

01674



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL

CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS GENÓMICA Y DE
EXPRESIÓN GENÉTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
ANTÍGENOS DE *Anaplasma marginale*.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

VERÓNICA OCAMPO ESPINOZA

TUTOR: ROGELIO A. ALONSO MORALES
COMITÉ TUTORAL: SERGIO D. RODRÍGUEZ CAMARILLO
JULIO V. FIGUEROA MILLÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL

CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS GENÓMICA Y DE
EXPRESIÓN GENÉTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
ANTÍGENOS DE *Anaplasma marginale*.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

VERÓNICA OCAMPO ESPINOZA

TUTORES : ROGELIO A. ALONSO MORALES
SERGIO D. RODRÍGUEZ CAMARILLO
COMITÉ TUTORAL: JULIO V. FIGUEROA MILLÁN

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por todo el apoyo que me brindaron, quienes en los momentos más difíciles estuvieron a mi lado apoyándome y alentándome a seguir adelante, en general por todo el apoyo y amor que me han brindado a lo largo de mi formación profesional y personal.

A los doctores Rogelio A. Alonso Morales, Sergio D. Rodríguez Camarillo y Miguel Angel García Ortiz por el tiempo que me dedicaron, la valiosa amistad que me brindaron y los grandes conocimientos que me transmitieron.

A la Biol. Amanda Gayosso Vázquez por todo el apoyo técnico en el área de biología molecular para la realización de ésta tesis y la gran amistad que me brindó a lo largo de todo el trabajo de investigación.

A mis compañeros Mario, Espiri, Noé y Felicitas por la gran amistad brindada, los grandes momentos que pasamos juntos y porque siempre estuvieron a mi lado cuando los necesitaba.

Al proyecto CONACYT 30416B "Caracterización inmunológica de antígenos de *Anaplasma marginale* relevantes a la protección en bovinos vacunados" (INIFAP, PRECI No. 1966) por el financiamiento otorgado para la realización de éste trabajo y PAPIT-UNAM INI2075023.

A todos aquellos que aportaron algo para que éste trabajo llegara a su fin y a quienes me alentaron para el término del mismo.

RESUMEN

La anaplasmosis bovina es una enfermedad hemolítica causada por la rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale* cuyos signos incluyen anemia progresiva, ictericia, fiebre, aborto y muerte entre otros. En México la ganadería reporta grandes pérdidas económicas por esta enfermedad y el problema se agrava por la ausencia de vacunas comerciales. El objetivo de éste trabajo fue generar recursos biológicos para la obtención de genes y antígenos relevantes de este microorganismo. Se construyeron bibliotecas genómicas y de expresión genética. Se preparó una biblioteca genómica en el vector Lambda DASH® por clonación de fragmentos de DNA de 19 Kpb obtenidos por digestión parcial con la enzima *Sau3AI* en el sitio *BamHI* del bacteriófago. El título obtenido de la biblioteca primaria fue 1.5×10^4 ufp que representa 15 veces el genoma de *A. marginale*. La biblioteca amplificada alcanzó un título de 1.1×10^{13} fagos recombinantes. Por otra parte, se prepararon dos bibliotecas de expresión mediante clonación de fragmentos genómicos de 700-1000 pb obtenidos por digestión parcial con las enzimas *RsaI*, *AluI* y *HaeIII* en los sitios *SmaI* y *EcoRV* del plásmido pQE30 y el fagémido 3.2, respectivamente. En ambas bibliotecas primarias se obtuvieron un título de 6×10^4 clonas con 79.1% de clonas positivas para pQE30 y de 72.9% y 62.5% para el fagémido 3.2, determinados mediante PCR con iniciadores específicos para cada vector. Estas bibliotecas se amplificaron en placa para obtener el ADN de las clonas. La biblioteca genómica se evaluó por PCR mediante la amplificación del gene para la proteína MSP5 a partir de un extracto crudo. Las tres bibliotecas presentan la calidad óptima en cuanto a sus dimensiones y porcentaje de clonas positivas. Las biblioteca genómica y las de expresión, son recursos complementarios para identificar y caracterizar antígenos (y sus genes) asociadas a protección y a diagnóstico. Esto dará más bases para un conocimiento profundo de la anaplasmosis y para establecer nuevos métodos de control en nuestro medio.

Palabras claves: *Anaplasma marginale*, Anaplasmosis, bibliotecas genómicas, bibliotecas de expresión, antígenos, genes, vacunas.

ABSTRACT

Bovine Anaplasmosis is a hemolytic disease caused by the intraerythrocytic rickettsia *Anaplasma marginale*. The disease is characterized by progressive anemia, icterus, fever, abortion and death. At present, there are great economic losses due to anaplasmosis in México and the problem is compounded by absence of commercial vaccines. The objective of this work was to generate both, a genomic library and an expression library for the study and derivation of recombinant genes and their products from this rickettsia. A genomic library was prepared using Lambda DASH ®II vector by cloning 19 Kpb DNA fragments obtained by partial digestion of the rickettsial DNA with the *Sau3A1* enzyme at the *BamHI* site of the bacteriophage. For this primary library a titer of 1.5×10^4 pfu was obtained. This number represents fifteen times the genome the *A. marginale*. Amplification of this primary library yielded 1.0×10^{13} recombinant phages. Two expression libraries were generated by cloning of 700-1000 bp DNA fragments obtained by partial digestion with the enzymes *RsaI*, *AluI* y *HaeIII* at the *SmaI* and *EcoRV* sites of the pQE30 plasmid and the 3.2 phagemid, respectively. In the two primary libraries we obtained a titer of 6×10^4 clones, with 79.1% of pQE30 positive clones and 72.9% and 62.5% of positive clones for the 3.2 phagemid as determined by PCR with specific primers for each vector. These libraries were plate-amplified to obtain the clones DNA. The genomic library was evaluated by PCR amplification for the MSP5 protein gene from crude extract. All three libraries showed optimal conditions with regards to total numbers of clones and percentages of positive clones. Both expression and genomic libraries are necessary and complementary resources for the identification and characterization of *A. marginale* antigens (and their genes) associated to protection and diagnostics.

Key words: *Anaplasma marginale*, Anaplasmosis, genomics libraries, expression libraries, antigens, genes, vaccine.

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	11
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS GENÓMICA Y DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE <i>A. marginale</i>	25
PREPARACIÓN DE CUERPOS INICIALES (c.i.) DE <i>Anaplasma marginale</i>	25
PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE CUERPOS INICIALES DE <i>A. marginale</i>	25
ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS BIBLIOTECAS.....	26
CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA GENÓMICA DE <i>A. marginale</i>	27
ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LA BIBLIOTECA.....	27
PREPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE 19 kpb DE DNA DE <i>A. marginale</i>	27
VECTOR Lambda DASH® II/ <i>Bam</i> HI.....	28
REACCIÓN DE LIGADO.....	28
SISTEMAS DE EMPACAMIENTO.....	29
PREPARACIÓN DE CÉLULAS HOSPEDERAS XL1B.....	29
EMPACAMIENTO DEL DNA DE λ GEM.....	30
TITULACIÓN DEL SISTEMA DE EMPACAMIENTO CON CÉLULAS XL1B.....	30
EMPACAMIENTO <i>in vitro</i> DEL DNA DE Lambda DE CADA UNO DE LOS LIGADOS.....	31
TITULACIÓN DEL EMPACAMIENTO DE LAS BIBLIOTECAS EN CÉLULAS HOSPEDERAS APROPIADAS XL1B-MRA y XL1B-MRAP2.....	31
AMPLIFICACIÓN DE LA BIBLIOTECA.....	31
CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN DE <i>Anaplasma marginale</i>	33
ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LA BIBLIOTECA.....	33

PREPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE 700 a 1000 pb DE DNA GENÓMICO DE <i>Anaplasma marginale</i> PARA LA CLONACIÓN EN EL PLÁSMIDO pQE30 Y EL FAGEMIDO PHAGE 3.2.....	33
PURIFICACIÓN DE DNA DEL PLÁSMIDO pQE30 Y DEL PHAGE 3.2.....	34
PREPARACIÓN DEL PLÁSMIDO pQE30 Y EL PHAGE 3.2 COMO VECTORES DE CLONACIÓN.....	35
REACCIÓN DE LIGADO.....	35
TRANSFORMACIÓN DE LAS BIBLIOTECAS DE EXPRESIÓN.....	36
DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CLONAS POSITIVAS PRESENTES EN LA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN CON CADA UNO DE LOS VECTORES DE CLONACIÓN.....	38
PROPAGACIÓN DEL FAGO AYUDADOR M13K07 DEL FAGÉMIDO 3.2.....	40
RESULTADOS.....	41
BIBLIOTECA GENÓMICA DE <i>Anaplasma marginale</i>	42
BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE <i>Anaplasma marginale</i>	47
DISCUSIÓN.....	57
BIBLIOTECA GENÓMICA DE <i>Anaplasma marginale</i>	57
BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE <i>Anaplasma marginale</i>	60
CONCLUSIÓN.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Títulos obtenidos del empacamiento de ligaciones de Lambda DASH II/*Bam*HI/CIAP en las células XL1B-MRA y XL1B-MRAP2.

Cuadro 2. Títulos obtenidos de la biblioteca amplificada y de los fagos control en células hospederas XL1B-MRA y XL1B-MRAP2 para cada caso.

Cuadro 3. Títulos a la transformación de 50ng de DNA a las diferentes concentraciones de inserto (fragmentos de 700-1000 pb) ligadas a los vectores de clonación pQE30/*Sma*II/FAC y pHage 3.2/*Eco*RV/FAC así como de ellos ligados así mismos y con un inserto control λ A/*ul*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Glóbulos rojos infectados con *Anaplasma marginale*.

Figura 2. Ciclo biológico de *Anaplasma marginale*.

Figura 3. Bovino infectado con *Anaplasma marginale* mostrando los signos clínicos característicos de la anaplasmosis.

Figura 4. Mapa del plásmido pQE30 utilizado como vector de clonación de fragmentos de 700-1000 pb de DNA para la construcción de la biblioteca de expresión genética de *Anaplasma marginale*.

Figura 5. Mapa del fagémido "pHage 3.2", empleado en la construcción de la biblioteca de expresión de *A. marginale*.

Figura 6. Mapa linear y secuencias del sitio múltiple de clonación del vector Lambda DASH®II empleado en la clonación de fragmentos de 19Kb para la construcción de la biblioteca genómica de *Anaplasma marginale*.

Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando MPM=marcador de peso molecular (λ BstIII), A: DNA de *Anaplasma marginale* intacto purificado a partir de cuerpos iniciales de la rickettsia (250ng) , B: DNA de *A. marginale* digerido con la enzima *Pst*1 (250ng).

Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% mostrando los fragmentos de 19 Kb de *Anaplasma marginale* obtenidos por digestión parcial con la enzima *Sau*3A1. Carril A: DNA Intacto de *A. marginale*, B: fragmentos de 19 Kb, C: DNA de λ GEM12/*Bam*HI y D: DNA de λ GEM12 intacto.

Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando la amplificación de un fragmento de 582 pb correspondientes a la proteína MSP5 de *A. marginale*. Carril 1: MPM= marcador de peso molecular PBR322, Carril 2: Biblioteca genómica de *A. marginale*, Carril 3: DNA intacto de *A. marginale*, Carril 4: control negativo, Carril 5: DNA λ GEM y Carril 6: MPM PBR322.

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando los fragmentos de 700-1000pb de *A. marginale* obtenidos por digestión parcial con las enzimas *AluI*, *RsaI* y *HaeIII* y purificados mediante geles de agarosa de bajo punto de fusión y extracciones con fenol y fenol cloroformo. Carril 1: MPM= Marcador de peso molecular λ BstIII en pb, Carril 2: fragmentos de 700-1000 pb (100ng), Carril 3: fragmentos de 700-1000 pb (200ng) y Carril 4: MPM pBR322 bajo rango en pb.

Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el MPM= marcador de peso molecular λ BstIII y el DNA del plásmido pQE30 digerido con la enzima *SmaI* y desfosforilado mediante una fosfatasa alcalina óptimo para la clonación de fragmentos de 700-1000 pb de *A. marginale*.

Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el MPM= marcador de peso molecular λ BstII y el DNA del fagémido pHage 3.2 digerido con la enzima *EcoRV* y desfosforilado por medio de una fosfatasa alcalina óptimo para la clonación de los fragmentos de 700-1000 pb de *A. marginale*.

Figura 13.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de fragmentos de entre 1104 y 1404 pb correspondientes al pHague 3.2 más los fragmentos de 700-1000 pb de DNA de *Anaplasma marginale* consideradas clonas positivas y de 404 pb correspondiente al vector sin insertos consideradas clonas negativas obtenidos mediante PCR con primers específicos del vector, de clonas de la biblioteca desnaturalizadas a 95°C en células TG1. MPM= marcador de peso molecular λ Bst III.

Figura 14.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de fragmentos de entre 1104 y 1404 pb correspondientes al pHague 3.2 más los fragmentos de 700-1000 pb de DNA de *Anaplasma marginale* consideradas clonas positivas y de 404 pb correspondiente al vector sin insertos consideradas clonas negativas obtenidos mediante PCR con primers específicos del vector, de clonas de la biblioteca desnaturalizadas a 95°C en células HB2151. MPM= marcador de peso molecular λ Bst III.

Figura 15.- Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de fragmentos de entre 1094 y 1394 pb correspondientes al plásmido pQE30 más los fragmentos de 700-1000 pb de DNA de *Anaplasma marginale* consideradas clonas positivas y de 394 pb correspondiente al vector sin insertos consideradas clonas negativas obtenidos mediante PCR con primers específicos del vector, de clonas de la biblioteca desnaturalizadas a 95°C en células DH10b. MPM= marcador de peso molecular λ Bst III.

INTRODUCCIÓN

ANAPLASMOSIS BOVINA

La anaplasmosis bovina es una enfermedad hemolítica, infecciosa, no contagiosa, transmitida por artrópodos hematófagos. La enfermedad es causada por la rickettsia intraeritrocítica *Anaplasma marginale*, que es la especie representativa del género *Anaplasma*, Familia *Anaplasmataceae*, Orden *Rickettsiales* (Drancourt y Raoult, 1994).

Las rickettsias son bacterias intracelulares obligadas, transmitidas por la picadura de artrópodos vectores; morfológicamente la mayoría son bacilos cortos, cocos, cadenas, filamentos o cocobacilos, algunas son pleomórficas y varían mucho de tamaño. Son inmóviles, Gram negativas, se multiplican sólo en células hospederas por fisión binaria (Davis y col., 1990), contienen enzimas metabólicas intracelulares y están rodeadas por una membrana plasmática (Pelezar, 1977).

Anaplasma marginale (Figura 1) fue descubierta por Theiler en 1910, quien usó el término anaplasma para indicar que el organismo carecía de citoplasma y *marginale* para describir la localización periférica dentro del eritrocito. *Anaplasma marginale* tiene forma de cuerpo esférico, cocoide con medidas de 0.2 a 1µl de diámetro y está compuesta de ocho subunidades o cuerpos iniciales que son las partículas infecciosas (Fragoso, 1991).

