

29
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Desarrollo de una técnica competitiva de PCR para cuantificar DNA de Toxoplasma gondii en tejido de ratón.

T E S I S

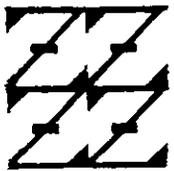
Que para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

CAROLINA PIÑA VAZQUEZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXION

Asesor: Dr. Pascal Héron.

MEXICO, D. F.

1999.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

271057



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en Laboratorio del Dr. Pascal Hérion Scohy en el departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomedicas de la U.N.A.M.

GRACIAS

A Dios, por todo.

A mis padres: Catalina e Ignacio por su amor, comprensión, apoyo y guía.

A mi hermana Miren por su gran amistad.

A mi hermano Ignacio por su cariño.

A mis amigas: Alejandra, Griselda, Isabel y Nancy por todo lo que me han enseñado.

A mi amigo Miguel Angel Ramírez, por su apoyo.

Deseo expresar mi gratitud a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Escuela Nacional Preparatoria y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, por que dentro de esta institución me forme como profesionalista y como ser humano.

Mi agradecimiento y reconocimiento a todos aquellos maestros que a lo largo de mi vida, me transmitieron sus conocimientos, el gusto por estos y sobre todo el amor por mi carrera.

Le agradezco al Dr. Pascal Hérion por la dirección de esta tesis.

Y a todas las personas que de alguna manera hicieron posible la realización de éste trabajo, simplemente gracias.

INDICE

| | |
|--|----|
| I. LISTA DE ABREVIATURAS..... | 1 |
| II. RESUMEN..... | 2 |
| III. INTRODUCCION | |
| 1. Toxoplasmosis..... | 3 |
| 1.1 Agente etiológico..... | 3 |
| 1.2 Rango de huésped..... | 3 |
| 1.3 Ciclo de vida de <i>Toxoplasma gondii</i> | 3 |
| 1.4 Epidemiología y espectro clínico de la toxoplasmosis..... | 5 |
| 1.5 Cepas de <i>Toxoplasma gondii</i> | 6 |
| 1.6 Modelo animal de la toxoplasmosis..... | 7 |
| 2. PCR..... | 8 |
| 2.1 Fundamento de la PCR..... | 8 |
| 2.2 Curva experimental de la PCR..... | 10 |
| 2.2.1 Fase de los primeros ciclos..... | 12 |
| 2.2.2 Fase de amplificación exponencial..... | 13 |
| 2.2.3 Fase de meseta..... | 13 |
| 2.3 Control enzimático de la contaminación en PCR..... | 14 |
| 2.4 PCR cuantitativo..... | 15 |
| 2.5 PCR competitiva cuantitativa (qcPCR)..... | 16 |
| 2.6 Ventajas de la qcPCR..... | 18 |
| 2.7 Tipos de estándares internos para la PCR competitiva..... | 19 |
| 2.7.1 Estándares homólogos..... | 20 |
| 2.7.2 Estándares heterólogos..... | 20 |
| 2.8 Detección y análisis de los productos de PCR..... | 22 |
| 2.9 Blancos para PCR dentro del genoma de <i>T.gondii</i> | 24 |
| IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 27 |
| V. OBJETIVOS..... | 27 |
| VI. HIPOTESIS DE TRABAJO..... | 28 |
| VII. MATERIAL Y METODOS | |
| 1. Equipo..... | 29 |
| 2. Reactivos..... | 30 |
| 3. Material biológico..... | 31 |
| 4. Iniciadores..... | 32 |
| 5. Preparación del fenol..... | 34 |
| 5.1 Saturación del fenol..... | 34 |
| 5.2 Equilibración del fenol..... | 34 |
| 5.3 Preparación del fenol saturado con Tris 0.1M pH 8..... | 34 |
| 5.4 Preparación del fenol - cloroformo - alcohol isoamílico..... | 34 |
| 6. Extracción de ADN genómico..... | 35 |
| 6.1 ADN de <i>T.gondii</i> | 35 |
| 6.2 Purificación de ADN de cerebro de ratón por el método de la proteínasa K..... | 35 |
| 6.3 Purificación de ADN de cerebro de ratón por el método de DNazol..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 7. Cuantificación de ADN..... | 38 |
| 8. Dilución del ADN blanco..... | 38 |
| 9. Digestión de ADN genómico..... | 39 |
| 10. Preparación del lisado de taquizoitos..... | 40 |
| 11. Generación del estándar interno..... | 40 |
| 11.1 Amplificación del segmento de ADN del fago lambda con los oligos compuestos..... | 41 |
| 11.2 Reamplificación del amplificado con los oligos Rd-1 y Rd-2..... | 41 |
| 12. Ligación del producto de PCR al vector pCR2.1..... | 42 |
| 13. Preparación de los medios de cultivo..... | 43 |
| 13.1 LB..... | 43 |
| 13.2 LB - Ampicilina..... | 43 |
| 13.3 Placas de LB - Agar - Ampicilina - IPTG - Xgal..... | 43 |
| 14. Preparación de las células competentes..... | 44 |
| 15. Transformación de bacterias..... | 45 |
| 16. Aislamiento del ADN plasmídico por el método de MINIPREP..... | 45 |
| 17. Aislamiento de ADN plasmídico por cromatografía de intercambio iónico (QIAGEN)..... | 47 |
| 18. Secuenciación de ADN..... | 48 |
| 19. Digestión de ADN plasmídico y de productos de PCR..... | 49 |
| 20. Protocolo de PCR..... | 49 |
| 20.1 PCR con AmpliTaq..... | 50 |
| 20.2 PCR con AmpliTaq Gold..... | 51 |
| 20.3 PCR con AmpliTaq Gold y UDG..... | 52 |
| 21. Protocolo de qcPCR..... | 54 |
| 22. Electroforesis en gel de agarosa..... | 55 |
| 22.1 Preparación del gel de agarosa..... | 55 |
| 22.2 Preparación de los estándares de tamaño..... | 56 |
| 22.3 Electroforesis..... | 56 |
| 22.4 Tinción..... | 56 |
| 22.5 Fotografiado..... | 57 |

VIII. RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 1. Sensibilidad y especificidad de la PCR para la detección de ADN de <i>T.gondii</i> usando los iniciadores Rd-1 y Rd-2..... | 58 |
| 2. Amplificación con AmpliTaq Gold..... | 60 |
| 3. Control de la contaminación..... | 61 |
| 4. Efecto de la UDG..... | 63 |
| 5. Amplificación del lisado de taquizoitos..... | 65 |
| 6. Optimización del número de ciclos..... | 67 |
| 7. Amplificación en presencia de ADN de cerebro de ratón..... | 67 |
| 8. Construcción del estándar interno..... | 72 |
| 8.1 Diseño y características..... | 72 |
| 8.2 Generación..... | 73 |
| 8.3 Clonación..... | 75 |

| | |
|---|-----|
| 9. Sensibilidad a MspI de los productos de amplificación obtenidos en presencia de dUTP..... | 89 |
| 10. Titulación de pCRLamB1.5 (estándar interno) sólo y con ADN de cerebro de ratón..... | 89 |
| 11. Comparación de las eficiencias de amplificación del blanco B1 y del estándar interno..... | 92 |
| 12. Digestión del ADN molde..... | 94 |
| 13 Simulación de las condiciones reales..... | 97 |
| IX. DISCUSION DE LOS RESULTADOS | |
| 1. Selección del blanco y diseño del estándar interno..... | 99 |
| 2. Reproducibilidad y sensibilidad del ensayo..... | 100 |
| 3. Especificidad..... | 101 |
| 4. Conservación..... | 101 |
| 5. Control de la contaminación..... | 102 |
| 6. Amplificación del lisado de taquizoitos..... | 103 |
| 7. Optimización del número de ciclos..... | 103 |
| 8. Selección del método de extracción de ADN..... | 104 |
| 9. Estándar interno | 105 |
| 10. Análisis de los productos | 105 |
| 11. Normalización del estándar interno contra el blanco..... | 105 |
| 12. Digestión del ADN molde..... | 106 |
| 13. Simulación de las condiciones reales..... | 106 |
| 14. Comparación del método desarrollado con lo reportado en la literatura..... | 107 |
| X. CONCLUSIONES | 109 |
| XI. PROPUESTAS | 109 |
| XII. REFERENCIAS | 110 |

I. LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| ADN | ácido desoxiribonucleico |
| BM | baño María |
| cPCR | reacción en cadena de la polimerasa competitiva |
| dATP | 2'-desoxiadenosina 5'-trifosfato |
| dCTP | 2'-desoxicitidina 5'-trifosfato |
| dGTP | 2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato |
| dTTP | 2'-desoxitimidina 5'-trifosfato |
| dUTP | 2'-desoxiuridina 5'-trifosfato |
| LB | medio de Luria Bertani |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| qcPCR | reacción en cadena de la polimerasa competitiva cuantitativa |
| RNA | ácido ribonucleico |
| TA | temperatura ambiente |
| UDG | uracil DNA glicosilasa |

II. RESUMEN

El protozoo intracelular *Toxoplasma gondii* es un parásito que infecta tanto a aves como a mamíferos, incluyendo al hombre. La infección que causa, la toxoplasmosis, es generalmente asintomática en individuos sanos, pero puede causar complicaciones severas en fetos y en pacientes inmunocomprometidos. En este laboratorio se trabaja el modelo murino de la toxoplasmosis y en el se prueban diferentes candidatos a vacuna. Para evaluar el grado de protección que ofrece una vacuna, es necesario determinar cuantitativamente la carga parasitaria que existe en el tejido de los ratones. Es por ello que en el presente trabajo se desarrolló una técnica competitiva de PCR para cuantificar ADN del parásito, la cual, proporciona un método directo para determinar la carga parasitaria. Como blanco de la PCR se utilizó el gen B1 de *T.gondii* que se encuentra repetido 35 veces en tandem dentro del genoma del parásito. Los iniciadores que se eligieron (Rd-1 y Rd-2) amplifican un segmento de 301 pb. Se sintetizó un competidor heterólogo (estándar interno), que consta de un segmento del fago lambda flanqueado por las secuencias de los iniciadores Rd-1 y Rd-2, el cual se encuentra clonado en un plásmido. El estándar es muy similar a el blanco en cuanto a longitud y %GC, pero difiere de éste en que a la mitad de su longitud tiene un sitio de restricción para MspI. La técnica consiste en coextraer el ADN genómico del cerebro de un ratón infectado junto con el ADN del parásito, someterlo a una coamplificación con una serie de diluciones del estándar interno, digerir los productos con MspI y separarlos por electroforesis en gel de agarosa. Debido a que las eficiencias de amplificación para ambos moldes, fueron diferentes, se normalizó al estándar en función del blanco. Finalmente, se logró desarrollar una técnica de PCR competitiva para cuantificar ADN de *T.gondii*. El método resultó sensible (detecta 2.3 taquizoitos en 500 ng de ADN de cerebro de ratón) y reproducible a nivel intraensayo. Éste fue aplicado exitosamente en condiciones que simulan ADN extraído del cerebro de un ratón infectado.

I. INTRODUCCIÓN

1. TOXOPLASMOSIS

1.1 AGENTE ETIOLÓGICO

La toxoplasmosis es una infección causada por el protozooario *Toxoplasma gondii*, que pertenece al grupo de parásitos intracelulares obligados que se han vuelto altamente adaptativos para invadir y desarrollarse en las células huéspedes (Smith et al., 1995).

T. gondii pertenece al Phylum: Apicomplexa, Clase: Sporozoea, Subclase: Coccidia, Orden: Eucocccidiida y Suborden: Eimeriina (Levine et al., 1980).

1.2 RANGO DE HUÉSPED

T. gondii tiene su estado sexual restringido a los enterocitos de los felinos, pero el estado asexual es capaz de invadir y desarrollarse dentro de muchos tipos celulares diferentes en todas las especies de animales de sangre caliente (mamíferos y aves). Esta amplia especificidad de tejido y de huésped implica que el parásito debe usar caminos muy conservados para su interacción con la célula huésped (Smith et al., 1995).

1.3 CICLO DE VIDA DE *Toxoplasma gondii*

El ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* está compuesto por una etapa asexual y una sexual (Fig 1).

La etapa asexual ocurre en huéspedes intermediarios y definitivos. *T. gondii* invade las células del huésped y comienza a dividirse por endodiogenia, un proceso semejante a la división binaria, dentro de una vacuola parasitófora. Se usa el término taquizoíto para

designar esta forma del parásito caracterizada por un ciclo de división rápida. El tiempo de división es usualmente de 6-8 hrs para el taquizoito de la cepa virulenta RH. Cuando el número de parásitos dentro de la célula alcanza de 64-128 (en cultivo de tejidos), la célula se rompe liberando taquizoítos que infectan a las células adyacentes. De esta manera, un tejido o un órgano infectado, pronto muestra evidencia de un proceso citopático. La mayoría de los taquizoítos son eliminados por la respuesta inmune humoral y celular. De 7 a 10 días después de la infección sistémica por taquizoítos, se desarrollan quistes tisulares que contienen bradizoítos, la forma asexual de división lenta del parásito. Estos quistes tisulares se encuentran en una gran variedad de órganos del huésped, pero principalmente dentro del sistema nervioso central y en músculo, donde pueden persistir por todo el tiempo de vida del huésped (Kasper et al., 1993).

Cuando los quistes son ingeridos (por ejemplo al ingerir productos de carne poco cocidos), la pared del quiste sufre una rápida digestión por las secreciones gástricas. En huéspedes no felinos, los bradizoítos ingeridos invaden el epitelio intestinal y se transforman en taquizoítos que se dividen rápidamente, para después seguir con el patrón de infección mencionado anteriormente (Kasper et al., 1993).

El ciclo de vida sexual del parásito se define por la formación de ooquistes / esporozoítos y ocurre únicamente en las células enteroepiteliales de los huéspedes definitivos (felinos). Este ciclo de vida comienza con la ingestión de los quistes tisulares y termina después de varios estados intermediarios, en la producción de micro y macrogametos. El microgameto es flagelado, permitiendo al parásito buscar al macrogameto. La fusión de los gametos produce un cigoto que se envuelve en una membrana rígida, formándose el ooquiste que es excretado en las heces. Durante la infección aguda, un gato puede excretar hasta 100 millones de parásitos por día. Después de 2-3 días de exponerse al aire a temperatura ambiente, el ooquiste no infeccioso esporula y se forman en su interior 8 esporozoítos. Estos ooquistes muy estables ahora son altamente infecciosos y pueden permanecer viables por muchos años en el suelo. Ellos pueden ser ingeridos por un huésped intermediario, tal como una mujer embarazada, un cerdo o tal vez un ratón. Una vez digeridos, los esporozoítos liberados infectan el epitelio intestinal

produciendo taquizoitos asexuales de rápido crecimiento y por último bradizoítos (Kasper et al., 1993).

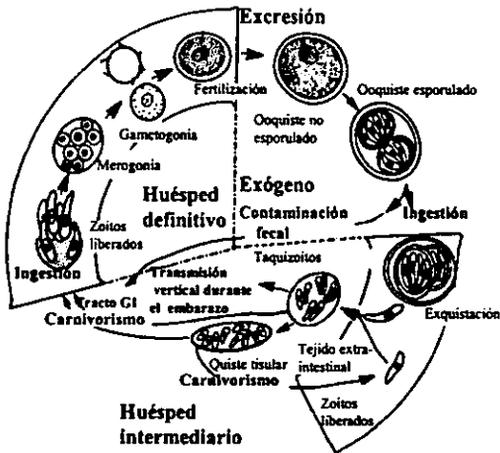


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

1.4 EPIDEMIOLOGÍA Y ESPECTRO CLÍNICO DE LA TOXOPLASMOSIS

La toxoplasmosis es una de las infecciones crónicas parasitarias más prevalentes en humanos, infectando del 10-25% de la población mundial (Dubey et al., 1988), mientras que en México, se ha reportado una seroprevalencia a nivel nacional del 32% (Velasco et al., 1992). Sin embargo la toxoplasmosis es generalmente asintomática en personas inmunocompetentes.

La toxoplasmosis postnatal adquirida puede ser localizada o generalizada, siendo la linfadenitis la forma de toxoplasmosis más frecuente en el hombre y transcurre sin el menor problema ya que la infección es resuelta espontáneamente en semanas o en meses (Dubey et al., 1993).

La toxoplasmosis congénita ocurre sólo cuando la mujer se infecta por primera vez durante el embarazo ya que mientras la madre raramente tiene síntomas de la infección, ella pasa por una parasitemia temporal durante la cual se desarrollan lesiones focales en la placenta y el feto puede ser infectado. Al principio hay una infección generalizada en el feto, más tarde la infección es eliminada de los tejidos viscerales y se puede localizar en el SNC (Dubey et al., 1993). Cuando la infección en el feto ocurre temprano en el embarazo, puede resultar en muerte intrauterina o en una severa enfermedad neurológica y si la infección ocurre más tarde en el embarazo entonces tiende más a ser asintomática y hasta puede resultar en un niño sin secuelas (Remington et al., 1989).

T. gondii puede causar también un severo daño neurológico o hasta la muerte en pacientes inmunocomprometidos, ya sea por alguna terapia con fármacos o por enfermedad; ésto es debido a la reactivación de los quistes que aparecieron y persistieron en los tejidos de la persona tras la infección primaria. La liberación de los bradizoítos y su transformación a taquizoítos pueden causar una severa toxoplasmosis diseminada y/o encefalitis que pueden ser fatales. De manera particular, los pacientes de mayor riesgo son los pacientes con SIDA, en los que la prevalencia de la toxoplasmosis es del 10% al 50%. Debido a este hecho, los estudios sobre *T. gondii* se han ampliado en éstas últimas décadas (Burg et al., 1989).

1.5 CEPAS DE *Toxoplasma gondii*

Hay grandes diferencias en la virulencia de varias cepas y aislados de *T. gondii*. Esta diversidad de virulencia puede tener un impacto considerable en la epidemiología, inmunología, patología y en la relación huésped - parásito. La virulencia puede ser estimada como: el tiempo que le toma al animal morirse después de ser infectado y el porcentaje de mortalidad o el número de parásitos necesarios para matar a animales infectados (Sibley et al., 1996).

De manera general, las cepas de *T.gondii* están agrupadas en dos amplios fenotipos basados en la habilidad de matar a un ratón tras haberlo retado con taquizoítos. Las cepas

agudamente virulentas como RH tienen una LD_{100} de diez organismos y la infección siempre conduce a una muerte típicamente rápida (6-10 días). Las cepas no virulentas como 113CE, Beverley y S-1 tienen valores de LD_{50} en un rango de 10^2 a $>10^5$ y los animales sucumben usualmente entre los 10 a 20 días postinfección y los sobrevivientes viven con la infección crónica. Se ha reconocido que diferentes especies y cepas de huésped varían en su susceptibilidad a la infección por *T. gondii*. La virulencia aguda aparentemente es independiente de la cepa de ratón usada; aunque algunas cepas no virulentas (i.e. Me49) muestran un incremento en su virulencia en ratones singénicos comparada en ratones no singénicos (Sibley et al., 1996).

1.6 MODELO ANIMAL DE LA TOXOPLASMOSIS

El modelo animal más usado para la toxoplasmosis es el modelo murino. Los ratones se pueden inocular de manera intraperitoneal o subcutánea con cualquiera de los tres estados infecciosos de *T. gondii* (taquizoítos, quistes tisulares u ooquistes) pudiéndose también inocular oralmente con ooquistes o quistes tisulares (Dubey et al., 1993).

Cuando son inoculados por vía intraperitoneal los taquizoítos crecen en las células de la cavidad peritoneal del ratón, algunas veces produciendo ascitis, y también crecen en la mayoría de los demás tejidos para después desarrollar quistes tisulares. La ascitis se desarrolla en 4-14 días después de la inoculación intraperitoneal dependiendo de la virulencia de la cepa (Dubey et al., 1993). Los quistes tisulares pueden ser vistos en los sobrevivientes después de 1-8 semanas de la inoculación en promedio (Dubey et al., 1997).

Para evaluar el estado de infección, pueden hacerse pruebas serológicas para la búsqueda de anticuerpos. Por otro lado los cerebros de los ratones pueden ser homogeneizados y examinados por microscopía de contraste de fase buscando y/o contando los quistes tisulares (Hollen et al., 1992).

Otra manera de evaluar la infección es expandir el número de parásitos presentes en el espécimen a un nivel en el que pueden ser detectados, lo cual puede hacerse por

reinoculación en un ratón sano o por crecimiento en líneas celulares. Para ello, el parásito puede multiplicarse en una gran variedad de líneas celulares: líneas continuas establecidas como células-L, VERO, fibroblastos, o Hep-2, y líneas de pasajes finitos tales como MRC-5 y células primarias de riñón de mono. Las células infectadas pueden ser identificadas a los 4 días por microscopía directa con tinción de Giemsa, pero más rápidamente por inmunofluorescencia indirecta después de la fijación de los cultivos con acetona (Ho-len et al., 1992).

2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

2.1 FUNDAMENTO DE LA PCR

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un procedimiento rápido para la amplificación enzimática *in vitro* de un segmento específico de ADN (Coen, 1994). En la PCR, la DNA polimerasa usa el principio de síntesis de la cadena complementaria de ADN en dirección 5' a 3' usando un ADN molde de cadena sencilla, empezando en una región de doble cadena (Graham et al., 1991). Por lo que en este caso se necesita conocer la secuencia nucleotídica de los sitios que bordean a la región por amplificar y, con base en ella, sintetizar dos pequeños oligonucleótidos de aproximadamente 20 nucleótidos, cada uno complementario a cadenas opuestas de la región de ADN (Sambrook et al., 1989). Estos oligonucleótidos se unen a su segmento complementario dentro del ADN molde creando la región de doble cadena necesaria para el inicio de la síntesis del ADN *in vitro*, por lo que se les llama iniciadores (Graham et al., 1991).

Los requerimientos de la reacción son simples: desoxinucleótidos (dNTP) que proveen la energía y nucleósidos para la síntesis de ADN, la DNA polimerasa termoestable (Taq DNA polimerasa proveniente de *Thermus aquaticus*) que permite el uso de altas temperaturas para la desnaturalización, el alineamiento y la extensión, los iniciadores, el

ADN molde, todo en una solución amortiguadora que contiene cloruro de magnesio (Graham et al., 1991).

Inicialmente, se desnaturaliza por calentamiento al ADN molde, cuando la temperatura baja, los iniciadores (agregados en un vasto exceso molar) se alinean con su secuencia complementaria en el ADN molde, lo cual requiere que los iniciadores encuentren su blanco correcto dentro del ADN molde (Fig 2). Inmediatamente después del alineamiento de los iniciadores, la DNA polimerasa se ancla al complejo de doble cadena iniciador - ADN molde, y entonces extrae dNTPs libres del medio y hace la extensión a lo largo de la hebra de ADN en el sentido 5' a 3' (Kidd et al., 1995). En esta primera ronda de síntesis se producen nuevas cadenas de longitud indeterminada que, como las cadenas originales, pueden hibridizarse con los iniciadores tras la desnaturalización y el alineamiento. Con cada ciclo de desnaturalización, alineamiento y extensión, estos productos se acumulan sólo aritméticamente (Coen et al., 1994).

En el segundo ciclo de desnaturalización, alineamiento y extensión, se sintetizan dos cadenas sencillas que juntas componen un producto discreto de doble cadena exactamente de la longitud del segmento de ADN bordeado por las secuencias de los iniciadores. Cada cadena de este producto discreto contiene en su extremo una secuencia complementaria a uno de los dos iniciadores y por lo tanto puede participar como molde preferencial en los ciclos subsecuentes. La cantidad de este producto se duplica en cada ciclo subsecuente, acumulándose exponencialmente así que teóricamente, n ciclos resultan en una amplificación de 2^n veces del producto discreto (Coen et al., 1994).

El producto principal de esta reacción exponencial es un segmento de ADN de doble cadena cuyos extremos están definidos por los extremos 5' de los oligonucleótidos y cuya longitud esta definida por la distancia entre las secuencias complementarias a los iniciadores (Kidd et al., 1995).

