIÓN

La brucelosis es una enfermedad infecciosa-contagiosa de curso crónico que afecta a los animales domésticos, animales silvestres y al hombre, siendo considerada una de las zoonosis bacterianas más importantes en el mundo. El reciente aislamiento de distintas cepas de *Brucella* a partir de mamíferos marinos ha extendido aún más su impacto ecológico (17).

La transmisión de la enfermedad se debe a la ingestión de leche no pasteurizada y otros productos lácteos, al contacto directo con tejidos de animales infectados o bien a la ingestión, inhalación o inyección accidental de cultivos de *Brucella*. Además de ser una zoonosis, su importancia radica en las graves pérdidas económicas que ocasiona a la industria ganadera, debido a una marcada disminución en la eficiencia reproductiva, abortos, crías débiles, baja en la producción láctea e infertilidad (34, 45, 48, 54, 59).

En 1995, el Sistema Nacional de Mercados<sup>1</sup> estimó la producción anual de carne de cabra en canal en 44, 494 toneladas, lo que representa un ingreso de \$ 497, 928, 000. 00 (M. N); así mismo, en ese año la producción de leche fue de 151, 144 miles de litros, lo que equivale a \$ 175, 327, 040. 00 (M. N). Por otra parte y tomando en consideración las pérdidas económicas por concepto de abortos, en el año de 1995, se cuantificaron 55, 620 abortos lo cual representa un costo de \$ 4, 626, 524. 00 (M. N).

*Brucella melitensis* es una bacteria Gram negativa e intracelular facultativa que causa aborto en cabras y borregas, además, en algunas áreas ha emergido como una causa de infección en bovinos, extendiendo así la posibilidad de infectar al humano (37).

La brucelosis causada por *Brucella melitensis* es considerada la zoonosis bacteriana más importante en el país por el elevado número de infecciones en el hombre, ocasionando un alto costo en el tratamiento, la pérdida de horas de trabajo, hospitalización y diagnóstico, llegando a causar la muerte si no se diagnostica con oportunidad.

---

<sup>1</sup> Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (NOM-022-SSA2-1994)

En México, en el año de 1996 se reportaron 3, 218 casos y para el año de 1997 se reportaron 3, 213 casos, siendo Guanajuato el estado con mayor incidencia con 636 casos, seguido de Coahuila con 340 casos y Sinaloa con 247 casos <sup>2</sup>.

El género *Brucella* consta de 6 especies clásicas: *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* y *B. neotomae*. Esta clasificación está hecha con base en la diferencia en la patogenicidad y preferencia por el hospedero; la diferenciación entre especies y biovariedades se realiza por pruebas diferenciales sobre la caracterización fenotípica de antígenos del lipopolisacárido (LPS), fagotipificación, sensibilidad a colorantes (tionina y fucsina básica), requerimiento de CO<sub>2</sub>, producción de H<sub>2</sub>S, producción de ureasa y propiedades metabólicas (37, 45, 54, 67).

Por otro lado, y con base en estudios moleculares sobre la subunidad 16S RNA, se ha propuesto una sola especie, *B. melitensis*, quedando como biovariedades las otras cinco especies clásicas. Este microorganismo pertenece a la subdivisión  $\alpha$ -2 de la clase proteobacteria, que incluye a bacterias púrpuras fotosintéticas y no fotosintéticas, además de bacterias intracelulares facultativas de plantas y animales. Asimismo, existe una estrecha relación filogenética del género *Brucella* con géneros como *Rochalimaea*, *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Ochrobactrum*. El genoma de *B. melitensis* tiene 58% de GC y posee 2 cromosomas, uno de 2, 100 Kb y otro de 1, 150 Kb (51,52).

## ANTÍGENOS DE BRUCELLA

Diversos antígenos relacionados con la patogenicidad, protección y diagnóstico han sido identificados en la membrana externa, el espacio periplásmico y el citoplasma.

La patogenicidad de este género está relacionada con la presencia de LPS; proteínas inducidas por estrés (GroEL, GroES, DnaK y HtrA) relacionadas con la sobrevivencia y colonización en macrófagos, además de monofosfatos de adenina y guanina que son inhibidores de la fusión fago-lisosoma; la activación y degranulación del sistema mieloperoxidasa y el factor de necrosis tumoral, así como, las enzimas superóxido dismutasa CuZn y eritrosa fosfato deshidrogenasa (13, 14, 26, 49, 66).

---

<sup>2</sup> Secretaría de Salud y el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

### **LIPOPOLISACÁRIDO (LPS)**

Puede estar presente como LPS liso (LPS-L), el cual contiene la cadena O completa (poli-N-formilpentosamina) o bien como LPS rugoso (LPS-R), el cual posee sólo remanentes de la cadena O. De las 6 especies de *Brucella*, cuatro de ellas, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae*, se aíslan en su forma lisa, mientras que dos (*B. ovis* y *B. canis*) solo se conocen en su forma rugosa y algunos presentan fenotipo mucoide. Es posible que colonias lisas pasen espontáneamente a ser rugosas y algunas rugosas puedan revertir a morfología lisa (17, 62).

### **PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA EXTERNA (PME)**

En la década de los 80s las PME de *Brucella* spp. identificadas mediante extracciones con detergentes, se clasificaban de acuerdo a su masa molecular como: PME del grupo 3, con peso molecular de 25-27 kDa y 31-34 kDa y PME (porinas) del grupo 2 con un peso de 36-38 kDa (11, 25, 30, 31, 32, 33, 47, 53).

Por otro lado, se han identificado proteínas minoritarias con pesos moleculares de 10, 16.5, 19, y 89 kDa. La proteína de 89 kDa es probablemente una PME del grupo 1, la cual ha sido descrita por otros autores como una proteína de 88 a 94 kDa (12, 25, 72).

Recientemente, estas proteínas se han caracterizado usando anticuerpos monoclonales y clonando los genes que las codifican, de tal forma que ahora, *Omp10*, *Omp16* y *Omp19* han sido identificadas como lipoproteínas; *Omp2a/Omp2b* con funciones de porina, *Omp25*, *Omp31* y *Omp1* ó proteína de 89 kDa del grupo 1 (15, 23, 32, 47, 57, 65, 68, 69, 74, 75).

### **PROTEÍNAS PERIPLÁSMICAS**

Varias proteínas periplásmicas inmunogénicas han sido descritas, tales como: BCSP31, superóxido dismutasa Cu-Zn y más recientemente la proteína BP26 previamente conocida como PME28. En particular, BP26/PME28 han despertado interés como antígeno de diagnóstico, ya que es inmunodominante en bovinos, ovinos y caprinos infectados (10, 46, 56, 57, 66).

## **PROTEÍNAS CITOPLÁSMICAS**

Esta última clase de proteínas inmunogénicas comprende a las proteínas de estrés GroEL, GroES, DnaK, CP24, HtrA; las proteínas ribosomales L7/L12; Ssb y UvrA, Bacterioferritina y proteínas de las que se desconoce su función llamadas p15, p17 y p39 (3, 8, 19, 20, 73, 77).

Se ha demostrado que algunas de estas proteínas, L7/L12, UvrA, GroEL y GroES pueden estimular la respuesta inmune celular de tipo Th1 con la producción de Interleucina-2 e Interferon- $\gamma$ . Las proteínas p15, p17 y p39 son de interés en el desarrollo de pruebas serológicas para el diagnóstico de la brucelosis (16, 70).

La función de las proteínas de *Brucella spp.* en la respuesta inmune no ha sido estudiada a profundidad. Este microorganismo es intracelular facultativo, por lo que la respuesta inmune está directamente relacionada con proteínas citoplásmicas y de superficie, dependiendo del procesamiento de la bacteria por el macrófago, además de su variabilidad entre especies y la capacidad de estimular la respuesta inmune humoral y celular (16).

## **IDENTIFICACIÓN DE GENES**

Aproximadamente 50 genes de *Brucella* han sido descritos y compilados en el banco de genes (*GenBank*). Algunos de éstos codifican para PME, factores de virulencia y moléculas específicas de diagnóstico. Además de otros genes cuyos productos están involucrados en procesos celulares como: proteasas (*htrA*) y chaperoninas (*dnaJ*, *dnaK*, *groEL* y *groES*).

## GENES DE BRUCELLA REPORTADOS EN EL GENBANK

GRUPO FUNCIONAL	DESIGNACIÓN GEN/PROTEÍNA
ENVOLTURA CELULAR	<i>omp1, 2a, 2b, 10, 19, 16A, 25, 28, bmp18, bp26, BA41, CP24, cdsA, lpxD, fabZ, lpxA, mepA</i>
PROCESOS CELULARES	<i>htrA, htra-like, dnaD, dnaJ, groEL, groES</i>
METABOLISMO ENERGÉTICO	GLK, GLUp, ERY
SÍNTESIS DE PURINAS	<i>purE, purK, purA</i>
FUNCIONES RESPIRATORIAS	<i>katE, sodC</i>
REPLICACIÓN	<i>recA, uvrA, adenil-metil-transferasa</i>
TRADUCCIÓN	16S dARN, 23S dARN
DESCONOCIDO	BCSP31, p39, ORFP17
SECUENCIAS REPETIDAS	IS711 (IS6501), Bru-RS1, Bru-RS2

Datos recopilados hasta el 5 de agosto de 1997 (38).

### DIAGNÓSTICO

Las pruebas serológicas son las herramientas más utilizadas para el diagnóstico de la brucelosis y tienen como base la detección de anticuerpos anti-LPS. Este antígeno es dominante tanto en cepas vacunales como en cepas de campo, por lo tanto, la diferenciación entre animales vacunados e infectados se dificulta.

Otro gran problema en el diagnóstico de la brucelosis son los resultados falsos-positivos en pruebas serológicas, ésto debido a la reactividad cruzada entre *Brucella* spp y especies de bacterias que también poseen componentes estructurales del LPS-L (18, 45).

Las técnicas convencionales para el diagnóstico de la brucelosis en cabras son la prueba de rosa de bengala y la fijación del complemento con detección de anticuerpos anti-LPS (22, 24). Otros métodos serológicos, propuestos para la diferenciación entre animales vacunados e infectados por cepas de campo son: inmunodifusión radial

utilizando un Poli B, que es un antígeno de LPS preparado inicialmente a partir de *B. melitensis*; una prueba de ELISA para ovinos utilizando como antígeno LPS-L de *B. melitensis* y un análisis mediante electro-inmunotransferencia para evaluar la respuesta humoral en borregos infectados con *Brucella* hacia PME de *B. ovis*.

Sin embargo, la prueba de inmunodifusión radial es poco sensible debido a que el Poli B se comporta como un glucano cíclico, que es serológicamente inactivo. Al mismo tiempo, las reacciones de precipitación observadas con sueros de ganado infectado se deben a la contaminación de las preparaciones del Poli B con la cadena O del LPS (5, 59, 64).

Por otra parte, utilizando técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se demostró que cepas de *Brucella* pueden ser distinguidas de acuerdo al patrón de bandas de su ADN amplificado (4, 29, 48). Asimismo, mediante un análisis de hibridación de ADN tipo "Southern blot", se observó que las biovariedades 1 y 3 de *B. melitensis* y *B. abortus*, *B. suis* bv 2 y *B. ovis*, pueden ser diferenciados entre sí (36). Además, se ha reportado que el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) puede usarse para tipificar especies del género *Brucella* (2, 13). Por otro lado, la purificación y caracterización de una proteína periplásmica de 20 kDa de *B. abortus*, se ha propuesto para el desarrollo de una prueba de diagnóstico de la brucelosis (79).

## PREVENCIÓN Y CONTROL

La brucelosis es una enfermedad de distribución mundial, sin embargo, en algunos países los programas de control y erradicación que se han aplicado han permitido su eliminación total, como es el caso de Inglaterra, Noruega, Suecia, Dinamarca y Finlandia; o bien reducir considerablemente su incidencia, como lo es Japón, Nueva Zelanda, Australia y Alemania (17).

Las vacunas más comúnmente usadas para combatir la brucelosis son las vacunas atenuadas derivadas de cepas silvestres de *Brucella* spp. La vacuna más utilizada para el ganado bovino es conocida como *B. abortus* cepa 19, proveniente de una cepa

virulenta aislada de leche de una vaca Yersey en 1923. La cepa 19 es poco virulenta para el ganado, sin embargo, la vacunación del ganado preñado puede provocar abortos que van del 1% al 2.5% en condiciones de campo (62).

Para el ganado ovino y caprino la cepa utilizada es conocida como *B. melitensis* Rev 1, que es una cepa atenuada originalmente a partir de una cepa virulenta. Esta vacuna retiene virulencia parcial, y dependiendo de la dosis administrada, puede provocar abortos con alta frecuencia. *B. melitensis* es un microorganismo liso que induce una respuesta serológica positiva, la cual interfiere con el diagnóstico (21).

Por lo anterior, se han empleado organismos rugosos para generar vacunas, tal es el caso de la vacuna *B. abortus* 45/20, cepa originalmente lisa que mediante 20 pases en cuyos derivó en morfología rugosa, la cual, desafortunadamente, cuando se utiliza como vacuna viva revierte a lisa, provocando una reacción positiva a la serología diagnóstica. Sin embargo, es un hecho que organismos rugosos tienen poca o ninguna habilidad para inducir anticuerpos en contra de la cadena O, además de producir una protección significativa contra la infección de *B. abortus* (55).

La cepa *B. abortus* RB51 es una cepa rugosa bastante estable. Esta vacuna derivada de la cepa 2308 fue producida mediante múltiples pases *in vitro* e *in vivo*. Debido a que posee pocos residuos de la cadena O, no es capaz de inducir anticuerpos detectables por las pruebas serológicas usadas en el diagnóstico de la brucelosis, sin importar edad, dosis o frecuencia de dosis. La inmunidad producida por esta cepa es similar o mejor que la inmunidad inducida por la cepa 19 (62, 80).