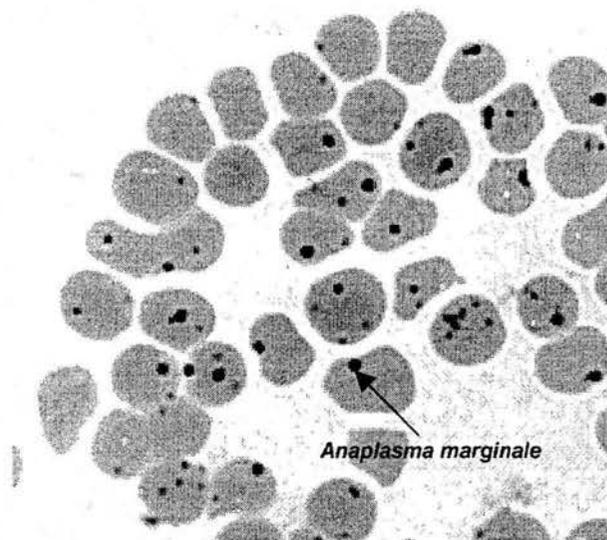


Figura1. Glóbulos rojos infectados con *Anaplasma marginale*.

El ciclo de vida de la rickettsia inicia cuando el cuerpo inicial penetra el eritrocito por invaginación de la membrana citoplasmática con la subsecuente formación de una vacuola, en la cual el cuerpo inicial se multiplica por fisión binaria y forma un cuerpo de inclusión que consiste generalmente de cuatro a ocho cuerpos iniciales (Figura 2, Ristic, 1981).

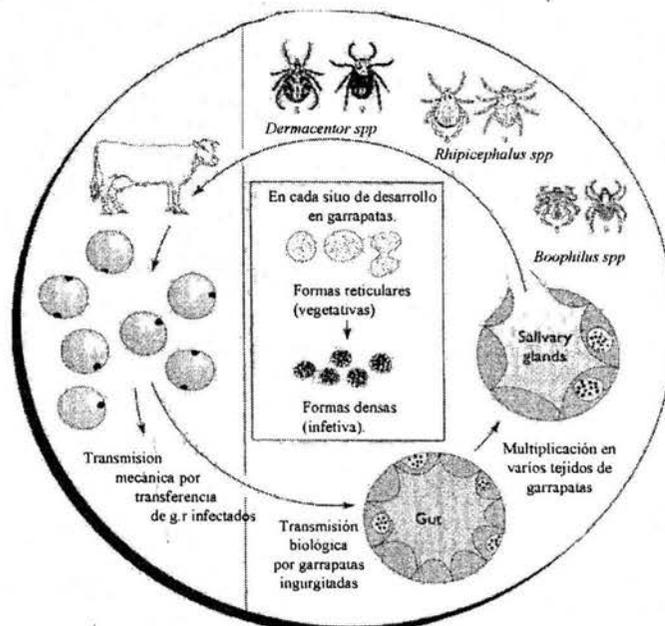


Figura 2. Ciclo biológico de *Anaplasma marginale*.

La anaplasmosis bovina puede presentarse en forma hiperaguda, aguda o crónica con signos que incluyen estados febriles, palidez de mucosas, ictericia, constipación y anemia progresiva entre otros (Figura 3, Ristic, 1981). Esta enfermedad puede transmitirse en forma biológica por garrapatas, en forma mecánica a través de insectos hematófagos y por manipulación (castraciones, descornes, etc) del ganado (Fragoso, 1991).

La enfermedad se caracteriza por producir pérdidas notables en la producción de carne y leche, abortos, retraso en el crecimiento y muertes ocasionales, además limita la introducción de razas especializadas en la producción de carne en aquellas zonas en donde la incidencia de anaplasmosis es mayor al 50%.

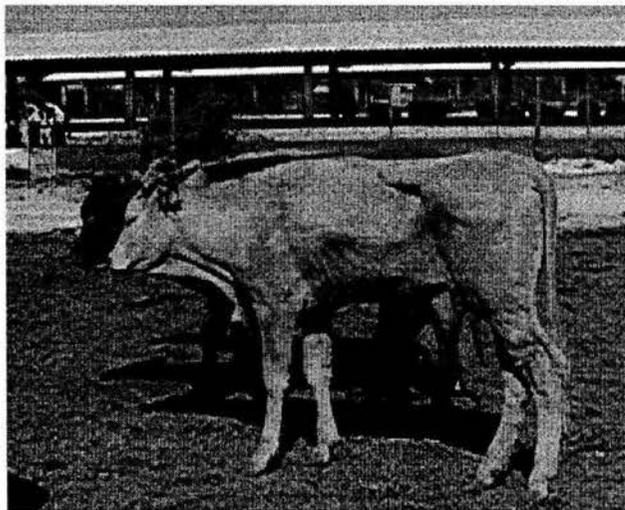


Figura 3. Bovino infectado con *Anaplasma marginale* mostrando los signos clínicos característicos de la anaplasmosis.

La anaplasmosis ha sido identificada como de alta ocurrencia en México (O.I.E., 1990) y destaca su importancia por la constante introducción al trópico de ganado *Bos taurus* altamente susceptible a la anaplasmosis (Álvarez, 1986), convirtiéndose en uno de los principales obstáculos para el mejoramiento genético; asimismo se le responsabiliza por ocasionar el 26 % del total de la mortalidad dentro del programa nacional de mejoramiento genético "Ganado Mejor" (Rodríguez y col., 1999), pérdidas anuales por 130 millones de dólares en zonas endémicas y una demanda de vacuna de un millón de dosis.

El diagnóstico de la anaplasmosis en forma directa se basa en la identificación microscópica de eritrocitos infectados y en forma indirecta mediante pruebas serológicas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA; Tello y col., 1986).

INMUNOLOGÍA DE LA ANAPLASMOSIS BOVINA

Actualmente en México, no existen vacunas comerciales contra la anaplasmosis. En otros países se usan vacunas con base en *Anaplasma centrale*, rickettsia que no se ha reportado en México y que por lo mismo está prohibida por las autoridades zoonosológicas de nuestro país (CONASA, 1995a). Las medidas que se aplican en programas de control de la enfermedad en zonas enzoóticas incluyen: control de poblaciones de vectores, premunización de animales susceptibles con sangre de animales portadores y el uso de antibióticos para prevenir o tratar la enfermedad, pero el riesgo que se corre es considerable y no existe una garantía de que los animales estarán protegidos.

Recientemente se ha evaluado la inmunización con proteínas purificadas de la membrana externa de *Anaplasma marginale* en un desafío homólogo, cuyos resultados revelan que de los animales inmunizados, algunos fueron protegidos completamente ante la confrontación del inmunógeno y esos animales desarrollaron bajos títulos de IgG1, altos títulos de IgG2 y alta producción de INF- γ mientras que los protegidos parcialmente desarrollaron cantidades menores de IgG2 e INF- γ . Esto sugiere que una gran respuesta de las células Th caracterizada por la producción de IgG2 e INF- γ es importante para la protección inmunitaria (Barigye y col. 2003, aprobado).

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE *Anaplasma marginale*.

En cuanto a las características moleculares de la rickettsia, se ha estimado un tamaño total del genoma de 1200-1260 kpb con un contenido del 56% de G/C (Barbet 1995), pero la secuencia completa del genoma y el número de genes presentes apenas están por concluirse sin embargo; se puede hacer un estimado por comparación con una rickettsia muy similar a *Anaplasma* tal como *Rickettsia prowazekii* la cual presenta un tamaño total del genoma muy similar de 1,111,523

pb con un promedio de G+C del 29.1% y del cual se han encontrado 834 genes que codifican para proteínas los cuales representan el 75.4% del genoma y que participan en diferentes funciones bioquímicas en el metabolismo de la rickettsia (Anderson, 1998).

Por otra parte se han identificado 6 proteínas principales de superficie en algunas cepas de *Anaplasma marginale* las cuales ha sido denominadas MSP1 constituida a su vez por dos subunidades (MSP1a y MSPb), MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5 (Palmer y col. , 1986). Tales proteínas de superficie han sido expresadas a altos niveles y de ellas se ha reportado que la MSP 1(a y b), 2 y 3 cuyos pesos moleculares son de 105, 102, 36 y 86 kDa respectivamente, se encuentran muy asociadas a una protección parcial por lo que se les atribuye un gran potencial para el desarrollo de vacunas. A su vez la MSP4, con peso molecular 31 kDa, parece estar conservada en diferentes aislados ya que no varía en apariencia a la electroforesis (Palmer et al. 1988) y es también considerada de suma importancia para la inducción de inmunidad protectora (Tobele et al. 1991). Una de las proteínas más conservadas en los diferentes aislados de *A. marginale* hasta ahora estudiados es la MSP 5 cuyo peso molecular es de 19 kDa, la cual es considerada muy inmunogénica pero no se encuentra muy asociada a protección por lo que se le atribuye una participación para el desarrollo de métodos diagnósticos (Reyna-Bella y col, 1998). Asimismo se ha reportado en la literatura que mediante el análisis del antígeno de diferentes aislados mexicanos de *Anaplasma marginale* (MEX-15, MEX-17, MEX-30 y MEX-31) se han observado ciertas proteínas las cuales están presentes en todos esos aislados y por lo tanto se consideran comunes entre ellos, sin embargo también hay la presencia de otras proteínas que son específicas para cada uno de esos aislados (Estrada y col., 1999). Por lo anterior podemos asumir que además de las seis proteínas ya caracterizadas, existen muchas otras aún no han sido caracterizadas observadas en el perfil antigénico que posiblemente puedan estar jugando un papel importante en la protección contra la anaplasmosis bovina. Por lo cual sería de gran importancia identificarlas y caracterizarlas a partir de una biblioteca de

Anaplasma marginale para determinar el papel que tales proteínas juegan en la protección contra la anaplasmosis bovina.

BIBLIOTECAS GENÓMICA Y DE EXPRESIÓN GENÉTICA.

Una biblioteca genómica también llamada genoteca es una colección de clonas recombinantes que llevan DNA foráneo y que representan todas las secuencias que comprenden un genoma particular. Este tipo de genotecas nos permite identificar las secuencias que integran cada uno de los genes y su organización dentro del genoma (Lewin, 1997).

Por otra parte, una biblioteca genómica de expresión nos permite determinar la expresión de ciertos epítopes antigénicos de alguna proteína de interés y a su vez caracterizarlos para determinar su participación dentro de la protección contra la anaplasmosis mediante el contacto con anticuerpos específicos del tipo IgG2. Se ha observado que este tipo de inmunoglobulinas son las más asociadas a protección, con el propósito de que dichas proteínas recombinantes puedan ser purificadas y usadas para uso diagnóstico o vacunal.

La construcción de cualquier tipo de biblioteca está basada en el procedimiento básico de clonación molecular del DNA, el cual en general incluye cinco pasos principales:

- 1.- Purificación del DNA de *A. marginale*.
- 2.- La generación de fragmentos del tamaño apropiado mediante digestión del DNA con enzimas de restricción.
- 3.- El ligado de dichos fragmentos a vectores de clonación.
- 4.- La introducción del vector recombinante en una célula para su replicación y,
- 5.- La selección de las clonas recombinantes de interés (Old R, 1985).

Uno de los elementos importantes a considerar en la construcción de una biblioteca es el uso de vectores adecuados para la clonación del DNA del organismo. Actualmente se han desarrollado varios tipos de ellos, entre los cuales

se encuentran los plásmidos, fagos, bacteriófagos, fagémidos y cósmidos entre otros.

Tres de ellos son de gran interés en este trabajo debido a sus características distintivas; plásmidos y fagémidos para la construcción de la biblioteca de expresión genética y fagos para la biblioteca genómica

Los plásmidos son moléculas de DNA circular de cadena doble, covalentemente cerrados, extracromosómicos, con capacidad de replicación autónoma. Algunos de ellos poseen la capacidad de integrarse reversiblemente en el cromosoma bacteriano (episomas) y los hay de tamaño variable desde 2Kb hasta 500-1600 Kb (Old R., (Old R., 1985)

Los plásmidos pueden dividirse en dos grandes grupos de acuerdo a si son o no transmisibles de una bacteria a otra:

- 1.- conjugativos: se transfieren entre cepas por conjugación y,
- 2.- no conjugativos: carecen de esta propiedad.

Además, los plásmidos poseen la característica de incompatibilidad referida a que dos plásmidos no pueden coexistir establemente en una misma célula en la ausencia de presión selectiva.

Los fenotipos y funciones que los plásmidos confieren a sus células hospederas son entre otras:

- 1.- resistencia a antibióticos
- 2.- resistencia a metales pesados
- 3.- producción de enterotoxinas
- 4.- producción de bacteriocinas
- 5.- inducción de tumores en plantas
- 6.- plásmidos de virulencia

Cada plásmido tiene un número característico de copias por célula. Generalmente los grandes plásmidos tienen una o dos copias por célula (llamados plásmidos con control estricto), mientras que los pequeños suelen estar representados como varias copias (>10, llamados plásmidos de control relajado).

El plásmido utilizado para la construcción de la biblioteca de expresión genética en este trabajo es el plásmido comercial pQE30 (QIAGEN, Cat. No. 33303; figura 4).

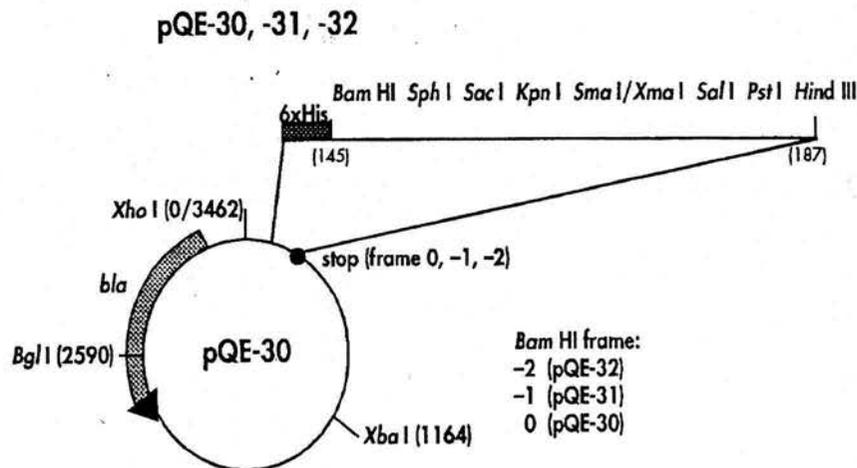


Figura 4. Mapa del plásmido pQE30 utilizado como vector de clonación de fragmentos de 700-1000 pb de DNA para la construcción de la biblioteca de expresión genética de Anaplasma marginale.