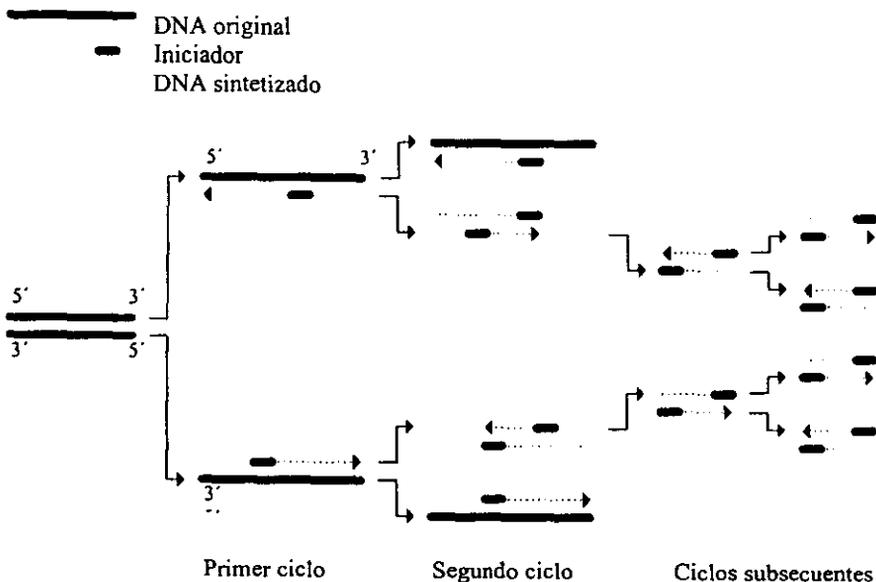


Figura 2. Esquematzación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR
Cada ciclo consta de desnaturalización, alineación y extensión

2.2 CURVA EXPERIMENTAL DE LA PCR

La cantidad de productos de PCR es función de la cantidad inicial de ADN y es descrito por la siguiente ecuación:

$$N = N_0 (1 + \text{eff})^n$$

donde N_0 es el número de copias del ADN inicial, N es la cantidad de ADN después de n ciclos de amplificación, y eff es la eficiencia de la amplificación. El valor actual de la eficiencia depende de factores que pueden ser únicos para cada par de iniciadores y secuencias intermedias a ser amplificadas. Si la eficiencia fuera constante e igual a 1, la representación gráfica de la ecuación mostraría una relación lineal entre N y N_0 para cualquier valor de n . Pero como con cualquier reacción enzimática, no se puede esperar que esta relación sea lineal indefinidamente, ya que la eficiencia de la PCR varía a lo largo de los ciclos de amplificación (Horikoshi et al., 1992), lo cual se puede observar en la cinética de reacción mostrada en la figura 3 donde se grafica la cantidad de producto de PCR

generado contra el número de ciclos, mostrando que existen tres fases bien definidas durante la amplificación:

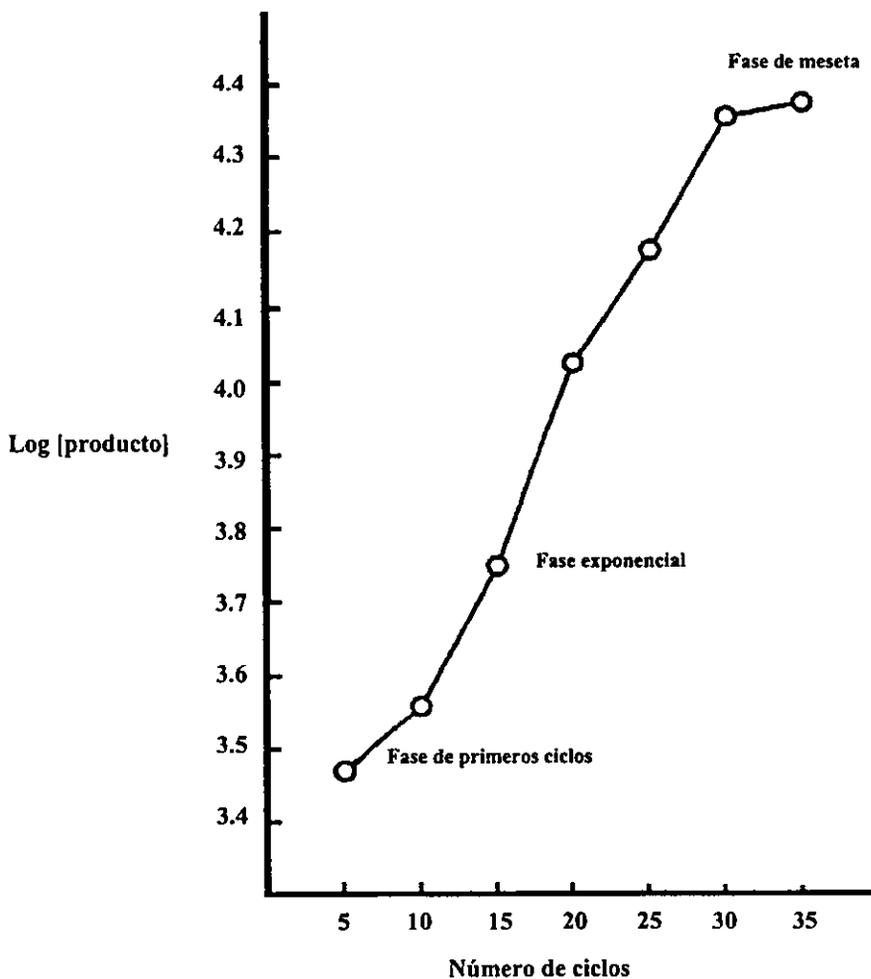


Figura 3. Cinética experimental de la PCR

Se grafica cantidad de producto contra el número de ciclos

2.2.1 FASE DE LOS PRIMEROS CICLOS

Se trata de una fase de monitoreo: durante los primeros ciclos, el fragmento de ADN deseado es seleccionado por una unión específica con los iniciadores (Kidd et al., 1995) y la eficiencia se eleva desde cero hasta su valor máximo.

Tener finalmente un resultado exitoso requiere, primero, que los iniciadores usados se unan muy bien en los lugares deseados, pero pobremente en cualquier otro lugar del ADN molde sobre todo durante los primeros ciclos. La unión eficiente del iniciador a la secuencia deseada, depende del diseño de los iniciadores (secuencia y longitud) y de las condiciones de rigor de la reacción (especialmente la concentración del ion magnesio y la temperatura de alineamiento). Esencialmente cualquier interacción del iniciador con el ADN molde puede conducir a un producto de extensión cuya especificidad puede ser difícil de controlar durante los primeros ciclos, dado el vasto exceso molar de los posibles sitios de alineamiento en el ADN molde con respecto al sitio deseado. Tales moléculas adicionales no deseadas producidas en un estado temprano del proceso pueden resultar en un resultado muy heterogéneo al final (Kidd et al., 1995).

Se han desarrollado una variedad de técnicas para cambiar el balance dinámico hacia el producto deseado. Una de ellas es el comienzo en caliente (Hot Start) de la PCR, que consiste en poner en contacto todos los elementos de la reacción a altas temperaturas, de modo que el alineamiento y extensión de secuencias erróneas o la formación de dímeros de iniciadores no ocurra bajo condiciones de baja rigurosidad durante la primera transición de baja temperatura (ambiente) hasta el primer paso de desnaturalización (Kidd et al., 1995). Una reciente variación consiste en adicionar una Taq polimerasa bloqueada químicamente lo cual previene que la polimerasa esté activa durante la primera transición de temperatura y es hasta que termina la primera etapa de desnaturalización, cuando el bloqueo se elimina y puede comenzar la extensión.

2.2.2 FASE DE AMPLIFICACIÓN EXPONENCIAL

Durante los ciclos subsecuentes, el número de copias del fragmento de ADN deseado se incrementa exponencialmente (Kidd et al., 1995), la eficiencia es constante y la cantidad de ADN amplificado (N) a cualquier valor de n es directamente proporcional a la cantidad de ADN inicial.

Durante la mayoría de los ciclos de la etapa de amplificación de la PCR, los ADN moldes son segmentos perfectamente demarcados, amplificados en ciclos anteriores. La complejidad del monitoreo es reducida efectivamente por el gran exceso del material recientemente amplificado que posee sitios perfectamente complementarios a ambos iniciadores (Kidd et al., 1995).

Así, cualquier molécula presente será duplicada en número en cada ciclo y su razón permanecerá inalterada por muchos ciclos mientras todas se incrementen en número. Los únicos requerimientos para que la fase proceda son:

- * Una cantidad suficiente de moléculas de iniciadores y enzima
- * Condiciones que permitan un alineamiento completo de los iniciadores, una extensión completa (por ejemplo, concentraciones adecuadas de nucleótidos libres), y una desnaturalización completa de las moléculas producidas antes del inicio del ciclo siguiente (Kidd et al., 1995).

2.2.3 LA FASE DE MESETA

Conforme los productos de reacción se acumulan, toda la enzima presente se ocupa totalmente y la razón iniciador - molde decrece, mientras que la razón molde - molde (amplificados de ciclos anteriores) aumenta, promoviéndose así el autoalineamiento de las cadenas molde. Cuando el autoalineamiento se vuelve más significativo o la cantidad de enzima se vuelve limitante, la reacción comienza a saturarse y cesa de ser exponencial

(Kidd et al., 1995) entonces la eficiencia desciende y se pierde la relación lineal.

La fase de amplificación es finita para cualquier blanco. Los ciclos térmicos más allá de esta fase desvían la amplificación en falsos blancos que no fueron los preferidos durante los primeros ciclos, debido a que los falsos blancos están en baja concentración, un menor porcentaje de ellos se realinearán a ellos mismos en comparación con aquellos productos (blancos verdaderos) que se encuentren en mayor concentración (Kidd et al., 1995).

En algunos casos de extremo exceso de producto, es posible que se dé la concatemerización del producto, resultando en bandas de peso molecular mucho más alto que el del producto deseado. Este artefacto puede prevenirse por reducción del número de ciclos y mediante un cálculo cuidadoso de la razón iniciador - molde (Kidd et al., 1995).

2.3 CONTROL ENZIMATICO DE LA CONTAMINACIÓN EN PCR

La PCR es especialmente sensible a la contaminación, ya que produce abundante amplificado a partir de trazas del ADN original. Cualquier posible contaminación debe ser eliminada para que los resultados de la PCR sean significativos. El ADN contaminante puede originarse de 3 fuentes. ADN de otras muestras a probar, ADN de materiales experimentales como clonas recombinantes o ADN generado de previas amplificaciones de la misma secuencia blanco. Esta última fuente de contaminación es la más común y también la que causa más problemas y es llamada contaminación por acarreamiento. Detectar la contaminación por acarreamiento por inclusión de un control negativo en las reacciones es esencial (Dieffenbach et al 1995).

El método más ampliamente usado para la descontaminación de PCR está basado en sustituir timina por uracilo en el ADN producto de la PCR. El ADN producido en tales condiciones es normal en muchos aspectos (puede ser cortado con muchas enzimas de restricción y ser hibridizado a sondas), excepto que contiene decenas o centenas de desoxiuridinas. Una preincubación de todas las reacciones de amplificación con la enzima

uracil DNA glicosilasa (UDG) resulta en la remoción de los uracilos del ADN acarreado (sin afectar ADN blanco y dUTP), creando decenas o centenas de sitios abásicos. Las DNA polimerasas se paran en estos sitios. Además, tales sitios son lábiles al calor y se rompen durante los ciclos de temperatura, lo que previene la amplificación. Si el dUTP es usado rutinariamente en todas las amplificaciones, entonces todos los productos tendrán uracilo y serán susceptibles a la UDG. Este método es poderoso y debido a que actúa en reacciones completas justo antes de los ciclos de temperatura (todos los componentes están presentes, incluyendo el ADN blanco), ningún producto de PCR acarreado, sin importar su fuente, puede escapar a la destrucción (Longo et al., 1990 y Dieffenbach et al., 1995).

2.4 PCR CUANTITATIVO

La PCR es una metodología altamente sensible y específica para la detección de ácidos nucleicos y es una herramienta muy útil para la cuantificación de la cantidad de ácidos nucleicos específicos presentes en una muestra. Una vía simple para la cuantificación por PCR es la medición de la cantidad de producto de amplificación en la fase exponencial por referencia a una serie de diluciones de un estándar externo. Como quiera, la cuantificación exacta con este tipo de PCR es impedida por un gran número de variaciones que pueden ocurrir durante la preparación de las muestras o en el curso de la reacción, y variaciones menores en las condiciones de reacción, ya que todas ellas son enormemente aumentadas durante el proceso de amplificación. Estas variaciones pueden ser superadas parcialmente por la normalización de la cantidad de productos de PCR del ADN molde específico con respecto a un molde de referencia interna como el gen celular de la β -globina amplificado en el mismo tubo. Una alternativa es la dilución limitante usando la metodología de PCR anidado (nested PCR), que puede ser usada en combinación con el análisis estadístico de Poisson para la evaluación de los resultados (Zimmermann et al., 1996).

2.5 PCR COMPETITIVA CUANTITATIVA (qcPCR)

La cuantificación más precisa del ADN molde puede ser obtenida por una PCR competitiva. Este ensayo está basado en la coamplificación competitiva de la secuencia blanco específica junto con concentraciones conocidas de un estándar interno en un tubo de reacción. El estándar interno tiene que compartir con el blanco específico los mismos sitios de reconocimiento de los iniciadores, y tanto el blanco específico como el estándar deben ser amplificados por PCR con una eficiencia similar, además debe ser posible cuantificar los productos de PCR del blanco específico y del estándar interno por separado. La cuantificación es entonces realizada comparando la señal de PCR del blanco específico con la señal de PCR del competidor (estándar interno), cuya concentración es conocida (Zimmermann et al., 1996).

Ya que tanto el blanco como el estándar interno se encuentran bajo las mismas condiciones de amplificación, el uso de este sistema compensa el alto número de factores incontrolables que afectan el rendimiento de la PCR (Förster, 1994).

Experimentalmente, a los tubos de reacción que contienen las muestras con una cantidad constante del blanco original se les adiciona una dilución seriada del estándar competidor, y se realiza la coamplificación, lo que da como resultado el patrón de la figura 4 tras resolver los productos de la PCR competitiva en un gel de agarosa. Cuando la razón molar de los productos de la PCR generados del blanco original y del competidor es igual a 1, la cantidad del blanco es igual a la del competidor. Como la cantidad del competidor agregada es conocida, entonces la cantidad del blanco puede ser determinada (Siebert et al., 1995).

En teoría, una sola concentración del estándar competitivo coamplificado con el molde específico pudiera ser suficiente para la cuantificación, por interpolación con una curva de calibración obtenida mezclando cantidades constantes del estándar interno con varias concentraciones conocidas del blanco original. Pero se ha demostrado que las mediciones cuantitativas son más exactas cuando las razones molares del blanco original y

del estándar competitivo son iguales o similares, por lo que es preferible el usar protocolos de PCR cuantitativa que usen la coamplificación de una concentración del molde específico con varias diluciones del estándar interno (Zimmermann et al., 1996).

Desde que este método fue descrito por primera vez (Gilliland et al., 1990), ha sido usado ampliamente para la cuantificación de ADN y ARN celulares, así como ácidos nucleicos virales y bacterianos. Ejemplos reportados incluyen la cuantificación: de ADN mitocondrial; de expresión de citocinas; de virus tales como el de la hepatitis B, hepatitis C, el citomegalovirus humano, herpes simplex, o el virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (HIV-I); y de bacterias, especialmente aquéllas de bajo crecimiento como mycobacterias (Zimmermann et al., 1996).

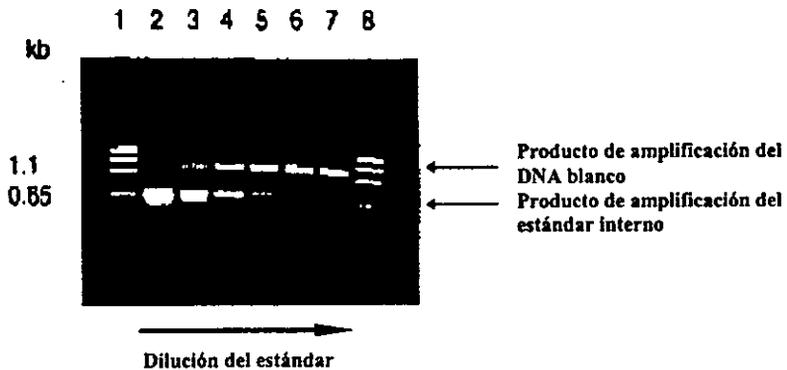


Figura 4. Electroforesis típica de una PCR competitiva cuantitativa
1 y 8: estándares de tamaño de DNA

2.6 VENTAJAS DE LA qPCR

La mayoría de los protocolos descritos para la PCR competitiva sugieren el uso de 30 a 50 ciclos, que en la mayoría de los casos llevan a la PCR más allá de la fase exponencial. Otras publicaciones recomiendan restringir el análisis cuantitativo competitivo a la fase exponencial de acumulación del producto ya que es sólo durante la fase exponencial de la amplificación que la cantidad de productos es proporcional a la cantidad inicial de ADN. Esta fase exponencial debe ser determinada cuidadosamente y puede diferir no sólo debido a la naturaleza del molde específico a ser cuantificado, sino también con respecto al equipo que está siendo usado, lo que es una gran complicación para esta técnica (Zimmermann et al., 1996). Como quiera, estudios recientes que se han dirigido a este problema han mostrado que la amplificación del blanco original y del estándar interno competitivo proceden durante las fases exponencial y no exponencial hasta la fase de meseta con una eficiencia similar, por lo que no es necesario realizar el ensayo durante la fase exponencial de la amplificación, lo que tal vez sea la ventaja más grande de usar PCR competitiva (Siebert et al, 1993, Murphy et al, 1990, Zimmermann et al., 1996).

Cuando existen diferencias menores entre las eficiencias de amplificación del blanco y del estándar interno, esto puede ser compensado al usar un factor de corrección, es decir al normalizar o estandarizar a los competidores (estándar interno) contra el blanco para así poder validar las determinaciones hechas con dicho estándar (McCulloch et al., 1995; Förster et al., 1994).

Por este método es posible medir pequeños cambios en la cantidad relativa de ADN o ARNm con una exactitud razonable. Claramente se puede discernir un cambio de 2 a 4 veces, haciendo el método comparable con hibridaciones Southern o Northern y slot/dot, pero con la sensibilidad, velocidad y conveniencia de la PCR (Siebert et al, 1993).

Finalmente, en protocolos en los que este método ha sido usado, ha mostrado tener un rango de cuantificación de entre tres (Yerly et al., 1992; Aoki et al., 1990) y cuatro ordenes de magnitud (Lee et al., 1991; Mallet et al., 1995; Pannetier et al., 1993; Rüster et

al., 1995).

2.7 TIPOS DE ESTÁNDARES INTERNOS PARA LA PCR COMPETITIVA

El competidor o estándar interno ideal debe ser rápidamente preparado, fácilmente distinguible del blanco, amplificarse con una eficiencia comparable, proveer un resultado independiente del número de ciclos y no requerir de radioisótopos para su cuantificación (McCulloch et al, 1995).

El generar y probar un estándar interno apropiado y el elegir un par de iniciadores son los aspectos más cruciales en la puesta en marcha de un protocolo de PCR competitiva. El camino más simple para escoger unos iniciadores apropiados es, siempre que sea posible, usar iniciadores que sean ampliamente usados o bien descritos en la literatura. Si se tiene que diseñar iniciadores nuevos, dos herramientas muy poderosas son las bases de datos de secuencias y los programas de computación especializados (Zimmermann et al., 1996). Debido a que diferentes pares de iniciadores para un mismo gen pueden exhibir diferencias de hasta 1000 veces en la sensibilidad (He et al., 1994), debe ponerse un énfasis especial en probar la eficiencia y especificidad del par de iniciadores antes de construir el estándar interno.

Una vez que se ha seleccionado el par de iniciadores adecuado, pueden ser usadas varias estrategias para construir el estándar interno. Los estándares internos para la PCR cuantitativa son fragmentos que comparten las secuencias de reconocimiento de los iniciadores con el blanco específico y pueden producir productos de PCR que se distinguen del blanco original tras una electroforesis de ADN (Zimmermann et al., 1996).

2.7.1 ESTÁNDARES HOMÓLOGOS

La manera más fácil de distinguir entre el blanco original y el estándar interno es por diferencias en el tamaño de los dos productos. Esto puede lograrse, por ejemplo, construyendo estándares que tienen la misma secuencia que el blanco específico pero que contienen una delección o una inserción. También se pueden obtener diferencias entre el blanco y el estándar al incorporar sitios de restricción (Zimmermann et al, 1996). Un refinamiento de este método es reemplazar el sitio de restricción del blanco, cuando se construye el estándar, por otro sitio de restricción diferente, y entonces digerir la mezcla amplificada con cada enzima por separado a lo que se le llama el método de doble corte (McCulloch et al, 1995). Otra manera de construir estándares internos es el intercambio de nucleótidos en el blanco específico, lo cual puede ser identificado tras una hibridización diferencial con sondas específicas para las secuencias original y la estándar (Zimmermann et al, 1996).

Estas estrategias pueden resultar en un blanco y un estándar que comparten la mayoría de sus secuencia nucleotídica con el objetivo de minimizar diferencias en la eficiencia de amplificación entre ambos. Una desventaja de estos métodos es que pueden formarse heteroduplex, que pueden interferir con el análisis si no pueden ser separados del blanco y del competidor ya que pueden correr a diferente velocidad en el gel o pueden ser resistentes a la digestión. La formación de estos heteroduplex se incrementa conforme la PCR se acerca a la fase de meseta (McCulloch et al, 1995).

2.7.2 ESTÁNDARES HETERÓLOGOS

Una forma básicamente diferente para construir un estándar competitivo es usar un gen espaciador no específico o segmento de ADN heterólogo. Estos competidores tienen secuencias nucleotídicas totalmente diferentes a la original, excepto por las secuencia de los iniciadores de la original que se encuentran unidas a sus extremos 5'. Estos pueden crearse de varias maneras:

1. Ligando las secuencias de los iniciadores a los extremos de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con enzimas de restricción (Siebert et al., 1995).
2. Amplificando un ADN heterólogo con un par de iniciadores compuestos. Los iniciadores compuestos contienen las secuencias de los iniciadores del blanco continuas a las secuencias que alinean con el fragmento de ADN heterólogo. Así, durante la amplificación las secuencias de los iniciadores del blanco son incorporados en los productos (Siebert et al., 1995).
3. Finalmente también se ha descrito la generación de estándares competitivos por la amplificación de múltiples fragmentos de ADN de material celular en una PCR de baja rigurosidad. Este procedimiento resulta en una variedad de productos de PCR de diferentes tamaños, de los cuales se puede purificar el más apropiado y usarlo como estándar interno en un ensayo cuantitativo de PCR competitiva (Zimmermann et al., 1996).

El uso de un mismo par de iniciadores para amplificar ADNs de diferentes tamaños no garantiza eficiencias de amplificación iguales. Incluso se ha observado que hay una relación inversamente exponencial entre la eficiencia de amplificación y el tamaño del templado, por lo que es muy importante minimizar las diferencias de tamaño entre el estándar y el blanco. También se recomienda que tanto el estándar como el blanco tengan contenidos similares de G+C (McCulloch et al, 1995; Vanden et al., 1993).

El molde competitivo construido en cualquiera de los modos anteriores, usualmente es separado por electroforesis en gel y purificado. Puede usarse directamente en un ensayo competitivo, pero también puede ser clonado en plásmidos (Zimmermann et al., 1996).

Después es importante determinar exactamente la concentración del estándar interno. Así que es aconsejable, no sólo cuantificar espectrofotométricamente el plásmido competidor que va a ser usado como estándar interno, sino también verificar su calidad electroforéticamente. Además la concentración del estándar interno puede ser verificada por PCR en combinación con dilución de punto final, tomando en cuenta la distribución de Poisson (Zimmermann et al., 1996).

2.8 DETECCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR

Para la detección y el análisis de los productos amplificados, hay disponibles una gran variedad de procedimientos.

Los productos de PCR de diferentes tamaños, usualmente son separados por electroforesis en gel, en gel capilar o por HPLC. El método más fácil y el más usado es la electroforesis en gel sumada a la tinción con bromuro de etidio u otro colorante fluorescente equivalente, para visualizar las bandas de ADN. El gel puede estar hecho de polyacrilamida o de agarosa. Para la cuantificación de las bandas de ADN, puede ser usado un sistema de video y análisis de imágenes, pudiéndose analizar por densitometría los geles directo del transiluminador o de la fotografía. La cantidad de colorante incorporado por molécula de ADN depende de la longitud de la misma, por lo que debe hacerse la corrección que tome en cuenta esto al momento de comparar las cantidades molares del blanco y del estándar para la cuantificación. Para determinar la cantidad de blanco debe construirse una gráfica en la que el logaritmo de la razón de la intensidad de la señal correspondiente al estándar interno sobre la del blanco, usualmente corregida por la diferencia de tamaños, es graficada en función del logaritmo de la concentración del estándar interno agregado. Esto produce una gráfica lineal (Fig. 5) y para encontrar el número de copias de ADN blanco presentes en la muestra, se hace una interpolación para $Y=0$ que es el punto en que los productos de amplificación del estándar y del blanco están en concentraciones iguales (Zimmermann et al., 1996).

Un procedimiento más sensible que la tinción con bromuro de etidio es el marcaje de los oligonucleótidos o de los dNTPs con fluorescencia o radiactividad. En el caso del marcaje radiactivo, después de la separación electroforética, se puede cuantificar la radiactividad incorporada en las bandas cortadas, se puede hacer una densitometría de la autoradiografía del gel, o una radioimagen del gel seco. En el caso del marcaje fluorescente, los productos pueden separarse en geles de poliácridamida y cuantificarse elegantemente usando un secuenciador automático de ADN con inductor laser de fluorescencia (Zimmermann et al., 1996).

Otro método es realizar una separación electroforética de productos no marcados, transferirlos a una membrana y cuantificar después de hibridizar con sondas marcadas de manera radiactiva o no radiactiva. Alternativamente los productos pueden hibridarse con sondas marcadas antes de la separación (hibridización en líquido). Para llevar a cabo una cuantificación más automatizada, se han reportado métodos que envuelven la captura de los productos de PCR en soportes sólidos (como microplacas o esferas magnéticas) seguida por cuantificación del material capturado por hibridación con sondas marcadas (Zimmermann et al., 1996).

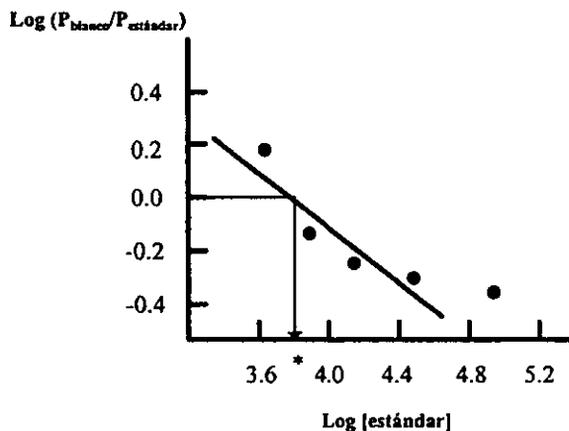


Figura 5. Representación gráfica de los resultados de una qcPCR

Se graficó el logaritmo de la razón molar del producto de amplificación del blanco sobre el producto de amplificación del estándar interno contra el logaritmo de la concentración de estándar interno.

