

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Aislamiento, Clonación, Expresión y Purificación
del Antígeno de Secreción Temprana 6 de
*Mycobacterium tuberculosis***

TESIS PROFESIONAL

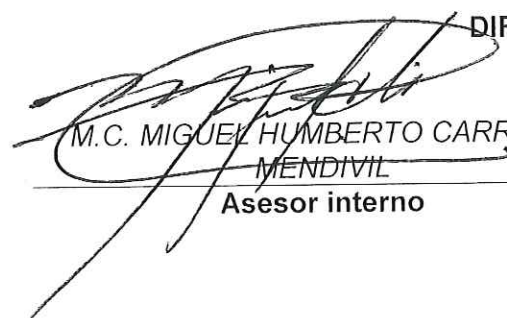
Que presenta

AMANDA DAVILA LEZAMA

Aprobado por:


Dr. ALEXEI FEDOROVISH LICEA
NAVARRO

DIRECTOR DE TESIS


M.C. MIGUEL HUMBERTO CARRILLO
MENDIVIL
Asesor interno


DR. MARIO VARGAS

Sinodal

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Aislamiento, Clonación, Expresión y Purificación
del Antígeno de Secreción Temprana 6 de
*Mycobacterium tuberculosis***

TESIS que para obtener el título

de Bióloga presenta:

Amanda Dávila Lezama

Ensenada, Baja California. Septiembre de 2005

DEDICATORIA

A mi Grace, a mis padres y hermanas

Sin sus esfuerzos esto jamas

se hubiera podido realizar....

AGRADECIMIENTOS

“Profesionales”

Al **Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada** por contribuir en la finalización de mi carrera.

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro: Gracias por permitirme trabajar con usted y realizar el ultimo paso para obtener mi titulo de Biologa. Por confiar en mi y tener paciencia cuando mas se necesito.

A los miembros del comite: **M. C. Miguel Humberto Carrillo Mendivil y Mario Alberto Vargas Olvera**, por haber sido parte importante en mi formación durante el transcurso de mi carrera profesional, el gran apoyo y asesoramiento durante la realización de este trabajo.

A **Miriam Hernandez e Irma Gabriela Hernandez**, por ayudar siempre a los estudiantes, especialmente a mi y compartir momentos agradables, hicieron que la estancia en CICESE fuera grata.

A la **Universidad Autonoma de Baja California** y la **Facultad de Ciencias** y todos los que son parte de ella.

A todos mis compañeros de laboratorio, que me ayudaron muchisimo en la realización de este trabajo, Mario, Sujey, Ale, Karla, Alheli, Tania, y a Johanna por ser un apoyo mas, gracias amiga.

“Personales”

Familia.

Grace: Gracias por ser la cabeza de esta familia, por su constante determinación de mantenerla unida, de su honesta caridad que la distingue y de su gran nobleza, es un ejemplo a seguir, cuando sea grande quiero ser como usted.

Papás: Gracias por darme la vida. Por enseñarme que habra hay tropiezos y desiciones, pero de todo hay que aprender y sacar lo mejor, por nunca darse por vencidos conmigo ya que fui la ultima de sus hijas y ya estaban cansados. Por darme la confianza de regarla y ayudar a levantarme. Todo esto es para ustedes, es mi manera de pagarles un poco todo lo que me dieron, aunque no se compare jamas. Gracias por se la base de mi educación.

Hermanas Wendy y Cindy: Por ser la autoridad cuando mis padres no estaban, aunque lo detestaba, por protegerme cuando sentian que lo necesitaba y estar ahi cuando ya no encontraba salida. No me imagino la vida sin ustedes dos. Gracias a mis cuñados Migue y Pico.

Tíos Victor y Norma, Pelón y Ruth, Nena, Dora y Negro: gracias por apoyarme siempre cuando tenía que recaudar fondos para la escuela o viajes deportivos durante mi educación, por compartir tanto con ustedes y porque ahi estan al pendiente.

Paty Dávila: Gracias prima por apoyarme tanto y preocuparte demasiado por mi bienestar, por tantos consejos que pondre en practica algun dia. Por confiar y

tener fe en mí siempre.

Adriana Palacios: gracias por ser parte de esta etapa desde su inicio, por su apoyo incondicional y su confianza. Por siempre decirme hasta el cansancio que todo iba a estar bien. Por ser la persona que siempre estuvo y sé que seguirá estando en mis ataques de histeria y siempre dejarme ser.