Los plásmidos pQE corresponden a la familia de plásmidos pDS781 derivados de plásmidos pDS56/RBSII y pDS781/RBSII-DHFRS. Este plásmido de expresión tiene un peso molecular de 3462pb y presenta las siguientes características:

- 1.- bajo número de copias.
- 2.- una etiqueta 6xHis.
- 3.- un promotor T5 y dos secuencias operadoras lac.
- 4.- dos fuertes terminadores transcripcionales t_0 del fago lambda y T1 del operón de *E. coli*.
- 5.- Sitios múltiples de clonación, Un sitio RBS II y codones de paro de traducción en todos los marcos de lectura.
- 6.- Un gen *b*-lactamasa (Bla) que confiere resistencia a ampicilina (Manual QIAGEN, 1997)

Otra serie de vehículos de clonación son los llamados fagémidos que son una mezcla entre plásmidos y fagos filamentosos, generalmente son más pequeños que los vectores M13 y han sido producidos por combinación de secuencias del plásmido pBR322 pero con origen de replicación de M13. Estos vectores pueden ser propagados normalmente como plásmidos de doble cadena dentro de las células pero cuando éstos son infectados con un fago ayudador "helper phage" el DNA del fagémido es replicado, empaquetado y movilizado a partículas infecciosas en una forma similar a la de fagos M13.

Generalmente son de tamaño pequeño (cerca de 3000pb) permitiendo la inserción y propagación estable de fragmentos de DNA más grandes que los que pueden aceptar los M13 (Watson J, 1998).

Para la construcción de la biblioteca de expresión de *A. marginale* se empleó el fagémido comercial "pHage 3.2" (Maxim Biotech, Inc. Cat. No. 94080, figura 5), un vector derivado de M13 con origen de replicación pUC y que está diseñado para la construcción de bibliotecas desplegadas en fagos. Este vector presenta las siguientes características:

1.- Un gene de resistencia a ampicilina el cual permite el crecimiento y la selección de clonas transformantes.

2.- La transcripción está bajo el control del promotor *lac* el cual permite que la transcripción del gene de fusión se dé a bajos niveles en ausencia de IPTG y la secreción de la proteínas de fusión del gene III está dirigida por la secuencia señal del gene III.

3.- La proteína de cubierta del fago gene III ayuda a exhibir las proteínas de fusión en la extremidad del mismo.

4.- Un codón de paro ámbar en el marco de lectura inmediatamente seguido de una etiqueta que permite la expresión de la proteína foránea como una fusión con el gene III en células supresoras TG1 o como fusión con sólo el Myc-tag en células no supresoras HB2151 (Manual Maxim Biotech, Inc., 1999).

El sistema del pHage 3.2 requiere del fago ayudador (M13K07) el cual convenientemente infecta células TGI que han sido transformadas con el fagémido, ese fago expresa una amplia variedad de proteínas del gene III y las

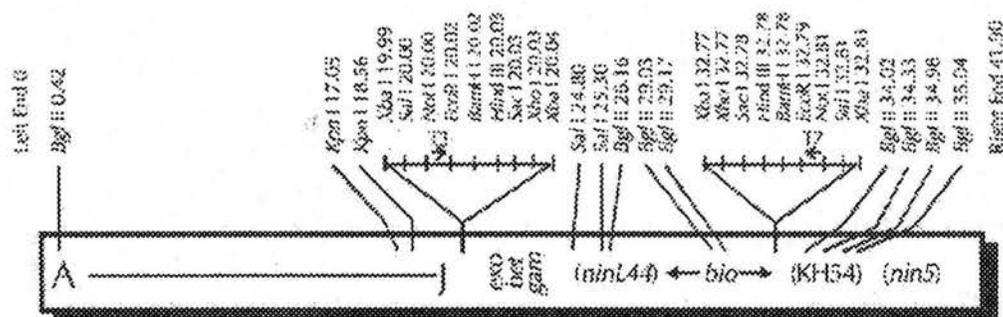
El vector empleado para la construcción de la biblioteca genómica en este trabajo es el fago comercial Lambda DASH®II/BamHI (Stratagene Cat. No. 247211, figura 6), éste fago es un vector usado para la clonación de grandes fragmentos de DNA genómico (9–23Kb). El sistema Lambda DASH tiene la ventaja de selección de spi (sensible a la inhibición de P2).

Cuando los fagos lambda contienen genes red y gama activos estos son incapaces de crecer en las células hospederas lisogénicas para P2 como XL1B-MRA(P2), un lisógeno P2 de XL1B-MRA.

Esos genes en el DNA de Lambda DASH II están localizados en el fragmento "stuffer" por lo que el fago no puede crecer en células XL1B-MRA(P2). Sin embargo, cuando ese fragmento es remplazado por un inserto los fagos recombinantes son capaces de crecer en XL1B-MRA(P2) y por ende sólo los fagos recombinantes pueden crecer en esas células. El DNA clonado dentro del sitio BamHI del vector Lambda DASH II puede ser removido por digestión con la enzima *NotI*. Los promotores T3 y T7 flanqueando los sitios de inserción pueden ser usados para generar sondas de RNA extremos específicos para uso en "caminar por el cromosoma" y mapas de restricción.

El vector Lambda DASH II se provee comercialmente pretratado con fosfatasa alcalina de intestino de vaca (CIAP) por lo que elimina la necesidad de desfosforilar el DNA de la rickettsia y si los insertos están libres de contaminantes y contienen un alto porcentaje de extremos ligables proporciona un título de 1×10^6 placas recombinantes al empacamiento del DNA (Manual Stratagene).

LAMBDA DASH® II VECTOR MAP



Lambda DASH II Multiple Cloning Site Regions

[sequences shown: 19.99-20.04kb (top sequence) and 32.77-32.81kb (bottom sequence)]

Xba I Sal I Not I T3 Promoter EcoR I BamH I Hind III Sac I Xba I Xba I
 TCTAGAGAGCTGTGAGGCGGCCCGGAATTAACCCCTCACTAAAGGGAAAGGAATTCGGATCCAAAGCTTGAGCTCCTCGAGAAATTCTGTAGA

Xba I Xba I Sac I Hind III BamH I EcoR I T7 Promoter Not I Sal I Xba I
 TCTAGAGAAATTTGTCGAGGAGCTCAAGCTTCGGATCCAAATTTCTTCCCTATAGTGAGTGGTATTACGCCCGCCGGTCCGAGAGCTCTGTAGA

Figura 6. Mapa linear y secuencias del sitio múltiple de clonación del vector Lambda DASH®II empleado en la clonación de fragmentos de 19Kb para la construcción de la biblioteca genómica de *Anaplasma marginale*.

La construcción de bibliotecas genómicas y de expresión de *Anaplasma marginale* se ha realizado con gran éxito con diferentes aislados extranjeros entre los cuales destaca el aislado Florida el cual ha sido objeto de estudio para la construcción de bibliotecas para la clonación de fragmentos de diversos tamaños en distintos sitios de clonación y en una variedad de vectores tales como fagos (Lambda ZAP, Alleman y col., 1997; Visser y col., 1992), cósmidos (supercoils 1, Meeus P. Y col., 2003) y plásmidos como pGEM4Z entre otros (Oberle y col., 1993). Tales bibliotecas han sido empleadas para la identificación, secuenciación y caracterización de diferentes proteínas de interés de *Anaplasma marginale*. Sin embargo; a pesar de las grandes pérdidas económicas que la anaplasmosis

ocasiona en nuestro país se conoce muy poco acerca de la biología molecular de esta rickettsia. Actualmente en México no existe ningún tipo de biblioteca de *Anaplasma marginale* por lo que sería de gran interés la construcción de bibliotecas genómica y de expresión genética del organismo, ya que el manejo y conocimiento de la información genética de la rickettsia mediante las bibliotecas nos permitirá por una parte identificar antígenos específicos para uso diagnóstico y por otra, antígenos asociados a protección. Estas bibliotecas son herramientas importantes para la elaboración de métodos diagnósticos o vacunas para la prevención y control de la anaplasmosis y evitar o disminuir así las grandes pérdidas que ésta ocasiona en nuestro país.

HIPÓTESIS.

La disponibilidad de bibliotecas genómica y de expresión genética de *A. marginale* serán herramientas importantes en el estudio de la biología del parásito y en la identificación de antígenos importantes.

OBJETIVO GENERAL.

Establecer una biblioteca genómica y de expresión genética de *Anaplasma marginale* para generar recursos biológicos experimentales para la identificación de antígenos relevantes en el diagnósticos y la inmunización.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Preparar una biblioteca genómica de *A. marginale* empleando como vector el bacteriófago Lambda DASH ®II/BamHI.
- 2.- Preparar una biblioteca de expresión genética de *A. marginale* con el plásmido pQE30.
- 3.- Preparar una biblioteca de expresión genética de *A. marginale* con el fagémido 3.2 para la expresión en la superficie de fagos filamentosos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS GENÓMICA Y DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE *A. marginale*

1.1.- PREPARACIÓN DE CUERPOS INICIALES (c.i.) DE *Anaplasma marginale*.

La extracción y purificación de cuerpos iniciales de *A. marginale* de la cepa MEX-15 se realizó mediante la técnica descrita por Palmer y McGuire, 1984 como sigue: 35 ml de glóbulos rojos infectados (g.r.i.) que contenían el equivalente a 2.16×10^{11} g.r.i. y 94 % de parasitemia, fueron descongelados en forma rápida en baño maría a 37°C. Inicialmente se centrifugaron a 1000 x g para eliminar los glóbulos blancos y sus núcleos y se lavaron cuatro veces resuspendiendo en 40 ml de solución salina de Puck 1x (KCl 0.40g, KH₂PO₄ 0.15g, NaCl 8.0g, Na₂HPO₄-7H₂O 0.29g, pH 7.2) adicionada con gentamicina (5µg/ml), centrifugando a 10,000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sedimento se resuspendió en 10 ml de la misma solución de lavado y se sometió a ruptura por ondas de ultrasonido con un Sonic Dismembrator (Fisher®) por 5' a 50% de potencia con una micropunta de 3mm de diámetro con intervalos de descanso de 30 segundos por cada minuto. Finalmente los c.i. se lavaron con solución salina de Puck 1x centrifugando 15' a 10,000 x g y resuspendiendo en un volumen final de 5 ml.

1.2.- PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE CUERPOS INICIALES DE *A. marginale*

Una vez obtenidos los cuerpos iniciales se realizó la purificación del DNA de la rickettsia de la siguiente manera:

500 µl de cuerpos iniciales fueron centrifugados a 5,000 xg/15' a 4°C, una vez obtenida la pastilla conteniendo los c.i. se resuspendieron en 1 ml de amortiguador de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 400mM NaCl, 20 mM EDTA pH8, 0.5% SDS), agregando RNAasa (50 µg/ml final) e incubaron 1 hora a 37 °C y, proteinasa K (100 µg/ml final) 2 horas a 50°C y 1 hora a 65 °C. Posteriormente se agregó NaCl

6M (2M final). Después de una lenta agitación se realizó una centrifugación a $3,500 \times g/5'/4^{\circ}\text{C}$ recuperando el sobrenadante, agregando un volumen de isopropanol e incubando $30'/-70^{\circ}\text{C}$. El DNA fue recuperado por centrifugación a $10,000 \times g/10'$, lavado 2 veces con etanol frío al 70% y resuspendido en un volumen final de $2000 \mu\text{l}$ de agua destilada.

Una vez obtenido el DNA se le hicieron las pruebas correspondientes para verificar la calidad y cantidad del material obtenido mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% y cuantificación por fluorometría. Para determinar si el material obtenido era realmente DNA genómico de la rickettsia y no DNA genómico de bovino se sometió a digestión con la enzima *PstI*.

1.3 ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LAS BIBLIOTECAS

El tamaño de las bibliotecas se estimó mediante la aplicación de la siguiente fórmula (Maniatis, T. 1989), a través de la cual se determinó el número de clonas que deberían representar en un 0.99% cada una de las bibliotecas:

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-(A/B))}$$

Donde:

P= grado de probabilidad (%)

A= tamaño de los fragmentos en pares de bases (pb).

B= tamaño total del genoma en pb.

En el caso de las bibliotecas de expresión, una vez obtenido el número de clonas necesarias, el valor resultante se multiplicó por 2 considerando las dos posibles orientaciones del inserto dentro del vector y por 3 considerando los tres marcos de lectura posibles.

2.- CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA GÉNOMICA DE *A. marginale*

2.1 ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LA BIBLIOTECA

Para estimar el tamaño de la biblioteca se empleó una fórmula en donde se considera el tamaño del genoma de la rickettsia (B), el tamaño de los insertos clonados (A) y la probabilidad de encontrar cualquier segmento genético (P). Obteniendo lo siguiente:

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-(A/B))}$$

$$\ln(1-(A/B))$$

$$N = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln(1-(19/1260))}$$

$$N = \frac{\ln(0.01)}{\ln(1-0.0150)}$$

$$N = 307 \times 2 \times 3 = \mathbf{1842 \text{ clonas}}$$

2.2 PREPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE 19 kpb DE DNA DE *A. marginale*.

La construcción de la biblioteca genómica de *Anaplasma marginale* se realizó en el fago Lambda DASH® II/BamHI mediante clonación de fragmentos de DNA genómico de 19Kb los cuales fueron obtenidos por digestión parcial con la enzima *Sau3A1* la cual, inicialmente fue titulada para determinar la cantidad de unidades(U) requeridas para generar fragmentos del tamaño deseado, para ello; se digirió inicialmente 1µg de DNA de *A. marginale* en 20µl con diferentes concentraciones de *Sau3A1* iniciando con 2U y siguiendo con diluciones seriadas hasta obtener 0.0078125U incubando por 1 hora, agregando 50mM de EDTA y siguiendo con una segunda incubación a 65°C/30' para desactivar la enzima, la digestión se valoró mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

Una vez determinada la cantidad de enzima requerida se procedió a digerir 25µg del DNA bajo las mismas condiciones y se corrió una muestra en gel de agarosa al 0.8% para verificar la eficiencia de la digestión.

Los fragmentos de 19 Kpb así generados se precipitaron agregando glicógeno 1µl (10µg/µl), acetato de sodio pH 5.3 a una concentración final de 0.3M y dos volúmenes de etanol absoluto y se suspendió en un volumen de 100µl. Ese DNA se pasó por una columna de Sephadex con el propósito de eliminar las sales presentes que pudieran inhibir el proceso de ligado de los fragmentos al vector. Finalmente el DNA correspondiente a los fragmentos de 19Kb se cuantificó y se corrió una muestra en un gel de agarosa al 0.8%.

2.3 VECTOR Lambda DASH® II/BamHI

Para la clonación de los fragmentos de 19 Kpb de *A. marginale* se empleó el fago Lambda DASH® II/BamHI/CIAP de Stratagene a una concentración de 1µg/µl, el cual se adquirió digerido con la enzima BamHI y, a su vez desfosforilado para continuar con el procedimiento de ligado y con ello la construcción de la biblioteca genómica de *A. marginale*.

2.4 REACCIÓN DE LIGADO

El ligado de los fragmentos de 19 Kpb al fago Lambda DASH® II/BamHI/CIAP se realizó como en el manual del mismo se recomienda. Se ligaron 400ng de los fragmentos por cada microgramo de vector en un volumen final de 5µl, sin la adición de polietilenglicol (PEG) ya que éste inhibe el proceso de empacamiento y con ello el crecimiento de los fagos recombinantes. Adicionalmente se realizaron dos ligados, una con 300ng de un inserto control del mismo tamaño que los fragmentos proporcionado en el Kit para evaluar la eficiencia del vector y otra ligando el vector así mismo para recuperar el fago silvestre.