La concentración del blanco se obtiene interpolando para $y=0$.

2.9 BLANCOS PARA PCR DENTRO DEL GENOMA DE *T. gondii*

Durante los últimos años se han desarrollado un considerable número de ensayos de PCR para el diagnóstico de la toxoplasmosis. En base a la secuencia de varios genes del parásito se han diseñado diferentes pares de iniciadores y/o sondas. Algunas de las secuencias son de genes que son monocopia como P30 (Weiss et al, 1991), otras son secuencias repetitivas multicopias tal como el gen B1 (Burg et al, 1989), otras son anónimas como TGR1E (Cristina et al, 1992), mientras que otro blanco es el gen multicopia de un ARNr de la pequeña subunidad ribosomal 18s (Guay et al, 1993).

Sin embargo la secuencia del gen B1 que está repetido 35 veces, es conservada y específica para *T. gondii* ha sido la más estudiada y utilizada (Pelloux et al, 1996).

El gen B1 fue aislado y descrito por primera vez en 1987, al hacer una búsqueda en una librería genómica en λ gt11 de la cepa RH de *T. gondii* con un suero policlonal de ratón contra un lisado de taquizoítos del parásito. Se encuentra dentro de un fragmento EcoRI de 2.2kb repetido en tandem dentro del genoma (Boothroyd et al., 1987). Debido a su naturaleza repetitiva, el gen B1 es un blanco muy atractivo para detectar al parásito *T. gondii* a través de una PCR específica para B1. El número de copias del gen B1 dentro del genoma fue determinado por hibridización comparativa con ADN genómico de la cepa RH y ADN de un plásmido donde fue clonada la secuencia de B1. Se concluyó que hay alrededor de 35 copias del gen B1 dentro del genoma de *T. gondii*. Aún no se ha logrado identificar el polipéptido codificado por el gen B1, pero se sabe que el ARNm para dicho gen es de alrededor de 1.6kb, y que la secuencia del gen posee un intron (Burg et al., 1989).

Se ha demostrado que es un gen altamente específico para *T. gondii*, lo cual se ha probado al tratar de amplificar con los oligos reportados por Burg (694-714 y 887-868) ADN de una variedad de organismos relacionados de manera cercana, como lo son *Sarcocystis*, *Neospora*, *Plasmodium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* y *Absidia* spp. sin encontrar en ningún caso alguna señal detectable indicando que esta combinación es específica para *T. gondii* (Burg et al., 1989). La especificidad de este gen también ha sido

probada con los oligos descritos por Pelloux et al. (1996) al tratar de amplificar ADN de *Trypanosoma*, *Plasmodium falciparum*, *Leishmania*, *Mycobacterium tuberculosis* y citomegalovirus.

También se ha reportado que el gen B1 se encuentra en todas las cepas que se han probado hasta la fecha, incluyendo varios aislados de pacientes con SIDA. Burg reportó que logró obtener amplificado con sus oligos (694-714 y 887-868) para cuatro cepas: RH, C56, P y C así como para dos aislados de pacientes con SIDA (A1 y A2) lo que indica que el gen se encuentra conservado por lo menos en la región amplificada. Además diferentes cepas contienen aproximadamente el mismo número de copias, según los resultados obtenidos (Burg et al., 1989). Grover et al. (1990) lograron la detección de B1 por PCR con los mismos oligos en un total de 15 cepas más. Groß et al. (1992) obtuvieron amplificado con sus oligos para la cepa RH así como para 5 aislados clínicos de Europa central BK, ALT, 177, NTE y 561.

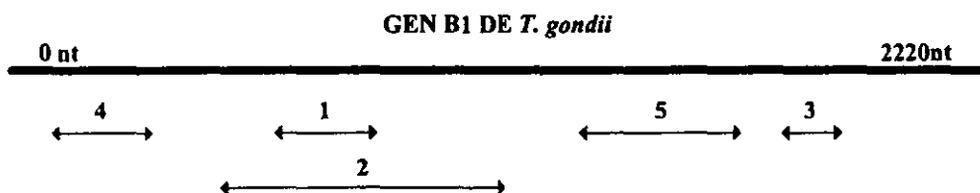
Otra evidencia de su conservación es que en todos los casos de los oligos reportados se han usado pruebas de hibridización para confirmar que el amplificado obtenido sea efectivamente de la región deseada (Burg et al, 1989; Groß et al, 1992; Bretagne et al, 1993; Pelloux et al, 1996). Alternativamente también se han realizado análisis de restricción de los segmentos amplificados (Groß et al, 1992).

También en todos los casos, en cuanto a nivel diagnóstico, la PCR basada en el gen B1 ha mostrado un nivel de especificidad y sensibilidad igual o mayor al de los métodos tradicionales para la detección del parásito, como lo son el cultivo en células en placa (Grover et al, 1990; van de Ven et al, 1991; Bretagne et al, 1993; Hohlefield et al, 1994; Pelloux et al, 1996), la inoculación en ratones (Grover et al, 1990; van de Ven et al, 1991; Groß et al, 1992; Hohlefield et al, 1994; Pelloux et al, 1996), microscopía (van de Ven et al, 1991; Groß et al, 1992; Bretagne et al, 1993) o incluso otras técnicas diagnósticas como las serológicas (Grover et al, 1990; Groß et al, 1992; Hohlefield et al, 1994; Pelloux et al, 1996).

En la tabla 1 se enlistan y esquematizan los pares de oligonucleótidos descritos hasta la fecha para el gen B1 de *T. gondii*, así como la sensibilidad reportada para cada caso.

Tabla 1. Oligonucleotidos diseñados y reportados para la amplificación del gen B1 de *T.gondii*

| PAR | REFERENCIA | LONG. DEL AMPLIFICADO | OLIGO 1 | OLIGO 2 | SENSIBILIDAD |
|-----|---------------------------|-----------------------|-----------|-----------|--|
| 1 | Burg et al (1989) | 194 pb | 694-714 | 887-868 | 10 taquizoítos /100,000 leucos |
| 2 | Groß et al (1992) | 634 pb | 547-567 | 1180-1160 | 10 taquizoítos / 2x10 ⁶ células |
| 3 | Bretagne et al (1993) | 115 pb | 1793-1817 | 1907-1881 | 5 moléculas de estándar interno |
| 4 | Pelloux et al (1996) | 301 pb | 88-110 | 388-368 | 10 taquizoítos / 1 µg ADN humano |
| 5 | Lab. Pascal Hérion (1997) | 328 pb | 1367-1390 | 1694-1671 | 100 taquizoítos |



IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El protozoario intracelular *Toxoplasma gondii* es un parásito que infecta tanto a aves como a mamíferos, incluyendo al hombre. La infección que causa, la toxoplasmosis, es generalmente asintomática en individuos sanos, pero puede causar complicaciones severas en fetos y en pacientes inmunocomprometidos. Por lo anterior, el desarrollo de una vacuna para controlar a este agente infeccioso, sería de gran utilidad.

Para lograr este objetivo, en este laboratorio se trabaja en el modelo murino de la toxoplasmosis y en el se prueban diferentes candidatos a vacuna. Para evaluar el grado de protección que ofrece una vacuna, es necesario determinar cuantitativamente la carga parasitaria que existe en el tejido de los ratones. Hasta ahora ésto se ha realizado mediante la observación microscópica y el conteo de quistes presentes en el tejido. Debido a que esta técnica es muy tardada y relativamente poco sensible, es necesario contar con otra técnica que ofrezca ventajas sobre la ya existente. Es por ello que en este proyecto se desarrollará una técnica de PCR para cuantificar ADN del parásito, la cual, proporcionará un método directo para determinar la carga parasitaria, de una manera más rápida y sensible que el conteo de quistes.

La utilización de una técnica competitiva con un estándar interno, es necesaria porque la técnica de PCR por sí sola no es cuantitativa, ya que con mínimas variaciones en las condiciones de reacción, se pueden obtener diferencias apreciables en los productos obtenidos en una y otra amplificación de la misma muestra.

V. OBJETIVOS

Desarrollar y optimizar una técnica de PCR competitiva para ADN de *Toxoplasma gondii* que sea útil para la detección cuantitativa del parásito en una muestra de tejido de ratón.

VI. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La técnica de PCR competitiva nos permitirá desarrollar un ensayo para la cuantificación de ADN de *T. gondii* presente en una muestra de tejido (cerebro) de ratón infectado.

VII. MATERIAL Y METODOS

1. EQUIPO

Balanza analítica Sartorius basic

Balanza semianalítica Sartorius MC1

Baño refrigerador recirculante Cole Parmer Polystat

Baño seco Thermolyne Type 16500

Baño térmico con agitación modelo New Brunswick Scientific 6760

Baño térmico HETO OB13

Cámara de electroforesis BioRad Wide Mini Sub Cell

Cámara Polaroid Fotodyne Incorporated

Centrífuga BECKMAN J2-21

Centrífuga clínica Sorvall T 6000D

Espectrofotómetro UV/Visible Beckman DU.65

Fuente de poder Life Technologies 250

Gabinete de seguridad Class IIA/B3 Biological safety cabinet Forma Scientific

Horno de microondas Panasonic

Incubadora WTC binder

Microcentrífuga Eppendorf 5415

Microcentrífuga IEC Micro Max

Micropipetas LabSystems, Finnpiette

Parrilla de agitación Thermolyne Cimarec 2

Plataforma giratoria Bellco Biotechnology

Potenciómetro Cole Parmer 05669-20

Propipeta eléctrica Drummond Scientific

Roto Torque Cole Parmer

Termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400

Transiluminador Fotodyne FotoPrep

Vortex Scientific Industries 2 Genie

2. REACTIVOS

5-bromo-4-cloro-indolil β -galatosido (X-gal) USB
Acetato de amonio Baker
Acetato de potasio Baker
Acido 3-(N-morfolino) propanosulfonico (MOPS) Sigma
Acido acético Baker
ADN del fago Lambda cepa CI857Sam7 Lakeside
Agar Bacto DIFCO
Agarosa para electroforésis Gibco BRL
Alcohol isoamílico Merck
Amortiguador para PCR I y II Perkin Elmer
Ampicilina Sigma
AmpliTaq Gold Perkin Elmer
AmpliTaq Perkin Elmer
Azul de bromofenol Sigma
 β -mercaptoetanol Sigma
Bromuro de etidio Sigma
Cloroformo Baker
Cloruro de calcio Baker
Cloruro de magnesio 25 mM Perkin Elmer
Cloruro de sodio Sigma
Columnas para purificación de plásmidos QIAGEN TIP 100
dATP, dTTP, dGTP, dCTP 100 mM Pharmacia
DNAzol Gibco BRL
Dodecil sulfato de sodio (SDS) BioRad
dUTP Lakeside
Enzimas y amortiguadores de digestión Lakeside
Estuche "TA cloning Kit" Invitrogen
Etanol absoluto Merck

Eter Baker
Etilen diamino tetraacetato de sodio (EDTA) Sigma
Extracto de levadura Bacto DIFCO
Fenol ultrapuro Gibco BRL
Glicerol Sigma
Glucosa Sigma
Hidróxido de sodio Baker
Isopropanol Baker
Isopropil β -tiogalactopiranosido (IPTG) Sigma
pBKS+ Stratagene
Proteínasa K Boehringer
RNAsa Sigma
Sulfato de amonio Baker
T4 DNA ligasa y su amortiguador 10X Lakeside
Tirosina Sigma
t-octilfenoxipoletoxietanol (Triton X100) Sigma
Triptona Bacto DIFCO
Tris ((hidroximetil) aminometano) grado electroforesis BioRad
Tris ((hidroximetil) aminometano) grado biología molecular Sigma
Tween 20 Sigma
Uracil DNA Glicosilasa (UNG) Lakeside

3. MATERIAL BIOLÓGICO

E. coli cepa DH5 α F' Gibco BRL
T. gondii cepa RH
T. gondii cepa Me49
T. gondii cepa Wiktor

4. INICIADORES

Los iniciadores Rd-1 y Rd-2 fueron reportados por Pelloux et al. (1996), juntos amplifican un segmento de ADN de 301 pb dentro del gen B1 de *T. gondii* que va del nucleótido 88 al 388 con 155 nt que son G o C. El oligonucleótido Rd-1 corresponde a los nucleótidos 88-110 de la cadena en sentido 5'-3' dentro del gen B1, y tiene la siguiente secuencia: 5'-AAG GGC TGA CTC GAA CCA GAT GT-3'. El oligonucleótido Rd-2 corresponde a los nucleótidos 388-368 de la cadena en sentido 3'-5' dentro del gen B1, y tiene la siguiente secuencia 5'-GGG CGG ACC TCT CTT GTC TCG-3'.

Los iniciadores XP-5 y XP-6 son iniciadores compuestos que amplifican una secuencia de 271pb del genoma del fago lambda cepa CI857Sam7 y además contienen en los extremos 5', las secuencias correspondientes a los iniciadores Rd-1 y Rd-2 respectivamente, que son usados para amplificar un segmento de 301 pb del gen B1 dentro del genoma de *T. gondii*. Para elegir la secuencia a amplificar dentro del genoma de lambda, se realizó una búsqueda con el programa GeneWorks versión 2.5.1 dentro de la función "Búsqueda de iniciadores para PCR" de la siguiente manera. La búsqueda se hizo dentro de la secuencia del fago lambda silvestre encontrada en la base de datos GenBank88 pero en la región 1-35460 nt que son los que comparte con la cepa CI857Sam7, que es con la que se cuenta en el laboratorio. Las demás condiciones fueron: la diferencia entre las temperaturas de fusión de los dos oligonucleótidos no debe ser mayor a 3°C, la concentración de las sales es de 50 mM, la concentración de ADN es de 50 nM, la longitud del amplificado debe estar entre 240-280 nt, la temperatura de fusión del amplificado debe estar entre 75-85°C, los oligonucleótidos no deben de tener más de 3 residuos consecutivos iguales, no debe haber residuos ambiguos dentro de los oligonucleótidos, el último residuo de los oligonucleótidos debe ser G o C, la longitud de los oligonucleótidos debe ser entre 16-22 nt con un óptimo de 20 nt, la temperatura de fusión de los oligonucleótidos debe ser entre 50-70°C con un óptimo de 60°C y el porcentaje de GC de los oligonucleótidos debe ser entre 40-60%.

Producto de esta búsqueda se obtuvo una lista de pares de iniciadores, de entre los cuales se seleccionó el compuesto por dos iniciadores que juntos amplifican un segmento de ADN de 271 pb dentro del genoma del fago lambda cepa CI857Sam7 que va del nucleótido 17712 al 17982, con una temperatura de fusión de 78°C, una temperatura de alineamiento teórica de 57°C, un contenido de GC de 134 nt y un sitio MspI que produce un corte en el nucleótido 135. El oligonucleótido A corresponde a los nucleótidos 17712-17731 de la cadena en sentido 5'-3' dentro del genoma de lambda y tiene la siguiente secuencia: 5'-CGT TTA TGA CCC GAC GGT AC-3'. El oligonucleótido B corresponde a los nucleótidos 17982-17963 de la cadena en sentido 3'-5' dentro del genoma de lambda, y tiene la siguiente secuencia 5'-ATG GGA TTC GGT TAT CTT GC-3'.

De este modo, los iniciadores compuestos XP-5 y XP-6 tienen las siguientes secuencias:

XP-5:

5'-AAG GGC TGA CTC GAA CCA GAT GT C GTT TAT GAC CCG ACG GTA C-3'

secuencia 88-110 de B1

secuencia 17712-17731 de lambda

XP-6:

5'-GGG CGG ACC TCT CTT GTC TCG ATG CGA TTC GGT TAT CTT GC-3'

secuencia 388-368 de B1

secuencia 17982-17963 de lambda

Los oligonucleótidos Rd-1, Rd-2, XP-5 y XP-6 se mandaron sintetizar por Oligos Etc. Los oligonucleótidos llegaron liofilizados, fueron hidratados y diluidos con agua MQ. Se cuantificaron espectrofotométricamente y se ajustó la concentración final a 20 µM, usando como coeficientes de extinción: 4.37, 5.44, 2.39 y 2.69 nmol/OD, respectivamente. De esta solución se hicieron alícuotas de 50 µl que se guardaron a -70°C.

5. PREPARACIÓN DEL FENOL

5.1 Saturación del fenol

Llevar a TA un frasco de fenol destilado, aflojar la tapa y poner el frasco en BM a 65°C hasta fusión. Agregar agua MQ hasta el cuello del frasco, cerrar bien y agitar hasta obtener una emulsión fina. Guardar a 4°C hasta la separación de las fases (una noche). Eliminar la fase acuosa y guardar a 4°C en la oscuridad (estable 6 meses).

5.2 Equilibración del fenol

Mezclar 15 ml de fenol más 15 ml de Tris 1 M pH8, agitar, decantar y eliminar la fase acuosa superior. Agregar 15 ml de Tris 0.1 M pH 8, agitar, decantar y eliminar la fase acuosa superior.

5.3 Preparación del fenol saturado con Tris 0.1M pH8

En una botella de 100 ml agregar 12.5 mg de hydroxiquinoleína, 12.5 ml de fenol equilibrado y 62 ml de Tris 0.1 M pH 8. Agitar y decantar.

5.4 Preparación del fenol - cloroformo - alcohol isoamilico

En una botella de 100 ml agregar 12.5 mg de hydroxiquinoleína, 12.5 ml de fenol equilibrado, 12 ml de cloroformo, 0.5 ml de alcohol isoamilico y 50 ml de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8). Agitar, decantar y eliminar fase acuosa superior. Agregar 50 ml de TE, agitar decantar y eliminar la fase acuosa superior. Agregar 10 ml de TE y guardar a 4°C en la oscuridad (estable un mes).

6. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO

6.1 ADN de *T. gondii*

El ADN de *T. gondii* de las cepas Wiktor y Me49 había sido previamente purificado en el laboratorio por el método de la proteinasa K.

6.2 Purificación de ADN de cerebro de ratón por el método de la proteinasa K

Se sacrificó un ratón cepa Swiss por dislocación cervical, se extrajo el cerebro y se homogeneizó en 600 μ l de DPBS (NaCl 138 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 8.1 mM, KH_2PO_4 1.2 mM) quedando una concentración aproximada de 25×10^7 células/ml, se tomaron 650 μ l de la suspensión y se colocaron en un tubo para microcentrífuga que se centrifugó a 3000 g por 5 min en una microcentrífuga (6000 rpm), se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en TE suficiente para llevarlo a un volumen final de 1 ml. La suspensión se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 ml, se agregaron 10 ml de amortiguador de extracción (Tris 10 mM, EDTA 0.1 M, SDS 0.5%, RNasa 20 μ g/ml pH 8) y la suspensión se dispersó. Se incubó por 1 h a 37°C en un baño térmico de agua. Se le agregó proteinasa K (20 mg/ml) a una concentración final de 100 μ g/ml y se incubó 3 h a 50°C en un baño térmico de agua, agitando periódicamente. Se dejó enfriar a TA y se transfirió a un tubo de polipropileno de 30 ml para centrifuga agregando después 11 ml de fenol saturado con Tris 0.1 M pH 8. Se mezcló suavemente durante 15 min en Roto Torque y después se centrifugó 15 min a 2410 g con el rotor H100 en la centrifuga clínica (3300 rpm) a TA. Se transfirió la fase acuosa (parte superior) a un tubo limpio de polipropileno de 30 ml para centrifuga con una pipeta pasteur cortada (orificio de aproximadamente 3 mm de diámetro) y se le agregaron 11 ml de fenol saturado con Tris 0.1 M pH8. Se mezcló suavemente durante 15 min en Roto Torque y después se centrifugó 15 min a 2410 g con el rotor H100 en la centrifuga clínica (3300 rpm) a TA. Se transfirió la fase acuosa (parte superior) a un tubo limpio de polipropileno de 30 ml para centrifuga con una pipeta pasteur cortada (orificio de aproximadamente 3 mm de diámetro) y se le agregaron 11 ml de fenol - cloroformo - alcohol isoamílico. Se mezcló suavemente durante 40 min en Roto Torque y

después se centrifugó 15 min a 2410 g con el rotor H100 en la centrifuga clínica (3300 rpm) a TA. Se transfirió la fase acuosa (parte superior) a un tubo limpio Corex de 30 ml con una pipeta pasteur cortada (orificio de aproximadamente 3 mm de diámetro). Se midió el volumen de la fase acuosa con una pipeta de plástico graduada (desechable). Se agregaron 0.2 volúmenes de acetato de amonio 10 M y se mezcló suavemente girando el tubo, después se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto a TA, el tubo se selló con papel parafilm y se invirtió varias veces hasta que las soluciones estuvieron totalmente mezcladas. Se centrifugó 10 min a 4306 g con el rotor JS13.1 (6500 rpm) a TA y se descartó el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a vacío. Se agregaron 10 ml de etanol al 70% a -20°C lentamente sin resuspender la pastilla. Se centrifugó 10 min a 4306 g con el rotor JS13.1 (6500 rpm) a TA y se descartó el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a vacío. Se agregaron 10 ml de etanol al 70% a -20°C lentamente sin resuspender la pastilla, se centrifugó 10 min a 4306 g con el rotor JS13.1 (6500 rpm) a TA y se descartó el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a vacío. Entonces se dejó evaporar hasta la última gota de líquido colocando el tubo verticalmente dentro de un desecador conectado al vacío, sin secar la pastilla. Se agregaron 250 µl de TE y se colocó el tubo verticalmente sobre una plataforma giratoria a TA por 24 h. Después se incubó 24 h a 4°C. Entonces la solución se transfirió a un tubo para microfuga utilizando una punta para micropipeta cortada (orificio de aproximadamente 3 mm de diámetro) y se centrifugó a 15750 g en una microcentrifuga (13000 rpm) por 5 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo para microfuga limpio usando una punta para micropipeta cortada (orificio de aproximadamente 3 mm de diámetro) y se guardó a 4°C.

El ADN se cuantificó como se menciona en cuantificación de ADN. Se obtuvo un total de 323 µg de ADN (rendimiento 1.24 µg de ADN por mg de cerebro) con una razón $A_{260}/A_{280} = 1.92$.

6.3 Purificación de ADN de cerebro de ratón por el método de DNAzol

Todas las operaciones donde los recipientes con soluciones o reactivos estuvieron abiertos se realizaron dentro del gabinete de bioseguridad. Todo lo que se utilizó dentro del gabinete y que no tuviera ningún reactivo o solución, fue irradiado 15 min con U.V. antes de usarse.

Se sacrificó un ratón cepa Swiss por dislocación cervical, se extirpó el cerebro, se pesó y se transfirió a un homogeneizador de tejido, se agregaron 300 μ l de DPBS, se homogeneizó por 3 pasajes del pistilo y se aforó a un volumen de 1 ml con DPBS. Se homogeneizó con pipeta Pasteur y se transfirió la suspensión a un tubo para microcentrífuga. Se tomaron muestras de 100 μ l que se colocaron en tubos para microcentrífuga y se centrifugaron a 2500 g por 5 min (5000 rpm). Se retiró el sobrenadante y se congelaron las muestras colocándolas en nitrógeno líquido. Se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Se sacó del ultracongelador una alícuota de macerado de cerebro (40 mg de tejido). Inmediatamente se le adicionó 1 ml de DNAzol y se lisaron las células por subir y bajar en la punta 50 veces. Se sedimentó el homogeneizado por centrifugar 2 veces a 10,000 g por 10 min en la microcentrífuga (11,000 rpm) a TA. Se transfirió el sobrenadante viscoso a un tubo nuevo para microcentrífuga y se precipitó el ADN presente por adición de 0.5 ml de etanol absoluto mezclando la muestra por inversión e incubando a TA por 3 min. Se centrifugó a 10,000 g en una microcentrífuga (11,000 rpm) por 5 min. Se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 95%, invirtiendo el tubo 6 veces y centrifugando a 4000 g en una microcentrífuga (7000 rpm) por 2 min para después remover el sobrenadante. El precipitado se lavó nuevamente con 1 ml de etanol al 95%, invirtiendo el tubo 6 veces y centrifugando a 4000 g en una microcentrífuga (7000 rpm) por 2 min para después remover el sobrenadante. Se dejó secar el precipitado dejando el tubo abierto durante 15 min a TA. Después se agregaron 300 μ l de NaOH 8 mM y el precipitado se resuspendió haciéndolo pasar por una punta cortada (diámetro aproximado de 3 mm) 30 veces e incubándolo por 15 min a 45°C en un baño seco. Después se dejó mezclar

suavemente toda la noche en el RotoTorque a TA. Se centrifugó a 11500 g en una microcentrífuga (12000 rpm) por 10 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo para microcentrífuga nuevo. Se hizo la cuantificación del ADN como se menciona en CUANTIFICACIÓN DE ADN pero diluyendo y leyendo contra un blanco de NaOH 8 mM. Se obtuvo un total de 75.6 µg (rendimiento de 1.89 µg de ADN por mg de cerebro) de ADN con una razón $A_{260}/A_{280} = 1.8$. Se ajustó el pH de la solución original de ADN a pH 8, agregando 1500 µl de Tris·HCl 0.1 M pH 7 por cada 8000 µl de NaOH 8 mM que se usaran para disolver el ADN. Por último se ajustó la concentración final de ADN a 200 µg/ml con TE.

7. CUANTIFICACIÓN DEL ADN

Se hizo una dilución con TE de la solución a cuantificar para que diera una absorbancia de aproximadamente 0.3 a 260 nm. La solución diluida se mezcló con vortex, dejando 10 min a TA para volver a mezclar con vortex y dar un pulso en la microcentrífuga. Se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm contra un blanco de TE. Posteriormente se hizo el cálculo de las razones de absorbancias A_{260}/A_{280} y el cálculo de la concentración, éste último considerando la dilución inicial y que una solución de ADN de doble cadena de 50 µg/ml tiene una absorbancia de 1 en una cuvetta con un trayecto óptico de 1 cm (Sambrook et al., 1989).