Amigos.

A mis amigos biólogos quienes pasaron por lo mismo durante estos últimos 5 años, y que se disfrutó tanto la carrera con su compañía. **Carol**, gracias por todo lo que me diste que jamás se podrá plasmar en palabras. **Monse**, gracias por todo tu apoyo, por ayudarme a darme cuenta de las cosas y ser la mamá de todos. **Ale**, gracias por permitirme compartir contigo diferentes puntos de vista. **Lu**, todo esto sin tu ayuda quizá nunca hubiera existido, mil gracias y por siempre estar ahí. **Marlenne**, gracias por enseñarme a apreciar el trabajo. Saruhen, gracias por compartir y enseñarme lo que es ser independiente. **Alejandro**, gracias por ser el sensible de la bola. **Gonzalo**, gracias por siempre preocuparte por mí y mostrar interés. **Ricardo**, gracias por tus chistes tontos que siempre sacaban una risa por más malos que fueran. **Carlos**, gracias por confiar en mí. **Polo**, gracias por tus pláticas en cada fiesta. **Rorris**, aunque fuiste biólogo durante dos semestres pues estás dentro, a ti, gracias por enseñarme a no perderle la fe a las personas, y por todos los años compartidos que han sido el doble de lo que duró la carrera.

A mis otras amigas que nunca faltaron para el party, **Payo**, amiga, gracias por tu comprensión y a enseñarme que nunca es bueno juzgar, **Haydee**, gracias por confiar en mí y dejarme ayudarte aunque nunca me lo pediste, **lily**, gracias por tu sencillez, **Isamara**, gracias por ser como eres y **claudia**, gracias por saber que puedo contar contigo. Gracias a todos los demás amigos biólogos y los que siguen en la carrera.

Amigos Oceanólogos.

Ricardo, que te puedo decir sin que ya te lo haya dicho, tanto tú como Ana, me han dado tanto que no me alcanzara la vida misma para agradecerles. Gracias por ser uno de los dos pilares que ha sido mi soporte en los momentos más difíciles, **Ana**, gracias por ser el otro pilar amiga, y por enseñarme a ver otras perspectivas que han marcado el rumbo de mi vida. Y por muchas cosas más que no me alcanzara este espacio para decírtelo. **José**, gracias por ser tan sensible y querer muchísimo a mi amiga, por la amistad que me has brindado. **Poncho**, gracias por abrirme los ojos en los momentos que lo tenía que hacer y por saber que cuento contigo en las buenas y en las malas. **Luis y Mo**, gracias por su amistad incondicional, y por enseñarme que aun con todas las adversidades de la vida, se puede seguir juntos. Y a todos mis demás amigos oceanólogos, gracias por todo lo que compartimos durante y después de la carrera.

Resumen

La tuberculosis es una infección bacteriana responsable de 2 millones de muertes anuales, siendo particularmente sensibles los países en vías de desarrollo. El agente causal de esta enfermedad es *Mycobacterium tuberculosis* y para poder diagnosticar su presencia en humanos depende de varias técnicas que pueden dar resultados muy tardados como falsos positivos o requerir de un equipo muy costoso. Por eso en este trabajo se propone mediante técnicas de biología molecular aislar el gen que codifica para el antígeno de secreción temprana 6 (ESAT-6), así como la expresión y purificación de la misma proteína, que tendrá utilidad posteriormente para diagnóstico de tuberculosis porque presentará mayor especificidad ya que el gen que codifica para ESAT-6 solo está presente en el complejo de *M. tuberculosis*.

Palabras claves: tuberculosis, antígeno de secreción temprana 6, *Mycobacterium tuberculosis*.

Abstract

Every year Tuberculosis claims 2 million deaths; developing countries being the most affected. *Mycobacterium tuberculosis* is the agent of this bacterial infection which diagnosis in humans depends on various techniques; this diagnosis may be slowed down because of false positives or the need of expensive equipment. This is why to isolate the gene that encodes for the early secretion antigen 6 (ESAT-6) it is proposed that Molecular Biology techniques be used. As well as with the expression and purification of the same protein that will be use in a later time for the diagnosis of tuberculosis, because it could present more specificity since the encoding gene for ESAT-6 is only present in the *M. tuberculosis* complex.