Los ligados fueron incubadas durante 16 horas a 4 °C para el posterior empacamiento del DNA de Lambda.

2.5 SISTEMAS DE EMPACAMIENTO.

Los sistemas de empacamiento usados para empacar el DNA de lambda de cada experimento de ligado antes mencionados se prepararon de la siguiente manera:

0.5 ml de un cultivo de toda la noche de células SMR10 se inocularon en dos matraces con 230 ml de medio LKB (10g N-Z Amino, 10g NaCl, 5g extracto de lavadura, 4 ml NaOH 1N/ 1 litro de H₂O) incubando a 34⁰C en agitación constante hasta que los cultivos alcanzaron una DO₅₅₀ de 0.8. Posteriormente se mantuvieron a 45⁰C con agitación vigorosa durante 20' seguido de una segunda incubación a 38⁰C/90'. Los matraces se enfriaron en hielo girándolos por 5' para permitir que todo el cultivo estuviera en contacto con la baja temperatura y las células fueron recuperadas por centrifugación a 4,000 x g/10'/4⁰C.

El sobrenadante fue removido y a cada pastilla se adicionaron 4.5 ml de TSP frío (13.2 ml H₂O estéril, 0.6 ml Tris-HCl 1M pH 7.9, 0.6ml espirmidina 0.25M pH7, 0.6 ml putresina 0.25M pH7). La pastillas fueron resuspendidas y ambas suspensiones se transfirieron a un tubo de 12 ml. Se realizó una segunda centrifugación a 6,000 x g/6'/4⁰C resuspendiendo la pastilla con 0.35 ml de TSP frío. Se alicuotaron 40µl de esa suspensión a cada tubo eppendorf con 5µl de la siguiente solución (225µl de H₂O estéril y fría, 300µl de DMSO y 45 µl de ATP 0.1M pH7) y finalmente, mezclando perfectamente los sistemas de empacamiento fueron almacenados en nitrógeno líquido para su posterior evaluación con un DNA control y células hospederas XL1B.

2.6 PREPARACIÓN DE CÉLULAS HOSPEDERAS XL1B.

Con el propósito evaluar mediante titulación la eficiencia de los sistemas de empacamiento previamente preparados, se utilizaron células XL1B las cuales se crecieron en cajas de LB agar (10g bacto-triptona, 5g extracto de levadura, 5g NaCl, 15g agra bacteriológico/ l litro) con tetraciclina a una concentración final de 12.5 µg/ml incubando toda la noche a 37⁰C. Posteriormente, se inocularon 8 ml de LB (LB sin la adición de agar bacteriológico) tetraciclina con una colonia de las células, adicionando maltosa 0.2% y MgSO₄ 10 mM e incubando toda la noche a

37°C en agitación constante. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 3,000 x g/10' decantando el sobrenadante, resuspendiendo en 4 ml de MgSO₄ 10mM y refrigerándolas hasta el momento de su uso.

2.7 EMPACAMIENTO DEL DNA DE λGEM

El DNA de λGEM (Promega) se empleó como un DNA control para evaluar la eficiencia de empacamiento de los sistemas preparados los cuales se esperaba mostrarán un título de 10⁷ o 10⁸ ufp/μg DNA. Para ello se empacó 1μg de DNA de λGEM como sigue: 5.6μl de DNA de λGEM conteniendo 1μg se mezclaron con el sistema de empacamiento, inmediatamente el tubo fue derretido, mezclado perfectamente e incubado durante 1:45 horas a temperatura ambiente. Seguido se adicionaron 500 μl de buffer SM (NaCl 5.8g, MgSO₄-7H₂O 2g, Tris HCl pH7.5 1M 50ml, Gelatina 2% 0.5ml/ 1 litro) conteniendo 50μg/ml de DNasa e incubando 15'/37°C, se adicionaron 15μl de cloroformo mezclando hasta que el lisado fuera homogéneo y se realizó una centrifugación 10,000 x g/2'/4°C. El sobrenadante fue recuperado y titulado utilizando células apropiadas XL1B como enseguida se describe.

2.8 TITULACIÓN DEL SISTEMA DE EMPACAMIENTO CON CÉLULAS XL1B

Con el objetivo de titular los sistemas de empacamiento, se realizaron diluciones 10⁻⁴ y 10⁻² de la mezcla de empacamiento de λGEM en buffer SM, 100μl de cada dilución fueron adicionados a 100μl de células hospederas XL1B e incubadas por 15' a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 4ml de TB suave (Tryptona 10g, NaCl 5g, ajustar a pH 7.5 con NaOH, 7g de agar/ 1 litro) y, homogenizando perfectamente se esparcieron sobre una placa de LB y se incubaron toda la noche a 37°C. El título fue determinado a partir del número de unidades formadoras de placa obtenidas en cada una de las diluciones y se expresó como ufp/μg (ufp) DNA.

2.9 EMPACAMIENTO *in vitro* DEL DNA DE Lambda DE CADA UNO DE LOS LIGADOS

Una vez evaluados los sistemas de empacamiento se procedió a empacar de la misma manera que para λ GEM, 4 μ l conteniendo 800ng de DNA de cada una de las ligaciones del Lambda DASH® II/BamHI/CIAP, obteniendo una mezcla de empacamiento de 500 μ l en cada uno de los casos.

2.91 TITULACIÓN DEL EMPACAMIENTO DE LAS BIBLIOTECAS EN CÉLULAS XL1B-MRA y XL1B-MRAP2.

Con el objetivo de determinar el número de ufp recombinantes y no recombinantes obtenido después del empacamiento *in vitro*, se titularon en las células XL1B-MRA y XL1B-MRAP2. Se plaquearon sobre ellas la mezcla de empacamiento directa para el vector sin inserto y diluciones 10^{-2} para el vector con insertos. El título obtenido en cada caso se expresó como ufp/ml.

2.92 AMPLIFICACIÓN DE LA BIBLIOTECA

Una vez obtenido el número de placas recombinantes en el empacamiento del DNA de cada una de las ligaciones, se procedió a la propagación de los fagos recombinantes y del fago silvestre. La propagación de la biblioteca se realizó en placa de acuerdo al manual del Lambda DASH II como sigue: 600 μ l de células hospederas XL1B-MRAP2 se mezclaron con 250 μ l de la biblioteca en suspensión en cada una de dos cajas de 15cm de diámetro, incubando 15' a 37⁰C. Posteriormente se agregaron 6.5 ml de TB suave y mezclando perfectamente se esparcieron sobre medio LB agar en cajas de vidrio de 150mm. Finalmente se incubaron a 37⁰C para permitir el crecimiento de las placas cuidando de no dejarlas crecer más allá de 1-2 mm de diámetro, una vez crecidas las placas se cubrieron con 15ml de buffer SM y se almacenaron a 4⁰C toda la noche para permitir que los fagos se difundieran en el buffer.

Se recuperó la suspensión con los fagos recombinantes agregando adicionalmente 2 ml de SM y cloroformo 5% final mezclando e incubando por 15' a temperatura ambiente y removiendo los restos celulares a 500 xg/10'. Se

recuperaron los fagos recombinantes (sobrenadante), se agregó cloroformo 0.3% final y se mantuvieron a 4⁰C. Cabe mencionar que la propagación del Lambda sin inserto con células XL1B-MRA y con el inserto control con XL1B-MRAP2 se realizó en líquido removiendo de igual manera los restos celulares empleando cloroformo y por centrifugación a la misma velocidad. La titulación de todos los fagos propagados (de la biblioteca, del Lambda DASH II con el inserto control y Lambda DASH II sólo) se realizó como previamente se describió empleando 100µl de cada una de las diluciones en buffer SM de 10⁻² , 10⁻⁴ , 10⁻⁶ y 10⁻⁸ para los primeros y 100µl directos para éste último.

Finalmente, con el propósito de evaluar de manera rápida y sencilla si la biblioteca genómica de *Anaplasma marginale* construida en el fago Lambda DASH® II/BamHI/CIAP presentaba alguna de las secuencias codificantes para una de las proteínas de superficie de la rickettsia, se realizó un PCR con iniciadores específicos para determinar la amplificación de un fragmento de 582pb correspondiente a la proteína MSP5 la cual se encuentra altamente conservada en los diferentes aislados de *Anaplasma* hasta ahora estudiados en México. Los iniciadores utilizados fueron los siguientes:

F 5' CGC GGA TCC GTG TTC CTG GGG TAC TCC TA 3'

R 5' CGC GGA TCC AGA ATT AAG CAT GTG ACC GC 3'

Con esos iniciadores se realizaron 4 reacciones de PCR como sigue: 1.- Biblioteca genómica de *A. marginale*, 2.- DNA genómico de la rickettsia, 3.- Control negativo sin DNA y 4.- DNA de λ/GEM utilizando un programa ya estandarizado para esos iniciadores con una temperatura de alineamiento de 62⁰C y 5' de extensión. Posteriormente se corrió una muestra en un gel de agarosa al 2% de cada una de las reacciones para observar la amplificación del fragmento correspondiente a la proteína MSP5.

3.- CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN DE *A. marginale*.

3.1 ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE LA BIBLIOTECA

El tamaño de ésta biblioteca se estimó de la misma forma que para la biblioteca genómica considerando igualmente el tamaño del genoma de la rickettsia (B), de los insertos clonados (A) y la probabilidad de encontrar cualquier segmento genético (P) como sigue:

$$N = \frac{\ln(1-0.99)}{\ln(1-(700/1260))}$$

$$N = \frac{\ln(0.01)}{\ln(1-0.55)}$$

$$N = 10,000 \times 2 \times 3 = \mathbf{60,000 \text{ clonas}}$$

3.2 PREPARACIÓN DE FRAGMENTOS DE 700 a 1000 pb DE DNA GENÓMICO DE *Anaplasma marginale* PARA LA CLONACIÓN EN EL PLÁSMIDO pQE30 Y EL FAGÉMIDO PHAGE 3.2.

La biblioteca de expresión genética de *A. marginale* fue construida en dos vectores de diferente naturaleza: el plásmido pQE30 y el fagémido pHage 3.2 y los fragmentos genómicos a clonar con un tamaño de 700-1000 pb fueron preparados por digestión parcial con enzimas de restricción. Inicialmente 1 µg de DNA genómico de *A. marginale* se digirió por separado durante 1 hora a 37°C con 1µl (10U) de las enzimas de restricción: *Alu I*, *Rsa I*, *HaeIII*, *Hinf I* y *Sau 3AI* (4U). Después de la incubación se corrió una muestra en gel de agarosa al 2% para verificar la calidad de la digestión; una vez determinada la eficiencia de cada enzima para generar fragmentos de 700-1000pb, cada una de las tres primeras enzimas se tituló por separado, incubando durante 1 hora a 37°C las reacciones, lo anterior con el propósito de determinar la cantidad requerida para la obtención de

una mayor cantidad de fragmentos del tamaño deseado valorando los productos en geles de agarosa al 2%.

Una vez determinada la cantidad de unidades requeridas de cada una de las enzimas para generar los fragmentos 700-1000 pb de DNA *Anaplasma marginale*, se procedió a digerir 25µg de DNA con cada una de ellas. Posterior a la digestión el DNA digerido con las tres enzimas se reunió en una sola muestra, se agregó buffer de muestra 2x final y se corrió en un gel preparativo de agarosa al 2% de bajo punto de fusión con peine ciego y se procedió a la purificación de dichos fragmentos de la siguiente manera:

Una vez terminada la corrida de gel se detectó la banda de interés y se recortó con una navaja de bisturí, el fragmento de agarosa se colocó en un tubo de 15 ml, se agregó un volumen de agua y se calentó a 65°C hasta lograr la disolución completa de la agarosa, posteriormente se mezcló con un volumen de fenol saturado incubando 10' a -70°C. Se realizó una centrifugación a 4,500 xg/10' recuperando el sobrenadante haciendo otra extracción con fenol cloroformo alcohol isoamílico (24:25:1). El DNA se precipitó con etanol absoluto incubando 30' a -70°C y centrifugando a 14,000 xg/10'. Se realizaron 2 lavados adicionales con etanol al 70% centrifugando a 12,000 rpm/5'. Finalmente se decantó el sobrenadante y la pastilla se secó a 55°C durante 5' resuspendiendo en un volumen final de 200µl. El DNA se valoró igualmente por fluorometría y electroforesis y se almacenó a -20°C.

3.3 PURIFICACIÓN DE DNA DEL PLÁSMIDO pQE30 Y DEL PHAGE 3.2

El DNA de ambos vectores empleados para la clonación de los fragmentos de 700-1000pb para la construcción de la biblioteca de expresión de *A. marginale* se purificó mediante un Kit comercial (QIAGEN, mega kit) a través de una columna de intercambio iónico de acuerdo al protocolo descrito en el manual del mismo. Una vez obtenido el material, se sometió a corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1% para verificar la calidad y se cuantificó por fluorometría para determinar la cantidad del material obtenido y se almacenó a -20°C.

3.4 PREPARACIÓN DEL PLÁSMIDO pQE30 Y EL PHAGE 3.2 COMO VECTORES DE CLONACIÓN.

100 µg de DNA del plásmido pQE30 y del fagémido PHAGE 3.2 se digirieron por separado con las enzimas de restricción *SmaI* y *EcoRV* respectivamente de acuerdo a las recomendaciones del proveedor valorando la digestión mediante geles de agarosa al 1% y transformación por choque térmico a 42°C de células competentes DH10b previamente preparadas.

Una vez digeridos los vectores, se precipitó el DNA de cada uno de ellos resuspendiendo en 500µl quedando a una concentración de 200ng/µl. Finalmente se desfosforilaron mediante la acción de una enzima fosfatasa alcalina (Roche) por una hora a 37 °C, desactivándola a 65°C/15'. Los vectores desfosforilados se ligaron asimismos, usando una T4 DNA ligasa, a su vez se realizó una reacción de ligado pero sin la adición de ligasa como un control de digestión de cada uno de ellos, incubando las ligaciones 16 hrs a 4 °C y verificando la eficiencia de la desfosforilación mediante transformación de células competentes DH10b, con 30ng en cada ligación.

3.5 REACCIÓN DE LIGADO

Una vez preparados los vectores de clonación y los insertos (fragmentos de 700-1000 pb de *A. marginale*) se procedió al ligado de dichos fragmentos a cada uno ellos variando la relación vector- inserto.

pQE30/*SmaI*/FAC + fragmentos de 700-1000pb (nanogramos vector- inserto)

1.- 100:50

2.- 100:100

3.- 100:200

4.- 100:300

pQE30/*SmaI*/FAC sin insertos

5.- Con ligasa

6.- Sin ligasa

7.- con un inserto control (λ/Alu, 30ng)

PHAGE 3.2/*EcoRV*/FAC + fragmentos de 700-1000pb (nanogramos vector-inserto)

A= 100:50

B= 100:100

C= 100:200

D= 100:300

PHAGE 3.2/*EcoRV*/FAC sin insertos

E= Con ligasa

F= Sin ligasa

G= λ /Alu (30ng)

Todas las ligaciones se realizaron en un volumen final de de 20 μ l con ayuda de una T4 DNA ligasa a una concentración de 1U/ μ g para lograr la máxima representación del genoma.