8. DILUCION DEL ADN BLANCO

Para preparar las diluciones del ADN blanco, se partió de soluciones concentradas de ADN purificado por los métodos aquí descritos y almacenado a 4°C. Todas las operaciones donde los tubos con solución de ADN se abrían, fueron hechas dentro del gabinete de bioseguridad. Todas las diluciones se hicieron en TE dentro de tubos para microcentrífuga limpios, autoclaveados e irradiados con U.V. Cuando la solución de ADN no iba a digerirse antes de la PCR, se calentaba por 2 min en un BM a ebullición entre dilución y dilución, a menos que se indique otra cosa en el experimento. Cuando la solución

iba a ser digerida antes de la PCR, se calentaba por 10 min a 70°C en un baño seco entre dilución y dilución.

9. DIGESTIÓN DE ADN GENÓMICO

Todas las operaciones donde los recipientes con soluciones o reactivos estuvieron abiertos se realizaron dentro del gabinete de bioseguridad.

En un tubo para microcentrifuga se agregaron el ADN genómico, el TE que fuera necesario para diluir y el volumen necesario de amortiguador de digestión 10X. Se mezcló la reacción con una punta de micropipeta, para después incubarla a 4°C (en un baño de hielo) por 2 h. Terminado este plazo se adicionó a cada reacción 10 U de enzima de restricción (10 U/ μ l) por cada μ g de ADN a digerir teniendo como limitante que el volumen de enzima agregado no debe exceder el 10% del volumen final de reacción. Entonces se mezcló la reacción con la punta de micropipeta y se incubó por 2 h a 37°C en un baño seco. Al final para inactivar la enzima, se incubó por 15 min a 65°C.

Las enzimas y la composición de los amortiguadores de restricción usados se mencionan en la tabla 2.

| ENZIMA | AMORTIGUADOR | COMPOSICION |
|---------|--------------|--|
| EcoRI | B | Tris-HCl 10 mM, MgCl ₂ 5 mM, NaCl 100 mM y mercaptoethanol 1 mM pH 8 |
| HindIII | L | Tris-HCl 10 mM, MgCl ₂ 10 mM, dithioerythritol 1 mM y mercaptoethanol 1 mM pH 7.5 |
| MspI | B | Tris-HCl 10 mM, MgCl ₂ 5 mM, NaCl 100 mM y mercaptoethanol 1 mM pH 8 |

Tabla 2. Enzimas y amortiguadores de restricción de Lakeside

10. PREPARACIÓN DE LISADO DE TAQUIZOÍTOS

Todas las operaciones donde los recipientes con suspensión de taquizoítos, solución de ADN o algún reactivo se abrían, fueron hechas dentro del gabinete de bioseguridad.

Se colectó el sobrenadante (5 ml) de un frasco de cultivo de células línea VERO infectadas con la cepa RH de *T. gondii*, en un tubo de plástico estéril. Se centrifugó a 834 g en la centrífuga clínica con el rotor H-100 (2000 rpm) por 10 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de DPBS. Se centrifugó a 834 g en la centrífuga clínica con el rotor H-100 (2000 rpm) por 10 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 5 ml de DPBS. Se hizo la cuenta de taquizoítos presentes en esta suspensión, con una cámara de Neubauer. Se hizo una dilución en DPBS de esta suspensión, para tener 1000 taquizoítos/5 μ l y de ahí se hicieron diluciones seriadas de 1:10 de 1 ml cada una para obtener suspensiones con las siguientes concentraciones: 1000 taquizoítos/5 μ l, 100 taquizoítos/5 μ l, 10 taquizoítos/5 μ l y 1 taquizoíto/ 5 μ l. Las 4 suspensiones más un blanco de DPBS se centrifugaron a 4000 g en la microcentrífuga (6500 rpm) por 15 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 ml de agua MQ estéril. Se incubó en BM a ebullición por 10 min, se dejó enfriar y se centrifugó a Vmax en la microcentrífuga por 15 min. Se hicieron alícuotas de 50 μ l que se guardaron a -20°C.

El día que se necesitaron se sacó una alícuota de cada concentración y se incubó en BM a ebullición por 1 min, se dejó enfriar y se centrifugó a Vmax en la microcentrífuga por 10 min.

11. GENERACIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO POR PCR

Todas las operaciones pre-PCR donde los recipientes con soluciones o reactivos estuvieron abiertos se realizaron dentro del gabinete de bioseguridad. Durante el ensamblaje de las reacciones todas las soluciones se mantuvieron sumergidas en un baño de hielo.

11.1 Amplificación del segmento de ADN del fago lambda con los oligos compuestos

El protocolo fue elaborado basándose en el protocolo original del estuche de P.E. Se ensamblaron tres PCR, dos con 50 ng y 5 ng respectivamente de ADN del fago lambda cepa CI857Sam7 y un blanco sin ADN. Se usó el amortiguador I para PCR 10X de Perkin Elmer (Tris·HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM, MgCl₂ 15 mM).

Estas son las concentraciones finales de cada reactivo en la reacción de PCR de 50 µl de volumen total: Tris·HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, dATP 200 µM, dGTP 200 µM, dCTP 200 µM, dTTP 200 µM, iniciador XP-5 0.8 µM, iniciador XP-6 0.8 µM, 1.25 U de AmpliTaq.

Por último los tubos se colocaron dentro del termociclador y se corrió el programa siguiente: 5 min a 95°C, 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 57°C y 1 min a 72°, una incubación de 5 min a 72°C y manteniendo a 4°C hasta el siguiente paso.

Se analizaron 5 µl de cada reacción por electroforesis en gel de agarosa y el resto de los productos se guardaron a -20°C.

11.2 Reamplificación del amplificado con los oligos Rd-1 y Rd-2

Este protocolo fue extraído de lo publicado por Pelloux et al. (1996), y fue modificado al cambiar el uso del amortiguador reportado por el amortiguador II de PE para PCR, además de eliminar la utilización de UDG y dUTP.

Se hizo una dilución 1:1000 del amplificado de 5 ng de ADN de lambda, y se ensamblaron dos reacciones, una con 5 µl de esta dilución y otra con un blanco de reacción.

Estas son las concentraciones finales de cada reactivo en la reacción de PCR de 50 μ l de volumen total: Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, dATP 100 μ M, dGTP 100 μ M, dCTP 100 μ M, dTTP 100 μ M, iniciador Rd-1 0.4 μ M, iniciador Rd-2 0.4 μ M, 1.25U de AmpliTaq.

Por último los tubos se colocaron dentro del termociclador y se corrió el programa siguiente: 5 min a 95°C, 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 70°C y 1 min a 72°, una incubación de 5 min a 72°C y manteniendo a 4°C hasta el siguiente paso.

Se analizaron 5 μ l de cada reacción por electroforesis en gel de agarosa y el resto de la reacción de reamplificación se usó inmediatamente para la ligación al vector.

12. LIGACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR AL VECTOR pCR2.1

Las reacciones se hicieron según el protocolo sugerido en el inserto del estuche "Original TA cloning Kit" de Invitrogen.

El estuche contiene los siguientes reactivos:

- plásmido pCR2.1 linearizado (25 ng/ μ l) en TE
- Amortiguador para ligación 10X (60 mM Tris.HCl pH 7.5, 60 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mg/ml de albúmina bovina, 70 mM β -mercaptoetanol, 1 M ATP, 20 mM dithiothreitol y 10 mM de espermidina)
- T4 ADN ligasa (4 unidades Weiss/ μ l)
- Agua estéril

La reacción de ligación contenía 4 ng de reamplificado con Rd-1 y Rd-2, Tris-HCl pH 7.5 6 mM, MgCl₂ 6 mM, NaCl 5 mM, 100 μ g/ml de albúmina de suero bovino, β -mercaptoetanol 7 mM, ATP 100 μ M, dithiothreitol 2 mM, espermidina 1 mM, 50 ng de

pCR2.1 y 4 U weiss de T4 ADN ligasa en un volumen final de 10 μ l. El control de recircularización contenía lo mismo, excepto los 4 ng de reamplificado con Rd-1 y Rd-2.

Las reacciones se incubaron toda la noche a 14°C en un BM recirculante y se guardaron a -20°C.

13. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

13.1 LB

Para preparar el medio de Luria Bertani (LB), se disuelven 10 g de NaCl, 10 g de triptona Bacto, 5 g de extracto de levadura Bacto, en un litro de agua MQ, se ajusta el pH a 7.5 con NaOH 5 M. Se esteriliza en autoclave 20 min a 120°C.

13.2 LB - Ampicilina

Para preparar LB ampicilina, al medio anterior, inmediatamente antes de usarse se agrega 1 ml de ampicilina (100 mg/ml) por cada litro de LB para obtener una concentración final de 100 μ g/ml.

13.3 Placas de LB agar - ampicilina - IPTG - Xgal

Se disuelven 10 g de NaCl, 1 g de triptona Bacto, 5 g de extracto de levadura Bacto, en un litro de agua MQ, se ajusta el pH a 7.5 con NaOH 5 M. Se agregan 15 g de agar Bacto y se esteriliza en autoclave 20 min a 120°C. Al sacar de la autoclave, el medio se agita para homogeneizarlo.

Antes de vaciar en las placas, el medio se funde en el horno de microondas y se equilibra a 48°C, se agrega 1 ml de ampicilina (100 mg/ml) por cada litro de LB para obtener una concentración final de 100 μ g/ml. Entonces se vacían 30 ml en cada caja petri. Una vez que el medio solidifique se depositan en su superficie 80 μ l de X-gal al 2% en

dimetilformamida y 40 μ l de IPTG 100 mM. Inmediatamente se reparten en toda la placa con un triángulo de vidrio estéril.

14. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Todas las operaciones donde los recipientes con soluciones o reactivos estuvieron abiertos se realizaron dentro del gabinete de bioseguridad.

Se inoculó un tubo para cultivo de 50 ml con 5 ml de medio LB con una asada de la cepa de *E.coli* DH5 α F' guardada en agar profundo y se incubó a 28°C en un baño con agitación a 300 rpm por 16 h. Se inocularon 100 ml de medio LB en un matraz de 500 ml con 2 ml de precultivo y se incubó a 37°C en un baño con agitación a 300 rpm.

Después de 2.5 h se empezó a medir la DO⁶⁰⁰ cada 30 min primero y conforme se acercaba a 0.2 cada 15 min. Cuando la DO⁶⁰⁰ alcanzó 0.2-0.25 se transfirió el cultivo a cuatro tubos para centrifuga de polipropileno estériles y se enfriaron sobre hielo por 10 min. Se centrifugó a 2000 g en el rotor JA20 (5000 rpm) por 10 min a 4°C. Se decantó el medio de cultivo y se guardaron los tubos con la pastilla de células sobre hielo, las pastillas se rompieron agitando los tubos con el vortex. Cada pastilla se resuspendió en 12.5 ml de NaCl (9 g/l) estéril a 0°C y se juntaron las suspensiones en 2 tubos (25 ml/tubo). Se centrifugó a 2000 g en el rotor JA20 (5000rpm) por 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. A cada pastilla se le agregaron 25 ml CaCl₂ 0.1M a 0°C y se resuspendió por pipeteo. Se incubó en hielo por 30 min agitando suavemente cada 10 min. Se centrifugó a 2000 g en el rotor JA20 (5000 rpm) por 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Cada pastilla se resuspendió en 2 ml de CaCl₂ 0.1 M, glicerol 15% a 0°C. Se distribuyeron alícuotas de 100 μ l en tubos de 17 X 100 mm de polipropileno estériles FALCON preincubados en hielo. Las alícuotas se incubaron en hielo 18 h, después se guardaron a -70°C.

15. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS

Todas las operaciones donde los recipientes con bacterias, soluciones o reactivos estuvieron abiertos se realizaron dentro del gabinete de bioseguridad.

Las reacciones de ligación se incubaron 15 min a 65°C en un baño seco. Se removieron del ultracongelador a -70°C 4 tubos cada uno con 100 µl de células competentes DH5αF'. Se derritió el contenido manteniéndolos en la mano y al momento que la suspensión se derritió, los tubos se transfirieron rápidamente a un baño de hielo donde se incubaron por 10 min. Entonces, se adicionó a cada tubo β-mercaptoetanol para llegar a una concentración final de 20 mM, mezclando con una punta para micropipeta. En ese momento se agregó el ADN (2 µl de reacción de ligación o ADN control) y se mezcló el contenido de los tubos girando suavemente el tubo sin calentar la parte de abajo del tubo donde se encontraban las células. Los tubos se dejaron en un baño de hielo por 30 min para después transferirse a una gradilla en un baño termostático a 42°C donde se dejaron sin agitar por 90 s. Entonces los tubos se transfirieron rápidamente a un baño de hielo y ahí se dejaron por 5 min para después agregarle a cada uno 900 µl de LB e incubar por 45 min en una baño a 37°C con agitación de 200 rpm. Entonces los tubos se sacaron del baño y se plaquearon 200 µl de cada uno en una caja de Petri con agar LB - X-gal - IPTG - Ampicilina. Las cajas se incubaron a 37°C y el resto de las células en los tubos se guardaron a 4°C. Además de las cajas plaqueadas con las células (4 cajas), se colocó otra caja que sólo tenía medio como control de esterilidad.

16. AISLAMIENTO DEL ADN PLASMÍDICO POR EL MÉTODO DE "MINIPREP"

En tubos para cultivo de 50 ml se sembraron colonias aisladas en 5 ml de medio líquido LB - Ampicilina. Los cultivos se incubaron a 37°C en un baño con agitación a 300 rpm por 16 h.

Se transfirieron 3 ml de cada cultivo a 2 tubos para microcentrifuga (1.5 ml de cultivo en cada uno) dentro del gabinete de bioseguridad y el resto de los cultivos se guardó a 4°C. Los tubos para microcentrifuga con los 3 ml de cultivo se centrifugaron a 9500 g en una microcentrifuga (10000 rpm) por 1 min. Usando un capilar afilado conectado a vacío se removió un 90% del sobrenadante; después de dejar decantar por un minuto se removió el sobrenadante restante dejando la pastilla lo más seca posible. Se agregaron a cada pastilla 50 µl de solución I a 0°C (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8 y lysosima 4 mg/ml) y, sin cerrar las tapas, se resuspendió la pastilla usando el vortex a velocidad alta. Se incubó 5 min a TA y durante éste tiempo se juntaron las suspensiones que provenían de un mismo cultivo en un sólo tubo. Se agregaron a cada tubo 200 µl de la solución II recién preparada a TA (NaOH 200 mM y SDS 1%) se cerró la tapa y se mezcló invirtiendo el tubo rápidamente 3 veces para después incubar en hielo por 5 min. Inmediatamente se agregaron 150 µl de acetato de potasio pH 4.8 a 0°C, se cerró la tapa, se mezcló con vortex a baja velocidad en posición invertida durante 10 s y se incubó por 5 min en un baño de hielo. Se centrifugó por 5 min a Vmax (16000 g) en una microcentrifuga a 4°C para después transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Al sobrenadante se agregaron 450 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se mezcló con vortex, se centrifugó por 3 min a Vmax en una microcentrifuga a T.A y se transfirió la fase superior (acuosa) con una micropipeta a un tubo limpio. Se repitió la extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. Se agregaron 450 µl de éter saturado con agua, se mezcló con vortex, se centrifugó a V.max en una microcentrifuga por 3 min y se eliminó la fase superior de éter aspirando con un capilar afilado conectado a vacío. Se repitió la extracción con éter y al final se dejaron los tubos abiertos para permitir que se evaporara el resto del éter. Se agregaron 2 volúmenes (700 µl) de etanol absoluto a TA, se mezcló con vortex, se incubó 2 min a TA, se centrifugó por 10 min a Vmax en una microcentrifuga y se descartó el sobrenadante por aspiración con un capilar afilado conectado a vacío. Se agregó 1 ml de etanol al 70% a -20°C, se centrifugó a Vmax por 5 min y se descartó el sobrenadante por aspiración con una capilar afilado conectado a vacío. La pastilla se dejó secar al aire hasta que no se vieran restos de líquido (aproximadamente 30 min); entonces se resuspendió cada

pastilla en 100 µl de TE-RNAsa (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8, RNAsa 50 µg/ml) con vortex y se incubó a 37°C por 1 h para finalmente guardarse a -20°C.

17. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (Columnas QIAGEN)

Se sembró en un tubo para cultivo de 50 ml con 5 ml de medio líquido LB - Ampicilina, una asada de bacterias guardadas en agar profundo y se incubó a 28°C en un baño con agitación a 300 rpm por 16 h. Se inoculó un matraz ErlenMeyer de 100 ml con 30 ml de medio LB - Ampicilina con 50 µl de este precultivo y se incubó a 37°C en un baño con agitación a 300 rpm por 16 h. El cultivo se transfirió a un tubo de polialómero con tapón de rosca estéril y se centrifugó a 1960 g en el rotor JA20 (5000 rpm) por 10 min a 4°C para después decantar perfectamente el sobrenadante dejando el tubo en posición invertida por unos minutos sobre papel absorbente. La pastilla se resuspendió en 4 ml de amortiguador P1-RNAsa (RNAsa 100 µg/ml, Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8) pipeteando hacia arriba y abajo en una pipeta de 5 ml hasta que no queden aglomerados. Se añadieron 4 ml de amortiguador P2 (NaOH 200 mM, SDS 1%), se mezcló suavemente invirtiendo el tubo 6 veces y se incubó 5 min a TA. Se añadieron 4 ml de amortiguador P3 a 4°C (acetato de potasio 3 M pH 5.5), se mezcló de inmediato pero suavemente invirtiendo el tubo 6 veces y se incubó en hielo por 15 min. Durante este tiempo se mezcló por inversión el tubo cada 5 min. Se centrifugó a 30,000 g en el rotor JA20 (18000 rpm) por 30 min a 4°C. Rápidamente se recuperó el sobrenadante claro con una pipeta Pasteur y se pasó a un tubo de policarbonato limpio y autoclaveado. Se centrifugó a 30000 g en el rotor JA20 (18000 rpm) por 15 min a 4°C, se recuperó rápidamente el sobrenadante y se pasó a un tubo limpio de policarbonato autoclaveado. Se equilibró una columna QIAGEN TIP 100 aplicándole 4 ml de QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM pH 7, etanol 15%, Triton X100 0.15%) y dejando que se drenara por gravedad. Una vez que el flujo de la columna se detuvo automáticamente (al alcanzar el menisco la parte superior de la columna) se aplicó el sobrenadante a la columna (inmediatamente después de la última centrifugación, por lo que estaba perfectamente claro) y se dejó que entrara a la resina por gravedad. Entonces se aplicaron a la columna 10 ml de amortiguador QC (NaCl 1 M, MOPS 50 mM pH 7, etanol

15%) dejando que entraran completamente a la columna por gravedad. Se aplicaron de nuevo 10 ml de amortiguador QC. El ADN se eluyó con 5 ml de amortiguador QF (NaCl 1.25 M, Tris-HCl 50 mM pH 8.5, etanol 15%); y se colectó en un tubo Corex de 15 ml dejando que la columna drenara por gravedad sin aplicar presión. El ADN se precipitó agregando 0.7 volúmenes (3.5 ml) de isopropanol a TA, se mezcló y centrifugó inmediatamente en el rotor JA20 a 24000 g (14000 rpm) por 30 min a 4°C. Antes se marcó el lado del tubo que hacía frente al exterior del rotor para ubicar más fácilmente la pastilla. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta Pasteur afilada conectada a vacío cuidando de no tocar la pared del tubo con la marca. Se añadieron 5 ml de etanol al 70% a -20°C sin mezclar y se centrifugó a 24000 g en el rotor JA20 (14000 rpm) por 15 min a 4°C. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante con una pipeta Pasteur afilada conectada a vacío, sin tocar de nuevo la pared del tubo del lado de la marca. La pastilla se dejó secar al aire aproximadamente 30 min hasta que no se vio restos de líquido. Se agregaron 400 µl de agua MQ y se agitó esporádicamente en vortex mientras se incubó por 1 h a TA Después la solución se transfirió a un tubo para microcentrifuga y se centrifugó a 16000 g en una microcentrifuga (14000 rpm) por 5 min. Se transfirió el sobrenadante a un tubo para microcentrifuga limpio y la solución se guardó a -20°C.

18. SECUENCIACIÓN DE ADN

Para secuenciar el inserto del plásmido pCRLamB1.5, se mandaron 5 µg del ADN plasmídico purificado por QIAGEN al Departamento de Bioquímica de la Universidad de Queen en Kingston Ontario, Canadá. El equipo usado para la secuenciación fue el Secuenciador Automático de Applied Biosystems modelo 377 versión 2.1.1. Los iniciadores usados para la secuenciación fueron los iniciadores universales para M13 (sentido directo y sentido contrario), que se encuentran flanqueando el sitio de inserción.

19. DIGESTIÓN DE ADN PLASMÍDICO Y DE PRODUCTOS DE PCR

En un tubo para microcentrífuga se agregaron el ADN, el TE si era necesario para diluir y el volumen necesario de amortiguador de digestión 10X. Después se adicionó a cada reacción 10 U de enzima de restricción (10 U/ μ l) por cada μ g de ADN a digerir teniendo como limitante que el volumen de enzima agregado no debe exceder el 10% del volumen final de reacción. Entonces se mezcló la reacción con vortex y se incubó por 2 h a 37°C en un baño seco. Al final la enzima se inactivó incubando por 15 min a 65°C.

Las enzimas y la composición de los amortiguadores de restricción usados se mencionan en la tabla 2.

20. PROTOCOLO DE PCR

Todas las operaciones pre-PCR, fueron hechas dentro del gabinete de bioseguridad. Las operaciones post-PCR siempre fueron hechas fuera del gabinete.

Antes de comenzar el protocolo, el gabinete de bioseguridad se sanitizó con alcohol al 70%, se introdujo todo lo que se fuera a utilizar dentro y además se colocaron en gradillas, todos los tubos para microcentrífuga y para PCR, que se iban a utilizar (abiertos), se destaparon las cajas de puntas para micropipetas, para que todo se irradiara con U.V. por 15 min.

Durante los experimentos se utilizaron dos diferentes soluciones amortiguadoras. Una fue la solución amortiguadora II para PCR de Perkin Elmer 10X (Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM); la otra, la solución amortiguadora reportada por Pelloux et al (1996) (Tris-HCl 670 mM pH 8.8, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 160 mM, Tween 20 0.1%). En ambos casos el magnesio fue agregado aparte en una solución de MgCl_2 25 mM de Perkin Elmer.

20.1 PCR con AmpliTaq

Este protocolo fue extraído de lo publicado por Pelloux et al. (1996), y fue modificado al eliminar la utilización de dUTP y UDG.

Las soluciones que se encontraban almacenadas a -20°C , se descongelaron, lo cual incluye las alícuotas de los iniciadores, la solución amortiguadora, la solución de MgCl_2 y los nucleótidos. Los iniciadores, la solución amortiguadora y la solución de MgCl_2 además se calentaron por 1 min en un BM a ebullición. Todos los tubos con las soluciones, incluyendo las gradillas con los tubos de las reacciones de PCR que se estaban ensamblando, se mantuvieron sumergidos en hielo. La AmpliTaq se sacó de -20°C directo al baño de hielo.

Se preparó una mezcla de nucleótidos agregando 380 μl de agua MQ, 5 μl de solución de dATP (100 mM), 5 μl de solución de dGTP (100 mM), 5 μl de solución de dCTP (100 mM) y 5 μl de solución de dTTP (100 mM). Al final se mezcló todo con vortex.

Entonces se preparó una mezcla maestra de reacción que contenía todos los elementos de la reacción de PCR en agua MQ, exceptuando el ADN. Esta mezcla maestra se preparaba agregando por cada reacción lo siguiente: 29.75 μl de agua MQ, 5 μl de solución amortiguadora 10X reportada por Pelloux et al.(1996), 4 μl de solución de MgCl_2 (25 mM), 4 μl de la mezcla de nucleótidos, 1 μl del iniciador en sentido directo (20 μM) , 1 μl del iniciador en sentido contrario (20 μM) y 0.25 μl de AmpliTaq (5 U/ μl), llegando así a un volumen final de 45 μl , por reacción. Al final se mezcló todo con vortex.

A los tubos de PCR se agregaron, primero 5 μl de la solución de ADN a amplificar o TE en el caso de los blancos de reacción y después se agregaron 45 μl de la mezcla maestra. Los tubos se cerraron y se les dio un pulso en la microcentrífuga (5 s a 8000 rpm). Los tubos se colocaron dentro del termociclador y se corrió el programa siguiente: 5 min a

95°C, 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 70°C y 1 min a 72°, una incubación de 5 min a 72°C y manteniendo a 4°C hasta el siguiente paso.

Una vez terminado de correrse el programa correspondiente en el termociclador, los tubos de las reacciones se transfirieron del termociclador a un baño de hielo. A cada tubo de reacción se le agregaron 5 µl de amortiguador de carga para electroforesis 10x (azul de bromofenol 2.5 mg/ml, SDS 1%, glicerol 50%, TAE 10X), se mezcló con vortex y se le dio un pulso en la microcentrífuga (5 s a 8000 rpm). Entonces se cargaron en el gel de agarosa 11 µl de cada reacción y el resto de cada reacción se guardó temporalmente a 4°C.

20.2 PCR con AmpliTaq Gold

Este protocolo fue extraído de lo publicado por Pelloux et al. (1996), y fue modificado al eliminar la utilización de dUTP y UDG, además de cambiar el uso de la AmpliTaq y del amortiguador reportado por AmpliTaq Gold (bloqueada químicamente) y amortiguador II de PE para PCR.