La cepa RB51 es la vacuna oficial en E.U.A. y está siendo introducida en México y Chile. Esta bacteria posee una mutación desconocida, aunque se piensa que la mutación es en el gene *rfbU*, el cual codifica para manosil transferasa, una enzima que es necesaria para ensamblar la cadena O del LPS. Otros investigadores han desarrollado cepas rugosas provocando mutaciones en el gene *rfbU*, estas "vacunas" son conocidas en *B. melitensis* como VBTRMI y en *B. suis*, VTRSI, las cuales aún están en fase de experimentación (76).

Por último, y usando tecnología de ADN recombinante, se han creado mutaciones en genes como *recA*, *sodC*, *htrA*, *feuPQ* y *purE*, tanto para generar vacunas, como para evaluar virulencia en células en cultivo y en modelos animales (26, 55).

En México, en el año de 1988 se publicó en el Diario Oficial de la Federación el acuerdo por medio del cual se establece la campaña de control y erradicación de la brucelosis con carácter de obligatorio y permanente. En el año de 1993 se instala la Comisión Nacional para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina y Brucelosis (CONETB), la cual propone una estrategia acorde a las necesidades actuales a nivel internacional (37).

Los esquemas de control y erradicación en el territorio nacional comprenden un programa combinado de vacunación, diagnóstico y sacrificio. El diagnóstico serológico de la brucelosis en caprinos, se basa en la prueba de tarjeta (aglutinación en placa) como tamiz y como prueba confirmatoria se recomienda fijación del complemento. Los pequeños rumiantes son vacunados con la cepa lisa atenuada *B. melitensis* Rev 1 (21, 59).

## **JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad es poca la información que se tiene acerca del genoma del género *Brucella*, aproximadamente 50 genes de *Brucella* han sido reportados en el *GenBank* y muchos de estos genes codifican para proteínas de la membrana externa, las cuales son estudiadas como antígenos de interés en el área de prevención y como agentes específicos en diagnóstico, así como, genes que codifican para productos involucrados en procesos celulares de mantenimiento.

Por lo anterior, es necesario reforzar la investigación en algunas áreas como patogénesis, metabolismo, regulación y transducción de señales del género *Brucella*.

**OBJETIVOS:**

**OBJETIVO GENERAL**

Aislamiento y secuenciación de genes de *Brucella melitensis*.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Aislamiento de clonas recombinantes a partir de un banco genómico de expresión de *B. melitensis*, mediante el uso de suero caprino positivo a *B. melitensis*.
2. Secuenciación y análisis del ADN clonado.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CEPAS BACTERIANAS

*Escherichia coli* XL1-blue MRF':  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}[F' \text{ proAB lac}^{\lambda} \Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^{\lambda}\text{)}]$  (Stratagene).

*Escherichia coli* XL0LR:  $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 \text{ endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac}[F' \text{ proAB lac}^{\lambda} \Delta M15 \text{ Tn10 (Tet}^{\lambda}\text{)}]$  Su<sup>-</sup>  $\lambda'$  (Stratagene).

*Brucella melitensis* 133. Cepa silvestre obtenida de una cabra con cuadro abortivo procedente del estado de Coahuila, México.

*Escherichia coli* XL1-blue fue crecida en caldo Luria-Bertani [10 g de NaCl (Merck), 10 g de triptona (Difco), 5 g de extracto de levadura (Merck), pH 7.0; se ajustó con agua deionizada a un litro y se esterilizó por autoclave] suplementado con maltosa al 0.2% (Merck) y MgSO<sub>4</sub> 10 mM (Baker) a 30°C con agitación orbital a 200 revoluciones por minuto [rpm] (New Brunswick Scientific G24). *Escherichia coli* XL0LR fue crecida en caldo Luria-Bertani (LB) sin suplementos, a 37°C con agitación orbital a 200 (rpm), cuando se requirió se adicionaron antibióticos [100 µg/ml de ampicilina (Sigma), 25 µg/ml de tetraciclina, 50 µg/ml de kanamicina (Sigma)]. Los cultivos de almacenamiento fueron preparados en caldo LB y 50% de glicerol (Sigma) y mantenidos a -80°C.

*Brucella melitensis*, cepa silvestre, fue crecida en agar Brucella (Difco), por 48 h a 37°C, el cultivo fue recolectado y colocado en una solución de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.1 mM (Merck), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9 mM (Merck), NaCl 154 mM (Merck) [PBS] e inactivado a 65°C por 1h en baño María (Fisher Scientific, Isotemp 51M). Una vez transcurrida la inactivación, se centrifugó a 4, 500 rpm (Jouan CR412, rotor 1117419) por 5 min y el paquete celular fue colocado en Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), ácido tetracético etilen-dinitrilo (EDTA) 1 mM (pH 8.0) (T:E) y almacenado a -80°C. Los cultivos de almacenamiento fueron preparados con leche descremada al 10% y mantenidos a -80°C.

### **EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE *Brucella melitensis***

El cultivo celular de *B. melitensis* fue lavado 2 veces en Tris-EDTA (pH 8.0), y resuspendido en la misma solución agregando lisozima (*Boehringer Mannheim*) a una concentración de 4 mg/ml e incubando a 37°C por 30 min. Se adicionó dodecil sulfato de sodio (SDS) a una concentración final del 1%, se incubó por 30 min a 37°C y se dejó mezclando por 10 min (*Adams Nutator*), posteriormente se adicionó RNAsa A (*Gibco, BRL*) a una concentración final de 50 µg/ml de una solución base de 10 mg/ml, a 37°C por 20 min.

Posteriormente, se agregó Proteinasa K (*Gibco, BRL*) a una concentración final de 100 µg/ml de una solución base de 20 mg/ml, a 50°C por 3 h, se agregó otra vez SDS (*Bio-Rad*) a una concentración final de 2% y se incubó a 50°C por 20 min. A esta mezcla se le agregó fenol (*Gibco, BRL*) a volúmenes iguales, mezclando lentamente por 10 min, se centrifugó a 10, 000 rpm (*Beckman J2-21, rotor JA-20*) por 30 min, tomando la fase acuosa para ser mezclado a volúmenes iguales, con fenol:cloroformo:alcohol isoamilico 25:24:1, y se centrifugó a 10, 000 rpm por 30 min.

Se tomó la fase acuosa, se mezcló a volúmenes iguales de cloroformo:alcohol isoamilico 24:1 y centrifugó a 10, 000 rpm por 30 min tomando la fase acuosa y se extrajo con éter, se evaporó y se agregó acetato de sodio 3 M (*J.T.Baker*) a una concentración final de 0.3 M. El ADN se precipitó al agregar 2-2.5 volúmenes de etanol absoluto frío (*Merck*) (58).

Posteriormente, se lavó con etanol al 70%, y se resuspendió en 100 µl de T:E, almacenándolo a -70°C hasta su uso.

La concentración de ADN se determinó por densidad óptica a 260 nm o bien en el gel de agarosa por comparación con el marcador de peso molecular, el fago λ digerido con *HindIII* (*Gibco, BRL*).

## CONSTRUCCIÓN DEL BANCO GENÓMICO

Al ADN de *B. melitensis* se le sometió a una digestión parcial con la enzima de restricción *EcoRI* (*Promega*) por 30 min a 37°C, utilizando diluciones décuples para generar fragmentos <2 kb, los cuales fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en una solución de Tris HCl/ácido bórico 45 mM, EDTA 10 mM (TBE), los fragmentos generados con la digestión con *EcoRI* se purificaron del gel utilizando cartuchos Glass Max® (*Gibco, BRL*). Los fragmentos de ADN se ligaron a los brazos del fago λ ZAP Express (*Stratagene*) a una proporción de 10:1 de inserto/vector. La ligazón de los insertos se realizó usando la enzima T4 ADN ligasa (*Promega*). Los sitios de inserción son únicos y están localizados en el gene *lacZ* de la β-galactosidasa (**Figura 1**). La inserción de ADN en esta región permitió la selección blanco/azul en placas con 5-Bromo-4-cloro-3-indol-β-D-Galactopiranosido [X-Gal (*Promega*)] por la inactivación del gene *lacZ* dentro del fago λ ZAP Express. El vector que contiene los fragmentos ligados fueron empacados *in vitro* utilizando el paquete comercial Gigapack® II Gold (*Stratagene*).

## TITULACIÓN DEL BANCO GENÓMICO

El banco genómico fue titulado en unidades formadoras de placa (UFP) para determinar el tamaño de la genoteca. Para calcular la probabilidad de que todos los genes de *B. melitensis* estuvieran representados en la genoteca, se utilizó la siguiente fórmula :

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

Donde:

P= probabilidad f= fracción del genoma en una clona recombinante

N= número de clones recombinantes

## SUEROS

Los sueros utilizados fueron proporcionados por el Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Los sueros positivos fueron obtenidos de tres cabras con infección natural a *B. melitensis*, confirmado por el aislamiento bacteriológico, asimismo, fueron positivos a las pruebas oficiales para la *brucelosis caprina*, aglutinación en placa y fijación de complemento, los sueros fueron marcados con los números 274, 373 y 397. Por otro lado, se utilizó un suero de cabra negativo a brucelosis, marcado con el número 8-49.

Los sueros fueron adsorbidos con *E. coli* XL1-blue de acuerdo al método descrito por Graber & Zingales (35). La cepa bacteriana fue inoculada en un litro de caldo LB a 37°C durante toda la noche con agitación orbital a 200 rpm. Posteriormente el cultivo se dividió en 2 muestras de 500 ml cada una, de las cuales, una muestra fue esterilizada por autoclave a 121°C por una hora, mientras que la otra muestra fue colocada en formaldehído al 0.5% (*Merck*) e incubada 2 h a 37°C con agitación orbital a 200 rpm. Las bacterias fueron mezcladas, centrifugadas 5, 000 x g por 10 min y lavadas dos veces con 200 ml de PBS. Las pastillas bacterianas fueron colocadas en 8 microtubos de 1.5 ml (*Sorenson*) y almacenadas a -80°C. Para la adsorción del suero, éste fue diluído 1:50 en PBS con albumina sérica bovina al 1% (*Sigma*). Cada pastilla bacteriana se resuspendió en 15 ml del suero diluído e incubado por 2 h a 4°C con agitación orbital de 100 rpm. Posteriormente, la solución se centrifugó a 5, 000 x g por 10 min y el sobrenadante fue transferido a otra pastilla bacteriana y el ciclo de adsorción fue repetido tres veces más. Después del último ciclo, el suero fue filtrado a través de una membrana de 0.22µm (*Millipore*) y almacenado a -80°C.

## SELECCIÓN DE CLONAS RECOMBINANTES

El banco genómico fue sembrado a un título de 50, 000 UFP en agar LB con sobre-agar NZY, sin X-gal e isopropil-β-D-tiogalactosido (IPTG). El fago λ ZAP Express recombinante fue adsorbido en *E. coli* XL1 azul, mediante incubación a 37°C por 20 min. La bacteria infectada con el fago λ se mezcló en sobre-agar (50°C) y colocó en

placas de agar LB, las cuales se incubaron a 42°C por 4 h hasta observar UFP de 1-2 mm de diámetro.

Previamente, se impregnaron membranas de nitrocelulosa (*Hybond-C, Amersham*) con IPTG 10 mM y se colocaron dentro de las placas para inducir la transcripción del gene de la  $\beta$ -galactosidasa y en consecuencia, la expresión de las proteínas fusionadas a  $\beta$ -galactosidasa, las cuales se unirían a la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa se incubó a 37°C por 4 h y se marcaron para saber la orientación de las placas después de la reacción antígeno-anticuerpo.

Las membranas se removieron suavemente y se sometieron a 2 lavados en Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.05 % (TBST), 5 min cada uno, y se agregó 1  $\mu$ l de lisado total de *B. melitensis* sobre un extremo de la membrana como control positivo para la inmunotransferencia. Los sitios activos en la membrana fueron bloqueados con 3% de gelatina (*Bio-Rad*) en TBST, se realizaron otros 2 lavados con TBST y las membranas se incubaron toda la noche a temperatura ambiente (TA) en 40 ml de suero de cabra positivo a *B. melitensis* y adsorbido con *E. coli*, asimismo, con suero negativo a *B. melitensis* y un control sin suero para el conjugado en TBST con 1% de gelatina (71).

Posteriormente, se lavaron 2 veces en TBST (5 min cada lavado). Las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de cabra conjugada a peroxidasa (*Pierce*) a una dilución de 1/2,000 en Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM (TBS) por 4 h. Después se realizaron dos lavados con TBST, de 5 min cada uno, y para el revelado se utilizó peróxido de hidrógeno (*Baker*) al 0.01%, 60 mg de 4-cloro-1-naftol (*Sigma*), 20 ml de metanol absoluto (*Merck*) y 100 ml de TBS.

Las clonas recombinantes con una señal positiva en la inmunotransferencia, fueron colectadas de las placas para su posterior caracterización. Las clonas seleccionadas se purificaron creciéndolas y seleccionándolas nuevamente hasta lograr un 100% de placas reaccionando positivamente.

### **ESCISIÓN *in vivo* DEL PLÁSMIDO pBK-CMV**

El vector de expresión contiene el fagémido pBK-CMV que puede ser liberado *in vivo* mediante co-infección de *E. coli* XL0LR con el fago recombinante seleccionado y el bacteriófago cooperador ExAssist™ (*Stratagene*). La presencia del episoma F' en las células *E. coli* XL0LR es esencial para la expresión del pili sexual, lo que permite la infección de la bacteria con el bacteriófago ExAssist, requerido para la liberación del plásmido pBK-CMV. Se tomaron las clonas de interés de la placa de agar y se transfirieron a una solución de NaCl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, Tris-HCl 1M (pH 7.5), 2% de gelatina y cloroformo (*Merck*), incubándose toda la noche a 4°C. Asimismo, se incubó la cepa *E. coli* XL1 azul en caldo LB suplementado con 2% de maltosa y MgSO<sub>4</sub> 10 mM y *E. coli* XL0LR, en caldo LB sin suplementos durante toda la noche a 30°C.