3.6 TRANSFORMACIÓN DE LAS BIBLIOTECAS DE EXPRESIÓN

100 μ l de células competentes de *E. coli* DH10b fueron transformadas con 50 ng de cada una de las 14 transformaciones mediante choque térmico a 42 $^{\circ}$ C para la replicación del vector, sembrando 100 μ l de células transformadas en placas de LB conteniendo ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml.y dejándolas crecer toda la noche a 37 $^{\circ}$ C

Una vez determinada la cantidad de inserto y ligaciones requeridas, para el óptimo de clonas recombinantes se procedió a la transformación de células DH10b con la cantidad de DNA necesario de cada uno de los vectores para recuperar las 60,000 clonas requeridas para cada biblioteca, se hicieron transformaciones de 50ng cada una y se plaquearon en cajas de vidrio de 150mm (10,000 colonias/caja) con LB ampicilina incubándolas toda la noche a 37 $^{\circ}$ C. Después de obtener las 60,000 colonias, éstas se recuperaron con buffer TE (Tris 1M pH8, EDTA 0.5M pH / 1litro)

para la obtención de DNA de la biblioteca por medio del kit comercial GeneElute™ Endotoxin-free Plasmad Midiprep Ki.

Una vez obtenido el DNA de la biblioteca en cada uno de los vectores se sometió a cuantificación por fluorometría y a una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar la cantidad y calidad de DNA obtenido.

Para obtener la biblioteca del **pHage 3.2** como fagos recombinantes, se transformaron por choque térmico células TG1 con 50 ng de DNA de la biblioteca y se agregó 1ml de medio 2xYT (Tryptona 16g, extracto de levadura 10g, NaCl 5g, pH 7/1 litro) conteniendo glucosa al 2%, pasada la incubación de 1 hora a 37°C con agitación; se tomaron 10µl de células transformadas para la determinación del número transformantes de clonas (número de colonias resistentes a ampicilina recuperadas después de la transformación), usualmente en éste paso se espera un promedio de 10⁶ clonas independientes, título que se determina con la siguiente fórmula:

$$\# \text{ clonas transformantes} = \# \text{ de colonias} \times \text{factor de dilución (0)} \times 100$$

El resto de las células (990 µl) se dejaron crecer por 6 horas adicionales con 100µg/ml de ampicilina para permitir el crecimiento de los fagémidos recombinantes. **NOTA:** Esta se considera como una biblioteca primaria de *Anaplasma marginale*.

Para rescatar los fagos recombinantes, se agregaron a 500 µl de los 990 µl de la biblioteca, 9.4ml de medio 2xYT conteniendo glucosa y ampicilina y 100 µl del fago ayudador M13K07 con un título 10¹⁰ (Ver punto 3.8) el cual fue previamente preparado, continuando con el crecimiento durante 2 horas adicionales. Se realizó una centrifugación a 2,000 x g/10' descartando el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 10 ml de 2xYT con ampicilina y kanamicina (100 µg/ml) incubando de 12-20 horas a 37°C con agitación a 300 rpm. Finalmente los fagos

recombinantes se recuperaron por centrifugación a 10,000 x g/20' descartando la pastilla y fueron almacenados a 4°C para su posterior titulación.

Esta biblioteca se tituló mediante la infección de células TG1 y HB2151 de crecimiento logarítmico, haciendo diluciones seriadas desde 10² hasta 10⁹ en medio 2X YT; 100µl de las diluciones 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ y 10⁻⁹ se mezclaron por separado con 100µl de cada una de las células correspondientes incubando durante 30' a temperatura ambiente. Finalmente fueron esparcidas en placas de 2X YT ampicilina e incubadas toda la noche a 37°C para su crecimiento. El título de células infectadas se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades formadoras de colonias/ml} = \frac{\text{\# colonias en la placa} \times \text{factor de dilución}}{0.5 \times 0.1 \text{ ml}}$$

$$\text{El título de células infectadas (cfu/ml)} = \text{título de la biblioteca (pfu/ml)}$$

3.7 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CLONAS POSITIVAS PRESENTES EN LA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN CON CADA UNO DE LOS VECTORES DE CLONACIÓN.

Para corroborar el porcentaje de clonas que incorporaron el inserto de 700-1000 pb de DNA de *Anaplasma marginale* en la biblioteca de expresión de la rickettsia tanto en el plásmido pQE30 como en el pHage 3.2, se realizaron PCR con primers específicos para cada uno de los vectores construidos a los extremos del sitio de clonación para con ello observar la amplificación de un fragmento de 394 y 404pb correspondientes a los vectores pQE30 y pHage 3.2 que no incorporaron el inserto o fragmentos de entre 1094-1394 y 1104-1404 para los mismos vectores pero que si incorporaron los insertos.

Los iniciadores de PCR utilizados fueron los siguientes:

PQE30 F: 5' TAG ATT CAA TTG TGA GCG 3'

PQE30 R: 5' TTA TAG GTA CAT TGA GCA AC 3'

PHage 3.2 F: 5' CAG CTA TGA CCA TGA TTA CG 3'

PHage 3.2 R: 5' CCT CAT AGT TAG CGT AAC GA 3'

Asimismo, las condiciones de PCR para esos iniciadores se estandarizaron inicialmente usando dos diferentes buffers de PCR: Crx (10mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 10 μ g/ml gelatina, 150 μ g/ml BSA, 0.1% TritónX100, 1.5mM MgCl₂) y D (10mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 10 μ g/ml gelatina, 150 μ g/ml BSA, 0.1% TritónX100, 2.0mM MgCl₂) y diferentes temperaturas de alineamiento de 58^oC a 68^oC. Una vez estandarizadas las condiciones de PCR, se procedió a transformar células DH10b en el caso del pQE30 con 50 ng de DNA de la biblioteca, creciéndolas en placas de LB ampicilina durante toda la noche a 37^oC. En el caso del pHage 3.2 se emplearon las colonias recuperadas de la infección de células TG1 y HB2151. De las colonias obtenidas con cada una de las tres diferentes células se recolectaron con una punta de pipeta 50 de cada una desnaturalizándolas a 95^oC/10'. De esas clonas desnaturalizadas sólo 5 μ l se mezclaron con la reacción de PCR correspondientes y las condiciones óptimas para la amplificación.

Posterior a la PCR se corrió una muestra (10 μ l) en geles de agarosa al 1% de cada una de las reacciones para determinar el porcentaje de clonas positivas en base al peso molecular de los fragmentos amplificados y al número de clonas negativas (las que amplificaron sólo el fragmento correspondiente al vector sin insertos). Con lo anterior se pudo determinar el porcentaje de clonas que presentan insertos correspondientes a los fragmentos de 700-1000 pb de DNA de *A. marginale*, haciendo un estimado del tamaño de la biblioteca en cada uno de los casos.

3.8 PROPAGACIÓN DEL FAGO AYUDADOR M13K07 DEL FAGEMIDO 3.2

Para la construcción de la biblioteca de expresión se requirieron 3ml de un stock del fago "helper" con un título de 10^9 ufp/ml, el cual fue obtenido por propagación de acuerdo al manual del mismo como sigue:

Como primer paso se inoculó 3ml de medio 2X YT conteniendo kanamicina una de las placas correspondientes al fago helper M13K07 crecidas en placas de LB agar y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación a 250 rpm.

El fago propagado fue recuperado por centrifugación a $12,000 \times g$ durante 2' a 4°C y almacenado a 4°C hasta el momento de su uso.

La titulación de fago propagado se realizó haciendo diluciones seriadas desde 10^2 hasta 10^9 en medio 2X YT. $100\mu\text{l}$ de cada dilución 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} se mezclaron con $100\mu\text{l}$ de células TG1 y se incubaron a temperatura ambiente durante 30', ya que el fago M13 absorbe rápidamente las células TG1, pasado ese tiempo, se agregaron a cada tubo 3ml de agarosa 0.7% en medio 2X YT y después de una lenta homogenización se esparcieron sobre cajas de agar 2X YT incubando toda la noche a 37°C para permitir el crecimiento de las placas. El título fue determinado a partir del número de placas crecidas empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades formadoras de placas/ml} = \frac{\# \text{ placas en la placa)} \times \text{factor de dilución}}{0.5 \times 0.1\text{ml}}$$

RESULTADOS

La purificación del DNA de *A. marginale* a partir de los cuerpos iniciales de la rickettsia empleando la técnica antes mencionada dió un rendimiento de 510 µg totales de DNA contenidos en un volumen final de 2000 µl quedando a una concentración de 255 ng/µl determinada por fluorometría, esa cantidad fue obtenida a partir de 35 ml de glóbulos rojos infectados (gri.) conteniendo el equivalente a 2.16×10^{11} gri. y una parasitemia del 94%.

Ese mismo DNA sometido a digestión con la enzima *Pst1*, no generó ningún patrón de restricción similar al observado en la digestión del DNA genómico de bovino lo que indicó que el DNA obtenido en la purificación era realmente DNA genómico de *Anaplasma marginale* (Figura 7).

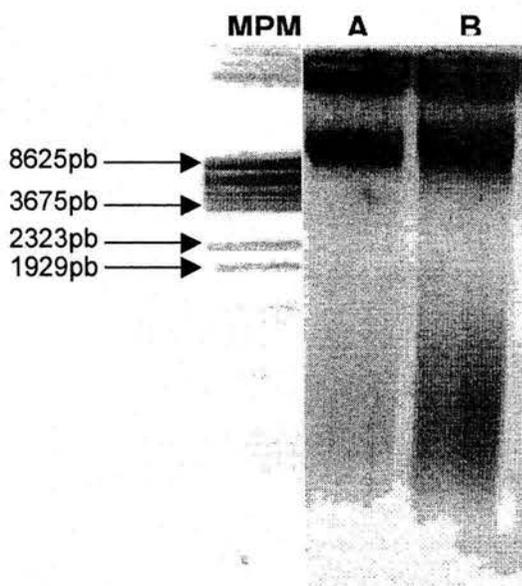


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando MPM=marcador de peso molecular (λ BstIII), A: DNA de *Anaplasma marginale* intacto purificado a partir de cuerpos iniciales de la rickettsia (250 ng) , B: DNA de *A. marginale* digerido con la enzima *Pst1* 250ng).

BIBLIOTECA GENÓMICA DE *Anaplasma marginale*

El tamaño de la biblioteca genómica de la rickettsia estimado como el número de clonas necesarias para representarla en un 99% considerando el tamaño del genoma de *Anaplasma* de 1260 Kpb y de los fragmentos a clonar de 19 Kb, fue de **1842** clonas.

Para la construcción de ésta biblioteca los fragmentos a clonar en el vector Lambda DASH® II/*Bam*HI/CIAP fueron obtenidos por digestión parcial con la enzima *Sau*3AI, la cual se tituló haciendo diluciones seriadas; determinándose así que la cantidad de enzima requerida para generar fragmentos del tamaño deseado fue de 0.00390625 U/ μ g DNA. Posteriormente, para obtener una mayor cantidad de los fragmentos se procedió a digerir 25 μ g de DNA con la misma enzima bajo las mismas condiciones. Los fragmentos digeridos se concentraron precipitándolos con etanol y se pasaron por una columna de Sephadex, recuperándose sólo 13 μ g de los 25 μ g empleados al inicio del proceso (Figura 8).

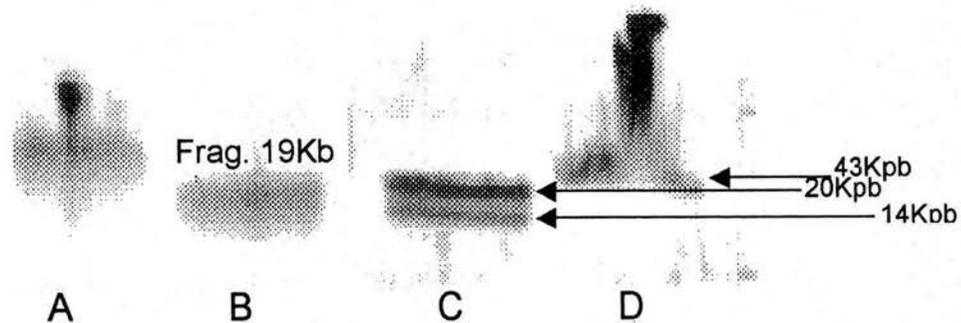


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% mostrando los fragmentos de 19 Kb de *Anaplasma marginale* obtenidos por digestión parcial con la enzima *Sau*A1. Carril A: DNA Intacto de *A. marginale*, B: fragmentos de 19 Kb, C: DNA de λ GEM12/*Bam*HI y D: DNA de λ GEM12 intacto.

Una vez preparados los fragmentos de 19 Kpb de DNA de *A. marginale* y debido a que el vector empleado en la construcción de ésta biblioteca, el Lambda DASH® II/*Bam*HI/CIAP ya se encontraba en las condiciones óptimas para el procedimiento

de ligación, se procedió al ligado por una parte de 400 ng de los fragmentos, por otra de 300 ng de un inserto control (19 Kpb) y por último del vector asimismo empleando 1 μ g de vector en cada caso. El empacamiento del DNA del vector de cada una de las ligaciones requirió la preparación de los sistemas de empacamiento a ser utilizados, los cuales presentaron un título de 1.3×10^7 ufp/ μ g DNA obtenido por titulación con células hospederas XL1B y un DNA control de λ GEM. Los resultados del empacamiento *in vitro* del ligado del DNA del vector Lambda DASH/BamHI/CIAP (800 ng) con los fragmentos de DNA de 19 Kb de *A. marginale*(400 ng) con un fragmento control (300 ng) y ligado así mismo, se resumen en el cuadro 1. Para esto se sembraron en placa 100 μ l de una dilución 10^{-2} de los fagos recombinantes y 100 μ l directos de los fagos sin insertos de los 0.5 ml recuperados después del empacamiento.

Posterior a la amplificación en placa de 1.5×10^4 fagos recombinantes (7.5×10^3 fagos/placa) de la biblioteca y en líquido de los fagos con el inserto control y el fago sin inserto, tanto los valores iniciales como el volumen de fagos recuperados se vieron incrementados notablemente obteniéndose un total de 30 ml de la biblioteca genómica de Anaplasma y 45 ml de fagos con el inserto control y sin insertos con títulos de 4×10^{11} ufp/ml, 3×10^4 ufp/ml y 6.6×10^3 ufp/ml mediante titulación con células XL1B-MRA y muy similares como debía esperarse de 3.9×10^{11} , 3×10^4 y 0 ufp/ml con células XL1B-MRAP2, respectivamente. Esos valores se obtuvieron a partir de 100 μ l de una dilución 10^{-8} para la biblioteca, 10^{-2} del inserto control y 100 μ l directos de los fagos sin insertos (Cuadro 2).

Cuadro 1. Títulos obtenidos del empacamiento de ligaciones de Lambda DASH II/*Bam*HI/CIAP en las células XL1B-MRA y XL1B-MRAP2.