Las soluciones que se encontraban almacenadas a -20°C, se descongelaron, lo cual incluye las alícuotas de los iniciadores, la solución amortiguadora, la solución de MgCl₂ y los nucleótidos. Los iniciadores, la solución amortiguadora y la solución de MgCl₂ además se calentaron por 1 min en un BM a ebullición. Todos los tubos con las soluciones, incluyendo las gradillas con los tubos de las reacciones de PCR que se estaban ensamblando, se mantuvieron a TA, a excepción de la AmpliTaq Gold que se sacó de -20°C directo al baño de hielo.

Se preparó una mezcla de nucleótidos agregando 380 µl de agua MQ, 5 µl de solución de dATP (100 mM), 5 µl de solución de dGTP (100 mM), 5 µl de solución de dCTP (100 mM) y 5 µl de solución de dTTP (100 mM). Al final se mezcló todo con vortex.

Entonces se preparó una mezcla maestra de reacción que contenía todos los elementos de la reacción de PCR en agua MQ, exceptuando el ADN. Esta mezcla maestra se preparó agregando por cada reacción lo siguiente: 29.75 μl de agua MQ, 5 μl de solución amortiguadora 10X, 4 μl de solución de MgCl_2 (25 mM), 4 μl de la mezcla de nucleótidos, 1 μl del iniciador en sentido directo (20 μM), 1 μl del iniciador en sentido contrario (20 μM) y 0.25 μl de AmpliTaq Gold (5 U/ μl), llegando así a un volumen final de 45 μl , por reacción. Al final se mezcló todo con vortex.

A los tubos de PCR se agregaron, primero 5 μl de la solución de ADN o TE en el caso de los blancos de reacción y después 45 μl de la mezcla maestra. Los tubos se cerraron y se les dio un pulso en la microcentrifuga (5 s a 8000 rpm). Los tubos se colocaron dentro del termociclador y se corrió el programa siguiente: 10.5 min a 95°C, 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 70°C y 1 min a 72°, una incubación de 5 min a 72°C y manteniendo a 4°C hasta el siguiente paso.

Una vez terminado de correrse el programa correspondiente en el termociclador, los tubos de las reacciones se transfirieron del termociclador a un baño de hielo. A cada tubo de reacción se le agregaron 5 μl de amortiguador de carga para electroforesis 10x, se mezcló con vortex y se le dio un pulso en la microcentrifuga (5 s a 8000 rpm). Entonces se cargaron en el gel de agarosa 11 μl de cada reacción y el resto de cada reacción se guardó temporalmente a 4°C.

20.3 PCR con AmpliTaq Gold y UDG

Este protocolo fue extraído de lo publicado por Pelloux et al. (1996), y fue modificado al cambiar el uso de la AmpliTaq y del amortiguador reportado por AmpliTaq Gold (bloqueada químicamente) y amortiguador II de PE para PCR.

Las soluciones que se encontraban almacenadas a -20°C, se descongelaron, lo cual incluye las alícuotas de los iniciadores, la solución amortiguadora, la solución de MgCl_2 y

los nucleótidos. Los iniciadores, la solución amortiguadora y la solución de $MgCl_2$ además se calentaron por 1 min en un BM a ebullición. Todos los tubos con las soluciones, incluyendo las gradillas con los tubos de las reacciones de PCR que se estaban ensamblando, se mantuvieron a TA, a excepción de la AmpliTaq Gold y la UNG que se sacaron de $-20^{\circ}C$ directo al baño de hielo.

Se preparó una mezcla de nucleótidos agregando 380 μl de agua MQ, 5 μl de solución de dATP (100 mM), 5 μl de solución de dGTP (100 mM), 5 μl de solución de dCTP (100 mM) y 10 μl de solución de dUTP (100 mM). Al final se mezcló todo con vortex.

Entonces se preparó una mezcla maestra de reacción que contenía todos los elementos de la reacción de PCR en agua MQ, exceptuando el ADN. Esta mezcla maestra se preparó agregando por cada reacción lo siguiente: 29.55 μl de agua MQ, 5 μl de solución amortiguadora 10X, 4 μl de solución de $MgCl_2$ (25 mM), 4 μl de la mezcla de nucleótidos, 1 μl del iniciador en sentido directo (20 μM), 1 μl del iniciador en sentido contrario (20 μM), 0.25 μl de AmpliTaq Gold (5 U/ μl) y 0.2 μl de UNG (1 U/ μl), llegando así a un volumen final de 45 μl , por reacción. Al final se mezcló todo con vortex.

A los tubos de PCR se agregaron, primero 5 μl de la solución de ADN o TE en el caso de los blancos de reacción y después 45 μl de la mezcla maestra. Los tubos se cerraron y se les dio un pulso en la microcentrífuga (5 s a 8000 rpm). Los tubos se colocaron dentro del termociclador y se corrió el programa siguiente: 3 min a $50^{\circ}C$, 10.5 min a $95^{\circ}C$, 40 ciclos de 30 s a $95^{\circ}C$, 30 s a $70^{\circ}C$ y 1 min a 72° , una incubación de 5 min a $72^{\circ}C$ y manteniendo a $72^{\circ}C$ hasta el siguiente paso.

Una vez terminado de correrse el programa correspondiente en el termociclador, a cada uno de los tubos de las reacciones se agregó 50 μl de cloroformo, se mezcló con vortex y se dio un pulso en la microcentrífuga. Entonces de cada tubo se tomaron 25 μl de la fase acuosa (parte superior) y se transfirieron a un tubo para microcentrífuga limpio,

donde se guardaron a -20°C . Para hacer la electroforesis, se tomaron $10\ \mu\text{l}$ de cada reacción y se mezclaron con $1\ \mu\text{l}$ de amortiguador de carga para electroforesis.

21. PROTOCOLO DE qcPCR

Este protocolo fue extraído de lo publicado por Pelloux et al. (1996), y fue modificado al cambiar el uso de la AmpliTaq y del amortiguador reportado por AmpliTaq Gold (bloqueada químicamente) y amortiguador II de PE para PCR.

Las soluciones que se encontraban almacenadas a -20°C , se descongelaron, lo cual incluye las alícuotas de los iniciadores, la solución amortiguadora, la solución de MgCl_2 y los nucleótidos. Los iniciadores, la solución amortiguadora y la solución de MgCl_2 además se calentaron por 1 min en un BM a ebullición. Todos los tubos con las soluciones, incluyendo las gradillas con los tubos de las reacciones de PCR que se estaban ensamblando, se mantenían a TA, a excepción de la AmpliTaq Gold y la UNG que se sacaron de -20°C directo al baño de hielo.

Se preparó una mezcla de nucleótidos agregando $380\ \mu\text{l}$ de agua MQ, $5\ \mu\text{l}$ de solución de dATP (100 mM), $5\ \mu\text{l}$ de solución de dGTP (100 mM), $5\ \mu\text{l}$ de solución de dCTP (100 mM) y $10\ \mu\text{l}$ de solución de dUTP (100 mM). Al final se mezcló todo con vortex.

Entonces se preparó una mezcla maestra de reacción que contenía todos los elementos de la reacción de PCR en agua MQ, exceptuando el ADN. Esta mezcla maestra se preparó agregando por cada reacción lo siguiente: $24.55\ \mu\text{l}$ de agua MQ, $5\ \mu\text{l}$ de solución amortiguadora 10X, $4\ \mu\text{l}$ de solución de MgCl_2 (25 mM), $4\ \mu\text{l}$ de la mezcla de nucleótidos, $1\ \mu\text{l}$ del iniciador en sentido directo, $1\ \mu\text{l}$ del iniciador en sentido contrario, $0.25\ \mu\text{l}$ de AmpliTaq Gold ($5\ \text{U}/\mu\text{l}$) y $0.2\ \mu\text{l}$ de UNG ($1\ \text{U}/\mu\text{l}$), llegando así a un volumen final de $40\ \mu\text{l}$, por reacción. Al final se mezcló todo con vortex.

A los tubos de PCR, se agregaron, primero 5 μ l de la solución de ADN o TE en el caso de los blancos de reacción, luego 5 μ l de una solución del estándar interno y finalmente 40 μ l de la mezcla maestra. Una vez que se terminaron de ensamblar las reacciones de PCR, los tubos se cerraron y se les dio un pulso en la microcentrifuga (5 s a 8000 rpm). Los tubos se colocaron dentro del termociclador y se corrió el programa siguiente: 3 min a 50°C, 10.5 min a 95°C, 40 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 70°C y 1 min a 72°, una incubación de 5 min a 72°C y manteniendo a 72°C hasta el siguiente paso.

Una vez terminado de correrse el programa correspondiente en el termociclador, a cada uno de los tubos de las reacciones se les agregó 50 μ l de cloroformo, se mezcló con vortex y se le dio un pulso en la microcentrifuga. Entonces de cada tubo se tomaron 25 μ l de la fase acuosa (parte superior) y se transfirieron a un tubo para microcentrifuga limpio, donde se guardaron a -20°C.

Después de la extracción con cloroformo se colocaron 8 μ l de los productos de PCR, 1 μ l de amortiguador de restricción L 10X y 0.5 μ l de enzima de restricción MspI (10 U/ μ l) en un tubo para microcentrifuga. Se mezcló con vortex y se incubó a 37°C dentro de un baño seco por 2 h; después la enzima se inactivó por incubación a 65°C en un baño seco por 15 min. Se agregó 1 μ l de amortiguador de carga para electroforesis 10X y se realizó la electroforesis.

22. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

22.1 Preparación del gel de agarosa

El gel de agarosa se preparó colocando en una botella la cantidad de agarosa y el volumen de TAE 1x (Tris 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético 20 mM, pH 8) correspondientes al porcentaje peso/volumen deseado. La agarosa se fundió en un horno de microondas y después se reconstituyó con agua MQ el volumen perdido por evaporación. La solución se equilibró a 50°C en un baño termostático y después se vertió dentro del

molde con el o los peines ya fijos, donde se dejó solidificar por 30 min. Pasado este tiempo se retiró el o los peines y se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis cubriéndolo con TAE 1x hasta 1mm arriba de su superficie.

22.2 Preparación de los estándares de tamaño

En un tubo para microcentrífuga se mezclaron 200 μl de una solución a 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ADN del fago lambda cepa CI857Sam7, 22 μl de amortiguador B 10X, 2 μl de EcoRI (10 $\text{u}/\mu\text{l}$) y 2 μl de HindIII (10 $\text{u}/\mu\text{l}$). Se incubó una noche a 37°C, se agregaron 23 μl de EDTA 0.5 M y se incubó a 65°C por 10 min, las alícuotas se guardaron en tubos para microcentrífuga a -20°C.

Como referencia de tamaño se cargó en un carril de cada gel una solución que contenía 2.5 μl de esta solución (500 ng de ADN), 7.5 μl de TE y 1 μl del amortiguador de carga 10X.

22.3 Electroforesis

Se agregó 1/10 del volumen de amortiguador de carga 10x a las muestras antes de cargarlas al gel. La electroforesis se corrió a 75 v (voltaje constante) hasta que el azul de bromofenol presente en el amortiguador de carga migrara a $\frac{3}{4}$ a lo largo del gel.

22.4 Tinción

Se sacó el gel sin el soporte y se tiñó por 30 min con agitación lenta sobre una plataforma giratoria dentro de un recipiente de plástico cubierto de la luz con una solución de bromuro de etidio a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en TAE 1X. La solución de bromuro de etidio se sustituyó por agua RO para desteñir el gel, con agitación lenta en una plataforma giratoria por 15min.

22.5 Fotografiado

Una vez desteñido el gel, se colocó sobre el transiluminador y se observó con luz U.V. a 302 nm. Se fotografió con filtro anaranjado con una abertura de 5.6 y un tiempo de exposición de $\frac{1}{4}$ o $\frac{1}{2}$ de segundo, usando películas Polaroid.

VIII. RESULTADOS

I. SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA PCR PARA LA DETECCIÓN DE ADN DE *T.gondii* USANDO LOS INICIADORES Rd-1 y Rd-2

El primer experimento se diseñó para probar los iniciadores Rd-1 y Rd-2, reportados por Pelloux et al. (1996) y verificar si era posible reproducir los resultados obtenidos en dicha referencia.

Un requisito indispensable de la técnica es que los iniciadores sean específicos para el blanco dentro de B1 y el estándar interno, por lo que no deben de amplificar nada en el resto del ADN presente en la reacción. Considerando que en las condiciones reales, además del ADN de *T.gondii*, estará presente ADN de cerebro de ratón debe demostrarse que los iniciadores no amplificarán nada dentro del genoma de ratón. También era necesario comprobar que los iniciadores Rd-1 y Rd-2 fuesen capaces de amplificar el gen B1 de la cepa Me49 que se usa en los ensayos de vacunación que se llevan a cabo en el laboratorio.

Por lo anterior se realizó una serie de amplificación usando como ADN molde diluciones seriadas de ADN de la cepa Wiktor, de la cepa Me49 y una cantidad fija de ADN de cerebro de ratón purificado con proteinasa K.

El protocolo usado fue una modificación del reportado por el autor, ya que se utilizaron los equipos y componentes de reacción equivalentes (de diferente proveedor) y se eliminó el sistema de control de contaminación enzimático (dUTP, UDG y la incubación previa a 50°C) sustituyendo los 200 μM de dUTP por 100 μM de dTTP.

Como se puede observar en la figura 6, en la amplificación del ADN de la cepa Wiktor, se obtuvo en todos los casos una banda de amplificado del tamaño esperado (menor de 500 pb). Además la amplificación resultó ser reproducible dentro del mismo experimento, ya que se observa una intensidad similar para los triplicados de cada concentración de ADN.

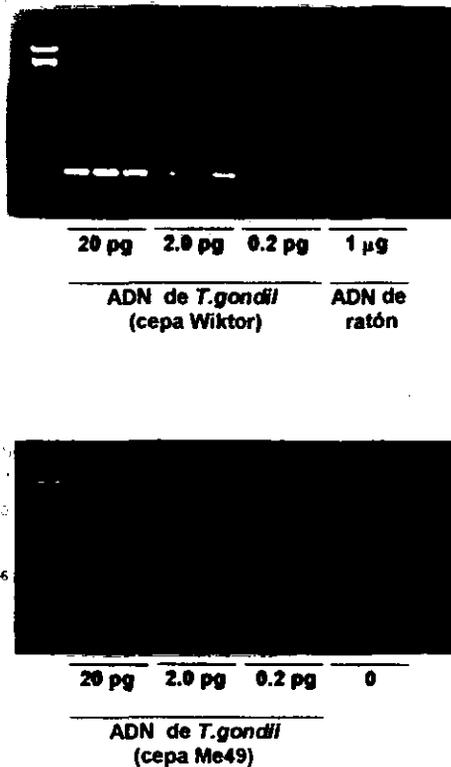


Figura 6. Especificidad de la PCR

Las PCR se llevaron a cabo por triplicado usando como molde diluciones seriadas 1:10 de ADN de *T.gondii*, cepas Wiktor y Me49 o 1 µg de ADN de cerebro de ratón purificado usando proteinasa K. Los iniciadores fueron Rd-1 y Rd-2, las condiciones de amplificación están descritas en "Material y Métodos" (protocolo de PCR con AmpliTaq). Después de la PCR, 10 µl (20%) de los productos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. 0 es un blanco de PCR sin ADN.

Por otro lado en cuanto a la sensibilidad, se logran ver 3 de 3 bandas para la concentración de ADN que equivale a 23 taquizoitos (2.0 pg). Por lo anterior se puede decir que la técnica resultó reproducible a nivel intraensayo, y con una sensibilidad de 23 taquizoitos. Los resultados también muestran que en la amplificación en presencia de 1 µg de ADN de cerebro de ratón, se puede observar un barrido que corresponde al ADN genómico y además algunas bandas bien definidas correspondientes a amplificados de tamaños diferentes al amplificado de *T.gondii*. Estas bandas corresponden a amplificados inespecíficos. En la amplificación del ADN de la cepa Me49 se pueden observar resultados similares a los obtenidos con la cepa Wiktor; sólo hay una ligera disminución en la intensidad de las bandas de amplificado de la última dilución de ADN (correspondiente a 2.0 pg o 23 taquizoitos).

Por último, se puede observar que en algunos carriles hay bandas difusas de un tamaño mucho menor al de las bandas del amplificado esperado. Es muy probable que estas bandas sean producto de la formación de multímeros de iniciadores (Carbonari et al., 1993). Estos multímeros se forman porque mientras la mezcla de reacción permanece a temperaturas bajas (antes y durante el ascenso de temperatura para la primera desnaturalización) se alinean 2 o más iniciadores, creando así un complejo de doble cadena iniciador - iniciador sobre el cual, la Taq polimerasa comienza a sintetizar. De esta manera se unen varios iniciadores de manera irreversible formándose así los multímeros de doble cadena.

2. AMPLIFICACIÓN CON AmpliTaq Gold

Para resolver el problema de inespecificidad que se presentó, se implementó el uso del comienzo en caliente (Hot start) al sustituir a la AmpliTaq por la AmpliTaq Gold (enzima bloqueada químicamente). Para probarla se hizo una amplificación usando como molde diluciones seriadas 1:10 de ADN de la cepa Wiktor, de la cepa Me49, así como ADN de cerebro de ratón purificado con proteinasa K. El protocolo para implementar el uso de esta enzima fue el recomendado por el proveedor de la misma. El amortiguador usado fue el amortiguador II para PCR de Perkin Elmer, ya que la enzima sólo puede recuperar su

funcionalidad en este amortiguador. El tiempo de desnaturalización inicial se incrementó a 10.5 min, lo necesario para quitar el bloqueo químico de la enzima y que esta pudiera polimerizar normalmente.

Como se observa en la figura 7, con el uso de la AmpliTaq Gold, ya no hubo amplificación inespecífica del ADN de cerebro de ratón. De este momento en adelante, se adoptó el uso de la AmpliTaq Gold en todas las reacciones de PCR. Sin embargo, se observa claramente la existencia de bandas definidas correspondientes a amplificadas del mismo tamaño que el amplificado de *T.gondii* en el blanco de reacción y en las reacciones que tenían sólo ADN de ratón como molde. Esto significa que hubo contaminación.

3. CONTROL DE LA CONTAMINACION

Para controlar el problema de contaminación, se realizó una limpieza en parte del equipo e instalaciones que se ocupaban para ensamblar las reacciones de PCR. La limpieza consistió en lavar con agua y jabón, para después irradiar con luz U.V. durante toda una noche.

Otra medida tomada fue el ser más estricto en la separación de las operaciones pre PCR y postPCR, en las áreas de trabajo, equipo y soluciones usadas en cada caso.

Por otro lado, se implementó dentro de cada reacción de PCR, el uso del control enzimático de la contaminación por acarreo. Este control se logra sustituyendo el dTTP por dUTP, adicionando a cada reacción la enzima Uracil DNA Glicosilasa (UDG), agregando un incubación de 3 min a 50°C previa a la primera etapa de desnaturalización, extendiendo la última incubación a 72°C hasta el momento de sacar los productos del termociclador para

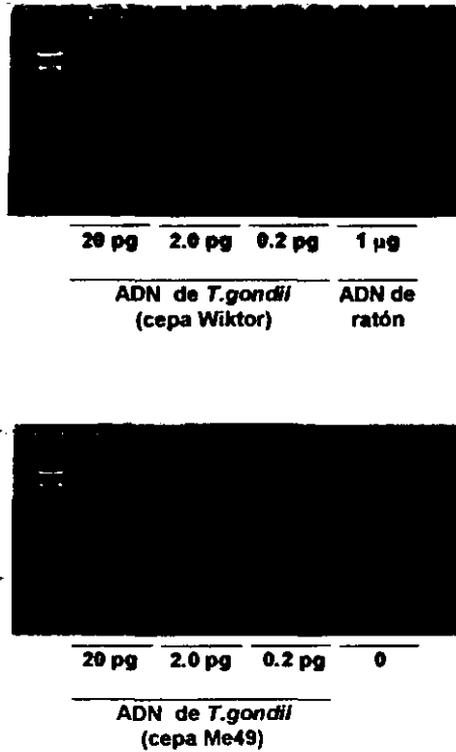


Figura 7. Especificidad de la PCR usando la AmpliTaq Gold

Las PCR se llevaron a cabo por triplicado usando como molde diluciones seriadas 1:10 de ADN de *T.gondii*, cepas Wiktor y Me49 o 1 µg de ADN de cerebro de ratón purificado usando proteinasa K. Se sustituyó la AmpliTaq por la AmpliTaq Gold (bloqueada químicamente). Los iniciadores fueron Rd-1 y Rd-2, las condiciones de amplificación están descritas en "Material y Métodos" (protocolo de PCR con AmpliTaq Gold). Después de la PCR, 10 µl (20%) de los productos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. 0 es un blanco de PCR sin ADN.

finalmente hacer una extracción con cloroformo de cada tubo con productos. El protocolo para implementar esta técnica, fue tomado de lo reportado por Pelloux et al. (1996).

Para verificar si la limpieza y el cambio de soluciones habían logrado eliminar la contaminación se hizo una serie de amplificaciones, utilizando dUTP en vez de dTTP (sin usar la UDG). Con la utilización del dUTP, se evitó el seguir generando productos de PCR no susceptibles al control enzimático. Los resultados se observan en la figura 8, donde se puede ver que en el blanco de reacción no hay ninguna banda de amplificado, por lo que se eliminó la contaminación existente. Como se ve en la amplificación del ADN de la cepa Wiktor, los resultados (banda visible en dos de tres amplificaciones con 2.3 taquizoítos) son comparables en sensibilidad y reproducibilidad intraensayo con amplificaciones anteriores. En cuanto a la amplificación en presencia de 1µg de ADN de cerebro de ratón purificado con proteinasa K, se puede observar un barrido que corresponde al ADN genómico sin ninguna banda definida por lo que no hay amplificado inespecífico.

Los resultados de la amplificación de ADN de la cepa Me49 (figura 8) son comparables en cuanto al tamaño del amplificado con los obtenidos para la cepa Wiktor. Sin embargo el límite de detección para esta cepa (banda visible en tres de tres amplificaciones con 23 taquizoítos) fue aproximadamente 10 veces menor que con la cepa Wiktor (banda visible en dos de tres amplificaciones con 2.3 taquizoítos).

4. EFECTO DE LA UDG

Para determinar el efecto del pretratamiento con UDG sobre los resultados de la PCR del segmento amplificado por Rd-1 y Rd-2 en el gen B1 de *T.gondii*, se hicieron dos series de amplificaciones usando como molde diluciones seriadas 1:10 de ADN de la cepa Wiktor. En la primera serie no se incluyó UDG mientras que en la segunda, sí se incluyó. En ambas series se agregó una incubación de 3 min a 50°C previa a la primera etapa de desnaturalización y una extensión de la última incubación a 72°C hasta el momento de sacar

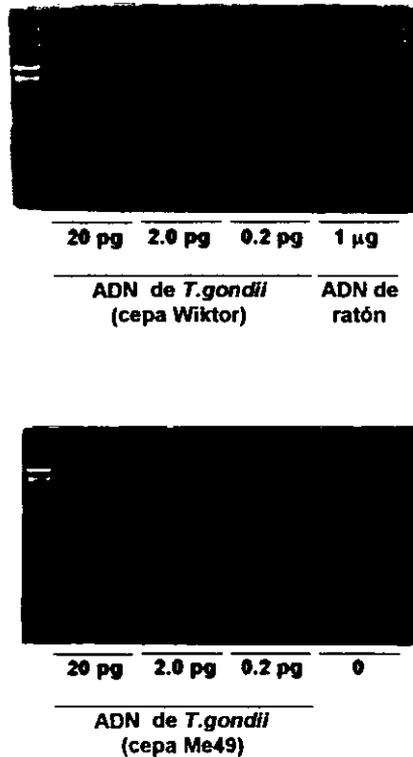


Figura 8. Efecto de la sustitución de dTTP por dUTP

Las PCR se llevaron a cabo por triplicado usando como molde diluciones seriadas 1:10 de ADN de *T.gondii*, cepas Wiktor y Me49 o 1 µg de ADN de cerebro de ratón purificado usando proteinasa K. Se sustituyó el uso de 100 µM de dTTP por 200 µM de dUTP. Los iniciadores fueron Rd-1 y Rd-2, las condiciones de amplificación fueron modificadas de las descritas en "Material y Métodos" (protocolo de PCR con AmpliTaq Gold). Después de la PCR, 10 µl (20%) de los productos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. 0 es un blanco de PCR sin ADN.

los productos del termociclador para finalmente hacer una extracción con cloroformo de cada tubo con productos.

En la figura 9, se ve que hay una disminución de la sensibilidad en las reacciones pretratadas con UDG (banda visible muy tenue en 1 de 3 amplificaciones con 0.2 pg de ADN equivalente a 2.3 taquizoitos) con respecto a las reacciones sin UDG (banda visible tenue en 2 de 3 amplificaciones con 0.2 pg de ADN equivalente a 2.3 taquizoitos). De lo cual se puede decir que el efecto del pretratamiento con la UDG en reacciones ensambladas con dUTP disminuye la sensibilidad de la técnica de manera no significativa, lo cual coincide con lo reportado por Pang et al., (1992). Esta ligera reducción de sensibilidad probablemente se deba a que la actividad residual de la enzima no puede ser detenida del todo. Aún así la sensibilidad es adecuada para las necesidades del proyecto.

5. AMPLIFICACIÓN DE LISADO DE TAQUIZOÍTOS

Con la intención de tener una cuantificación más exacta de la sensibilidad de la técnica, se realizó la amplificación directa de taquizoitos lisados por calentamiento (Groß et al., 1992). Esto se hizo debido a que los parásitos que se usaron para obtener el ADN de *T.gondii*, siempre tienen un cierto grado de contaminación con células huéspedes y como consecuencia no se conoce el grado exacto de pureza del ADN obtenido.