Posteriormente, se colocó *E. coli* XL1 azul crecida a una densidad óptica de 600, la clona recombinante a un título de >1X10<sup>5</sup> y el bacteriofago cooperador ExAssist a un título >1X10<sup>6</sup> pfu/μl, incubándose a 37°C por 15 min. Se adicionó caldo LB e incubó por 2.5 h a 37°C. Una vez concluida la incubación, la reacción se colocó a 70°C por 15 min y se centrifugó a 4, 000 x g por 15 min.

El sobrenadante contiene el fagémido pBK-CMV liberado, el cual fue colocado con *E. coli* XL0LR a una densidad óptica de 600, se incubó a 37°C por 15 min y se adicionó caldo LB incubándose a 37°C por 45 minutos adicionales. Posteriormente, fueron sembradas en agar LB-Kanamicina (50 μg/ml) y se incubaron toda la noche a 37°C. Las colonias que aparecieron en el agar contenían el fagémido pBK-CMV con el fragmento de ADN clonado.

### **EXTRACCIÓN DE ADN DE PLÁSMIDOS**

La lisis por álcali fue llevada a cabo por el método descrito previamente (58), *Escherichia coli* XL0LR conteniendo los plásmidos recombinantes, fue sembrada en 100 ml de caldo LB-Kanamicina (50 μg/ml) e incubada 24 h a 37°C. El cultivo se centrifugó a 5, 000 x g por 10 min a TA, el sobrenadante se removió y se dejó que la pastilla se secase lo más posible. La pastilla bacteriana fue resuspendida en 15 ml de

solución I a 4°C [glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8.0)], EDTA 10 mM (pH 8.0), se mezcló vigorosamente, hasta observar una mezcla homogénea, posteriormente se agregaron 15 ml de solución II (NaOH 0.2 N, SDS al 1%), se mezcló invirtiendo los tubos 5 veces y se almacenó en hielo.

Se adicionaron 15 ml de solución III a 4°C [acetato de potasio 5 M (*Baker*), 11.5% de ácido acético glacial (*Merck*)], se mezcló invirtiendo los tubos durante 10 seg, y se almacenó en hielo por 5 min.

Se centrifugó a 12, 000 x g por 5 min a 4°C, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se precipitó el ADN con 2 volúmenes de etanol al 100% a TA, se mezcló y dejó a TA por 2 min.

Se centrifugó a 12, 000 x g por 5 min a 4°C, se removió el sobrenadante por aspiración y se lavó la pastilla de ADN con un volumen de etanol al 70% a 4°C y se removió el sobrenadante dejando que la pastilla se seque por 10 min.

El ADN se resuspendió en 2 ml de TE (pH 8.0) conteniendo 20 µg/ml de RNAasa (*Sigma*), se mezcló suavemente y se almacenó a -20°C.

### **ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN**

Los plásmidos fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* (*Gibco, BRL*) para conocer el tamaño de los fragmentos clonados. Asimismo, los plásmidos se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRV*, *Sau3A* (*Boehringer Mannheim*), *HindIII* y *BamHI* (*Gibco, BRL*), para observar diferencias en el patrón de restricción de los fragmentos. El tiempo de digestión fue de 2 h a 37°C.

### **EXPRESIÓN DE LOS PRODUCTOS RECOMBINANTES**

*Escherichia coli* XL0LR conteniendo el plásmido pBK-CMV recombinante, *E. coli* XL0LR sin plásmido y *E. coli* XL0LR con plásmido sin inserto recombinante, fueron cultivadas en caldo LB-Kanamicina (*Sigma*), 50 µg/ml, e incubadas toda la noche a una temperatura de 30°C con agitación orbital (200 rpm). Posteriormente, se realizó una

dilución de 1:500 en medio LB-Kanamicina, se incubó por 3 h y se agregó IPTG 10 mM y se incubó a 30°C por 5-6 h con agitación orbital.

Las células fueron recuperadas por centrifugación a 12, 000 rpm por 5 min, la pastilla se lavó con  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10 mM (pH 7.2) a 12, 000 rpm por 2 min. La pastilla se resuspendió en la misma solución, se mezcló y sonicó (*Ultrasonic Homogenizer, Cole Parmer*) hasta que clarificó (50 W por 2 min con 6 intervalos de descanso de 10 seg), se centrifugó a 12, 000 rpm por 2 min a TA, se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se centrifugó a 12, 000 rpm por 30 min a 4°C. Se almacenó el sobrenadante (lisado soluble), la pastilla fué resuspendida en la misma solución conteniendo Tritón X-100 al 2% (*Boehringer Mannheim*) y se incubó por 30 min a 37°C.

La mezcla se centrifugó a 12, 000 rpm por 30 min a 4°C, 2 veces. Posteriormente, la pastilla se resuspendió en la misma solución. Tanto el lisado soluble como las PME fueron separadas en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), para evaluar la presencia de proteínas recombinantes, seguido por un análisis de "Western blot".

### **SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA DE PROTEÍNAS**

A las muestras se les agregó solución de Laemmli [25 mM Tris pH 6.8, SDS al 1%, mercaptoetanol al 1% (*Sigma*), glicerol al 15% (*Sigma*), azul de bromofenol al 0.005% (*Sigma*)] y se hirvieron por 3 min (44).

Las proteínas fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12% para determinar los pesos moleculares aproximados y el número de bandas principales que componen la muestra. La electroforesis se llevó a cabo a 100 volts de 45 a 60 min en una solución de 25 mM Tris, 192 mM glicina, SDS al 0.1%. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 (*Fluka*).

### **CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES**

Las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa con solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol) a 100 volts por 2.5 h. Después de la transferencia, los sitios activos restantes de la membrana fueron

bloqueados con 3% de gelatina en TBST, después de 2 ciclos de lavados (5 min cada uno), las membranas se cortaron en tiras y se incubaron con los sueros de cabra positivos a *B. melitensis* a una dilución de 1:300 en TBST durante toda la noche.

Los anticuerpos que no se encontraban firmemente unidos al antígeno fueron removidos mediante 3 lavados en TBST y tres más en TBS (5 min cada uno). Las membranas lavadas se incubaron durante 2 h con anticuerpos anti-IgG de cabra conjugados a peroxidasa (*Pierce*) a una dilución de 1/2,000 en TBS por 4 h, después de dos lavados con TBST se utilizó 0.01% de peróxido de hidrógeno (*Baker*) y 60 mg de 4-cloro-1-naftol (*Sigma*) como indicador de color para el revelado de los "Western blots" (71).

### **PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS**

La purificación de los plásmidos se llevó a cabo utilizando el sistema "Wizard Kit" (*Promega*) de acuerdo a las instrucciones descritas por el comerciante.

Se agregaron 10 ml de resina de purificación a la solución de ADN mezclando por agitación, se transfirió la solución de ADN y resina dentro de la columna, y se le sometió a vacío para que la mezcla quedara dentro de la columna, se adicionó solución de lavado y se aplicó vacío para que la solución de lavado pasara a través de la columna. Para lavar la columna se agregaron 5 ml de etanol al 80% y se aplicó vacío, dejando actuar el vacío por 1 min adicional.

Posteriormente, se insertó la columna en un tubo de 50 ml y se centrifugó a 2, 500 rpm (*Jouan CR 4 12 rotor 1117419*) por 5 min, se removió la columna y se desechó el tubo y el sobrenadante. Asimismo, se colocó la columna en sentido contrario a la fuente de vacío, se secó por completo la resina y se dejó actuar la fuente de vacío por 5 min adicionales. Se colocó la columna en un tubo de 50 ml, se agregaron 1.5 ml de agua destilada precalentada (70°C) por 1 minuto y se eluyó el agua de la columna por centrifugación a 2, 500 rpm por 5 min. Los plásmidos se almacenaron a 4°C.

## SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

La secuencia de ADN fue determinada por el método previamente descrito (60), de terminación en cadena-dideoxi, con 7-deazaGTP (*Amersham*) en lugar de dGTP para eliminar los problemas de compresión presentes por las regiones ricas en G+C. Se utilizó el paquete comercial de secuenciación T7 Sequenasa versión, 2. 0 (*Amersham*). Reacciones de secuenciación: Primero se desnaturalizó la doble cadena de ADN, utilizando 0.1 volúmenes de NaOH 2 M (*Baker*), EDTA 2 M (*Sigma*) y se incubó a 37°C de 10 a 30 min. Esta mezcla se neutralizó por adición de 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 4.5-5.5); posteriormente, el ADN se precipitó con 2.5 volúmenes de etanol (-70°C, 15 min). Después de lavar la pastilla con etanol al 70%, fue disuelta en agua destilada (*Gibco, BRL*).

Mezcla de alineamiento : se mezclaron de 3-5 µg de ADN, 2 µl de solución de reacción, 0.5-1 pmol de iniciadores M13 delantero (5'd[GTAAAACGACGGCCAGT]3'), M13 reverso (5'd[CAGGAAACAGCTATGAC]3') y se ajustó el volumen a 10 µl con agua destilada, se calentó la mezcla por 2 min a 65°C y se enfrió lentamente hasta 35°C, se cetrifugó y mantuvo en hielo.

Se marcaron 4 tubos con las letras G, A, T, C y se agregaron 2.5 µl de mezcla de terminación dGTP y mantuvo a TA, al mismo tiempo se realizó una dilución de la mezcla de marcaje y se precalentaron los tubos de terminación (G, A, T, C) a 37°C en baño María.

Reacción de marcaje : a la mezcla de alineamiento se le adicionó ditiotritol 0.1M, mezcla de marcaje diluída, ( $\alpha$ -<sup>35</sup>S) dATP y T7 secuenasa diluída, se mezcló e incubó a TA por 5 min.

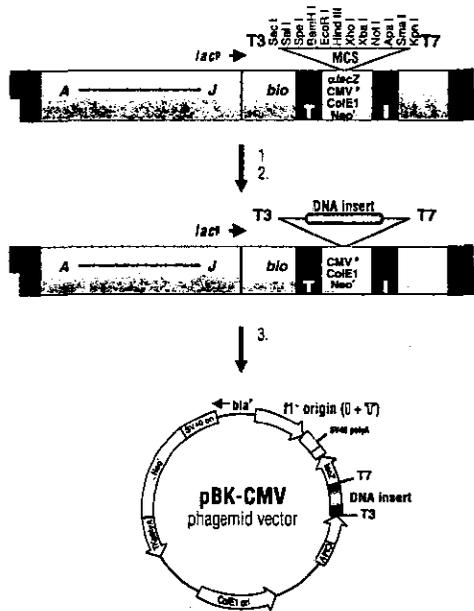
Reacciones de terminación : Se transfirieron 3.5 µl de la reacción de marcaje a cada tubo de terminación (G, A, T, C), se mezcló y se incubó a 37°C por 5 min, la reacción se detuvo adicionando 4 µl de formamida al 95%, EDTA 20 mM, 0.05% de azul de bromofenol y 0.05% de xilencianol FF.

Las muestras se calentaron a 75°C por 2 min, e inmediatamente se colocaron en geles de secuenciación al 6% (urea 7 M (*Gibco, BRL*), poliacrilamida 5.7 g (*Boehringer*

*Mannheim*), bis acrilamida 0.3 g (*Gibco, BRL*), 10 ml de TBE 10X, 40 ml agua destilada). El gel fue precalentado por media hora a 70 volts y posteriormente las muestras fueron colocadas a intervalos de media hora. El gel se corrió a 90 volts en una solución de TBE. Después del corrimiento, el gel fue colocado en papel filtro (*Whatman@ 3 mm*) y cubierto con plástico para su posterior secado (*Fisher Scientific FB GD 45*) a 80°C por 1 h y 15 min, el gel se colocó en un cassette y fue expuesto a una película radiográfica (*Bio Max MR-1, 35 X 43 cm, Kodak*) por 24 h y por último se reveló dicha película radiográfica.

El análisis de la secuencia de ADN y de aminoácidos, así como la búsqueda de los posibles MAL fueron realizados con los programas *MacVector (Macintosh)* y *DNAMAN 3.0 (Lynnon Biosoft)*.

La búsqueda de homologías fue realizada utilizando el sistema *BLASTX 2.0.3 (1)* del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).



**Figura 1. Esquema del fago  $\lambda$  ZAP Express<sup>®</sup> y del fagémido pBK-CMV. Sitio de inserción de ADN (1), aislamiento de clonas positivos (2), y liberación del fagémido pBK-CMV mediante co-infección con el fago filamentoso ExAssist<sup>™</sup> (3).**

## RESULTADOS

**CONSTRUCCIÓN DEL BANCO GENÓMICO:** Después de extraer y purificar el ADN de *Brucella melitensis* (Figura 2), éste fue parcialmente digerido con la enzima de restricción *EcoRI* a una concentración de 0.14 U/ $\mu$ g de ADN (Figura 3), la cual generó fragmentos de 2.5 a 7.5 kb (Figura 4) que fueron ligados al vector de expresión Lambda ZAP Express® (Figura 5).

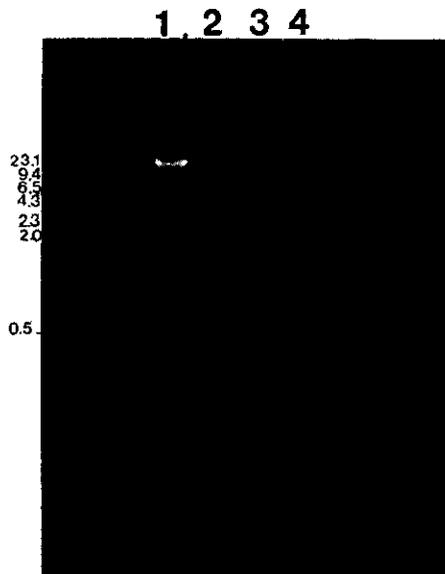
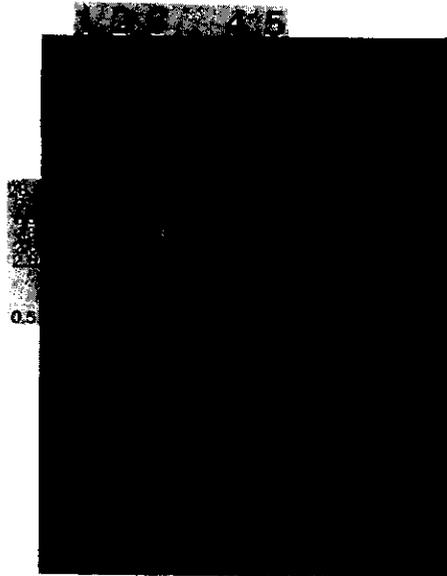


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. En los carriles del 2 al 4 se colocó ADN de *Brucella melitensis*. En el carril 1 se colocó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*.



**Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se muestra ADN de *Brucella melitensis* digerido parcialmente con *Sau3A* (carril 1 y 2) y con *EcoRI* (carriles 3 y 4). Las concentraciones de la enzima fueron 1 U/ $\mu$ g de ADN (carriles 1 y 3) y 0.14 U/ $\mu$ g de ADN (carriles 2 y 4).**



**Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se muestran diferentes digestiones del ADN de *Brucella melitensis*: Carril 3 (fragmentos de 2.5 a 7.5 Kb generados con *EcoRI*, carril 5 (fragmentos de 2.5 a 7.0 Kb generados con *EcoRI*), carril 2 (fragmentos de 2.3 a 7.3 Kb generados con *Sau3A*) y carril 4 (fragmentos de 2.5 a 7.5 Kb generados con *Sau3A*). Marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII* (carril 1).**



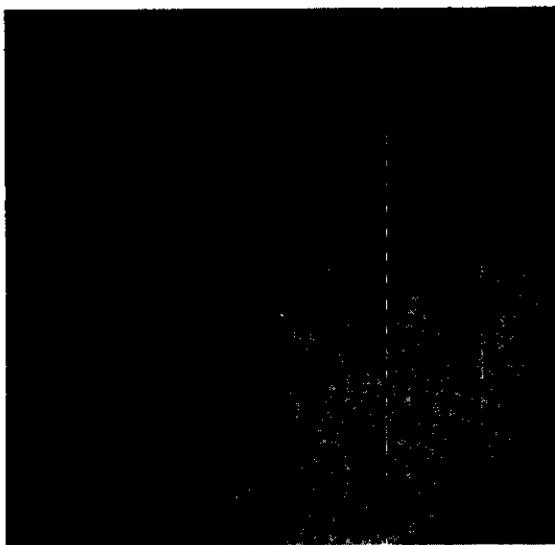
**Figura 5. Gel de agarosa al 1%. Donde se muestra el ligamiento de insertos de ADN de *B. melitensis* al Vector  $\lambda$  ZAP Express. Carril 1 (100 ng de ADN + 1  $\mu$ g/ml de Vector + 2 U/ $\mu$ l de T4 ADN ligasa), carril 2, concentración utilizada (300 ng de ADN + 1  $\mu$ g/ml de Vector + 2 U/ $\mu$ l de T4 ADN ligasa), carril 3 (300 ng de ADN + 2 U/ $\mu$ l de T4 ADN ligasa), carril 4 (400 ng de ADN + 1  $\mu$ g/ml de Vector + 2 U/ $\mu$ l de T4 ADN ligasa), carril 9 (Marcador de peso molecular  $\lambda$  HindIII).**

### TITULACIÓN DEL BANCO GENÓMICO

El banco genómico presentó un título de  $1.5 \times 10^7$  UFP por ml, de la biblioteca sin amplificar. Considerando que el tamaño del genoma de *B. melitensis* reportado es de  $3.3 \times 10^6$  pares de bases (52), y el tamaño promedio de los fragmentos clonados fue de 5 kb y utilizando el método descrito por Clarke *et al.* (1976) (9), se estimó que el banco genómico representa el 99% del genoma de *B. melitensis*.

### SELECCIÓN DE CLONAS RECOMBINANTES

El banco genómico fue analizado con un grupo de sueros de cabra positivos a *B. melitensis*, después de 5 selecciones se recuperaron 6 clonas recombinantes con base a ese grupo de sueros (**Figura 6**). Las clonas fueron denominadas con los números 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 respectivamente.



**Figura 6. Membrana de nitrocelulosa donde se observa la clona recombinante 10.1, después de 5 selecciones, utilizando como sonda sueros de cabra positivos a *Brucella melitensis* (↗).**

**\* (Control positivo, lisado total de *Brucella melitensis*).**

### ESCISIÓN *IN VIVO* DEL FAGÉMIDO pBK-CMV

Después de realizar la sub-clonación directa, mediante liberación del fagémido pBK-CMV, y liberar los fragmentos con la enzima de restricción *EcoRI*, se caracterizó el banco genómico en cuanto al tamaño de los insertos, cuyo promedio fue de 4kb aproximadamente (Figura 7).

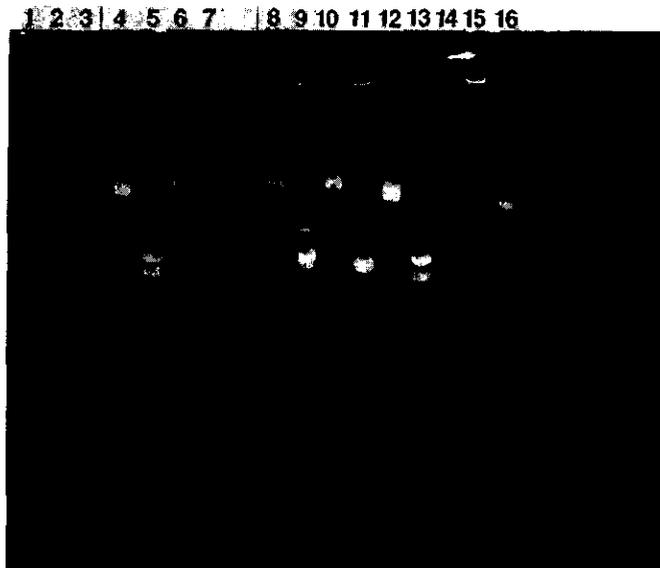


Figura 7. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión del plásmido pBK-CMV con la enzima de restricción *EcoRI*. En los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 se colocaron los plásmidos recombinantes 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 sin digerir, respectivamente. En los carriles 3, 5, 7, 9, 11 y 13 se colocaron los plásmidos recombinantes 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 digeridos, respectivamente. En los carriles 14 y 15 se colocó el plásmido pBK-CMV sin digerir y digerido, respectivamente. El marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII* se incluyó en los carriles 1 y 16.

Por otra parte, el análisis de restricción de las 6 clonas seleccionadas fue utilizando las enzimas de restricción *EcoRV*, *Sau3A* (Boehringer Mannheim), *HindIII* y *BamHI* (Gibco, BRL). El patrón de bandas que se observó en la digestión enzimática, mostró que las seis clonas fueron diferentes entre sí (Figura 8-11).

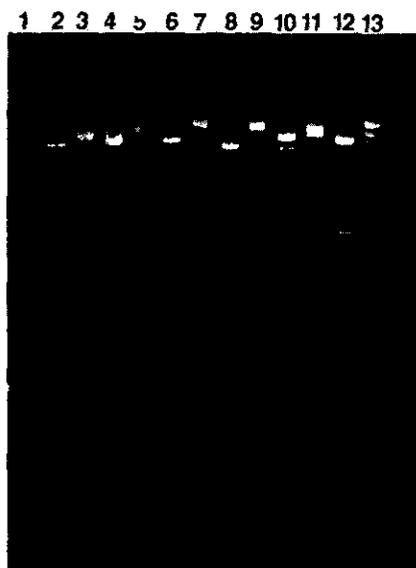
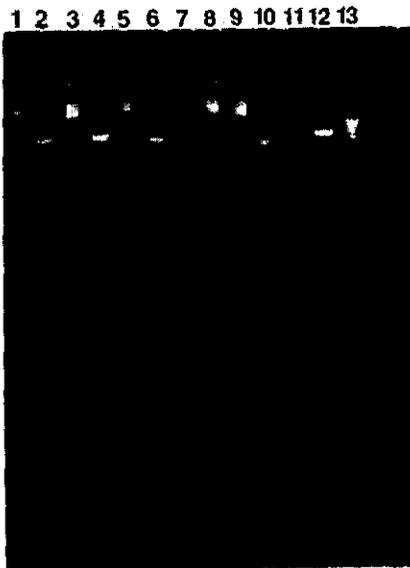
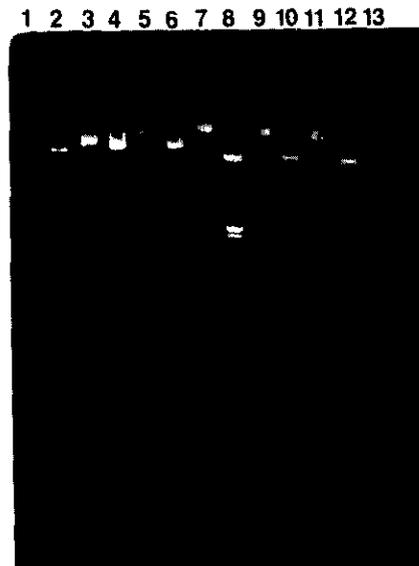


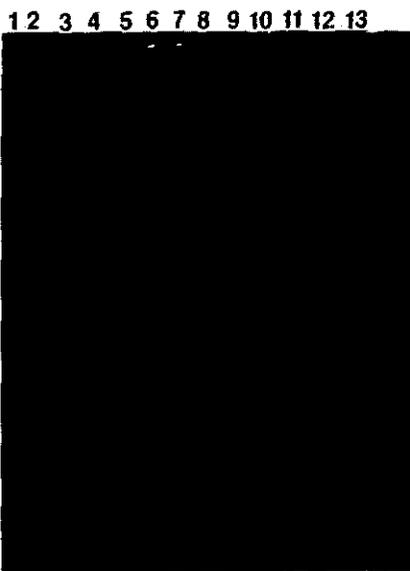
Figura 8. Gel de agarosa al 1% donde se observa la digestión enzimática con *BamHI* del plásmido pBK-CMV. En los carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11 se colocaron los plásmidos 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 sin digerir, mientras que en los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 se colocaron los plásmidos 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 digeridos, respectivamente. En el carril 13 se incluyó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*.



**Figura 9.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión enzimática con *EcoRV* del plásmido pBK-CMV. En los carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11 se colocaron los plásmidos 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 sin digerir. En los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 se colocaron los plásmidos 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 digeridos respectivamente. En el carril 13 se incluyó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*.



**Figura 10.** Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión enzimática con *HindIII* del plásmido pBK-CMV. En los carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11 se colocaron los plásmidos 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 sin digerir, mientras que en los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 se colocaron los plásmidos 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 digeridos respectivamente, en el carril 13 se incluyó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*.



**Figura 11. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la digestión enzimática con *Sau3A* del plásmido pBK-CMV. En los carriles 1, 3, 5, 7, 9 y 11 se colocaron los plásmidos 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 sin digerir. En los carriles 2, 4, 6, 8, 10 y 12 se colocaron los plásmidos 41, 73, 101, 101C, 122 y 132 digeridos respectivamente, en el carril 13 se incluyó el marcador de peso molecular  $\lambda$  *HindIII*.**

## EXPRESIÓN DE PRODUCTOS RECOMBINANTES

Después de realizar el protocolo de expresión de las clonas recombinantes en *E. coli* XL0LR, mediante la inducción con IPTG y analizar las PME y el lisado soluble en SDS-PAGE y "Western blot", no logró observarse la expresión de proteínas recombinantes.

## ANÁLISIS DE SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

Se eligió al azar al plásmido recombinante 101, el cual contenía un fragmento de *B. melitensis* de 4.069 Kb, dicho fragmento fue secuenciado diseñando iniciadores de afuera hacia adentro en ambos sentidos [Genosys, (Tabla 1)], el fragmento reveló 4 posibles marcos abiertos de lectura (MAL I-IV) en dirección 3' y 2 posibles MAL en dirección 5' (MAL V-VI) (Figuras 12 y 13).

**TABLA 1.** Iniciadores utilizados para secuenciar el fragmento de *B. melitensis*.

Sentido	Secuencia	Nucleotidos	%G-C	Temperatura
3'	CTTTTCGCCAACATGCTC	18	50%	57.9°C
5'	ATCCAGTGGGCATCGTTACC	20	55%	65.9°C
3'	CCTCTTCGCCGTCTAATC	18	55%	59.9°C
5'	GGATTATGATCGGGAATGG	19	53%	62.6°C
3'	CGTTCGGGCTTTTCTACC	18	55%	62.1°C
5'	AGTGGTGCTCGACCAGAAC	19	52.6%	63°C
3'	AAGAAGGAACTGGAAGAAGCCCGC	24	54.2%	68°C
5'	ATTCTAAAGCAAACGCCGCCCG	24	54.2%	72.7°C

En dirección 3' del fragmento se localizó un codón de término de la traducción (TGA) en la posición 547, hasta la segunda base del inicio del fragmento, mostrando el posible MAL I incompleto de 546 pares de bases (pb), que codifica para una proteína de 181 aminoácidos (aa). Comparando la secuencia de aa de este MAL con la base de datos del *GenBank*, mostró una identidad del 48% y una similitud del 82% con la bunidad A del dominio F<sub>0</sub> del operón ATPsintasa de *Rhodospirillum rubrum* (Figura 14).

En la misma dirección, se localizó un codón de inicio (ATG) en la posición 615 y el codón de término de la traducción (TAA), en la posición 842, revelando el posible MAL II de 224 pb que codifica para una proteína de 75 aa, así como, un posible sitio de unión a ribosoma (AGAAGG), 8 bases hacia arriba del codón de inicio. Este MAL mostró una identidad del 51% y una similitud del 85% con la subunidad C del dominio F<sub>0</sub> del operón ATPsintasa de *Rhodobacter capsulatus* (**Figura 15**).