LIGACIÓN DE 800 ng DE DNA DE Lambda DASH II/ <i>Bam</i> HI/CIAP +	CELULAS XL1B-MRA	CELULAS XL1B-MRAP2
400 ng de fragmentos de 19 Kpb de DNA de <i>A. marginale</i> .	33 ufp= 3.0×10^4 ufp/ml	31 ufp= 3×10^4 ufp/ml
300 ng de un inserto control de 19 Kpb	120 ufp= 1.2×10^5 ufp/ml	102 ufp= 1×10^5 ufp/ml
Ligado así mismo	4 ufp= 2×10^1 ufp/ml	0 ufp= 0 ufp/ml

Cuadro 2. Títulos obtenidos de la biblioteca amplificada y de los fagos control en células hospederas XL1B-MRA y XL1B-MRAP2 para cada caso.

	CELULAS XL1B-MRA	CELULAS XL1B-MRAP2
Biblioteca genómica de <i>A. marginale</i>	408 ufp= 4×10^{11} ufp/ml	395 ufp= 3.9×10^{11} ufp/ml
Lambda DASH II/ <i>Bam</i> HI + Inserto control	30 ufp= 3×10^4 ufp/ml	3 ufp= 3×10^4 ufp/ml
Lambda DASH II/ <i>Bam</i> HI Ligado así mismo	661 ufp= 6.6×10^3 ufp/ml	0 ufp= 0 ufp/ml

Con el fin de mostrar que la biblioteca genómica clonada en Lambda DASH II contiene secuencias del genoma de *A. marginale*, se efectuó una amplificación por PCR del gen que codifica para la proteína MSP5 de la rickettsia, empleando iniciadores específicos. 5µl de la biblioteca en suspensión y desnaturalizando a 95°C dio como resultado la amplificación por PCR de un fragmento de 582 pb en el DNA intacto de la rickettsia de la misma manera que se observó en la biblioteca genómica, mientras que hubo ausencia de amplificación tanto en el control negativo como en el DNA de λ/GEM (Figura 9).

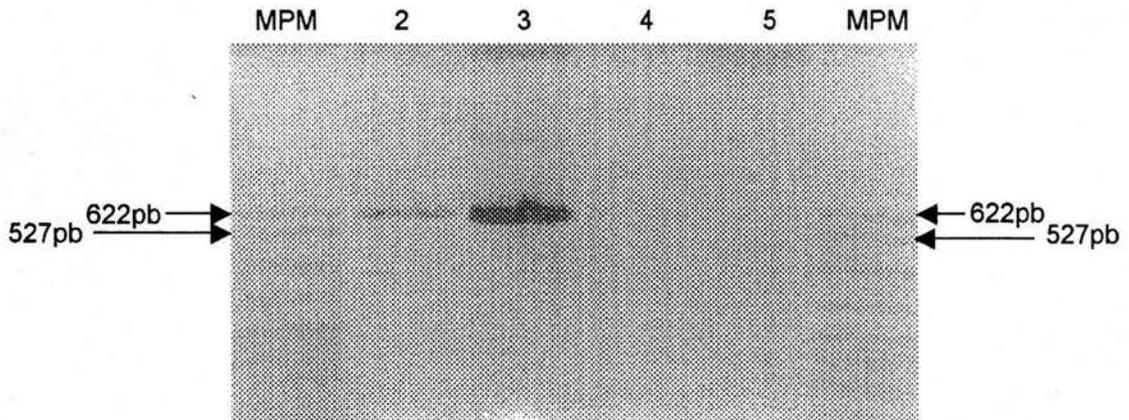


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando la amplificación de un fragmento de 582 pb correspondientes a la proteína MSP5 de *A. marginale*. Carril 1: MPM= marcador de peso molecular PBR322, Carril 2: Biblioteca genómica de *A. marginale*, Carril 3: DNA intacto de *A. marginale*, Carril 4: control negativo, Carril 5: DNA λ/GEM y Carril 6: MPM PBR322.

BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Anaplasma marginale*

El tamaño requerido de la biblioteca de expresión de *Anaplasma marginale* fue de 60,000 clonas, mayor al de la biblioteca genómica como era de esperarse considerando que los fragmentos a clonar en éste caso de 700-1000 pb fueron de mucho menor tamaño.

La digestión de 1 μg de DNA genómico de *Anaplasma* con las enzimas *AluI*, *RsaI* y *HaeIII* generó una mayor cantidad de fragmentos del tamaño deseado, no así el resto de enzimas evaluadas (*Hinf I* y *Sau3AI*), a su vez; de la titulación de cada una de ellas por separado y con diferentes concentraciones de las mismas se pudo determinar que la cantidad de unidades requeridas para generar los fragmentos del tamaño deseado fue de 1.25 U/ μg DNA para *AluI* y *RsaI* y de 0.625 U/ μg DNA para *HaeIII*.

De los fragmentos obtenidos por digestión parcial de 25 μg de DNA con cada una de las enzimas y purificados a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión y extracciones con fenol cloroformo, se recuperaron al final de todo el proceso 32 μg de DNA correspondiente a los fragmentos (Figura 10) de los 75 μg manejados inicialmente.

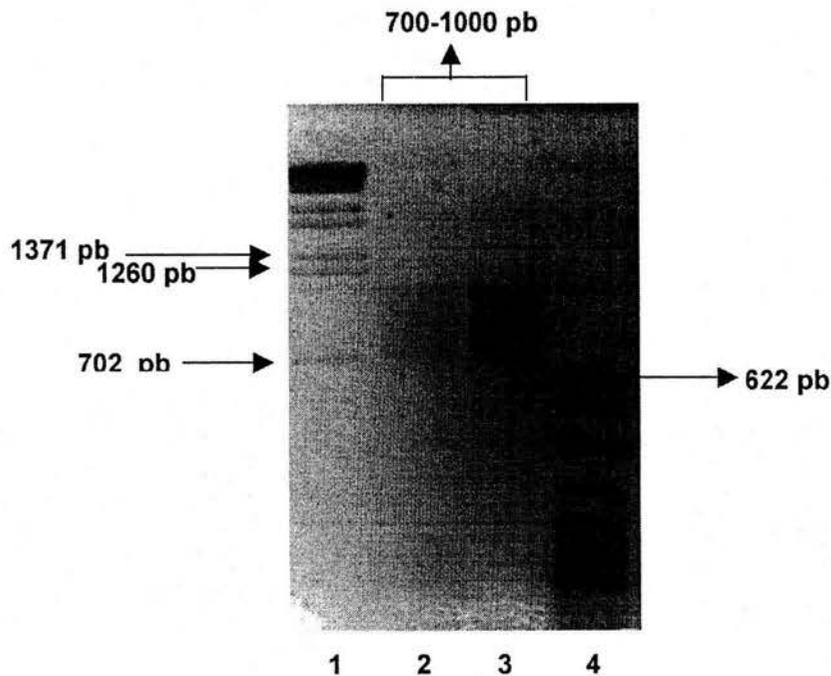


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% mostrando los fragmentos de 700-1000 pb de *A. marginale* obtenidos por digestión parcial con las enzimas *AluI*, *RsaI* y *HaeIII* y purificados mediante geles de agarosa de bajo punto de fusión y extracciones con fenol y fenol cloroformo. Carril 1: MPM= Marcador de peso molecular λ /BstIII en pb, Carril 2: fragmentos de 700-1000 pb (100 ng), Carril 3: fragmentos de 700-1000 pb (200 ng) y Carril 4: MPM pBR322 bajo rango en pb.

Por otra parte, la purificación del DNA del plásmido pQE30 y del fagémido pHage 3.2, empleados como vectores de clonación por medio del kit comercial QIAGEN, megakit (cat. No. 32149) a través de una columna de intercambio iónico dió un rendimiento de 1.43 y 1.5 mg totales de DNA obtenidos a partir de 2.5 litros de cultivo de cada uno.

La preparación de los vehículos de clonación para la construcción de la biblioteca de expresión requirió la previa digestión de ambos vectores (100 μ g c/uno) con las enzimas *SmaI* y *EcoRV* para el pQE30 y el pHage 3.2, respectivamente. La digestión total fue valorada por electroforesis y transformación de células competentes DH10b, obteniéndose al final de la digestión un título de transformación de 5.8×10^3 ufc/ μ g DNA y 4.5×10^3 ufc/ μ g DNA respectivamente; a su vez los vectores desfosforilados mediante una fosfatasa alcalina y ligados así mismos presentaron títulos de 8.4×10^3 ufc/ μ g DNA y 5.2×10^3 ufc/ μ g DNA,

obteniendo al final de todo el proceso 60 μg del plásmido pQE30/*Sma*I/FAC (Figura 11) y 80 μg del pHage 3.2/*EcoRV*/FAC (Figura 12).

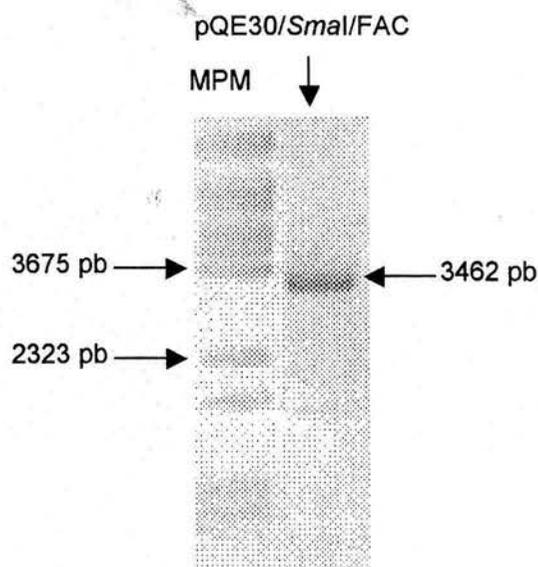


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el MPM= marcador de peso molecular λ BstII y el DNA del plásmido pQE30 digerido con la enzima *Sma*I y desfosforilado mediante una fosfatasa alcalina óptimo para la clonación de fragmentos de 700-1000 pb de *A. marginale*.

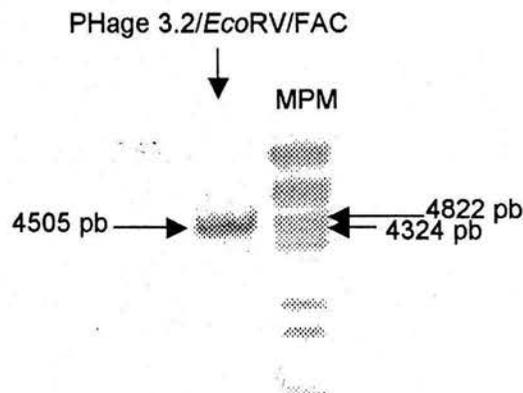


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el MPM= marcador de peso molecular λ BstII y el DNA del fagémido pHage 3.2 digerido con la enzima *EcoRV* y desfosforilado por medio de una fosfatasa alcalina óptimo para la clonación de los fragmentos de 700-1000 pb de *A. marginale*.

Una vez preparados los fragmentos de DNA de *A. marginale* y los vectores de clonación se procedió al ligado de los mismos a las diferentes concentraciones mencionadas en material y métodos. A la transformación de células competentes DH10b con 50 ng de cada una se obtuvieron títulos de: 3.0×10^4 , 3.8×10^4 , 7.6×10^4 , 1.1×10^5 ufc/ μ g DNA a las siguientes concentraciones: 100:50, 100:100, 100:200 y 100:300 nanogramos de vector- inserto para el plásmido pQE30 y de: 5.1×10^4 , 8.3×10^4 , 9.1×10^4 , 1.9×10^5 ufc/ μ g DNA para el pHage 3.2, mostrando una relación directamente proporcional a la cantidad de inserto incorporado. Cabe mencionar que en éste experimento la transformación de los vectores ligados así mismo dieron títulos de 1.0×10^4 y 7.0×10^3 ufc/ μ g DNA y con un inserto control λ /A/ μ l títulos de 1.6×10^5 y 3.6×10^5 ufc/ μ g DNA respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Títulos a la transformación de 50 ng de DNA a las diferentes concentraciones de inserto (fragmentos de 700-1000 pb) ligadas a los vectores de clonación pQE30/*Sma*I/FAC y pHage 3.2/*Eco*RV/FAC así como de ellos ligados así mismos y con un inserto control λ Alu1.

RELACION VECTOR-INSERTO (ng)	TÍTULO A LA TRANSFORMACIÓN (pQE30)	TÍTULO A LA TRANSFORMACIÓN (pHage 3.2)
100:50	3.0×10^4 ufc/ μ g DNA	5.1×10^4 ufc/ μ g DNA
100:100	3.8×10^4 ufc/ μ g DNA	8.3×10^4 ufc/ μ g DNA
100:200	7.6×10^4 ufc/ μ g DNA	9.1×10^4 ufc/ μ g DNA
100:300	1.1×10^5 ufc/μg DNA	$1. \times 10^5$ ufc/μg DNA
Vector así mismo	1.0×10^4 ufc/ μ g DNA	7.3×10^3 ufc/ μ g DNA
Vector con inserto control λ Alu1(30 ng)	1.6×10^5 ufc/ μ g DNA	3.6×10^5 ufc/ μ g DNA

En base a los resultados obtenidos previamente se determinó que para experimentos posteriores se realizarían ligados con una relación 1:3 ng vector-inserto para obtener un mayor número de recombinantes por ml de células transformadas así como la cantidad de ligaciones y transformaciones requeridas para reunir las 60,000 colonias que representarían la biblioteca de expresión de Anaplasma. Para la biblioteca en el plásmido pQE30 se recuperaron 5,714 colonias/ml células transformadas requiriendo un total de 14 transformaciones de 50ng c/una a partir de 7 ligaciones; mientras que para la biblioteca en el pHage 3.2 se recuperaron 9,520 colonias/ml requiriendo un total de 8 transformaciones y por tanto 4 ligaciones todo lo anterior para lograr reunir el número de clonas necesarias. Las clonas se plaquearon en 6 cajas de vidrio con LB ampicilina (10,000 clonas/placa).

Una vez recuperadas las 60,000 clonas se purificó a partir de ellas el DNA de cada una de las bibliotecas de expresión tanto en el plásmido como en el fagémido empleando el kit comercial GeneElute™ Endotoxin-free Plasmid Midiprep (sigma) lo cual dio como resultado un total de 46 y 259.5 µg de DNA de la biblioteca en cada uno de los vectores.

Posteriormente, a la transformación de células competentes TG1 con 50ng de DNA de la biblioteca en pHage 3.2 se obtuvo un total de 1.2×10^6 ufc/µg DNA. Las células transformadas se superinfectaron con el fago ayudador, obteniendo la biblioteca como bacteriófagos recombinantes alcanzando títulos de 1.5×10^9 ufc/ml en células TG1 y 2.4×10^9 ufc/ml en HB2151.

Con el propósito de determinar mediante PCR con primers específicos para cada uno de los vectores, el porcentaje de clonas positivas que incorporaron insertos de 700-1000 pb de DNA de *A. marginale*, de las colonias recuperadas de la infección de células TG1 y HB2151 para el pHage 3.2 y de las recuperadas en la transformación de células competentes DH10b con 50 ng de DNA de la biblioteca en el pQE30, se tomaron 50 clonas de cada biblioteca obteniéndose los siguientes resultados: 72.9% y 62.5% de clonas positivas en las células TG1 (Figura 13) y

HB2151 (Figura 14) con el pHage 3.2 y un 79.1% con el pQE30, un porcentaje por arriba del esperado en ambas bibliotecas (Figura 15).