Se hicieron diluciones de taquizoitos, se lisaron por calentamiento y después se sometieron a amplificación. En la figura 10 se muestran los resultados, obteniéndose una sensibilidad de 2 de 3 bandas visibles en amplificaciones correspondientes a 10 taquizoitos, lo que es aproximadamente 4 veces menos que la sensibilidad obtenida con ADN purificado (banda visible en 2 de 3 amplificaciones con a 2.3 taquizoitos). Este bajo nivel de detección fue debido probablemente a la presencia de inhibidores de amplificación dentro del lisado total, por lo cual no se pudo concluir nada más con respecto a la sensibilidad.

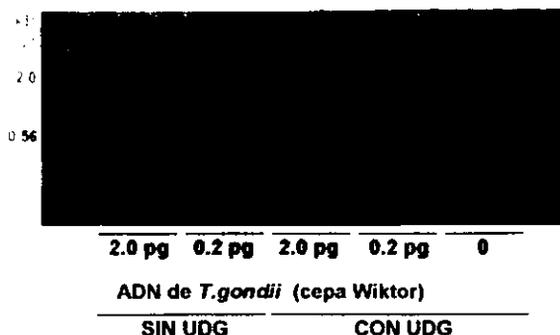


Figura 9. Efecto de la presencia de la Uracil DNA glicosilasa sobre la sensibilidad de la PCR
 Las PCR se llevaron a cabo por triplicado usando como molde diluciones seriadas 1:10 de ADN de *T. gondii*, cepa Wiktor. En todas las reacciones se substituyó el dTTP por el dUTP y en las reacciones que se indica se adicionó Uracil DNA glycosilasa. En cuanto a las incubaciones, se agregó una incubación de 3 min a 50°C previa a la primera etapa de desnaturalización, además de que al terminar la extensión final de 5min a 72°C se dejó a esta temperatura hasta sacar los tubos del termociclador. Los iniciadores fueron Rd-1 y Rd-2, las condiciones de amplificación están descritas en “Material y Métodos” (protocolo de PCR con AmpliTaq Gold y UDG). Después de la PCR, las reacciones se sometieron a una extracción con un volumen igual de cloroformo y 10 µl de la fase acuosa (20%) fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. 0 es un blanco de PCR sin ADN.

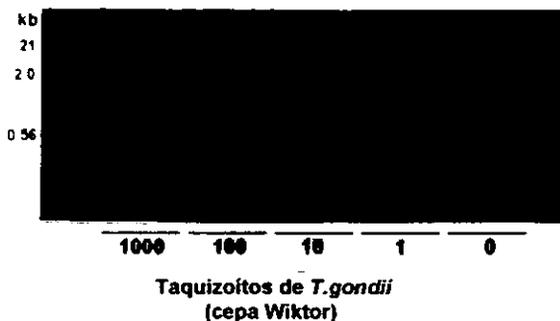


Figura 10. Amplificación de un lisado de taquizoitos

Las PCR se llevaron a cabo por triplicado usando como molde un lisado total de taquizoitos de *T. gondii*, cepa Wiktor. Los iniciadores fueron Rd-1 y Rd-2, las condiciones de amplificación están descritas en “Material y Métodos” (protocolo de PCR con AmpliTaq Gold y UDG). Después de la PCR, las reacciones se sometieron a una extracción con un volumen igual de cloroformo y 10 µl de la fase acuosa (20%) fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. 0 es un blanco de PCR sin ADN.

6. OPTIMIZACIÓN DEL NÚMERO DE CICLOS

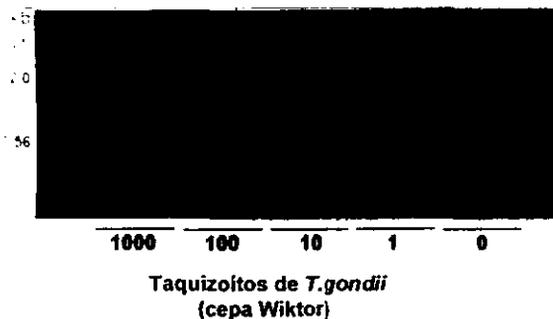
Se intentó aumentar la sensibilidad aumentando el número de ciclos, para lo que se realizaron dos amplificaciones independientes usando el mismo procedimiento que en el experimento anterior, pero con la diferencia de que en vez de usar 40 ciclos térmicos, en la primera amplificación se usaron 45 ciclos y en la segunda se usaron 50 ciclos. En la figura 11 se muestran los resultados de la amplificación con 45 y 50 ciclos sobre lisado de taquizoitos, y si se compara con la figura 10, se ve que el aumentar el número de ciclos, aumenta también la intensidad de las bandas, pero la sensibilidad no varía, ya que en los 3 casos oscila entre 1 de 3 bandas visibles o 2 de 3 bandas visibles en las amplificaciones que corresponden a 10 taquizoitos. Por lo tanto se regresó al número de ciclos original.

7. AMPLIFICACIÓN EN PRESENCIA DE ADN DE CEREBRO DE RATÓN

Inicialmente, las extracciones de ADN se realizaron con la técnica de la proteinasa K -fenol-cloroformo, que es la técnica de referencia. Sin embargo, esta técnica es lenta e implica muchas manipulaciones, lo cual es poco recomendable para un protocolo de PCR. Por ello se verificó si era posible sustituir esta técnica por el método comercial de extracción DNAzol de GIBCO, el cual reportan que es rápido, eficiente y adecuado para PCR (Ally et al., 1995), por lo que se hizo una extracción de ADN de cerebro de ratón con este método obteniéndose un rendimiento de 1.89 μg de ADN por mg de cerebro de ratón y una razón de absorbancias A_{260}/A_{280} de 1.8.

La razón de absorbancias A_{260}/A_{280} es una indicación de la pureza del ADN, ya que si está por encima del rango significa que tiene un alto contenido de ARN (Felsenfeld et al., 1965 y Allen et al., 1972), mientras que si esta por debajo significa que está contaminado con proteínas o impurezas fenólicas. La razón de absorbancias A_{260}/A_{280} obtenida fue de 1.8, la cual es muy buena considerando que el rango para asegurar pureza es de 1.7-2 (Sambrook et al., 1989). Además si se compara con el valor obtenido en la extracción del mismo tejido pero con el método de referencia (proteinasa K-fenol-cloroformo), que fue de 1.9, está muy cercano. Sin embargo esta determinación no descarta otros tipos de

a



b

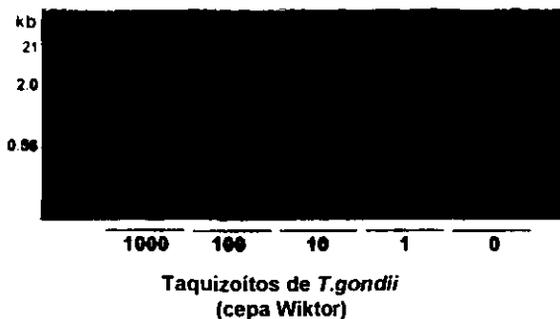


Figura 11. Efecto del número de ciclos sobre la sensibilidad de la PCR

Las PCR se llevaron a cabo por triplicado usando como molde un lisado total de taquizoitos de *T.gondii*, cepa Wiktor. Los iniciadores fueron Rd-1 y Rd-2, las condiciones de amplificación están descritas en "Material y Métodos" (protocolo de PCR con AmpliTaq Gold y UDG). En a las PCR se sometieron a 45 ciclos de amplificación y en b a 50 ciclos. Después de la PCR, las reacciones se sometieron a una extracción con un volumen igual de cloroformo y 10 µl de la fase acuosa (20%) fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. 0 es un blanco de PCR sin ADN.

contaminantes que pueden afectar el desarrollo de la PCR por lo que se hicieron otras pruebas.

Una prueba más de la pureza del ADN, fue que se logró obtener una eficiencia de digestión enzimática con EcoRI de alrededor del 95-100%, con respecto a la desaparición de la banda de ADN intacto (al comparar el ADN digerido con el no digerido), lo que indica la ausencia de inhibidores para este tipo de reacción enzimática (figura 12).

Entonces se procedió a probar la técnica de PCR en una simulación de las condiciones reales, es decir que además de la presencia del ADN genómico con el gen B1 también se encontrara presente el ADN del cerebro de ratón purificado con DNAzol. De ese modo se determinaría si la presencia de ADN de cerebro de ratón purificado con este método afectaba la amplificación de B1. Se amplificaron diluciones 1:10 de ADN de la cepa Wiktor agregando o no, a cada reacción, 500 ng de ADN de ratón. Todo el ADN que se sometió a amplificación, incluyendo el purificado con DNAzol, fue previamente digerido enzimáticamente con EcoRI.

Dentro del genoma de *T. gondii*, las 35 copias del blanco (gen B1) se encuentran en tandem, mientras que en el estándar interno cada molécula de ADN contiene una sola secuencia blanco, esto puede significar que las copias de B1 sean menos accesibles para la Taq que las moléculas estándar, y por lo tanto que haya diferencias entre las eficiencias de amplificación de ambos moldes. Para evitar esto, la amplificación se realizó sobre ADN genómico digerido con Eco RI, donde se han separado las copias del gen B1, ya que esta enzima corta en el segundo nucleótido de cada copia del gen B1 (Burg et al., 1989).

Como se ve en la figura 13, los resultados de la amplificación no cambian con la presencia de ADN de cerebro de ratón, por lo que se mostró que bajo condiciones muy cercanas a las de muestras reales, la sensibilidad y la reproducibilidad intraensayo de la

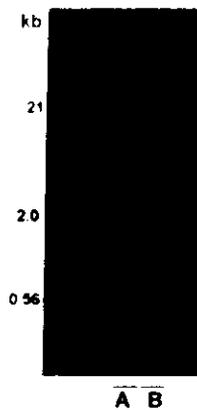
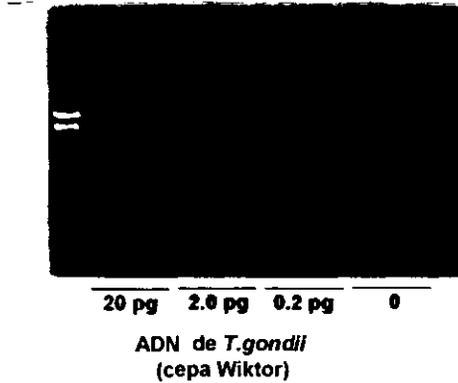


Figura 12. Análisis del ADN de cerebro de ratón purificado con DNazol

Se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%, 250 ng de ADN de cerebro de ratón purificado con DNazol (A) y 250 ng de ADN de cerebro de ratón purificado con DNazol y digerido con EcoRI (B). Después de la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio.

a



b

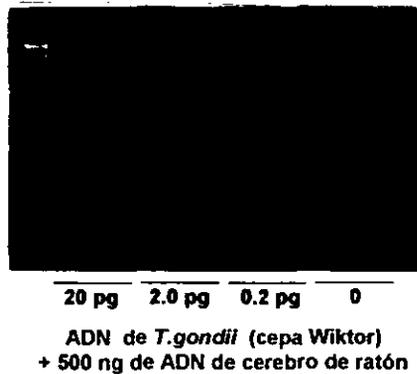


Figura 13. Efecto de la presencia de ADN de cerebro de ratón sobre la amplificación del gen B1 de *T.gondii*

Las PCR se llevaron a cabo por triplicado usando como molde diluciones seriadas 1:10 de ADN de *T.gondii* (cepa Wiktor), como iniciadores Rd-1 y Rd-2 y las condiciones de amplificación descritas en "Material y Métodos" (protocolo de PCR con AmpliTaq Gold y UDG). En **b** se adicionó al ADN de *T.gondii*, ADN de cerebro de ratón purificado con DNAzol. Las diluciones de ADN molde con o sin ADN de ratón fueron digeridas con EcoRI antes de ensamblar las PCR. Después de la PCR, las reacciones se sometieron a una extracción con un volumen igual de cloroformo y 10 μ l de la fase acuosa (20%) fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio. 0 es un blanco de PCR sin ADN.

amplificación del segmento de B1, no cambiaron con respecto a la obtenida usando sólo ADN de *T. gondii*.

Como para esta prueba se usó ADN purificado con DNAzol, se demostró que era posible la amplificación de B1 en presencia de ADN de cerebro de ratón purificado con este método. De esto se concluye que el ADN purificado con DNAzol no posee ningún inhibidor para la PCR, por lo que es factible usarlo para purificar ADN para PCR a partir de cerebros de ratón infectados con *T. gondii*.

8. CONSTRUCCIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO

8.1 Diseño y características

Se escogió usar un estándar heterólogo en vez de uno homólogo ya que, de ese modo, se evita la formación de heterodúplex que puedan interferir con el análisis (McCulloch et al., 1995). La secuencia heteróloga se buscó dentro del genoma del fago lambda cepa CI857Sam7, debido a que se conoce toda su secuencia y el ADN se encontraba disponible en el laboratorio. Para minimizar las posibilidades de que el estándar interno y el blanco tuvieran eficiencias de amplificación muy diferentes, se minimizaron las diferencias de tamaño y de porcentaje de GC entre ambos (McCulloch et al. 1995). Para poder diferenciar los productos de amplificación del gen B1 y del estándar interno durante el análisis, al momento de seleccionar la secuencia del estándar, se buscó que ésta tuviera un sitio de restricción que no compartiera con el blanco y que estuviera aproximadamente a la mitad de su longitud (Zimmermann et al., 1996), así los productos de amplificación de ambos podrían ser distinguidos en una electroforesis en gel de agarosa tras una digestión enzimática. Otra característica que debía tener el sitio de restricción era que sólo contuviera guanosinas y citosinas ya que, en los productos de amplificación se sustituyeron las timinas por uracilos para el control enzimático de la contaminación (Bodner et al., 1983) y esto pudiera afectar el corte por la enzima de restricción.

En la tabla 3 se muestran algunas características del segmento original de lambda, el segmento de lambda más las secuencias de Rd-1 y Rd-2 (estándar interno) y el segmento blanco en B1. Como se puede observar los últimos dos son similares en longitud y porcentaje de GC, mientras que el estándar interno contiene un sitio de reconocimiento para MspI, que no se encuentra en el blanco en B1. La secuencia de reconocimiento para MspI es CCGG, y como no contiene ni T ni A es compatible con el método de control enzimático de la contaminación.

La razón de clonar al estándar interno en un plásmido fue que de éste modo se tiene una mejor manera de almacenarlo, ya que a mayor tamaño de la molécula de ADN, mayor estabilidad. Por otro lado, teniendo al estándar interno en un plásmido, es muy económico producirlo en grandes cantidades, además de que es más fácil de purificar y cuantificar.

| | Iniciadores Rd-1 + Rd-2 | Segmento de λ . | Segmento de λ + Rd-1 + Rd-2 | Segmento blanco en B1 |
|--------------------|----------------------------|-------------------------|--|--------------------------|
| Longitud | 44 pb | 271 pb | 315 pb | 301 pb |
| Cantidad de GoC | 26 nt | 134 nt | 160 nt | 155 nt |
| %GC | ----- | 49.45% | 50.79% | 51.50% |
| Corte de MspI | ----- | nucleótido 135 | nucleótido 158 | no hay |

Tabla 3. Características del estándar interno y del blanco.

8.2 Generación

Para generar el estándar interno se eligió el amplificar el ADN heterólogo dentro del genoma de lambda con un par de iniciadores compuestos que contienen las secuencias de los iniciadores Rd-1 y Rd-2 continuas a las secuencias que alinean con el fragmento heterólogo ya que de ese modo las secuencias de los iniciadores Rd-1 y Rd-2 son incorporados a los productos de la amplificación (Siebert et al., 1995). El esquema de este método para sintetizar al estándar interno se puede ver en la figura 14.

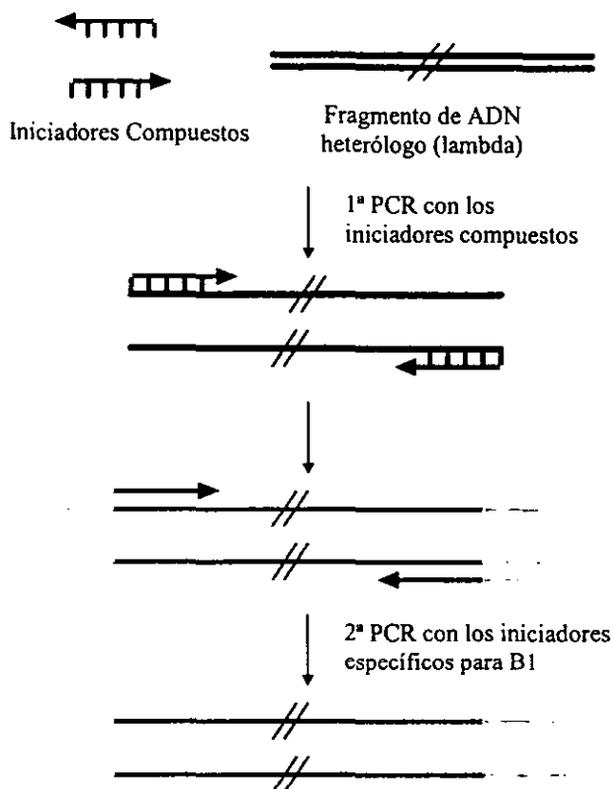


Figura 14. Esquema de las reacciones de síntesis del estándar interno (competidor)

Primero se realizó una amplificación con los iniciadores compuestos XP-5 y XP-6, usando como molde 50 ng y 5 ng de ADN del fago lambda cepa CI857Sam7. Como se ve en la figura 15a, en ambos casos la amplificación resultó en una banda del tamaño esperado (menor de 500 ng).

Fue necesario asegurarse que la secuencia de Rd-1 y Rd-2 se encontrara intacta y completa en el estándar interno, ya que los oligonucleótidos que son tan largos como los iniciadores compuestos (40 o más nucleótidos) suelen estar incompletos hacia el extremo 5' con más frecuencia que oligonucleótidos más pequeños como Rd-1 y Rd-2 (alrededor de 20 nt). Para ello, después de obtener de la amplificación con los iniciadores compuestos un producto del tamaño esperado, este último fue reamplificado, pero ahora con los iniciadores Rd-1 y Rd-2. En la figura 15b se muestra que la amplificación resultó en una banda de peso molecular similar a la de la amplificación anterior.

Antes de seguir con la clonación del estándar interno, se comprobó que el producto de la amplificación tuviera el sitio de reconocimiento para MspI aproximadamente a la mitad de su longitud. En la figura 16 se ve que efectivamente el amplificado contiene el sitio MspI, ya que la digestión con esta enzima produce una banda de menor tamaño (aproximadamente la mitad) que la banda del amplificado.

8.3 Clonación

Entonces se procedió a clonar este amplificado de lambda con secuencias de los iniciadores Rd-1 y Rd-2 en sus extremos (estándar interno). En cuanto al sistema de clonación, se utilizó un estuche de Invitrogen especial para clonar productos de PCR basado en la propiedad de la Taq de añadir una A extra en el extremo 3'. El plásmido del estuche (pCR2.1) posee en cada extremo 3' una T cohesiva para la A extra presente en los productos de PCR (figura 17). Con el fin de hacer la clonación, una alícuota del amplificado fue ligado con el vector pCR2.1 y los productos de la ligación fueron usados para transformar células competentes de *E.coli* cepa DH5 α F'. No pudo utilizarse la cepa de *E.coli* Top 10 F' que es la recomendada por el proveedor, ya que no se contaba con esa cepa en el laboratorio. Se sustituyó por la cepa de *E.coli* DH5 α F' que comparte muchas características genotípicas con Top10 F' (tabla 4) por lo que también pudo ser transformada con el plásmido del estuche.

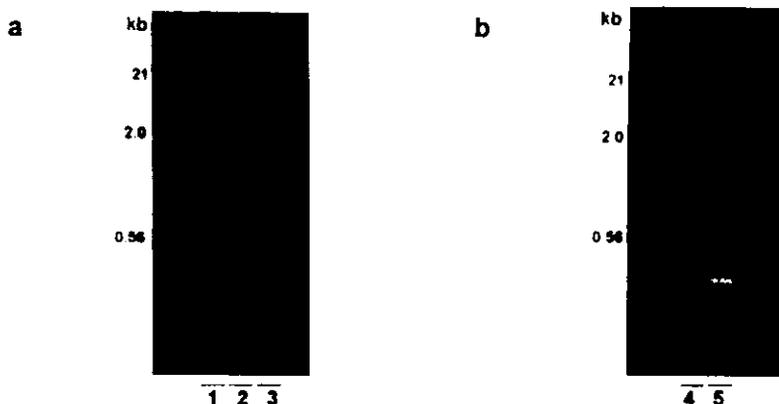


Figura 15. Generación del estándar interno por PCR

En **a** se hizo una amplificación usando como molde 50 ng (carril 2) y 5 ng (carril 3) de ADN de lambda CI857Sam7, además de un blanco de reacción sin ADN (carril 1). Se usaron los iniciadores compuestos XP-5 y XP-6 y las condiciones de amplificación son las mencionadas en “Material y Métodos” (Generación del estándar interno). Después de la PCR, 10 μ l (20%) de los productos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.

En **b** se hizo una amplificación usando como molde una dilución 1:1000 del producto de la amplificación anterior (correspondiente a 5 ng de ADN de lambda) (carril 5), además de un blanco de reacción sin ADN (carril 4). Se usaron los iniciadores Rd-1 y Rd-2 y las condiciones de amplificación son las mencionadas en “Material y Métodos” (Generación del estándar interno). Después de la PCR, 10 μ l (20%) de los productos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.

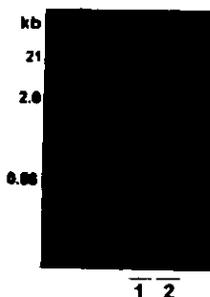


Figura 16. Digestión del segmento amplificado de lambda con MspI

Se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% 5 μ l (10%) de los productos de reamplificación del fragmento del fago lambda con Rd-1 y Rd-2 (1) y 5 μ l de los mismos productos después de su digestión con MspI (2). Después de la electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio.

| CEPA DE <i>E.coli</i> | GENOTIPO |
|--------------------------|---|
| DH5 α F' | F' ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U 169, <i>endA1 reA1, hsd17 (r_k- m_{k+}), deoR, thi-1, supE44, gyrA96, relA1, lambda-</i> |
| TOP10 F' | F' { <i>lacI^q Tn10 (Tet^r) mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG</i> |

Tabla 4. Genotipo de las cepas de *E.coli*.

Para poder explicar los resultados de la transformación es necesario mencionar como funciona el sistema de clonación elegido (figura 17), ya que permite la selección de las bacterias transformadas por el plásmido basándose en la resistencia a la ampicilina. Ésto es debido a que el plásmido pCR2.1 posee un gen de resistencia a la ampicilina, y como la cepa de *E.coli* usada para la transformación (DH5 α F') es sensible a la ampicilina, sólo las bacterias transformadas con el plásmido podrán crecer en un medio con ampicilina. Además el sistema utilizado permite la selección de las bacterias transformadas por el plásmido con el inserto (recombinante) gracias a la pérdida de α -complementación. Esto es debido a que el plásmido posee una región codificante para el fragmento N-terminal de la β -galactosidasa y la cepa de *E.coli* usada para la transformación (DH5 α F') posee en su ADN una región que codifica para el fragmento C-terminal de la β -galactosidasa; esto provoca que las bacterias con el plásmido y en presencia de IPTG produzcan una proteína enzimáticamente activa (α -complementación), la cual hidroliza al X-gal presente en el medio produciendo un pigmento azul (colonias azules). Como el sitio de clonación del plásmido se encuentra dentro de la región codificante para el fragmento N-terminal de la β -galactosidasa, la presencia del inserto rompe el marco de lectura evitando así la α -complementación, y produciendo colonias sin pigmento (colonias blancas).

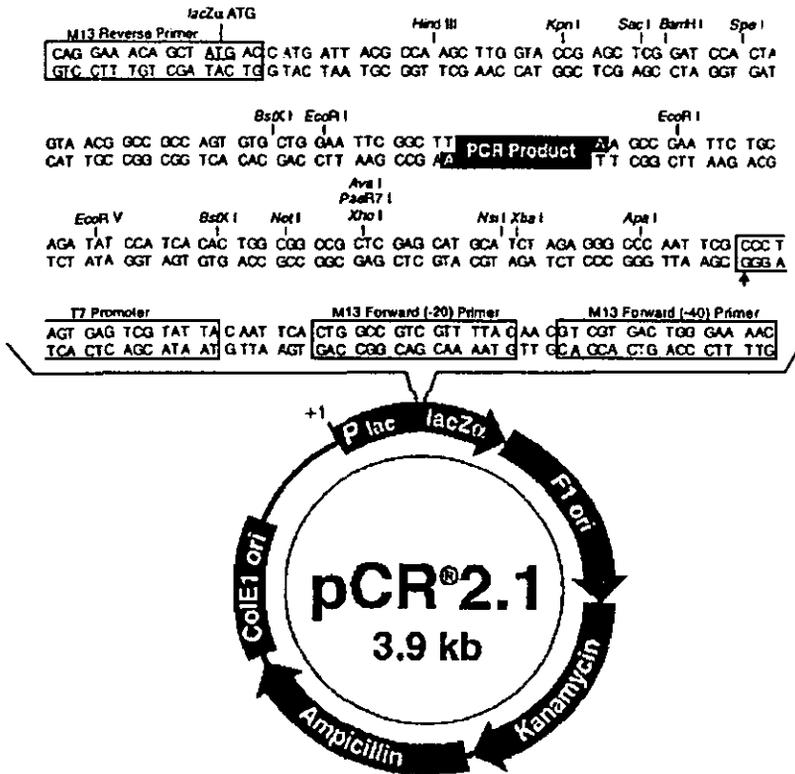


Figura 17. Mapa del vector pCR2.1

La secuencia del sitio múltiple de clonación se muestra con un producto de PCR insertado por clonación T/A. El producto de PCR clonado está flanqueado por sitios EcoRI de cada lado.

| # caja | Cantidad de ADN usado para transformar las bacterias sembradas | Colonias blancas | Colonias azules | Comentario |
|--------|--|------------------|-----------------|---|
| 1 | 0.4 ng de pBKS+ superenrollado | 22 | 186 | Control de transformación |
| 2 | 2 ng de pCR2.1 | 3 | 2 | Control de recircularización en la ligación |
| 3 | 2 ng de pCR2.1 ligado a 0.16 ng de reamplificado | 25 | 2 | Reacción de ligación, relación 1:1 |
| 4 | sin ADN | — | — | Control de células competentes sin ADN |
| 5 | sin ADN ni células competentes | — | — | Control de esterilidad del medio |

Tabla 5. Resultados de la transformación.