Posteriormente, se observó un codón de inicio (ATG) en la posición 1012 y el codón de término de la traducción (TGA) en la posición 1638, mostrando el posible MAL III de 627 pb que codifica para una proteína de 208 aa, un posible sitio de unión a ribosoma (GGGGAA) se localizó 6 bases hacia arriba del codón de inicio. Este MAL mostró una identidad del 36% y una similitud del 70% con la subunidad B' del dominio F<sub>0</sub> del operón ATPsintasa de *Rhodospirillum rubrum* (**Figura 16**).

Asimismo, se localizó un codón de inicio (ATG), en la posición 1649 y el codón de término (TGA) en la posición 2132, mostrando el posible MAL IV de 483 pb que codifica para una proteína de 160 aa, el sitio de unión a ribosoma (GAGGAG) fue localizado 6 bases arriba del codón de inicio y 2 bases dentro del codón de término de la transcripción. Una región rica en G-C de simetría bivalente que pudiera funcionar como terminador de la transcripción fué localizada 18 bases hacia abajo del codón de término.

Este MAL mostró una identidad del 36% y una similitud del 66% con la subunidad B del dominio F<sub>0</sub> del operón ATPsintasa de *Rhodospirillum rubrum* (**Figura 17**).

Por otro lado, en la cadena 5' se localizó un codón de término de la traducción (TGA) en la posición 937 y comenzando en la segunda base del inicio del fragmento clonado, revelando el posible MAL V incompleto de 936 pb que codifica para una proteína de 311aa.

Este MAL incompleto mostró homología con una proteína hipotética de *Mycobacterium tuberculosis* y una proteína conservada de *Archaeoglobus fulgidus*, observándose una identidad del 36% y una similitud del 68%, para *M. tuberculosis* y una identidad del 35% y una similitud del 57% para *A. fulgidus* (**Figura 18**).

Finalmente, en el mismo sentido se localizó un codón de inicio en la posición 1154 (ATG) y el codón de término de la traducción (TAG) en la posición 1816, revelando el posible MAL VI de 663 pb que codifica para una proteína de 220 aa. Por otra parte, no se encontró un posible sitio de unión a ribosoma.

Comparando la secuencia de aminoácidos de este MAL con el banco de datos del GenBank, se encontró homología con una ribonucleasa HII de *Mycobacterium tuberculosis*, codificadas por el gene *rnhB*, observándose una identidad del 42% y una similitud del 65%. Por otra parte, se observó en éste MAL la presencia de tres motivos reportados anteriormente en *E. coli* y *Streptococcus pneumoniae* (78).

El motivo I, está constituido de 13 aa hidrofóbicos, 1 ácido aspártico, 1 ácido glutámico y 4 glicinas; el motivo II, por una secuencia DSK y el motivo III, por 5 aa hidrofóbicos, 2 dicarboxílicos, 2 básicos y 2 aa pequeños (A, G o S). Algunos de los residuos cargados positiva y negativamente, juegan un papel importante en el mecanismo hidrolítico de esta enzima. El motivo I se localizó del aa 35 al 56, el motivo II, del aa 66 al 77 y el motivo III del aa 147 al 168 (**Figura 19**).

1 CGTGGCGACA AGCCTGAGAG ATTCCGGCAGG GTCGAAGGGC ATGAAGTCTT TCCCTTTCGT  
1 V A T S L R D S A G S K G M K F F P F V  
61 CTTCTCGCTC TTCATGTTTCG TCCTCGTTGC CAATTTTCATC GGCCTGTTC CCTACTTCTA  
21 F S L F M F V L V A N F I G L F P Y F Y  
121 TACGGTGACG AGCCAGATCA TCCTGACCTT CGCACTGTCG CTTCTGGTCA TCGGTACGGT  
41 T V T S Q I I V T F A L S L L V I G T V  
181 CATCTTCTAC GGTTCCTTCA AGCAGCGCTT CGGCTTCTC AAGCTTTTCG TGCCAGCGG  
61 I F Y G F F K H G F G F L K L F V P S G  
241 CGTTCGGGGC ATCATCGTGC CGCTCGTCTT CCTGATTGAA ATCATCTCGT TCCTGTCCGG  
81 V P G I I V P L V V L I E I I S F L S R  
301 TCCGATCACC CTTTCGGTTC GTCTTTTCGC CAACATGCTC GCTGGCCACA TCACGCTCAA  
101 P I T L S V R L F A N M L A G H I T L K  
361 GTTTTCGGCC GGTTCCTGGG TTTTCGCTGAG CTCGCTGGC GCGCTGGCA TCGGTGGCG  
121 F S P G F V V S L S S L G A L G I G G A  
421 TGTTCTGCCG CTCCTGATGA CGGTTCCGAT CACGGCTCTC GAATTCCTGG TGCCCTTCTC  
141 V L P L L M T V A I T A L E F L V A F L  
481 CCAGGCATAT GTCTTTACCG TTCTCACCTG CATGTACATC AACGACGCTG GCATCCGGG  
161 Q A Y V F T V L T C M Y I N D A V H P G  
541 ACACTGAGTT CTAACCGCGC GGCACCGCC AGAAGTAAA TCCGGCCTTA TTTTCAATCC  
181 H -  
601 AGAAGGAGCT TAACATGGAA GCGGAAGCAG CAAAGTACAT CGGCGCCGGT CTCGCCCTGT  
1 M E A E A A K Y I G A G L A C  
661 TCGGTATGGC CGGTACGGCT CTCGGCCTCG GCAACATCTT CGGCCAATAC CTCCTCCGGC  
16 F G M A G T A L G L G N I F G Q Y L S G  
721 CTCTGCGCAA CCCGTCGCT GCTGACAGCC AGTTCCGGCCG TCTGGTGTTC GGTTCGCGC  
36 A L R N P S A A D S Q F G R L V F G F A  
781 TTACGGAAGC TCTGGGCATC TTCTCGCTGC TCATCGCGCT TCTGCTCCTC TTCGCGCTCT  
56 V T E A L G I F S L L I A L L L L F A V  
841 AATCAACGGT CGTTGAGACT GGCTGCCGCG AAGCAGCTTT GGGAAACCGG GCCGAAAGGT  
-  
901 CGTGTTCAT AAAGAAATGC AGACGCGGCT GGCCTTTGCA TATGACGCTT GAGTAAGGCA  
961 TGATCTTGTT CCAATCAGGT AAGATCAGGC TGGATTAAG GGGAATCTG GATGTTCTGT  
1 M F V  
1021 TCCACGGCGT TTGCCAAAC CGCCACC GAA TCGCAACCGG CATCTACTGC TGCGGAGCAC  
4 S T A F A Q T A T E S Q P A S T A G E H  
1081 GGCGCAGCCG ATGCTGTGCA CACCGAAACC GGGGTCCGCG ACGATGCCGG ACACGGCAGC  
24 G A A D A V H T E T G V A H D A G H G S  
1141 GGCCTATTCC CTCGGTTCGA TTCCACCCAT TAGCCCTCGC AGTTCCTCTG GCTCGCCATC  
44 G V F P P F D S T H Y A S Q V L W L A I  
1201 ACGTTCGGGC TTTTCTACTT ATTCTGTGCG CGCGTGGTTC TGCCGCGTAT CGGCGCGGTG  
64 T F G L F Y L F L S R V V L P R I G G V  
1261 ATCGAAACCC GCCGCGACC CATCGCCAG GATCTGGAGC AGGCTGCCGG TCTGAAGCAG  
84 I E T R R D R I A Q D L E Q A A R L K Q  
1321 GATGCCGACA ACGCCATCGC CGCTPATGAG CAGGAACTGG CCCAGGCCCG CAGCAAGGCT  
104 D A D N A I A A Y E Q E L A Q A R S K A  
1381 GCTTCAATCG CAGAAGCCGC CCGCGAAAAG GGCAAGGGCG AAGCGGATGC CGAACCGGCT  
124 A S I A E A R E K G K G E A D A E R A  
1441 TCCGCCGAGG CCGTTCGGA AAGCAAGCTC AAGGAAGCCG AAGAGCGTAT TGCTGCGATC  
144 S A E A V L E S K L K E A E E R I A A I  
1501 AAGCCAAAGG CCATGAGCGA CGTCCGCAAT ATCCCGGAGG AAACCATGGC AAGCATGCTC  
164 K A K A M S D V G N I A E E T M A T I V  
1561 GAACAGCTTC TGGGCTGAC GGCTGACAAG GCTTCTGTTT CGGAAGCCGT CAAGGCCATC  
184 E Q L G L T A D K A S V S E A V K A I  
1621 CGGCGCTCGA AGCCTGAGG AGAGGACAAT GGACGCAACA TTCTGGGCAT TTATTGCTCT  
204 R A S N A - M D A T F W A F I A L

1681 CGTCATCTTC GTTGCCATCG TGGTTTACAT GAAGGTTCCG GGCATGATCG GACGCACGCT  
12 V I F V A I V V Y M K V P G M I G R T L  
1741 CGATGAGCGC GCGGACCGTA TCAAGAAGGA ACTGGAAGAA GCCCGCACAT TGCCTGAGGA  
32 D E R A D R I K K E L E E A R T L R E E  
1801 AAGCCAGCA ATTCTGGCC CGAATATCAT CGCAAGCGCA AGGAAGCCCG AAAAGGAAGC  
52 S P A I A G P N I I A S A R K P E K E A  
1861 AGGCGATATC GTCGCTTCCG CCGAGCGTGA AGCAAAGGCT CTCTGGGAG AGGCCAAGGG  
72 G D I V A S A E R E A K A L L E E A K R  
1921 TCGCAGCGAA GAATATGTCG CTCGCCGCAA CAAGCTCGCC GAGCAGAAGA TCGCAACGGC  
92 A T E E Y V A R R N K L A E Q K I A T A  
1981 TGAAACCGAT GCCATTAATG CCGTACGCGC TTCCGCTGTC GATCTGGCGG TTGCTGCTGC  
112 E T D A I N A V R A S A V D L A V A A A  
2041 TGGCAGCATC CTTGCCGAAA AGTTCGATGC CAAGGCAGCC GGAACCTGT TCAATGACGC  
132 G S I L A E K V D A K A A F N D A  
2101 TCTTGCTCAG GTGAAGTCGC ACCTGAACTG ACATCACCTT ACAAGATATC ATGAAACTCC  
152 L A Q V K S H L N -  
2161 GCCCTTATCG GGGCGCGCTT TTGCTTTAGA ATAAGCTTGA TAAACGAAT AGTTAGAGCG  
  
2221 GTTCCGGTTA AAATGGAATC GCTGGAACCG CTGATTGTCA GCTTCGCGG AAACCTAGCCA  
220 - C D F R G K I P  
2281 CGCTTACATA TCGCTACTTC TGGCCTTGC CCGGGAAGCG AAAGTTACCG GCGCGCCACA  
212 A F T Y R H L G P V P G E S E I A A R R H  
2341 AAAACCCACC GTATCGGCCG TACCTAAGG TCGGGTATTC CGCCTACCGG CCGCGGTCCG  
192 K Q T A Y G A H I E L G Y P P H A A G A  
2401 GCCTAGTAGT ACGCCAGAGC ACGTGGAAC CGGTGTATC TGGCCCGCGG TTAGCTCTGC  
172 R I M M R D R T V K A V I S A A A I S V  
2461 CTTGCGACTA GCGGAAAGTG GTCTCGGCTT GGCCCGCTCC CGTCCGCGCC TCCGTGCAGG  
152 S R Q D G K V L A S G P C P L G P P V D  
2521 GCGGCGAGCT GGTGCGTAC CGTACCGAAC TCGCAGTCCG GCTACTCGCG CGCCGCGTAC  
132 R G D V L A H C P K L T L G I V A R R M  
2581 CGGAGTTCAC GCGGGAACCG CTATAGCGAC CGCAGCTATG ACGCCCGCGA CTCCGAACGG  
112 A E L A A K R I D S A D I S R A S L S A  
2641 TGGCTTTGGC ACTAGCGGAA CCACTCTTAC TAAAGTATT CGCGAAGCGC GGAACGCCGA  
92 V S V T I A K T L I I E Y L A E R R A A  
2701 CACTCGCGGA ACCTTAGCAG GTCGGGAAGC CCTTCTAGCA AGACCAGCTC GTGGTGACGG  
72 T L R K S D D L G E P L D N Q D L V V A  
2761 CGCCGCTGCT GCGCGGCGG GTTCCCGCGC GCGGGTCGGA GCAGTTACGG GCGTTATACA  
52 A A V V P G A L P G R G A E D I G A I H  
2821 AAGTCCGGCG CGAAGTACTC GACGACGAGA ACACTTTTTA GTCGCGCTC CCTTCTAGC  
32 K L G R K M L Q Q E Q S F D P A L P L D  
2881 TTCTCTTCGC CTCTTAGTCT TCGGCTCGCA AAGTAAACCG CCGCTACGAG CGTAACGAAG  
12 F L L P S D S A S R K M  
2941 GTTAAGAGGC GTTCCGGGGA CGGGATCCTA CCACCGCATT TTCGTCCAC GGATAGCGCG  
3001 GCTTCCCTGT CAGTCCGCTT TTGTCTCGAA TTAAGCTGGC CTCACCTTGC ACGAGGTTCA  
3061 CATCGGCCCC TTTTGGGGCT TTCATAGCCC TAGTTTTATC GCTTTCGACA AAAGCGGAA  
3121 AGACCTACCC GAGTTTGTCC AGCCACGCGT CCGGCTCGGC GACCCACAAC TTCGGCTCGA  
311 - V P R H A P A A P H Q L R A  
3181 ACGCGCGCGC CTAGATPTC GCGCGCGCT AGACGGTCCG TATCCCGGA TGGCCGCTAT  
296 Q A R R D R L P P R D A L C L A T G R M  
3241 GCGAACGGG TAAGGCGTAG TATTAGGAAC GGCAGCGCT ACCTCGCATG GTCGCTGTAC  
276 R K G W E A D Y D K G D R M S R V L S M  
3301 TGTACCGCCA TTGCCAGGCC CATCAACGCG TCCTCGGTCA GGAACCTTCT GCGCGGTGA  
256 V H R Y R D P Y N R L L W D K F L P A V  
3361 AGGTCGCGT CCTCGTGTAT CGGACGGAGC GCGCGTGAA CCGTATCCG ACGTAGGCT  
236 E L P L L V Y G A E R A G Q A Y A A D L

```

3421 TACGCAAGAT AGAGCACCAG CAACTACGGC CCTTACTGAC CAGGGTAGTA GTGGCTTCGC
216 I R E I E H D N I G P I V P G M M V S A
3481 CCTTACGGGC GTAGCCTACT GGACGCCTAC CGAACGTCGC CTTCCGAGCC ACAGCTCCGC
196 P I G A D T L R R I A Q L R L S P T S A
3541 GCGCCAAGGT ACCACGGCGC GTCTACACGC AGCTCGCAAC AGTGGCTTTC GCGGTGGAAC
176 R P E M T R A L H A D L T T V S L A V K
3601 CGCTCGGGGA AAAGTGCCTA CGCCGAGTTA TACAGCTATA GCGCGTGGTG CTCGCGGCTA
156 A L G K E R M R S L I D I D R V V L A S
3661 AACCATTGCT ACGGGTGACC TACTAACCGA CGGAGGTCGT GAAGCTCTTA AAGTGCCTAC
136 K T V I G V P H N A A E L V E L I E R M
3721 TACGCGGTAA AGAAGAGCTG ACCGACTATT CCTAGCCATA ACCACGGTTA CCGCTAACAG
116 I R W K K E V P Q Y P D T N T G I A I T
3781 AAACCGACTA TCGGCCCGGA CCGTTCGAGC GCAAGGTCTT CCGCGCCCGG CAGGCCGAAC
96 K P Q Y G P R A L E R E L R P A D P K
3841 CGCTTCTCCG CCCAAAGTTT TAGCTCTGGC CGCCTTCCG GGTATATCGA TACCCACCCG
76 A F L R T E F D L G A S L G M Y S H T P
3901 GCCCGCTTTG TTATCTACGT CGGTACAAGC GTCGGCGCTA TCCCTAACTA CCTCGCCAGC
56 R A F C Y I C G H E C G R Y P N I S R D
3961 TTCCTTTATA GCTCTCTTAG TAACGCACAC TACTACCACG CGCCGAAGAG CTAGACATGC
36 F S I D L S D N R T I I T R P K E I Q V
4021 AGCCAGAACT TACGTCCGTC GAGAAGGTCG CACCGGGTCG GTAGCAGC
16 D T K F A P L E E L T A W G D D