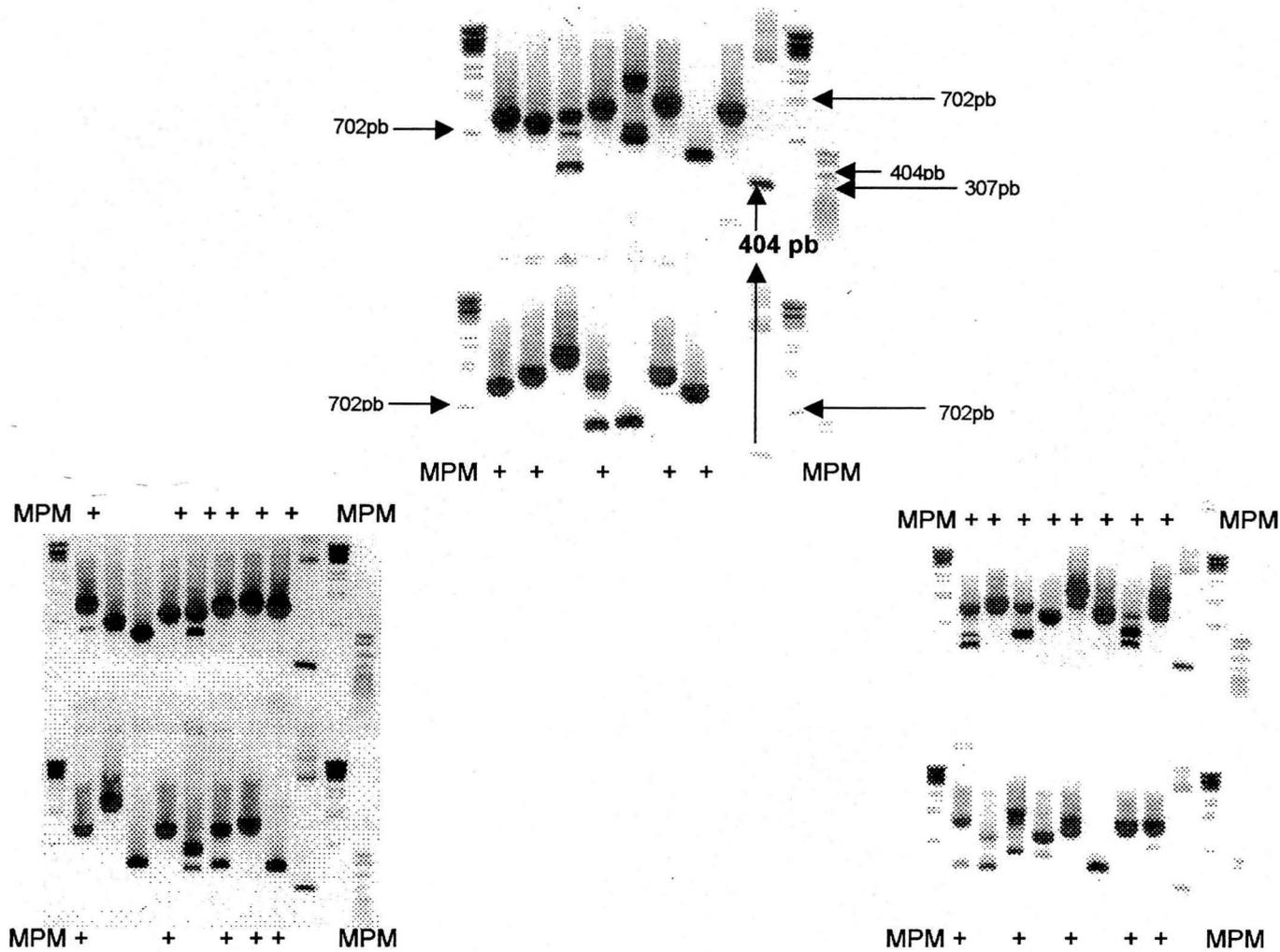


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de fragmentos de entre 1104 y 1404 pb correspondientes al pHage 3.2 más los fragmentos de 700-1000 pb de DNA de *Anaplasma marginale* consideradas clonas positivas y de 404 pb correspondiente al vector sin insertos consideradas clonas negativas obtenidos mediante PCR con primers específicos del vector de clonas de la biblioteca desnaturalizadas a 95°C en células TG1. MPM= marcador de peso molecular λ Bst III.

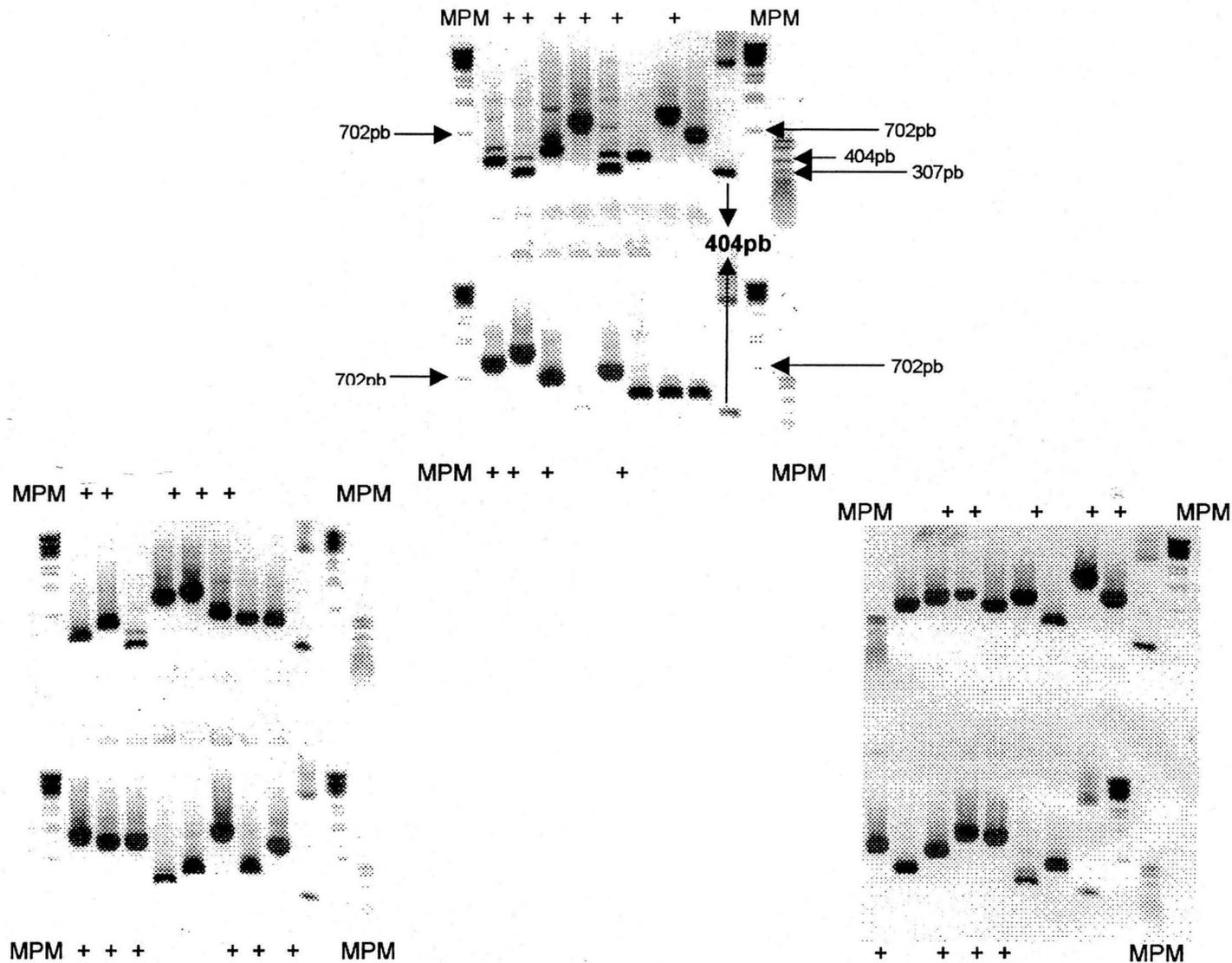


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de fragmentos de entre 1104 y 1404 pb correspondientes al pHage 3.2 más los fragmentos de 700-1000 pb de DNA de *Anaplasma marginale* consideradas clonas positivas y de 404 pb correspondiente al vector sin insertos consideradas clonas negativas obtenidos mediante PCR con primers específicos del vector de clonas de la biblioteca desnaturalizadas a 95°C en células HB2151. MPM= marcador de peso molecular λ *Bst* III.

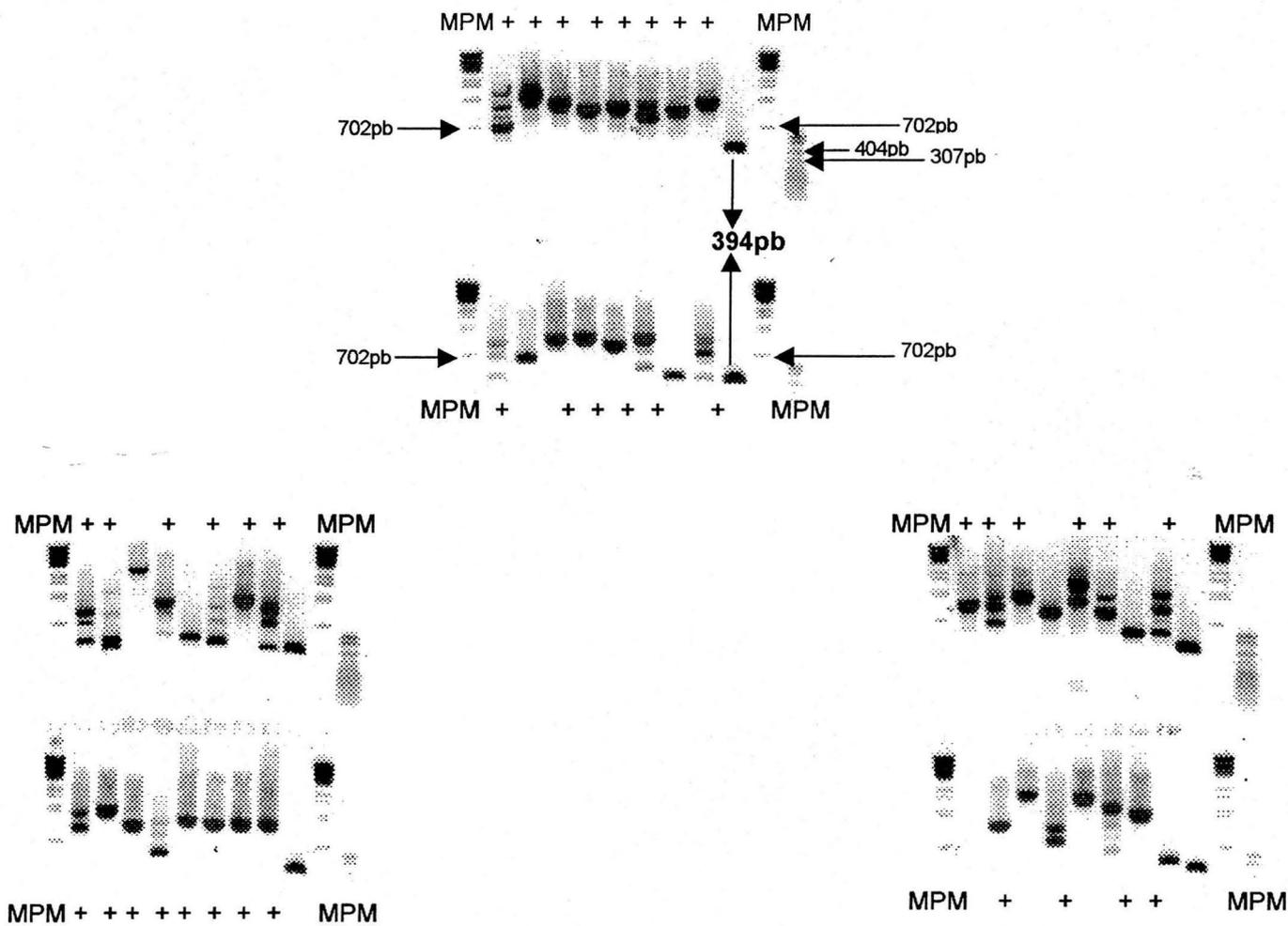


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación de fragmentos de DNA de entre 1094 y 1394 pb correspondientes al plásmido pQE30 más los fragmentos de 700-1000 pb de DNA de *Anaplasma marginale* consideradas clonas positivas y de 394 pb correspondiente al vector sin insertos consideradas clonas negativas obtenidos mediante PCR con primers específicos del vector de clonas de la biblioteca desnaturalizadas a 95°C en células DH10b. MPM= marcador de peso molecular λ Bst III.

DISCUSIÓN

El DNA genómico de la rickettsia se utilizó para generar fragmentos de 19Kb y de 700-1000 pb para la clonación en el fago Lambda DASH II el plásmido pQE30 y fagémido 3.2 para la construcción de las bibliotecas genómica y de expresión genética respectivamente. El DNA fue obtenido a partir de eritrocitos infectados de bovino. El rendimiento de la purificación de ese DNA en éste estudio fue aceptable ya que no se requirió un gran volumen de eritrocitos infectados (35ml). La cantidad recuperada de DNA (510 µg) fue 5 veces mayor a lo requerido para generar fragmentos del tamaño deseado para la construcción de ambas bibliotecas.

BIBLIOTECA GENÓMICA DE *Anaplasma marginale*.

El número estimado de clonas necesarias para representar en un 99% el genoma de *Anaplasma* en la biblioteca genómica es de 1,842, es un número pequeño de clonas pero acorde al tamaño del genoma de la rickettsia que es de 1200-1260 Kpb el cual es a su vez relativamente pequeño.

Los fragmentos de 19 Kpb fueron obtenidos por digestión parcial con la enzima de restricción *Sau3AI* y clonados en el sitio *BamHI* del fago Lambda DASHII a diferencia de una biblioteca genómica de *A. marginale* de un aislado de Florida construída por clonación en el sitio *EcoRI* de un fago lambda ZAP de fragmentos obtenidos por ruptura del DNA ultrasonicamente y que ha sido empleada para la clonación y caracterización de una proteína de 19 kDa denominada MSP5 la cual se encuentra altamente conservada entre los diferentes aislados de *Anaplasma* hasta ahora estudiados (Visser y col, 1992). La cantidad de DNA correspondiente a fragmentos de 19 Kpb recuperada al final de todo el proceso de preparación fue de 13 µg de los 25 µg manejados inicialmente, observando una pérdida del 48%. A pesar de ello, para nuestros propósitos esa cantidad fue 33 veces mayor a lo necesitado ya que sólo se requirieron 400 ng para la construcción de la biblioteca genómica. Esta biblioteca fue construída en el fago comercial Lambda DASH II el cual se adquirió en las condiciones óptimas de digestión y desfosforilación por lo

que no requirió ningún proceso de preparación previo al ligado de fragmentos para el empacamiento del DNA.