Los resultados de la transformación se muestran en la tabla 5 y se explican a continuación:

- La caja 1 fué el control de transformación, ya que ahí las bacterias fueron transformadas con un plásmido superenrollado (pBKS+ intacto) que es la conformación que más eficientemente transforma a la bacteria. Así que el número de bacterias transformadas con este plásmido fue un indicador de la eficiencia de las células competentes para ser transformadas. En base al número total de transformantes obtenidas en la caja 1, se calculó la eficiencia de transformación, que fue de 6.45×10^5 UFC/ μ g de ADN (pBKS+ superenrollado). El valor de la eficiencia de transformación se encuentra ligeramente por debajo del rango de eficiencia de transformación reportado para las células competentes preparadas por el método utilizado (Sambrook et al., 1989). Esto probablemente se deba a que las células competentes tenían aproximadamente un año de haberse preparado, lo cual es más de lo recomendado para que las células mantengan una buena eficiencia de transformación. Sin embargo, la eficiencia obtenida fue suficiente para los fines del experimento. Por otro lado, contrario a lo esperado, no todas las bacterias transformadas con el plásmido produjeron el pigmento azul (α -complementación), e incluso las que lo produjeron lo hicieron de manera deficiente, ya que las colonias eran azul claro. Debido a que las transformantes de las cajas 2 y 3 que estaban pigmentadas tenían un color azul

intenso, no es posible que las bacterias fueran las causantes de lo ocurrido en la caja 1, por lo que probablemente se deba a que el plásmido que se utilizó (pBKS+) tenía alguna mutación que le impedía realizar eficientemente la α -complementación.

- La caja 2 fue el control de recircularización; en esta caja las bacterias fueron transformadas con el plásmido pCR2.1 linearizado e incubado con ligasa en ausencia de inserto, por lo que se esperaba que hubiera pocas transformantes, lo cual ocurrió, ya que la mayoría del plásmido teóricamente se encontraba en forma lineal y por lo tanto es poco eficiente para transformar bacterias. El objetivo principal de este control fue tener una referencia de que porcentaje del plásmido se recircularizó espontáneamente (sin inserto) ya que, con el tiempo, las T en los extremos 3' del vector se degradan y se produce la autoligación de los extremos romos. Estos plásmidos recircularizados producen transformantes que no tienen α -complementación porque la autoligación de los extremos romos causó un cambio en el marco de lectura del gen que codifica para el fragmento N-terminal de la β -galactosidasa. Según el instructivo del estuche de Invitrogen, el porcentaje de plásmidos recircularizados que producen colonias blancas debe ser menor al 5%; en este caso fue del 60%, pero aún así sirvió como referencia para saber que porcentaje de colonias blancas de la caja 3 (ligación con el inserto) realmente corresponden a colonias de bacterias con el plásmido recombinante.
- La caja 3 contenía las bacterias que recibieron la ligación 1:1 del vector con el inserto; el número de colonias obtenidas y el porcentaje de colonias blancas (92.6%) fueron muy superiores a los obtenidos en la caja 2, lo cual sugiere que la mayoría de estas colonias contenían un plásmido con el inserto.

La caja 4 contenía bacterias no transformadas para verificar que éstas no tuvieran resistencia a la ampicilina por sí mismas antes de que se les transformara con el plásmido, ya que de ese modo podrían pasar por transformantes y confundirse con ellas, sin embargo no fueron resistentes.

- La caja 5 fue el control de contaminación del medio, y como no hubo crecimiento, es una prueba de que las cajas se manejaron en condiciones estériles.

Se tomaron 10 colonias blancas de la caja 3; para verificar que contenían el plásmido recombinante, de cada una se purificó el ADN plasmídico con la técnica de MINIPREP y el ADN plasmídico se analizó por electroforesis. En la figura 18a se muestra que para las 10 clonas, se obtuvo ADN plasmídico en varias conformaciones y que el tamaño de la conformación mayoritaria tiene un tamaño de aproximadamente 2740 pb. Todos los ADN plasmídicos migraron a la misma velocidad con excepción del de la clona 6, que migró más rápido.

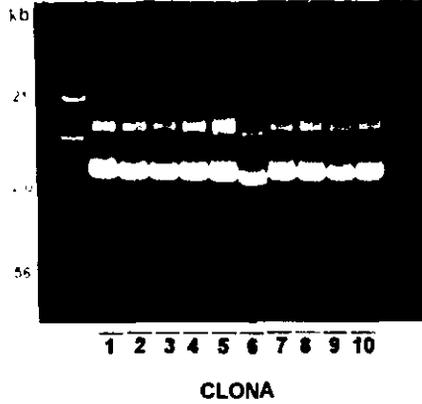
Para determinar si estos plásmidos contenían un inserto del tamaño esperado, se digirió el ADN con EcoRI que tiene sitios de reconocimiento a cada lado del sitio de inserción. En la figura 18b, se ve un análisis por electroforesis de las digestiones, y se puede observar que todos los plásmidos se digirieron en un 85-90% y que a excepción del de la clona 6, todos contienen un inserto del tamaño esperado (menor de 500ng).

Por lo anterior, se puede observar la gran eficiencia de clonación que proporciona este sistema para los productos de PCR, puesto que de 10 clonas seleccionadas por ser β -galactosidasa negativas, 9 tuvieron el inserto.

Para asegurarse de que el inserto presente en estas clonas era el esperado, se realizaron las siguientes pruebas:

1. Se escogieron al azar 5 de las clonas con inserto y se amplificaron con Rd-1 y Rd-2. En la figura 19a se muestra que la amplificación de estos 5 plásmidos (clonas 1, 3, 5, 7 y 9) resultó en todos los casos en una banda del tamaño esperado, por lo que todas presentan en la secuencia del inserto, los sitios de reconocimiento de los iniciadores Rd-1 y Rd-2. Además de estas 5 clonas con inserto, también se amplificó el ADN plasmídico de la clona 6 que no contenía el inserto (control negativo); el resultado fue una banda del

a



b

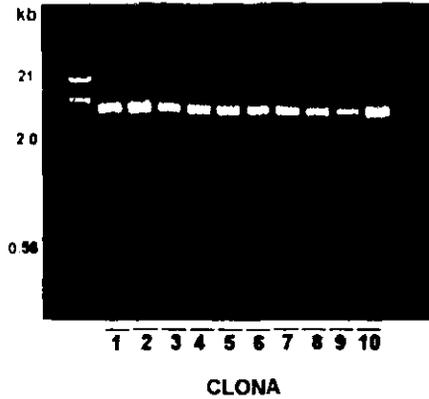


Figura 18. Clonación del estándar interno en el vector pCR2.1: análisis del ADN plasmídico de las colonias transformadas

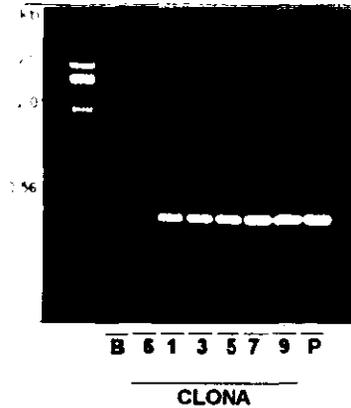
Se purificó por la técnica de "Miniprep" el ADN plasmídico de 10 colonias transformadas (blancas). Se analizaron, por electroforesis en gel de agarosa al 2%, 8 μ l de cada solución de ADN plasmídico (a) y 2 μ l de cada solución de ADN plasmídico después de su digestión con EcoRI (b). Después de las electroforesis, el gel fue teñido con bromuro de etidio.

mismo tamaño que las de las clonas con inserto pero de menor intensidad, la cual se piensa es producto de la contaminación del ADN plasmídico de la clona 6 por ADN plasmídico de las otras clonas.

2. Para verificar que el estándar interno tuviera un sitio MspI en su centro, se digirieron con MspI los productos de amplificación del ADN plasmídico de las 5 clonas (1, 3, 5, 7 y 9). En la figura 19b se muestra que la digestión produjo en todos los casos una sola banda del tamaño esperado. Esto significa que los productos de amplificación poseen un sitio de reconocimiento para MspI aproximadamente a la mitad de su longitud.
3. Se secuenció una clona de las anteriores para verificar que tenía la secuencia completa e intacta de los iniciadores Rd-1 y Rd-2. De este modo, se puede asegurar una complementariedad completa y por lo tanto una eficiencia de amplificación más parecida a la del blanco en B1. Por ello, la clona 5 se cultivó nuevamente y se purificó el ADN plasmídico de la misma por cromatografía en columna de intercambio iónico (QIAGEN) (figura 20) y después se determinó la concentración espectrofotométricamente. Una alícuota de ésta solución que contenía 5 µg de éste plásmido pCRLamB1.5 se mandó a secuenciar. Los resultados de la secuenciación están en la figura 21, donde se muestran las secuencias obtenidas para ambas hebras, con los iniciadores universales M13 sentido directo e inverso. En la figura 22 se muestra que ambas secuencias se alinearon perfectamente y no hubo ninguna discordancia entre las dos hebras. Además, las secuencias de los dos iniciadores Rd-1 y Rd-2 también se encuentran perfectamente conservadas.

Por lo anterior se puede decir que se encontró que el inserto de la clona pCRLamB1.5 tenía la secuencia esperada y por lo tanto se decidió utilizarla como estándar interno.

a



b

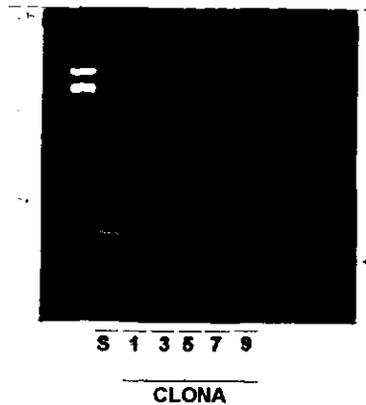


Figura 19. Caracterización por PCR y digestión con enzima de restricción de cinco de las clonas obtenidas en la clonación del estándar interno en el vector pCR2.1

Se eligieron 5 (clonas 1, 3, 5, 7 y 9) de las 10 clonas obtenidas en la clonación del estándar interno en el vector pCR2.1. 5 μ l de diluciones 1:2000 de las soluciones de ADN plasmídico correspondientes a estas clonas se sometieron a amplificación con los iniciadores Rd-1 y Rd-2 usando el mismo protocolo que el usado durante la generación del estándar interno (reamplificación con Rd-1 y Rd-2). Además se amplificó también el ADN plasmídico de la clona 6 que no contenía el inserto. Como control positivo (P), se reamplificó una dilución 1:1000 del producto de la amplificación (con los iniciadores XP-5 y XP-6) de los 5 ng de ADN de lambda. Como control negativo (B) se hizo un blanco de reacción sin ADN.

En a, 10 μ l (20%) de los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.

En b, 5 μ l (10%) de los productos de amplificación se digirieron con la enzima MspI, previamente a la electroforesis. Como referencia (S), se colocaron 5 μ l del producto de amplificación de la clona 1, sin digerir.



A

Figura 20. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del plásmido pCRLamB1.5 purificado por cromatografía de intercambio iónico (columnas QIAGEN)

En A, 137 ng de ADN plasmídico de la clona pCRLamB1.5 purificado en columna QIAGEN sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% y teñido con bromuro de etidio.



Model 377
Version 2.1.1

F0027 F = pCR Lamb B1.5

Signal G:345 A:631 C:799 T:565
DT (pR Set Any-Primer)
dPrnd.1
Points 1038 to 6258 Base 1. 1038

Page 1 of 1
Tue, Jan 20, 1998 12:16 AM
Mon, Jan 19, 1998 4:48 PM
Spacing: 9.05

Unedited Forward

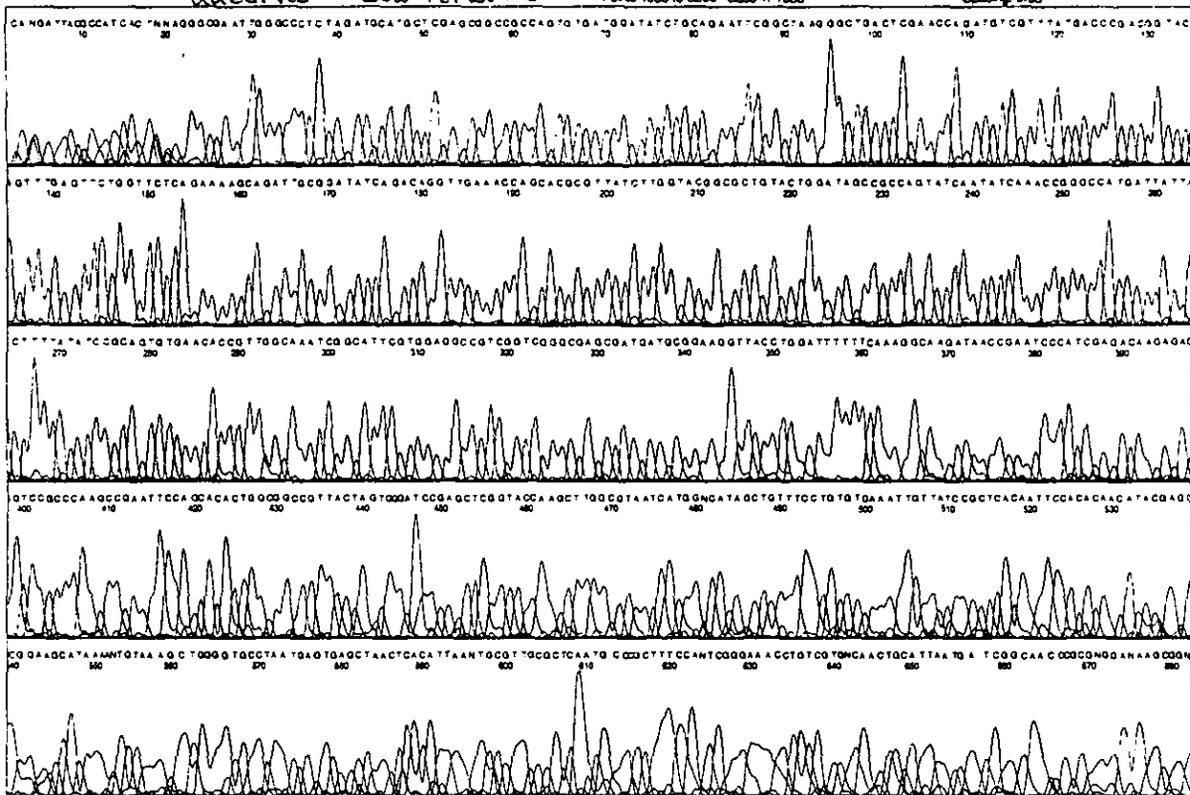


Figura 21a. Resultados de la secuenciación del plásmido pCRLamb1.5. Se muestra el reporte que proporcionó el secuenciador automático de ADN con el iniciador universal M13 en sentido directo.

F0027 Alignment 1/21/98 3:55 PM

| | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 |
|---|---------|------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------|------------|-------------|------------|
| 1 | F0027 F | GAATTCGGCT | <u>AAGGGCTGAC</u> | <u>TGGAACCAGA</u> | <u>TGTCGTTTAT</u> | GACCCGACGG | TACAGTTTGA | GTTCCTGGTTC | TCAGAAAAGC |
| 2 | F0027 R | GAATTCGGCT | AAGGGCTGAC | TGGAACCAGA | TGTCGTTTAT | GACCCGACGG | TACAGTTTGA | GTTCCTGGTTC | TCAGAAAAGC |
| | | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 |
| 1 | F0027 F | AGATTGCGGA | TATCAGACAG | GTTGAAACCA | GCACGCGTTA | TCTTGGTACG | GCGCTGTACT | GGATAGCCGC | CAGTATCAAT |
| 2 | F0027 R | AGATTGCGGA | TATCAGACAG | GTTGAAACCA | GCACGCGTTA | TCTTGGTACG | GCGCTGTACT | GGATAGCCGC | CAGTATCAAT |
| | | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 |
| 1 | F0027 F | ATCAAACCGG | GCCATGATTA | TTACTTTTAT | ATCCGCAGTG | TGAACACCGT | TGGCAAATCG | GCATTCGTGG | AGGCCGTCCG |
| 2 | F0027 R | ATCAAACCGG | GCCATGATTA | TTACTTTTAT | ATCCGCAGTG | TGAACACCGT | TGGCAAATCG | GCATTCGTGG | AGGCCGTCCG |
| | | 250 | 260 | 270 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 |
| 1 | F0027 F | TCGGGCGAGC | GATGATGCGG | AAGGTTACCT | GGATTTTTC | AAAGGCAAGA | TAACCGAATC | CCATCGAGAC | AAGAGAGGTC |
| 2 | F0027 R | TCGGGCGAGC | GATGATGCGG | AAGGTTACCT | GGATTTTTC | AAAGGCAAGA | TAACCGAATC | CCATCGAGAC | AAGAGAGGTC |
| | | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| 1 | F0027 F | CGCCCAAGCC | GAATTC | | | | | | |
| 2 | F0027 R | CGCCCAAGCC | GAATTC | | | | | | |

Figura 22. Secuencia del inserto del plásmido pCRI Lamb1.5. Se alinearon las secuencias obtenidas con el iniciador universal M13 directo y M13 reverso, las secuencias de los dos iniciadores (Rd-1 y Rd-2) están subrayadas.

9. SENSIBILIDAD A MspI DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN OBTENIDOS EN PRESENCIA DE dUTP

Se hizo una prueba para determinar si los productos de PCR con uracilo en vez de timina podían ser digeridos eficientemente con MspI.

Para ello, los productos de dos amplificaciones (usando como molde el ADN plasmídico de la clona 5 purificado por MINIPREP) uno con dUTP y otro con dTTP, fueron digeridos con la enzima MspI (figura 23). Se observó que no había diferencia en la eficiencia de la digestión, por lo que esta digestión es compatible con el uso del control enzimático de la contaminación. Sin embargo sí pudo observarse una menor intensidad en las bandas de los productos obtenidos con uracilo, comparadas con los productos con timina, lo cual ya había sido observado anteriormente al probar el efecto del pretratamiento con UDG.

10. TITULACIÓN DE pCRLamB1.5 (ESTÁNDAR INTERNO) SÓLO Y CON ADN DE CEREBRO DE RATÓN

Para obtener el estándar interno, el ADN del plásmido pCRLamB1.5 fue purificado a escala mediana (aproximadamente 100 µg) por cromatografía de intercambio iónico sobre columna QIAGEN. Este método se eligió por la alta calidad del ADN que se obtiene, ya que la razón de absorbancias del ADN plasmídico fué de $A_{260}/A_{280}=1.9$. Antes de la amplificación fue necesario linearizar el plásmido, para lo cual se eligió digerirlo con EcoRI, debido a que es más eficiente la amplificación de ADN linear que la de ADN circular (Sambrook et al., 1989).

Para conocer el límite de detección de la técnica al amplificar al estándar interno, se decidió titularlo. Para ello, se amplificó una serie de diluciones 1:3 de ADN del plásmido pCRLamB1.5 (estándar interno) purificado por QIAGEN y linearizado por digestión con EcoRI. El resultado de la amplificación (figura 24) muestra que se obtuvo una buena

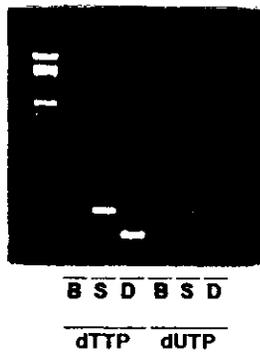


Figura 23. Comparación de la eficiencia de digestión con MspI de productos de amplificación con uracilo y con timina

Se hicieron dos amplificaciones de una dilución 1:2000 de la solución de ADN plasmídico obtenida por "Miniprep", de la clona 5. En los carriles marcados **dUTP**, las condiciones son las reportadas en "Material y Métodos" (protocolo de PCR con AmpliTaq Gold y UDG). En los carriles marcados **dTTP**, las condiciones son las mismas con la diferencia que se usó 100 μM de dTTP en vez de 200 μM de dUTP. Se tomaron 5 μl del producto de las amplificaciones y se digirieron con la enzima MspI. Después de la digestión, la totalidad de las reacciones fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (**D**). Como referencia (**S**) se colocaron 5 μl del producto de cada amplificación, sin digerir. Como control negativo (**B**) se hizo un blanco de PCR sin ADN.

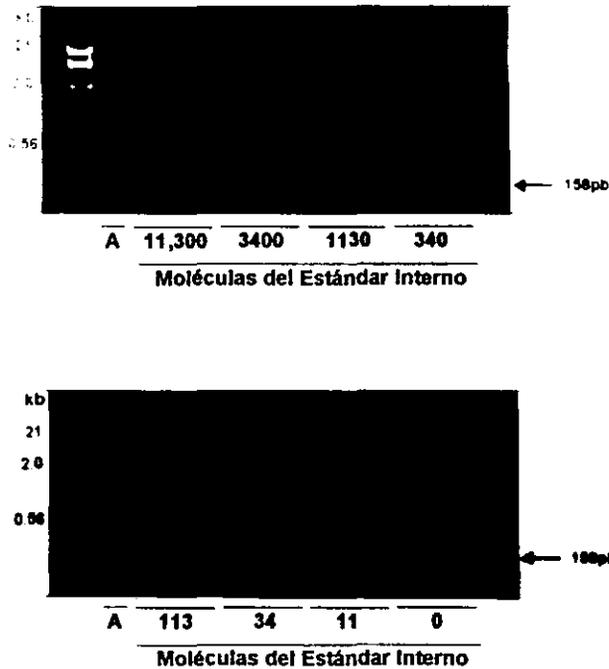


Figura 24. Titulación del estándar interno por PCR

Se amplificó por triplicado una serie de diluciones 1:3 del plásmido pCRLamB1.5 (estándar interno) purificado por QIAGEN y linearizado con EcoRI. Los iniciadores fueron Rd-1 y Rd-2, las condiciones de amplificación se mencionan en "Material y Métodos" (qcPCR). El ADN blanco fué sustituido por 5 µl de TE. Después de la amplificación, los productos se sometieron a una extracción con un volumen igual de cloroformo, una congelación, una descongelación y 8 µl (16%) de los productos de la PCR fueron digeridos con MspI, los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. A corresponde al amplificado no digerido. 0 es un blanco de PCR sin ADN.

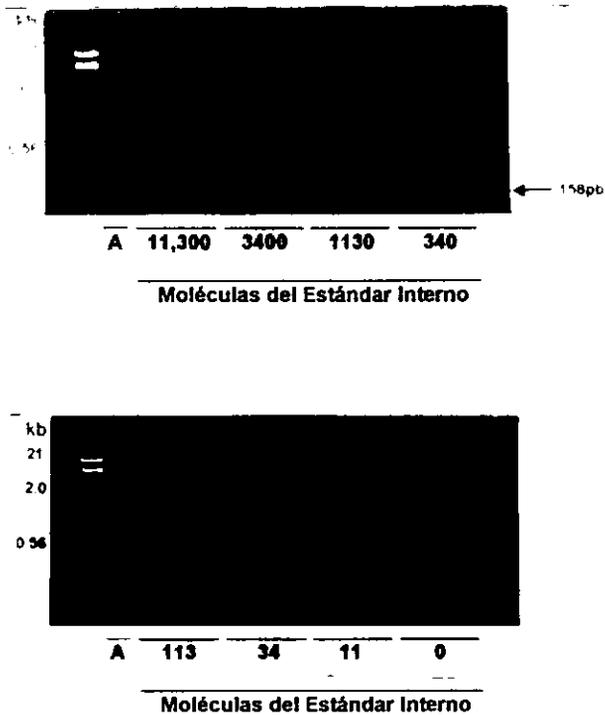


Figura 25. Titulación por PCR del estándar interno en presencia de ADN de cerebro de ratón

Se hizo el mismo experimento que en la figura 24, con la diferencia de que se sustituyeron los 5 μ l de TE por 5 μ l de una solución con 500 ng de ADN de cerebro de ratón purificado con DNAzol. A corresponde al amplificado no digerido. 0 es un blanco de PCR sin ADN.

QIAGEN y linearizado por digestión con EcoRI, junto con una cantidad constante de ADN de *T.gondii* de la cepa Wiktor equivalente a 23 taquizoítos (825 moléculas de B1) digerido con EcoRI. Los resultados de la coamplificación (figura 26) mostraron que la intensidad de las bandas de los productos de amplificación del estándar interno, se acercaba más a la intensidad de las bandas de los productos de amplificación del ADN de *T.gondii* (cepa Wiktor) en la dilución correspondiente a 3400 moléculas del estándar interno, aunque aparentemente se necesitaría una dilución mayor (10,000 moléculas) para tener mayor certeza.

En el caso de que ambos moldes tuvieran una misma eficiencia de amplificación, la cantidad de moléculas en este punto debía coincidir. Como no sucedió así, se concluye que sus eficiencias de amplificación no son iguales. Ya que aproximadamente fueron necesarias 3400 moléculas del estándar para producir la misma cantidad de producto que 825 moléculas de blanco, se puede decir que la eficiencia de amplificación del estándar es aproximadamente 4.1 veces menor a la del blanco en B1.