```

Figura 12. Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos del fragmento clonado de *Brucella melitensis*, sitio de unión a ribosoma (==), terminador transcripcional tipo rho-independiente (→ ←), sitio de corte *HindIII* (—), *EcoRV* (-----), *EagI*, *Eco521*, *XmaIII* (.....), *EcoRI* (cursivas).

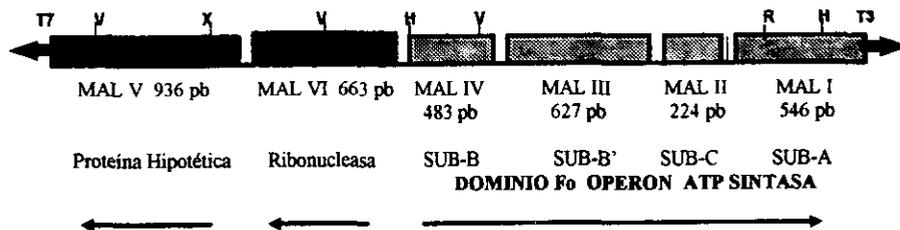


Figura 13. Localización y orientación de los MAL clonados en el plásmido 101. Dirección de la transcripción (← →), sitios de corte de enzimas de restricción *EcoRV* (V), *HindIII* (H), *EcoRI* (R), *XmaIII*, *EagI* y *Eco521* (X), promotores T7 (←) y T3 (→).



```

A  ASTAGEHGAADAVHTETGVVAHDAGHSGVFPFDSTHYASQVLWLAITFGLFYLFLSRVV
      : : . . : : : : . . . . . : : . . . .
B  MPQFDPSSEFSSQIVWLVLVIALVAMYFVMSRLA
      10          20          30

      80          90          100          110          120          130
A  LPRIGGVIETRRDRIAQDLEQAARLKQDADNAIAAYEQELAQARSKAASIAEAAAREKGGK
      . . . . . : : . . : : : : : : : : . . . . . : : : : : . . . . .
B  IPRLAEVLEQRQRLINDDLKQAEALKAETEAATAAYETALAEARARAHDEIRAVTEAAAK
      40          50          60          70          80          90

      140          150          160          170          180          190
A  EADAERASAEAVLESKLEAEERIAAIKAKAMSDVGNIAEETMATIVEQLLGLTADKASV
      . : : . . . . . : : : : : : : : . . . . . : : : : : . . . . .
B  AAEARNAEVAKALNTRIKDGEARIVQARDEALTHVREVAGAVASDIVGKLAGLRVDDAAL
      100          110          120          130          140          150
A  SEAVKAIASNA
      . : : .
B  TAAVAAAIKE

```

Identidad= 36.5% Similitud= 70.5% Similaridad= . Identidad: :  
A: *Brucella melitensis* B: *Rhodospirillum rubrum*

**Figura 16. Alineamiento de secuencia de aminoácidos entre el MALIII y la subunidad B' del dominio F<sub>0</sub> del Operón ATPsintasa de *Rhodospirillum rubrum*.**

```

A  MDATFWAFIALVIFVAIVVVMKVPGMIGRTLDERAD
      : : : . . . . . : : : . . . : : : : :
B  MISLALAAETAEHGGEAASHGGLFADPAFWVSIAPFLMVVGFV-YIKARNKILGALDGRGA
      10          20          30          40          50

      40          50          60          70          80          90
A  RIKKELEEARTLREESPAIAGPNIIASARKEPEKEAGDIVASAEREAKALLEEAKRATEEY
      . : : : : : : : . . . . . : : : : : . . . . . : : : : : . . . . .
B  AVKAKLDEARKLRDDAQLLA-EYQRRQRDAMKEADEIIRHAKDEAARLRAKAEADLEAS
      60          70          80          90          100          110

      100          110          120          130          140          150
A  VARRNKLAEQKIATAETDAINAVRASAVDLAVAAAGSILA EKVDAAKAGN-LFNDALAQV
      . : : . . . : : : : : . . : : : : : : : : . . : : : : : : : : . . . . .
B  IRRREQQAVDRIAQAEQAALQVRNEAVDVAVSAARSLMAGSL-AKADQNRLIDAAIADL
      120          130          140          150          160          170
A  KSHLN
      . . . .
B  PGKLN

```

Identidad= 36.8% Similitud= 66.8% Similaridad= . Identidad: :  
A: *Brucella melitensis* B: *Rhodospirillum rubrum*

**Figura 17. Alineamiento de secuencia de aminoácidos entre el MAL IV y la subunidad B del dominio F<sub>0</sub> del Operón ATPsintasa de *Rhodospirillum rubrum*.**

```

      10      20      30      40      50      60
A WATLEELPAFKTDVQIEKPRTIITRNDSLDISFDRSINPYRGCEHGCIYCFARPTHSYMG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
B RSVRAPQFDGITHFEVLCKSALNKVPNAAALPFRYTVNGYRGCSHACRYCFARPTHEYLD
      30      40      50      60      70      80

      70      80      90      100      110      120
A LSAGLDFETRLFAKPDAPRLLERELARPGYQPKTIAIGTNTDPYQPVEKKWRIMREILEV
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
B ENPGTDFDTQVVVKTNVAAVLRHELRRPSWRRETVALGTNTDPYQRAEGRYALMPGIIGA
      90      100      110      120      130      140

      130      140      150      160      170      180
A LEAANHPVGIIVTKSALVVRRIDILSRMREKGLAKVALSVTTLDAHLARTMEPRASTPSLR
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
B LAASGTPLSILTRKGTLLRRDLPLIAEAAQQVPVSVAVSLAVGDFELHRDVESGTPTPQAR
      150      160      170      180      190      200

      190      200      210      220      230
A LQAIRRLTDAGIPASVMMGPVIPGIND--HEIERILDAAYAQQGAREAGYVLLPLEVAP--
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
B LALITAIRAAGLDCHVMVAPVLPQLTDSGEHLDQLLQIAAAGATGTVTFGLHLRGSTRG
      210      220      230      240      250      260
      240      250      260      270      280      290
A LFKDWLLRNYPD---RYRHVMSLVRSMRDGKDYDAEWGKRMRGTALCLADRPPLRDRRAQ
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
B WFMCWLARAHPELVSRYSRELYRRGPYLPSPSYREMLRERVAPLIAKYRLAGDHRPAPPETE
      270      280      290      300      310      320

```

Identidad = 36.08%    Similitud = 68.2%  
 Similaridad :-      Identidad ::  
 A : *Brucella melitensis*    B : *Mycobacterium tuberculosis*

**Figura 18. Alineamiento de secuencia de aminoácidos entre el MAL V y una proteína hipotética de *Mycobacterium tuberculosis*.**

```

      10      20      30      40      50
A MKRSASDSPLFLDLPLAPDFSQEQQLMKRGLKHIAGIDEAGRGLAGPVVAAAVLDQN
      .. : . : : ..... : : : .
B MTKTWPPRTVIRKSGGLRGMRTLESALHRGGLGPVAGVDEVGRGACAGPLVVAACVLGPG
      10      20      30      40      50      60

      60      70      80      90      100     110
A DLP--EGLDDSKRLTAAAREALYEIILTKAITVSVASLSARSIDASDIRKAALEAMRRAV
      ..... : : . : : .. : . . : : .. : .....
B RIASLAALDDSKLSEQAREKLFPLICRYAVAYHVVFIPSAEVDRRGVHVANIEGMRRAV
      70      80      90      100     110     120

      120     130     140     150     160     170
A IGLTLKPCHALVDGRDVPVPGGLPCPGSALVKGDQRSVIAAASIVAKVTRDRMMIRAGAAH
      ..... : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
B AGLAVRPGYVLSDFRVP--GLPMPSPVIGGDAAAACIAAASVLAKVSRDRVMVALDADH
      130     140     150     160     170

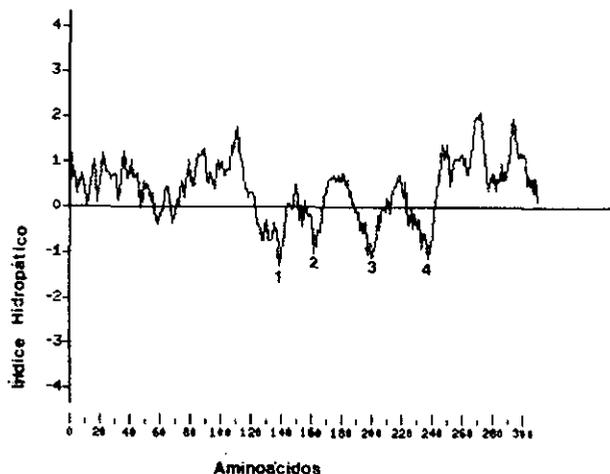
      180     190     200     210     220
A PPYGLEIHAGYATQKHRAAIESEGVPVGLHRYTFAPIKGRFDC
      : : . : : : : : : : : : : : : :
B PGYGF AEHKGYSTPAHSRALARLGPCPQ-HRYSFINVRRVAGSNTAEVADGQDPDRDGT
      180     190     200     210     220     230

B AQTGEGRWSKSSHPATMRATGRAQGT
      240     250     260

```

Identidad = 42.5%    Similitud = 65.1%  
 Similaridad :    Identidad : :  
 A : *Brucella melitensis*  
 B : *Mycobacterium tuberculosis*

**Figura 19. Alineamiento de secuencia de aminoácidos entre el MAL VI y una Ribonucleasa HII de *Mycobacterium tuberculosis*. Motivos I, II y III (negritas).**



**Gráfica 1. Perfil hidropático de la secuencia de aminoácidos del MAL V de *B. melitensis*. Posibles segmentos transmembranales (1-4).**

#### **NÚMERO DE ACCESO A LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS**

La secuencia de nucleótidos del fragmento de *B. melitensis* clonado en el plásmido 101 fue depositada en el banco de genes (*GenBank*) bajo los números de acceso: AF054609 (*dominio F<sub>0</sub> del operón ATPsintasa*), AF054610 (*ribonucleasa HIII*) y AF059568 (*proteína hipotética*).

## DISCUSIÓN

El genoma del género *Brucella* ha sido poco estudiado y las líneas de investigación tienen como base la búsqueda de antígenos de interés en el diagnóstico y la prevención de la enfermedad. Por otra parte, no se han aislado y caracterizado mutantes nutricias, esto debido al crecimiento difícil de la bacteria y a la dificultad en estudiar su estricto metabolismo aerobio, aunado a que no se cuenta con información acerca de la fosforilación oxidativa de *Brucella*.

Con el objetivo de encontrar antígenos de *Brucella melitensis* que reaccionaran contra sueros de cabra positivos a *Brucella*, se construyó un banco genómico de *B. melitensis* 133 en el vector de expresión Lambda ZAP Express®.

De las seis clonas seleccionadas con base en su reactividad al conjunto de sueros utilizados como sonda, se tomó al azar una clona con un fragmento *EcoRI* de 4069 pb, la cual fue subclonada en el plásmido pBK-CMV dando como resultado el plásmido 101.