Después del ligado bajo las condiciones establecidas y con los sistemas de empacamiento preparados en el laboratorio los cuales rendían con DNA intacto un título de 1.3×10^7 ufp/ μ g DNA, los títulos de la biblioteca genómica de *Anaplasma marginale* como con el inserto control obtenidos antes de la amplificación de fagos fueron de 3×10^4 ufp/ml y 1.2×10^5 ufp/ml,. Tales títulos fueron inferiores a los reportados ya que generalmente se recuperan entre 1×10^6 y 1.5×10^7 placas recombinantes (Manual stratagene, 2003) pero usando extractos de empacamiento de alta eficiencia tales como Gigapack® III Plus, los cuales si hubieran sido empleados en nuestro caso probablemente nos proporcionarían títulos mayores a los obtenidos, muy similares a los esperados. Pero, considerando que el número de clonas requeridas es relativamente pequeño (1842) para representar la biblioteca genómica, el título obtenido es muy aceptable para nuestros propósitos ya que fue 81 veces mayor a lo requerido proporcionando una mayor confiabilidad de nuestros resultados.

La eficiencia de la producción de la biblioteca puede estimarse en nuestras condiciones si consideramos que el máximo número obtenido de clonas está representado por el dado con el inserto control.

El número de clonas obtenidas en la biblioteca de *Anaplasma* (3×10^4) estuvo muy por arriba del esperado (1842) casi 15 veces más por lo que se procedió a la ronda de propagación en placa de la biblioteca de acuerdo al manual de Lambda DASH II y en líquido la del inserto control. Posterior a la amplificación los títulos finales se vieron incrementados notablemente ascendiendo a 3.9×10^{11} ufp/ml y 3×10^4 ufp/ml muy similar a lo esperado en el caso de la biblioteca de la rickettsia ya que una biblioteca propagada por ese medio generalmente suele presentar títulos de entre 10^9 y 10^{11} ufp/ml, títulos similares a los reportados (Manual Stratagene, 2003). Cabe mencionar que el título obtenido en la propagación en el caso de inserto control estuvo muy por debajo del esperado, sin embargo

podríamos asumir esa diferencia a la forma de propagación empleada en cada uno de los casos, obteniendo finalmente una biblioteca genómica de *Anaplasma marginale* de 1.1×10^{13} clonas en un volumen final de 30ml de fagos amplificados. Cabe mencionar que ni tampoco el vector ligado así mismo dio un título similar al recomendado ya que se obtuvieron antes de la propagación sólo 2×10^1 ufp/ml , sin embargo a la propagación el título ascendió a 6.6×10^3 ufp/ml obteniendo un total de 297, 000 placas.

Para corroborar si la biblioteca genómica de la rickettsia construida en el fago Lambda DASH II presentaba secuencias codificantes a una proteína de superficie de Anaplasma de 19 kDa denominada MSP5, se realizaron PCRs con iniciadores específicos para el gene de tal proteína observando mediante electroforesis la amplificación de un fragmento de 582 pb correspondiente a la MSP5 tanto en la biblioteca genómica como en el DNA intacto de la rickettsia de igual manera que se ha reportado en la literatura (Visser y col, 1992) y no así en el control negativo y en el DNA de un λ GEM 12 como era de esperarse, lo que nos da la pauta para asumir que la biblioteca al igual que presenta secuencias correspondientes a la proteína MSP5 puede también contener secuencias correspondientes a muchas otras proteínas de la rickettsia.

La biblioteca genómica de *Anaplasma marginale* construida por clonación de fragmentos de 19 Kpb de DNA genómico de la rickettsia en el sitio *Bam*HI del fago Lambda DASH® II/*Bam*HI/CIAP con un título de 1.1×10^{13} clonas, es una herramienta de suma importancia que nos permitirá captar genes completos que codifiquen para proteínas de interés y que puedan ser purificadas para su eventual uso diagnóstico y/o vacunal.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN GENÉTICA DE *Anaplasma marginale*.

El tamaño estimado para éstas bibliotecas de expresión de *Anaplasma marginale* fue de 60, 000 clonas, mayor al de la biblioteca genómica debido a que los fragmentos clonados en ésta caso de 700-1000 pb fueron 27 veces menores a los de 19 Kpb.

Los fragmentos de 700 – 1000 pb de DNA de *Anaplasma* empleados para la construcción de las bibliotecas de expresión mediante clonación de los mismos en la plásmido pQE30 y el fagémido pHague 3.2, se obtuvieron por digestión parcial del DNA genómico de la rickettsia con tres diferentes enzimas de restricción: *AluI*, *RsaI* y *HaeIII* similar a lo realizado en otros estudios (Oberle y col., 1993 y Meeus y col., 2003) en donde también generaron fragmentos de DNA de la misma manera para la construcción de bibliotecas del aislado Florida; sin embargo contrario a lo realizado por Visser y col. en 1992 y Alleman y col. en 1997 quienes generaron fragmentos de DNA en forma mecánica y no mediante restricción con endonucleasas. Dichos fragmentos se purificaron haciendo extracciones con fenol cloroformo y precipitando con etanol absolutos como en muchos otros casos (Alleman y co., 1997; Meeus y col., 2003) en los que fueron utilizados para la construcción de una biblioteca en el Lambda Zap para la caracterización de una proteína MSP3 de *A. marginale* de tres aislados diferentes de *A. marginale*: Virginia, Florida y South Idaho, (Alleman y col, 1997).

La generación de fragmentos genómicos de 700 – 1000 pb para la construcción de la biblioteca no requirió gran cantidad de las enzimas evaluadas y tituladas previamente por lo que con la cantidad de 32U de *AluI* y *RsaI* y de 16U de *HaeIII* se logró la obtención de una gran cantidad de esos fragmentos.

De los 75 µg manejados inicialmente se recuperaron sólo 32 µg de DNA de fragmentos del tamaño deseado reflejando una pérdida del 58% a lo largo de todo el proceso de preparación, sin embargo fue una cantidad suficiente y muy por arriba de los requerimientos para la construcción de la biblioteca de expresión en éste estudio.

Las enzimas empleadas para generar los fragmentos: *AluI*, *RsaI* y *HaeIII* así como las utilizadas para digerir cada uno de los vectores: *SmaI* y *EcoRV* proporcionan extremos romos.

El rendimiento en la purificación del DNA del plásmido pQE30 y del fagémido 3.2 de 1.4 y 1.5 mg respectivamente fue similar a lo recomendado (Manual pQE30, QIAGEN, 1995) y se consideró aceptable ya que tales valores sobrepasaron considerablemente lo requerido de cada uno de los vectores (100 μ g) para la preparación como vehículos de clonación y la construcción de la biblioteca de expresión además de que dichos valores se presentaron muy similares entre ellos. Después de la digestión de 100 μ g de cada uno de los vectores como requerimiento necesario para la preparación como vehículos de clonación, los títulos obtenidos de 10^3 en experimentos de transformación así como los obtenidos después de la desfosforilación también de 10^3 para ambos, fueron los apropiados para determinar una buena eficiencia de digestión y desfosforilación.

Al ligado de los insertos a los vectores de clonación a las diferentes concentraciones de insertos evaluadas: 100:50, 100:100, 100:200 y 100:300, los títulos se vieron incrementados en forma ascendente, observándose una relación directamente proporcional a la cantidad de inserto ligado. La transformación de 50 ng de DNA de cada uno de los vectores con un inserto control λ /*AluI* dio títulos muy similares entre ellos de 10^5 , lo que nos dio la pauta para determinar que los vectores se encontraban en condiciones satisfactorias para la clonación de fragmentos de 700-1000 pb de DNA genómico de *Anaplasma*.

El ligado a una relación de 1:3 ng vector-inserto fue la más adecuada para la recuperación de las 60,000 clonas con ambos vectores ya que los títulos obtenidos por transformación a partir de 50 ng de DNA fueron de 10^5 superando los requerimientos necesarios de 6×10^4 , requiriendo sólo poco menos de 1 μ g de DNA del vector para recuperar las 60,000 clonas.

La purificación del DNA de la biblioteca construída en los dos tipos de vectores dio valores muy variables entre ellos de 46 μg y 259.5 μg para el plásmido y el fagémido pero lo suficiente para la recuperación de las 60,000 clonas.

El número de clonas positivas evaluadas por PCR (que incorporaron los insertos de 700-1000 pb) fue muy similar en ambos vectores observándose un 79.1% en el pQE30 en células DH10b y 72.9% en células TGI y 62.5% en HB2151 para el caso de phague 3.2. Cabe mencionar que el porcentaje obtenido en el caso de las células HB2151 no está muy por debajo del obtenido en TG1 por lo que no se observa una pérdida notable de clonas para recuperar los fagos recombinantes en las células HB2151 para la expresión de proteínas. Este tipo de biblioteca se considera de suma importancia ya que es una herramienta indispensable para la identificación de antígenos de *Anaplasma marginale* asociados a protección inmunitaria y que pueden ser determinados mediante el contacto con anticuerpos del tipo IgG2 para su posterior caracterización y la determinación de su participación dentro de la protección contra la anaplasmosis bovina.

Aparentemente las bibliotecas construídas tanto genómica como de expresión genética de *Anaplasma marginale* presentan las condiciones óptimas para su buen funcionamiento. Estas bibliotecas son complementarias ya que podrán ser utilizadas para identificar y caracterizar antígenos asociados a protección contra *Anaplasma* en el caso de la expresión y la posible captación de genes completos en la biblioteca genómica para la posterior caracterización de ellos, así como la purificación y uso como candidatos a vacunas y/o métodos diagnósticos.

CONCLUSIÓN

Se preparó una biblioteca genómica de *Anaplasma marginale* mediante clonación de fragmentos de 19 Kpb obtenidos por digestión parcial del DNA genómico de la rickettsia con la enzima *Sau3AI* en el sitio *BamHI* del fago Lambda DASH® II/*BamHI*/CIAP. Esta biblioteca original presentó un título de 3.4×10^4 ufp/ml representando 15 veces el genoma. Después de la amplificación se obtuvo un título de 3.9×10^{11} ufp/ml en un volumen de 30 ml, obteniendo un total de 1.1×10^{13} fagos recombinantes. Se valoró que la biblioteca presenta secuencias de *A. marginale* correspondientes a la proteína MSP5 demostrado por PCR con iniciadores específicos amplificando un fragmento de 582 pb. Esta biblioteca muy probablemente contenga también muchas otras secuencias correspondientes a otras proteínas de *Anaplasma* y la cual nos permitirá obtener genes completos que codifiquen para diferentes proteínas de interés de la rickettsia para a su vez purificarlas y emplearlas para los fines que se requieran.

Por otra parte se prepararon dos bibliotecas de expresión genética de *Anaplasma* en dos vectores de diferente naturaleza, una construída en el plásmido de expresión pQE30 y otra en el fagémido pHague 3.2, ambas por clonación de fragmentos de 700-1000 pb de DNA genómico de la rickettsia obtenidos por digestión parcial con las enzimas *AluI*, *RsaI* y *HaeIII* y purificados a partir de geles de agarosa haciendo extracciones con fenol cloroformo. Dichos fragmentos fueron clonados en el sitio *SmaI* y *EcoRV* respectivamente. Ambas bibliotecas presentan un título de 6×10^4 con un porcentaje de clonas positivas de 79.1% y 62.5 % en cada uno de los casos.

La inducción de la expresión de proteínas así como el reconocimiento de las mismas mediante el contacto con anticuerpos del tipo IgG2 en cada una de éstas bibliotecas nos permitirá identificar y caracterizar proteínas asociadas a protección y de esa manera poder tener las bases moleculares para la elaboración de vacunas o métodos diagnósticos y así evitar o disminuir las grandes pérdidas que la anaplasmosis ocasiona en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

Barbet A. 1995. Recent developments in the molecular biology of anaplasmosis. *Vet. Parasitol.* 57(1-3):43-9

Bernard R, Pasternak G y Pasternak J. 1994. *Molecular Biotechnology, principles and applications of Recombinant DNA.* ASM Press. E.U. 35-53.

Brown W, Shkap V, Zhu D, McGuire T, Tuo W, McElwain T, Palmer G. 1998. CD4⁺ T-lymphocyte and immunoglobulin G2 responses in calves immunized with *Anaplasma marginale* outer membranes and protected against homologous challenge. *Infect. Immun.* 66:5406-5413.

Brown W, Rice-Ficht A, Estes D. 1998. Bovine type 1 and type 2 responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 63:45-55.

Davis B, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg H. 1990. *Tratado de Microbiología.* Salvat. México. 622-626 y 237-241 pp.

Drancourt M, Raoult D. 1994. Taxonomic position of the Rickettsiae: current Knowledge. *FEMS Microbiology Reviews.* 13:13-24.

Fragoso H. 1991. Anaplasmosis bovina: prevalencia en México, diagnóstico, tratamiento y control. En "DIAGNOSTICO Y CONTROL DE ENFERMEDADES DE PARASITOS DE ANIMALES Y EL HOMBRE" H. Quiroz-Romero, editor. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 160-169 pp.

Lewin B. 1997. *Genes VI.* Oxford. E.U.

Meeus P., Brayton K., Palmer G. y Barbet A. 2003. Conservation of a gene conversion mechanism in two distantly related paralogues of *Anaplasma marginale*. *Molecular Microbiology*. USA. 633-643 pp.

Oberle S. y Barbet A. 1993. Derivation of the complete msp4 gene sequence of *Anaplasma marginale* without cloning. *Gene*. USA. 291-294 pp.

Old R, Primrose S. 1985. *Principles of Gene Manipulation*. Blackwell. Great Britain. 45-152.

Palmer G, Barbet A, Davis W, McGuire T. 1986. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science*. USA. 231:1299-1302.

Palmer G., Barbet A., Cantor G. y McGuire C. 1989. Immunization of cattle with the MSP-1 Surface Protein Complex Induces Protection against a Structurally Variant *Anaplasma marginale* Isolate. *Infection and Immunity*. USA. 3666-3669 pp.

Alleman A., Palmer G., McGuire T., McElwain T., Perryman L. Y Barbet F. 1997. *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 3 Is Encoded by a Polimorphic, Multigene Family. *Infection and Immunity*. USA 156-163 pp.

Pelezar M. 1977. *Microbiología*. Mc-Graw-Hill. México. 228-241 pp.

Ristic M, McIntyre I. 1981. *Diseases of Cattle in the Tropics*. Martinus Nijhoff Publishers.. The Netherlands. 327-344 pp.

Visser E., McGuire T., Palmer G., Davis W., Shkap V., Pipano E. y Knowles, Jr. D. 1992. The *Anaplasma marginale* msp5 Gene Encodes a 19 Kilodalton Protein Conserved in All Reconized Anaplasma Species. *Infection and Immunity*. USA. 5139-5144 pp.

Watson J, Gilman M, Witkowski J y Zoller M. 1998. Recombinant DNA. Scientific American BOOKS. E.U. 63-78.