12. DIGESTIÓN DEL ADN MOLDE

Los experimentos anteriores se realizaron con ADN molde (blanco y estándar interno) digerido antes de la amplificación; para ahorrarse ese paso, se decidió repetir el experimento anterior pero usando ADN de *T.gondii* (cepa Wiktor) sin digerir, y además agregando una dilución más del estándar interno (10,000 moléculas). Los resultados de la coamplificación (figura 27) mostraron que la intensidad de las bandas de los productos de amplificación del estándar interno, se acercaba más a la intensidad de las bandas de los productos de amplificación del ADN parasitario en un punto intermedio entre la dilución correspondiente a 3000 y la dilución correspondiente a 1000 moléculas del estándar interno.

Estos resultados mostraron que por lo menos en cuanto a la eficiencia de la amplificación, no había diferencia significativa entre digerir o no digerir el ADN de *T.gondii*, por lo que se prefirió el no digerir. Además confirmaron lo encontrado en el

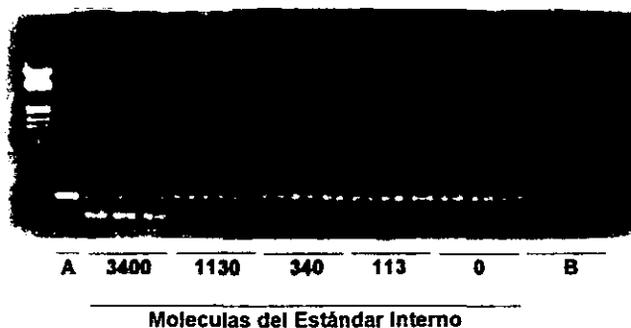


Figura 26. PCR cuantitativa competitiva con el estándar interno linearizado y el blanco digerido

Se coamplificó por triplicado una serie de diluciones 1:3 del plásmido pCRLamB1.5 (estándar interno) purificado por QIAGEN y linearizado con EcoRI junto con 2 pg de ADN de *T.gondii* cepa Wiktor digerido con EcoRI, equivalente a 23 taquizoitos. Los iniciadores fueron Rd-1 y Rd-2, las condiciones de amplificación se mencionan en "Materiel y Metodos" (qcPCR). Después de la PCR, las reacciones se sometieron a una extracción con un volumen igual de cloroformo, una congelación, una descongelación y 8 µl (16%) de los productos de la PCR fueron digeridos con MspI. Los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. **A** corresponde al amplificado no digerido y **B** es un blanco de PCR sin ADN.

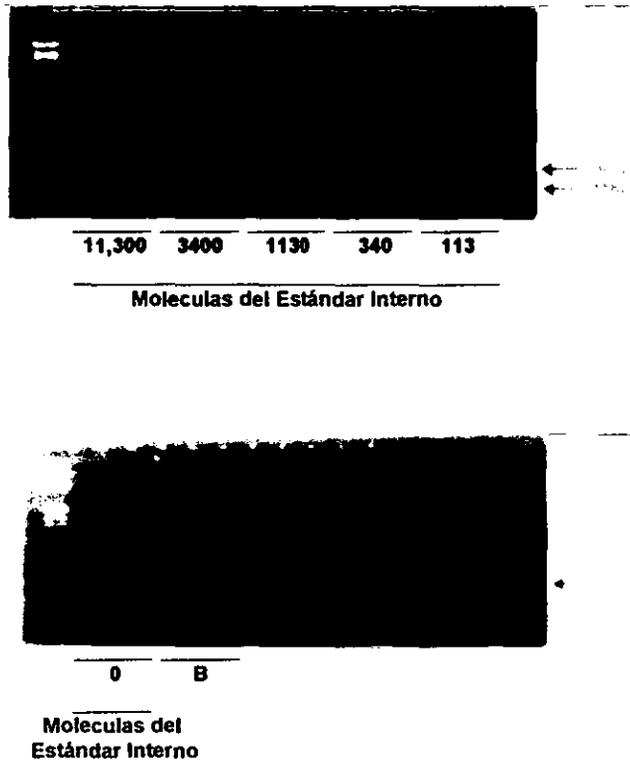


Figura 27. PCR cuantitativa competitiva con el estándar interno linearizado y el blanco no digerido

Se coamplificó por triplicado una serie de diluciones 1:3 del plásmido pCRLamB1.5 (estándar interno) purificado por QIAGEN y linearizado con EcoRI junto con 2 pg de ADN de *T.gondii* cepa Wiktor equivalentes a 23 taquizoítos. Los iniciadores fueron Rd-1 y Rd-2, las condiciones de amplificación se mencionan en "Material y Métodos" (qPCR). Después de la PCR, las reacciones se sometieron a una extracción con un volumen igual de cloroformo, una congelación, una descongelación y 8 μ l (16%) de los productos de la PCR fueron digeridos con MspI. Los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. B es un blanco de PCR sin ADN.

experimento anterior, sobre la diferencia entre las eficiencias de amplificación del blanco en B1 y del estándar interno.

13. SIMULACIÓN DE LAS CONDICIONES REALES

Por último, la técnica se probó en condiciones que simulaban a las reales (una muestra de cerebro de ratón infectado): se coamplificó una cantidad constante de ADN de *T.gondii* (la cepa Wiktor, 23.5 taquizoítos) sin digerir junto con diluciones de pCRLamB1.5, todo en presencia de 500 ng de ADN de cerebro de ratón purificado con DNazol. Los resultados de la amplificación (figura 28) muestran que no hubo ningún cambio con respecto a los obtenidos en la coamplificación sin ADN de cerebro de ratón, por lo que la presencia del ADN de cerebro de ratón no afecta en nada a la coamplificación de los dos moldes y por lo tanto la técnica es viable.

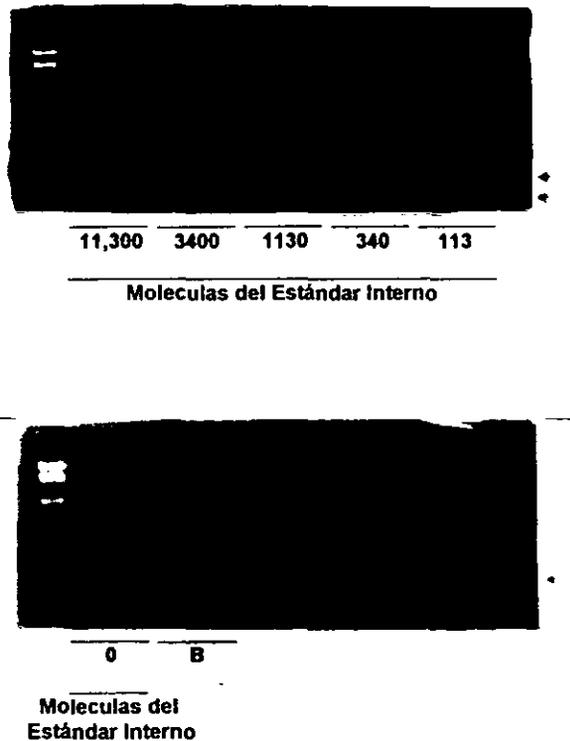


Figura 28. PCR cuantitativa competitiva con estándar interno linearizado y blanco no digerido en presencia de ADN de cerebro de ratón

Se hizo el mismo experimento que en la figura 27, con la diferencia de que, junto con los 2 pg de ADN de *T.gondii* (cepa Wiktor), se agregaron 500 ng de ADN de cerebro de ratón purificado con DNazol. B contiene únicamente 500 ng de ADN de cerebro de ratón.

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1. SELECCIÓN DEL BLANCO DE AMPLIFICACIÓN Y DISEÑO DEL ESTÁNDAR INTERNO

Las razones por las que se decidió escoger como blanco de la amplificación dentro del genoma de *T. gondii* al gen B1, fueron mencionadas anteriormente (Introducción: blancos para PCR dentro del genoma de *T. gondii*) y se resumen a continuación:

- es un gen conservado y altamente específico para *T. gondii*.
- ha sido el más estudiado y usado como blanco para PCR dentro del genoma del parásito.
- es un gen repetido 35 veces en el genoma de *T. gondii*, lo que hace que la técnica sea más sensible, pues el que haya un mayor número de moléculas blanco por parásito hace posible detectar un menor número de parásitos.

Se decidió que los iniciadores usados serían unos previamente reportados en la literatura y no diseñar unos nuevos, debido a que diferentes iniciadores para el mismo gen pueden exhibir una diferencia en sensibilidad de hasta 1000 veces (He et al., 1994), lo que hace que el encontrar un par de iniciadores con la eficiencia y sensibilidad adecuadas, sea algo que puede consumir mucho tiempo y recursos.

Por otro lado, debido a que la eficiencia de la Taq polimerasa empieza a decaer a partir de los 500 nucleótidos polimerizados (Rychlik, 1993), era necesario que el blanco de amplificación tuviera un tamaño cercano o inferior a 500 pb. Por otro lado también era necesario que el segmento blanco fuera lo más grande posible, ya que a mayor tamaño del amplificado, éste es más fácil de detectar por electroforesis y por lo tanto hay una mayor sensibilidad de la técnica de PCR. Además, como se vió anteriormente (Resultados: diseño y características del estándar interno), la longitud final de los productos del estándar interno (ya digeridos) sería la mitad de la longitud de los productos del blanco, por lo que a mayor tamaño del blanco, mayor sería la diferencia de tamaño entre éste y el estándar interno y

más sencillo sería separar electroforéticamente los productos de amplificación de ambos. Como se puede observar en la tabla 1, el par de iniciadores que más se acercaba a estas necesidades fue el reportado por Pelloux et al. (1996), ya que amplifican un segmento de 301 pb; además estos iniciadores amplifican el ADN de *T. gondii* con una sensibilidad de 1 taquizoito o de 10 taquizoitos en presencia de 1 µg de ADN contaminante (humano) y se ha probado que no amplifican ADN de especies relacionadas con *T. gondii*. Por todo lo anterior, los iniciadores elegidos fueron los reportados por Pelloux et al. (1996): Rd-1 (nucleótidos 88-110) y Rd-2 (nucleótidos 388-368).

2. REPRODUCIBILIDAD Y SENSIBILIDAD DEL ENSAYO

El protocolo que se usó inicialmente para la PCR estuvo basado en el que Pelloux et al. (1996) usaron junto con los iniciadores Rd-1 y Rd-2; solo se modificó para adecuarlo a los reactivos y equipo existentes en el laboratorio, además de eliminar el control enzimático de la contaminación. El protocolo implementado resultó ser reproducible a nivel intraensayo, y tener sensibilidad de 2.3 taquizoitos similar a la reportada de 1 taquizoito.

Para asegurarse de la reproducibilidad a nivel interensayo e intraensayo y como resultado de la experiencia previa en este laboratorio (datos no reportados), se implementó dentro del protocolo: el calentar las alícuotas de los iniciadores y el calentar las soluciones de ADN entre cada dilución por 1 ó 2 min en un BM en ebullición con el propósito de homogeneizar las soluciones que habían sido sometidas a congelación - descongelación o a almacenamiento a 4°C, ya que estos procesos pueden convertir una solución en una mezcla no homogénea a nivel molecular. Por lo tanto de ese modo se puede asegurar una misma concentración de los reactivos en todas las reacciones o un mismo número de moléculas de ADN blanco en los triplicados. Cuando se observaron problemas de falta de reproducibilidad interensayo, el problema se solucionó al calentar las soluciones amortiguadora y de MgCl₂ antes de ensamblar las PCR (Allen et al., 1992).

3. ESPECIFICIDAD

Un requisito indispensable de la técnica es que los iniciadores sean específicos del blanco dentro de B1 y del estándar interno ya que si hay secuencias de alineación para los iniciadores en el resto del ADN, competirían con el ADN blanco en B1 y con el estándar interno, haciendo imposible la cuantificación. Como ya se observó anteriormente, en presencia de ADN de la cepa Wiktor, los iniciadores producen una sola banda de amplificación, lo que significa que son específicos para esa región dentro del genoma de *T.gondii*. En las condiciones reales, además del ADN de *T.gondii* estará presente ADN de cerebro de ratón, por lo que los iniciadores no deben amplificar nada dentro del genoma de ratón. Por ello se implementó el comienzo en caliente (Hot Start) usando la AmpliTaq Gold, (Taq Polimerasa bloqueada químicamente), ya que de esa manera se obtuvo la especificidad deseada. Este comienzo en caliente (Kidd et al., 1995) asegura que la Taq Polimerasa sólo comience a polimerizar después de la primera desnaturalización, evitando polimerizaciones a temperaturas menores, que suelen ser debidas a alineaciones poco específicas.

4. CONSERVACION

Se demostró que la secuencia amplificada por Rd-1 y Rd-2 se encontraba conservada en la cepa Me49 de *T.gondii*, ya que al amplificar con estos iniciadores, fue posible obtener un amplificado del mismo tamaño que con la cepa Wiktor. Sin embargo el límite de detección fue aproximadamente 10 veces menor que con la cepa Wiktor. Esto puede deberse a que el ADN usado para la determinación de sensibilidad, fue preparado a partir de un sobrenadante de cultivo celular, el cual si bien contenía en su gran mayoría taquizoitos, no estaba completamente libre de células de la monocapa. Esto quiere decir que la pureza del ADN de *T.gondii* pudiera variar ligeramente de una cepa a la otra, y por lo tanto podría verse afectado el nivel de detección aparente. Otra explicación sería que el número de copias del gen B1 sea menor en esta cepa de *T.gondii*, y que por lo tanto disminuya el nivel de detección, pero ésta última explicación es poco probable debido a que

en las cepas de *T.gondii* en las que se ha determinado, se ha encontrado aproximadamente el mismo número de copias de B1 (Burg et al., 1989).

5. CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN

Debido a la sensibilidad de la técnica, es muy fácil que se detecte la más mínima contaminación con ADN molde existente en reactivos y equipo. Para controlar la presencia de contaminación se tomaron varias medidas.

1. Manejar zonas de prePCR y postPCR. Los reactivos, material desechable, micropipetas, microcentrífugas, etc., usados en la preparación de las reacciones eran diferentes a los usados para el postratamiento y análisis de los productos. Además, las reacciones de PCR eran ensambladas en un gabinete de bioseguridad.
2. Todo el material usado para montar las reacciones de PCR a excepción de las soluciones, los reactivos y la microcentrífuga, eran irradiados con U.V. antes de ensamblar las reacciones.
3. En todas las series de reacciones se incluyó un blanco o control negativo sin ADN para verificar la ausencia de contaminantes en los reactivos.
4. En cuanto se tuvieron problemas de contaminación se pensó que la mayor fuente de contaminación eran los productos de PCR anteriores, por ello se implementó un control enzimático de la contaminación por acarreo (Longo et al., 1990), que consiste en que todos los productos de PCR generados tengan uracilo en vez de timina, para que así puedan ser eliminados selectivamente si están presentes en una reacción nueva por medio del uso de la Uracil DNA glicosilasa. Para implementar este sistema se siguió en gran parte el protocolo original de Pelloux et al. (1996) ya que se usaron las concentraciones de dUTP y UDG que se mencionan ahí. En ese protocolo la razón de sustituir 100 μM de dTTP por 200 μM de dUTP es que la Taq polimerasa tiene una menor afinidad por el dUTP que por el dTTP (Pang et al., 1992). Normalmente se aumenta la concentración del MgCl_2 debido a que el aumento de concentración en el dUTP aumenta la cantidad de ion magnesio secuestrado, pero en este caso no fue

necesario, ya que el protocolo original de Pelloux ya contemplaba esta concentración de dUTP. La primera incubación de las reacciones a 50°C mencionada por Pelloux et al. (1996) y también implementada aquí, tiene el objetivo de que la UDG actúe sobre los posibles productos de PCR contaminantes con uracilo. Debido a la actividad residual de la UDG a temperaturas menores de 72°C después de los ciclos térmicos de la PCR (Thornton et al., 1992), se adicionó al protocolo el mantener las reacciones a 72°C, hasta ser retiradas del termociclador, en vez de mantenerla a 4°C como en el común de los protocolos. Por la misma razón, después de terminados los ciclos térmicos, las reacciones se someten a una extracción con cloroformo y una congelación que desnaturalizan las proteínas presentes, produciendo la inactivación de la UDG (Holhfeld et al., 1994).

La implementación de esta técnica de control de contaminación no afecta la reproducibilidad pero produce una reducción de sensibilidad de la PCR, la cual probablemente se deba a que la actividad residual de la enzima no puede ser detenida del todo (Pang et al., 1992). Aún así la sensibilidad es adecuada para las necesidades del proyecto.

6. AMPLIFICACIÓN DEL LISADO DE TAQUIZOÍTOS

No fue posible tener una cuantificación más exacta de la sensibilidad de la técnica al amplificar taquizoítos lisados debido a la presencia de inhibidores de amplificación dentro del lisado total, por lo cual no se pudo concluir nada más con respecto a la sensibilidad.

7. OPTIMIZACIÓN DEL NÚMERO DE CICLOS

Se intentó aumentar la sensibilidad aumentando el número de ciclos, sin resultado, por lo que se regresó al número de ciclos original.

8. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN

Inicialmente, las extracciones de ADN se realizaron con la técnica de proteinasa K-fenol-cloroformo, que es la técnica de referencia. Sin embargo esta técnica es muy larga e implica muchas manipulaciones. Para una técnica de PCR cuantitativa, donde se necesita procesar un gran número de muestras al mismo tiempo, es necesario que la técnica sea rápida y tenga el menor número de pasos posibles para así poder evitar mucha manipulación, ya que ésta podría favorecer la contaminación cruzada de las muestras. Se seleccionó el método de extracción DNAzol de GIBCO entre una gran variedad de métodos comerciales, debido al bajo costo, la alta eficiencia de extracción (1.89 µg de ADN por mg de cerebro de ratón), la poca manipulación requerida (son 5 pasos), la rapidez con la que se lleva a cabo (60 min máximo), la facilidad para manejar varias muestras al mismo tiempo, y que es de los pocos que están recomendados para la extracción de ADN para PCR.

La calidad del ADN purificado por este método fue determinada por la razón de absorbancias A_{260}/A_{280} , análisis por electroforesis en gel de agarosa y digestión enzimática.

La última prueba y la más concluyente fue el probar que la presencia de ADN de cerebro de ratón purificado con este método no afectaba la amplificación de B1. En una simulación de las condiciones reales, es decir, que además de la presencia del ADN genómico con el gen B1 también se encontrara presente el ADN del cerebro de ratón purificado con DNAzol (500 ng), la sensibilidad y la reproducibilidad intraensayo de la amplificación del segmento de B1 no cambiaron con respecto a la obtenida usando sólo ADN de *T.gondii*. Esto significa que en condiciones reales, va a ser posible detectar el ADN de 2.3 parásitos presente en 500 ng de ADN de cerebro de ratón. Se eligió la cantidad de 500 ng de ADN de cerebro de ratón, porque es el máximo recomendado para PCR de ADN genómico de mamífero en el instructivo del estuche de Perkin Elmer, que es el proveedor de la mayoría de reactivos y equipo usados aquí para hacer la PCR.

También se puede establecer que el límite de detección del método es de 2.3

taquizoítos, y en este caso es definido como la última dilución de ADN que produce un amplificado visible en por lo menos 2 de 3 ensayos (triplicado). En cambio el límite de cuantificación del método debe ser más confiable que el límite de detección, por lo que es de 23 taquizoítos, y en este caso se define como la última dilución de ADN que produce un amplificado visible y reproducible o de la misma intensidad en 3 de 3 ensayos (triplicado).

9. ESTÁNDAR INTERNO

Una vez que el estándar fue sintetizado y clonado, para asegurarse de que el inserto presente (estándar interno) en las clonas transformantes era el esperado, se realizaron varias pruebas como la amplificación con los iniciadores Rd- 1 y Rd-2, la digestión con MspI, e incluso la secuenciación del inserto de una de las clonas. Al secuenciar se encontró que el inserto de la clona pCRLamB1.5 tenía la secuencia esperada y se decidió utilizarla como estándar interno.

10. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS

En las condiciones de amplificación reales, los productos de PCR con uracilo en vez de timina, pueden ser digeridos eficientemente con MspI, por lo que los productos del estándar podrían ser separados de los productos del blanco en B1 sin ningún problema al usar el control enzimático de la contaminación.

11. NORMALIZACIÓN DEL ESTÁNDAR INTERNO CONTRA EL BLANCO

Como se puede ver en los resultados, al titular el estándar interno sólo o con ADN de ratón, el nivel de detección obtenido hizo pensar que el estándar interno poseía una eficiencia de amplificación similar a la del blanco en B1. Sin embargo, al momento de comparar las eficiencias de ambos moldes en una coamplificación, se demostró que las eficiencias no eran similares, ya que la eficiencia del estándar interno fue aproximadamente 4.1 veces menor que la del blanco.

Debido a lo anterior, es necesario normalizar a pCRLamB1.5 contra el blanco en B1 para poder usar a pCRLamB1.5 como estándar interno, es decir, que para una cuantificación se usará el factor de corrección de 4.1 moléculas del estándar por cada molécula del blanco en B1 (McCulloch et al., 1995 y Föster et al., 1994). Dicho de otra manera, 3400 moléculas de pCRLamB1.5 equivalen a 23 taquizoítos de *T.gondii*.

12. DIGESTIÓN DEL ADN MOLDE

En el genoma de *T.gondii*, el gen B1 se encuentra repetido en tándem y debido a esta cercanía de las copias, la eficiencia de amplificación del blanco pudiera verse afectada en comparación con la eficiencia de amplificación del estándar interno, ya que éste se encuentra en moléculas linearizadas de un plásmido, lo cual lo hace más accesible para la Taq. Entonces sería necesario separar las copias del gen, para que fuera válido usar un estándar interno como éste, ya que sólo así se puede decir que el blanco dentro de B1 y el estándar interno, son igualmente accesibles para la Taq.

Sin embargo al hacer la coamplificación de ambos moldes, se demostró que por lo menos en cuanto a la eficiencia de la amplificación, no había diferencia significativa entre digerir o no digerir el ADN de *T.gondii*, por lo que se prefirió el no digerir.

13. SIMULACIÓN DE LAS CONDICIONES REALES

Por último, la técnica probó ser efectiva en condiciones que simulaban a las reales, es decir, una coamplificación en presencia de ADN de cerebro de ratón, lo cual demostró que la técnica es viable para ser aplicada en una muestra de cerebro de ratón infectado.

14. COMPARACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO CON LO REPORTADO EN LA LITERATURA

Al comparar la técnica desarrollada con técnicas similares reportadas en la literatura se pueden observar las ventajas que tiene sobre lo que ya se ha hecho.

Previo a este trabajo, Bretagne et al. (1995) ya habían desarrollado una qcPCR para *T.gondii*, en donde construyeron su estándar interno según el mismo principio que el usado aquí. La técnica desarrollada aquí tiene varias ventajas comparada con la reportada por Bretagne et al.: la diferencia relativa de longitud entre el estándar y el blanco es mucho menor (4.7%) que en la reportada por Bretagne et al. (24.3%), lo cual significa que las eficiencias de amplificación pueden ser más parecidas en la técnica usada aquí (McCulloch et al., 1995); en la técnica de Bretagne et al., la manera de diferenciar los productos del blanco y del estándar era por su tamaño, por lo que era necesario marcar los productos con un fluorocromo y analizarlos en un secuenciador automático de ADN, mientras que en la técnica desarrollada aquí, hay una diferencia de un sitio de corte entre ambos (estándar y blanco), lo que hace que la separación sea más sencilla, económica y que se acople más a las necesidades y recursos existentes.

Una ventaja que tiene la técnica reportada por Bretagne et al. en comparación con la desarrollada aquí, es su mayor sensibilidad ya que logra detectar 5 moléculas de estándar interno. Sin embargo, el nivel de sensibilidad que se obtuvo con la técnica desarrollada aquí (2.3 taquizoitos) es suficiente para el objetivo de la misma.

En la referencia donde se encuentran reportados por primera vez los iniciadores Rd-1 y Rd-2 utilizados aquí (Pelloux et al., 1996), también se describe una cPCR con un estándar interno heterólogo. Una desventaja de este estándar interno, es que la técnica que usaron para sintetizarlo es muy complicada comparada con la amplificación con iniciadores compuestos usada aquí. Por otro lado, los autores apenas lograron separar electroforéticamente los productos del estándar y del blanco en un gel de agarosa al 2%, ya

que ambos productos sólo difieren en longitud por 59 nt, mientras que en la técnica usada aquí, la diferencia entre los productos ya digeridos es de 158 nt, por lo que la separación electroforética es mucho mejor. Otra desventaja del estándar reportado es que la diferencia relativa de longitud entre el estándar y el blanco es mucho mayor (19.6%) que en la técnica usada aquí (4.6%), lo cual significa que las eficiencias de amplificación pueden ser más parecidas en la técnica usada aquí (McCulloch et al., 1995).

En cuanto a la sensibilidad de la técnica (2.3 taquizoítos/ 500 ng de ADN de ratón), se encuentra en el rango de las sensibilidades reportadas en estudios previos con varios iniciadores para el gen B1, que van desde 5 moléculas de ADN blanco (Bretagne et al., 1993) hasta 10 taquizoítos/1 µg de ADN humano (Burg et al., 1989, Groß et al., 1992, y Pelloux et al., 1996).

X. CONCLUSIONES

Se logró desarrollar una técnica de PCR competitiva para cuantificar ADN de *T.gondii*. El método resultó sensible (detecta 2.3 taquizoítos en 500 ng de ADN de cerebro de ratón) y reproducible a nivel intraensayo. Este fue aplicado exitosamente en condiciones que simulan ADN extraído del cerebro de un ratón infectado.

XI. PROPUESTAS

Para estudios posteriores, se propone integrar a esta técnica el análisis de imágenes para la cuantificación exacta del ADN del parásito. Además sería útil una validación de la misma al compararla con las técnicas convencionales para la cuantificación de *Toxoplasma gondii*: el cultivo en líneas celulares y la inoculación en ratones.