Al realizar la secuencia en dirección 3' se localizaron 4 MAL (I-IV), los cuales mostraron identidades del 48%, 51%, 36% y 36% con la secuencia de aminoácidos de las subunidades a, c, b' y b, respectivamente, del dominio F<sub>0</sub> del operón ATPsintasa de *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodobacter capsulatus* (27).

El operón ATPsintasa de diferentes microorganismos posee dos sectores que son estructural y funcionalmente distintos : el F<sub>1</sub> que es extrínseco a la membrana interna y el F<sub>0</sub>, intrínseco de la membrana interna. En *E.coli* y *B. subtilis* el sector F<sub>1</sub> consta de 5 subunidades,  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  ; codificadas por los genes *atpHAGDC* respectivamente, el dominio F<sub>0</sub> consiste en tres subunidades, a, b<sub>2</sub>, c<sub>10-12</sub>, codificadas por los genes *atpBEF*, respectivamente. En este sector se encuentra también el gen *atpI*, que codifica para una proteína transmembranal, pero que no es estructural del dominio y su función es desconocida (28, 61).

La región  $F_1$  contiene 3 sitios catalíticos en la subunidad  $\beta$  y 3 sitios no catalíticos en las interfases de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Por su parte el dominio  $F_0$  forma el canal transmembranal permitiendo el paso de los protones de  $H^+$ , reacción vectorial que se acopla a la síntesis o hidrólisis de ATP (6, 50).

Los dos sectores están unidos por porciones de las subunidades  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $a$  y  $b$ , y los 3 sitios catalíticos están físicamente separados del canal de protones, por lo menos por la misma distancia que abarca el sector  $F_0$ , por lo que la alternativa más viable de comunicación entre los dos sectores es la vía del cambio conformacional. Recientes estudios estructurales apoyan esta idea e identifican a las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  involucradas en esta actividad de transmisión conformacional (6).

De acuerdo al arreglo de genes encontrado en este trabajo, el sector  $F_0$  de *B. melitensis* mostró diferencias en el número de genes comparado con *E. coli* y *B. subtilis*, en donde sólo se observa un solo gene de la subunidad B (*atpF*) y no dos como se muestra en *Brucella*. Por otro lado, se encontró similitud entre el orden y número de los genes de *Brucella* con los genes de *R. capsulatus* y *R. rubrum*. Esta situación pudiera atribuirse a que tanto *Brucella* como *Rhodobacter* y *Rhodospirillum* están relacionados filogenéticamente, debido a que pertenecen a la subdivisión  $\alpha$  de la clase proteobacteria, que incluye a bacterias púrpuras fotosintéticas y no fotosintéticas y bacterias intracelulares facultativas de plantas y animales.

Otra característica importante de la organización del operón ATPsintasa es la disposición de los sectores que ha sido reportada en bacterias Gram positivas, Gram negativas, cloroplastos y mitocondrias. En estos ejemplos los genes de las proteínas del sector  $F_0$  se encuentran posteriores al del sector  $F_1$ . Sin embargo, en *Brucella* esta disposición no ocurre, debido a que después del término del dominio  $F_0$ , se encuentra el gene *mhB* de la ribonucleasa HII. Datos similares fueron reportados en *Rhodopseudomona blastica*, donde solo se observa el dominio  $F_1$  y no se encontró cercano el dominio  $F_0$ . Lo mismo sucede en el operón ATP sintasa de *R. rubrum*, en el

que la disposición de los dominios se encuentra separada por una secuencia no codificadora, de tamaño no determinado, pero dentro de la misma región del operón (28, 61).

Por otro lado, se han encontrado diferencias en el arreglo de los genes del dominio  $F_0$  de *Streptococcus mutans*, en donde no se encontró el gene *atpI* y el gene de la subunidad c (*atpE*) se encontró delante del gene *atpB* (63).

De acuerdo al arreglo de genes encontrado en el dominio  $F_0$  del operón ATPsintasa de *B. melitensis*, se pueden proponer las siguientes hipótesis: 1.- En *B. melitensis* el orden de los genes del operón ATPsintasa es diferente al de los microorganismos reportado hasta ahora, 2.- *Brucella* posee una ATPsintasa adicional cuyos sectores se encuentran separados.

Por lo tanto, se sugiere que el conocimiento del dominio  $F_0$  sea completado, así como localizar y secuenciar el dominio  $F_1$  de *Brucella melitensis*, para observar su distribución local y en el genoma de la bacteria y determinar el número de copias que pudiese tener y caracterizar el funcionamiento de este operón en *Brucella*. Esto podría extenderse a la construcción de mutantes con el fin de obtener información acerca de la fosforilación oxidativa de esta bacteria.

Al analizar la secuencia del fragmento en dirección 5' se encontraron dos MAL, uno de ellos de 936 pb (MAL V), en forma incompleta, el cual codifica para una proteína de 311 aminoácidos. Este MAL mostró una identidad del 36% con una proteína hipotética de *Mycobacterium tuberculosis* y 35% de identidad con una proteína hipotética de *Archeaglubus fulgidus* con una similitud del 68% y 56% respectivamente (41).

La proteína hipotética de *M. tuberculosis* y *A. fulgidus* es conservada y su localización es transmembranal y de membrana externa, respectivamente. Al realizar el análisis del perfil hidropático de la proteína hipotética de *B. melitensis* (43) se observaron cuatro posibles segmentos transmembranales en los aa 138-141, 159-164, 198-202 y 232-238 (Gráfica 1).

Por otra parte, la masa molecular aproximada de este MAL incompleto es de 34.2 kDa, comparando este peso con el peso de las proteínas de *M. tuberculosis* y *A. fulgidus*, 37.2 y 40 kDa respectivamente, y una vez completo, es probable que su peso podría coincidir con los pesos antes mencionados.

Asimismo, la secuencia de nucleótidos de este MAL mostró un contenido rico en GC (G+C, 61%) como es esperado en genes de *Brucella* (51).

En la misma dirección y 217 pb hacia abajo del codón de término del MAL V se localizó el MAL VI de 663 pb, el cual mostró una identidad del 42% con la ribonucleasa HII de *M. tuberculosis*. La masa molecular calculada de este MAL es de 24.2 kDa, similar al reportado en *M. tuberculosis* e inclusive parecido al de las ribonucleasas HII de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholera* y *Streptococcus pneumoniae* (39).

Existen al menos dos ARNasas identificadas en *E. coli* y en células eucariotas. En bacterias la ribonucleasa mejor caracterizada es la ARNasa HI de *E. coli*, esta enzima es una proteína de 18 kDa, codificada por el gene *rnhA*, por otro lado, la ARNasa HII, una proteína de 23-24 kDa, ha sido poco estudiada y es codificada por el gene *rnhB* y es considerablemente diferente a la ARNasa HI, con la que sólo comparte un 17% de identidad (39).

Comparando la secuencia de aa de los motivos I, II Y III de *B. melitensis* con los de *E. coli*, se observaron diferencias en el número de aa presentes en cada motivo. En *E. coli* el motivo I consta de 19 aa y el motivo III de 15 aa, mientras que en *Brucella* se encontraron 22 aa en ambos motivos. En relación al motivo II, éste mostró ser el mismo en tamaño e identidad (78). Estos motivos fueron utilizados como sonda para buscar homologías en banco de datos (*Gen Bank*) y demostraron la presencia de genes *rnhB* en levaduras y gusanos redondos, así como en células de humano y de ratón.

La función de esta enzima es degradar específicamente la cadena de ARN en el híbrido de ARN:ADN. Aunque estudios sobre mutantes *rnh* de *E. coli* mostraron que está involucrada en diferentes papeles, como lo es la supresión de la replicación de ADN de otros sitios *oriC*, además de degradar el *primer* de ARN de los fragmentos de Okazaki y de estar involucrada en la reparación del ADN y en la mutagénesis SOS-inducida (7, 40, 42).

Aprovechando las funciones de la enzima ARNasa HII, así como su presencia en todo tipo de células, pudiera ser explotado en el uso de drogas oligonucleótido-antisentido. En función con un ARNm blanco, como agente que coloca al mRNA susceptible de ser degradado de manera específica pudiera ser terapéuticamente benéfico (7).

Al respecto se sugiere realizar estudios sobre la composición molecular y bioquímica de esta proteína, así como construir mutantes para conocer específicamente las funciones de esta enzima en el género *Brucella*.

Es posible que la falta de expresión de los productos de los genes clonados se deba a que los MAL de ambos extremos del fragmento se encontraban en forma incompleta y de igual forma no se encontraban en fase, además de que el MAL V se encontraba en dirección opuesta a la del promotor utilizado.

Por último se sugiere terminar la secuencia de los genes incompletos y subclonarlos individualmente para tratar de realizar la expresión de cada uno de los genes que se lograron clonar. De esta manera, se podría avanzar en el estudio de los productos de estos genes desde el punto de vista bioquímico e inmunológico.

## CONCLUSIONES

- (1) En este trabajo se clonó y determinó la secuencia de nucleótidos de las subunidades a, b', b y c del sector  $F_0$  del operón ATPsintasa de *Brucella melitensis*, así como, del gene de la ribonucleasa HII (*rnhB*) y del gene de una proteína hipotética.
- (2) Los seis genes aislados en este trabajo son reportados por primera vez en *B. melitensis* y se encuentran disponibles en el GenBank, bajo los números de acceso : AF054609 (dominio  $F_0$  del operón ATPsintasa), AF054610 (ribonucleasa HII) y AF059568 (proteína hipotética).
- (3) El operón ATPsintasa consta de dos dominios :  $F_0F_1$ , sin embargo, el dominio  $F_0$  del operón ATPsintasa de *B. melitensis* está flanqueado por el gene de la ribonucleasa HII (*rnhB*), éste arreglo es diferente al de otros microorganismos hasta ahora estudiados, donde los genes del dominio  $F_0$  están flanqueados por los genes del dominio  $F_1$  del operón ATPsintasa.
- (4) El aislamiento de los genes del dominio  $F_0$  servirá para conocer el arreglo del operón completo en *B. melitensis*, así como facilitar el estudio sobre la fosforilación oxidativa de esta bacteria.
- (5) La secuencia de aminoácidos del gene de la ribonucleasa HII (*rnhB*), mostró una homología del 42% con la ribonucleasa HII de *M. tuberculosis*, además de poseer tres dominios que se encuentran igualmente presentes en bacterias, levaduras, gusanos redondos y células de humano y ratón.

## LITERATURA CITADA

1. - Altschul, S. F., Madden, L. T., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. And Lipman, J. D. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST a new generation of protein databases search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 : 3389-3402.
2. - Allardet-Servent, A., Bourg, G., Ramuz, M., Pages, M., Bellis, M. and Roizes, G. (1988) DNA polymorphism in strains of the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 170 : 4603-4607.
3. - Bachrach, G., Bar-nir, D., Banai, M. and Bercovier, H. (1994) Identification and nucleotide sequence of *Brucella melitensis* L7/L12 ribosomal protein. *FEMS Microbiol.* 120 : 237-240.
4. - Baily, G. G., Krahn, J. B., Drasar, B. S. and Stoker, G. (1992) Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hygiene.* 95 : 271-275.
5. - Bowden, A. R., Cloeckaert, A., Zygmunt, S. M., Bernard, S. and Dubray, G. (1995) Surface exposure of outer membrane proteins and lipopolysaccharide epitopes in *Brucella* species by enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry. *Infect. Immun.* 63 : 3945-3952.
6. - Capaldi, A. R., Aggeler, R., Turina, P. and Wilkens, S. (1994) Coupling between catalytic sites and the proton channel in F1F0-type ATPases. *TIBS.* 19 : 284-289.
7. - Cazenave, C., Frank, P., Toulme, J-J. And Busen, W. (1994) Characterization and subcellular localization of ribonuclease H activities from *Xenopus leavis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 269 : 25185-25192.
8. - Cellier, M. F. M., Teyssier, J., Nicolas, M., Liautard, P. J., Marti, J. and Sri Widada, J. (1992) Cloning and characterization of the *Brucella ovis* heat shock protein DnaK functionally expressed in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 174 : 8036-8042.
9. - Clarke, L. and Carbon, J. (1977) A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell.* 9-91.
- 10.- Cloeckaert, A., Debarh Salih-Alj, H., Vizcaino, N., Saman, E., Dubray, G. and Zygmunt, S. M. (1996) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella*

- melitensis* bp26 gene coding for a protein immunogenic in infected sheep. *FEMS Microbiol.* 140:139-144.
- 11.- Cloeckaert, A., De Wergifosse, P., Dubray, G. and Limet, J. N. (1990) Identification of seven surface-exposed *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies: immunogold labeling for electron microscopy and enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 58 : 3980-3987.
  - 12.- Cloeckaert, A., Kerkhofs, P. and Limet, J. N. (1992) Antibody response to *Brucella* outer membrane proteins in bovine brucellosis: Immunoblot analysis and competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 3168-3174.
  - 13.- Cloeckaert, A., Verger, JM., Grayon, M. and Grépinet, O. (1995) Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36 kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology.* 141: 2111-2121.
  - 14.- Cloeckaert, A., Verger, J-M., Grayon,, M. and Vizcaino. (1996) Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*. *FEMS Microbiol.* 145 : 1-8.
  - 15.- Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., Dubray, G. and Limet, J. N. (1992) Demonstration of peptidoglycan-associated *Brucella* outer membrane proteins by use of monoclonal antibodies. *J. Gen. Microbiol.* 138 : 1543-1550.
  - 16.- Cloeckaert, A. (1997) Antigenes of *Brucella*. 50<sup>th</sup> Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. November 8-9, 1997. Chicago, USA. 35-37.
  - 17.- Corbel, M. J. (1997) Brucellosis: An overview. *Emerging Infectious Diseases.* 3: 213-221.
  - 18.- Debbarh, H. S., Cloeckaert, A., Zygmunt, M. S., and Dubray, G. (1995) Identification of sero-reactive *Brucella melitensis* cytosoluble proteins which discriminate between antibodies elicited by infection and rev. 1 vaccination in sheep. *Vet. Microbiol.* 44 : 37-48.
  - 19.- Denoel, A. P., Kim-anh, V. T., Tibor, A., Weynants, E. V., Trunde, J-M., Dubray, G., Limet., N. J. and Letesson, J-J. (1997) Characterization, occurrence, and molecular

- cloning of a 39-kilodalton *Brucella abortus* cytoplasmic protein immunodominant in cattle. *Infect. Immun.* 65 : 495-502.
- 20.- Denoel, A. P., Zygmunt, S. M., Weynants, V., Tibor, A., Linchtouse, B., Briffevil, P., Limet, N. J. and Letesson, J-J. (1995) Cloning and sequencing of the bacterioferritin gene of *Brucella melitensis* 16M strain. *FEBS lett.* 361: 238-242.
- 21.- Díaz, A. E. (1995) Pruebas diagnósticas en brucelosis caprina. *Congreso internacional en producción caprina*. Zacatecas, México., 51-59.
- 22.- Díaz, R. and Levieux, D. (1972) Role respectif en serologie de la brucellose bovine des antigenes et des immunoglobulines G1 and G2 dans les tests d'agglutination, de Coombs et au Rose Bengale ainsi que dans le phenomene de zone. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences*. Paris. 274D : 1593-1596.
- 23.- Douglas, J. T., Rosenberg, E. Y., Nikaido, H., Verstraete, D. R. and Winter, A. J. (1984) Porins of *Brucella* species. *Infect. Immun.* 44 : 16-21.
- 24.- Dubray, G. (1987) Protective antigens in brucellosis. *Ann Inst Pasteur/Microbiol.* 138 : 84-87.
- 25.- Dubray, G. and Charriaut, C. (1983) Evidence of three major polypeptide species and two mayor polysaccharide species in the *Brucella* outer membrane. *Ann. Rech. Vet.* 14 : 397-403.
- 26.- Elzer, H. P., Phillips, W. R., Robertson, T. G. and Roop, R. M. (1996) The HtrA stress response protease contributes to resistance of *Brucella abortus* to killing by murine phagocytes. *Infect. Immun.* 64 : 4838-4841.
- 27.- Falk, G., Hampe, A. and Walker, E. J. (1985) Nucleotide sequence of the *Rhodospirillum rubrum* *atp* operon. *Biochem. J.* 228 : 391-407.
- 28.- Falk, G. and Walker, E. J. (1988) DNA sequence of a gene cluster for subunits of the F<sub>0</sub> membrane sector of ATPsynthase in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem. J.* 254 : 109-122.
- 29.- Fekete, A., Bantle, J. A., Halling, S. M. and Sanborn, M. R. (1992) Amplification fragment length polymorphism in *Brucella* strains by use of polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriol.* 174 : 7778-7783.

- 30.- Ficht, T. A., Bearden, S.W., Sowa, B. A. and Adams, A. L.(1988) A 36-kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA. *Infect. Immun.* 56 : 2036-2046
- 31.- Ficht, A. T., Bearden, W. S., Sowa, A. B. and Adams, L. G. (1989) DNA sequence and expression of the 36-Kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 57 : 3281-3291.
- 32.- Ficht, A. T., Bearden, W. S., Sowa, A.B. and Marquis, H. (1990) Genetic variation at the *omp2* porin locus of the brucellae: species-specific markers. *Mol. Microbiol.* 4 : 1135-1142.
- 33.- Gamazo, C., Vitas, A. I., Moriyón, I., López-Goñi, I. and Díaz Ramón. 1993. Brucella group 3 outer membrane proteins contain a heat-modifiable protein. *FEMS Microbiol.* 112 : 141-146.
- 34.- Goldbaum, A. F., Leoni, J., Wallach, C. J. and Fossati, A. C. (1993) Characterization of an 18 kilodalton Brucella cytoplasmic protein wich appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *J. Clin. Microbiol.* 31 : 2141-2145.
- 35.- Graber, A. and Zingales, B. (1995) Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *Biotechniques.* 19 : 28-30
- 36.- Grimont, F., Verger, J. M., Cornelis, P., Limet, J., Lefèvre, M., Grayon, M., Régnault, B., Van Broeck, J. and Grimont, P. A. D. (1992) Molecular typing of *Brucella* with cloned DNA probes. *Res. Microbiol.* 143 : 55-65.
- 37.- Gurria, T. F. (1993) Informe de los avances de la campaña nacional contra la Brucellosis. SARH. México.
- 38.- Halling, S. (1997) *Brucella* genetics. 50 th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. November 8-9, 1997. Chicago, USA. 19-25.
- 39.- Hostomsky, Z., Hostomska, Z. and Matthews, A. D. (1993) Ribonucleases H in: Nucleases, 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor. 341- 376.

- 40.- Itaya Mitsuhiro (1990) Isolation and characterization of a second Rnase III of *Escherichia coli* K-12 encoded by the *rnhB* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 8587-8591.
- 41.- Klenk, H-P., Clayton, A. R., Tomb, J-F., White, O., Nelson, K., Woese, C. and Venter, C. J. (1997) The complete genome sequence of hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature.* 390 : 364-370.
- 42.- Kogoma, T., Subia, L. N. and Meyenburg, K. (1985) Function of ribonuclease H in initiation of DNA replication in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* 200 : 103-109.
- 43.- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hidropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157 : 105-132.
- 44.- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680-685.
- 45.- Lantier, F. (1985) Diagnosis. In : *Brucella melitensis*. Plommet, M. and Verger, M. J. *Martinus Nijhoff editors.* 247.
- 46.- Lindler, L. E., Hadfield, T. L., Tall, B. D., Snellings, J. N., Rubin, A. F., Van de Verg, L. I., Hoover, D. and Warren, L.r. (1996) Cloning of a *Brucella melitensis* group 3 antigen gene encoding *Omp28*, a protein recognized by the humoral immune response during human brucellosis. *Infect. Immun.* 64 : 2490-2499.
- 47.- Marquis, H. and Ficht, A. T. (1993) The *omp2* gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins. *Infect. Immun.* 61 : 3785-3790.
- 48.- Matar, G. M., Khneisser, I. A. and Abdelnoor, A. M. (1996) Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. *J. Clinic. Microbiol.* 34 : 477-478.
- 49.- Mayfield, J. E., Bricker, B. J., Godfrey, H., Crosby, R. M., Knight, D. J., Halling, S. M., Balinsky, D. and Tabatabai, L. B. (1988) The cloning, expression, and nucleotide sequence of a gene coding for an immunogenic *Brucella abortus* protein. *Gene.* 63 : 1-9.

- 50.- McCarty, E. R. (1992) A plant biochemist's view of H<sup>+</sup>-ATPases and ATP synthases. *J. Exp. Biol.* 172 : 431-441.
- 51.- Michaux, S., Bourg, G., Jumas-Bilak, E., Gurgue-Talet, P., Allardet-Servent, A., Ocallaghan, D. and Ramuz, M. (1997) Genome structure and phylogeny in the genus *Brucella*. *J. Bacteriol.* 179 : 3244-3249.
- 52.- Michaux, S., Paillisson, J., Carles-Nurit, M.-J., Boug, G., Allardet-Servent, A. and Ramuz, M. (1993) Presence of two independent chromosomes in the *Brucella melitensis* 16M genome. *J. Bacteriol.* 175 : 703-705.
- 53.- Moriyon, I., and Berman, D. (1983) Isolation, purification, and partial characterization of *Brucella abortus* matrix protein. *Infect. Immun.* 39 : 394-402.
- 54.- Nicoletti, P. (1990) *Brucella melitensis*. In : Animal Brucellosis. Nielsen, K. and Duncan, R. J. Editors. *CRC Press*. Boca Raton, Florida, USA. 284-296.
- 55.- Olsen, C. S., Chevillat, F. N., Stevens, G. M., Houg, H. H., Drazek, E. S., Hadfield, L. T., Warren, L. R. and Hoover, L. D. (1997) Lymphocyte proliferative responses of goats vaccinated with *Brucella melitensis* 16M or a  $\Delta$ purE201 strain. *Infect. Immun.* 65 : 2987- 2891.
- 56.- Riezu-Boj, J. I., Moriyón, I., Blasco, J. M., Gamazo, C. and Díaz, R. (1990) Antibody response to *Brucella ovis* outer membrane proteins in ovine brucellosis. *Infect. Immun.* 58 : 489-494.
- 57.- Rossetti, O. L., Arese, A. I., Boschioli, M. L. and Cravero, S. L. (1996) Cloning of *Brucella abortus* gene and characterization of expressed 26-Kilodalton periplasmic protein: potential use for diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 165-169.
- 58.- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) In molecular cloning a laboratory manual. *Cold Spring Harbor*. Laboratory, 2nd edition. Cold Spring harbor, New York.
- 59.- Sánchez, G. I. (1993) Conceptos fundamentales del género *Brucella*. *Apuntes del curso internacional de diagnóstico de la brucelosis por ELISA*. La Habana, Cuba.
- 60.- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74 : 5463-5467.

- 61.- Santana, M., Ionescu, M., Vertes, A., Longin, R., Kunst, F., Danchin, A. and Glaser, P. (1994) *Bacillus subtilis* F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATPase: DNA sequence of the *atp* operon and characterization of *atp* mutants. *J. Bacteriol.* 176 : 6802-6811.
- 62.- Schurig, G. (1997) *Brucella* vaccines. *50 th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference*. November 8-9. Chicago, USA. 26-34.
- 63.- Smith, J. A., Quivey, G. R. and Faustoferri, C. R. (1996) Cloning and nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus mutans* membrane-bound, proton-translocating ATPase operon. *Gene*. 183 : 87-96.
- 64.- Sowa, B. A. (1990) *Advances in Brucellosis research*. Edited by Adams, L. G. first ed. *Texas A&M University Press*. Texas, USA. 85-105.
- 65.- Sowa, B. A., Kelly, K. A., Ficht, T. A., Frey, M. and Adams, L. G. (1991) SDS-soluble and peptidoglycan-bound proteins in the outer membrane-peptidoglycan complex in *Brucella abortus*. *Vet. Microbiol.* 27 : 351-369.
- 66.- Stevens, G. M., Tabatabai, B. L., Olsen, C. S. and Cheville, F. N. (1994) Immune responses to superoxide dismutase and synthetic peptides of superoxide dismutase ion cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 or RB51. *Vet. Microbiol.* 41 : 383-389.
- 67.- Suárez, G. F. (1995) Brucellosis: Un viejo problema de actualidad. *Congreso internacional en producción caprina*. Zacatecas, México. 38-43.
- 68.- Tibor, A., Samar, E., Wergifose, F., Cloeckaert, A., Limet, N. J. and Letesson, J-Q. (1996) Molecular characterization, occurrence, and immunogenecity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane protein of *Brucella abortus*. *Infect. Immun.* 64 : 100-107.
- 69.- Tibor, A., Weynants, V., Denoel, P., Lichtfous, B., De Bolle, X., Saman, E., Limet, J. N. and Letesson, J-J. (1994) Molecular cloning, nucleotide sequence, and occurrence of a 16.5- kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to PAL lipoproteins. *Infect. Immun.* 62 : 3633-3639.

- 70.- Toth, E. T., Cobb, A. J., Boyle, M. S., Roop, R. M and Schurig, B. (1995) Selective humoral response of Balb/C mice to *Brucella abortus* proteins expressed by vaccinia virus recombinants. *Vet. Microbiol.* 45 : 171-183.
- 71.- Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 : 4350-4354.
- 72.- Verstrete, D. R., Creasy, M. T., Caveney, N. T., Baldwin, C. L., Blab, M. W. and Winter, A. J. (1982) Outer membrane proteins of *Brucella abortus*: Isolation and characterization. *Infect. Immun.* 35 : 979-989.
- 73.- Vizcaino, N., Cloeckert, A., Dubray, G. and Zygmunt, S.M. (1996) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene coding for a ribosome releasing factor-homologous protein of *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 64 : 4834-4837.
- 74.- Vizcaino, N., Cloeckert, A., Zygmunt, S. M. and Dubray, G. (1996) Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis omp31* gene coding for an immunogenic major outer membrane protein. *Infect. Immun.* 64 : 3744-3751.
- 75.- Wergifose, P., Lintermans, P., Limet, N. J. and Cloeckert, A. (1995) Cloning and nucleotide sequence of the gene coding for the major 25-Kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus*. *J. Bacteriol.* 177 : 1911-1914.
- 76.- Winter, J. A., Schurig, G. G., Boyle, M. S., Sriranganathan, N., Bevis, S. J., Enright, M. F., Elzer, H. P. and Kopec, D. J. (1996) Protection of BALB/C mice against homologous and heterologous species of *Brucella* by rough strain vaccines derived from *Brucella melitensis* and *Brucella suis* biovar 4. *AJVR.* 57 : 677-683.
- 77.- Yingxun, Z., Oliveira, C. S., and Splitter, G. A. (1993) Isolation of *Brucella abortus* *ssb* and *uvr A* genes from a genomic library by use of lymphocytes as probes. *Infect. Immun.* 16 : 5339-5344.
- 78.- Zhang, Y., Ayalow, S. and Lacks, A. S. (1997) The *rnhB* gene encoding RNAase HII of *Streptococcus pneumoniae* and evidence of conserved motifs in eucaryotic genes. *J. Bacteriol.* 179 : 3828-3836.

- 79.- Zygmunt, M. S., Gilbert, F. B. and Dubray, G. (1992) Purification, characterization and seroactivity of a 20-Kilodalton *Brucella* protein antigen. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 2662-2667.
- 80.- Zygmunt, M. S., Debarth, H. S., Cloeckert, A., and Dubray, G. (1994) Antibody response to *Brucella melitensis* outer membrane antigens in naturally infected and Rev 1 vaccinated sheep. *Vet. Microbiol.* 39 : 33-46.