Key words: tuberculosis, early secretion antigen 6, *Mycobacterium tuberculosis*.

CONTENIDO

	Página
I. INTRODUCCION	1
I.1 Descripción de Mycobacterium tuberculosis.....	4
II. Antecedentes	7
II.1 Tipos de diagnóstico de tuberculosis.....	7
III. Hipotesis	11
IV. Objetivos	12
IV.1 Objetivo general	12
IV.2 Objetivos particulares	12
V. MATERIALES Y METODOS	13
V.1 Aislamiento y purificación del vector pComb3x.....	13
V. 2 Cuantificación del plásmido pComb3x por medio de espectofotometría.....	16
V. 3 Digestión del plásmido pComb3x.....	16
V. 4 Diseño de Iniciadores.....	17
V. 5 Aislamiento y purificación del antígeno de Secreción temprana – 6	18
V. 6 Cuantificación de ESAT-6 por medio de espectofotometría.....	20
V. 7 Digestión de esat-6.....	20
V. 8 Purificación del plásmido pComb3x y esat-6 digeridos por el método de congelamiento y maceración.....	20
V. 9 Ligación del vector pComb3x más esat-6 y su electroporación	21

CONTENIDO (Continuación)

V. 10 Tamizado	24
V. 11 Expresión del Antígeno de Secreción Temprana – 6.....	25
V. 12 ELISA de expresión	26
V. 13 Gel de acrilamida y Western Blot	26
V.14 Purificación del Antígeno ESAT-6 por medio de HPLC.....	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	30
VI. 1 Obtención y Purificación del plásmido pComb3x.....	30
VI. 2 Cuantificación del plásmido.....	30
VI. 3 Aislamiento y purificación del antígeno de secreción temprana – 6.....	31
VI. 4 Cuantificación de esat-6	32
VI. 5 Digestión de pComb3x y esat-6.....	33
VI. 6 Purificación del plásmido pComb3x y esat- 6 digeridos por el método de congelamiento y maceración.....	34
VI. 7 Tamizado	35
VI. 8 Expresión del antígeno de secreción temprana 6.....	38
VI. 9 Purificación del Antígeno de secreción temprana 6 por medio de HPLC.....	41
VII. CONCLUSIONES.....	47
VIII. PERSPECTIVAS	48
IX. REFERENCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Mapa de la distribución de tuberculosis en el mundo	2
2	Imágenes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
3	Imagen de contagio de la tuberculosis	5
4	Descripción de el plásmido pComb3x y sus partes	14
5	Esquema del funcionamiento del HPLC	28
6	Gel de agarosa al 1%. Aislamiento del plásmido pComb3x	30
7	Gel de agarosa al 2%. Aislamiento del gen que codifica para el antígeno de secreción temprana 6	32
8	Gel de agarosa al 1%. Separación del plásmido pComb3x digerido.	33
9	Gel de agarosa al 2%. Separación del gen esat-6 digerido.	33
10	Gel de agarosa preparativo al 2% para purificación de esat-6.	34
11	Top 10 con crecimiento después de 12 h de sembrado donde se encuentran las clonas positivas.	36
12	Cultivo donde fue sembrado el vector sin inserto con ligasa.	36
13	Cultivo donde fue sembrado el vector sin ligasa y sin inserto.	37
14	Gel del agarosa al 2% con las clonas positivas.	38
15	Gráfica de resultado del ELISA de expresión.	39
16	Gel del bisacrilamida al 18% con muestras de la extracción periplasmica.	40

17	Muestra de Top 10 sin inducir (control).	42
18	Gráfica del resultado de la purificación con HPLC de la clona 1 en comparación con el control.	43
19	Gráfica del resultado de la purificación con HPLC de la clona 2 en comparación con el control.	44
20	Gráfica del resultado de la purificación con HPLC de la clona 6 en comparación con el control.	45
21	Gráfica del resultado de la purificación con HPLC de la clona 7 en comparación con el control.	46

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Mezcla de reacción para la digestión del plásmido.....	16
II. Condiciones de reacción para aislar el gen que codifica para esat-6.....	18
III. Mezcla de reacción para aislar el gen que codifica para el esat-6.....	18
IV. Mezcla de reacción para la digestión de esat-6.....	20
V. Mezcla de reacción para la ligación de vector mas inserto.....	22
VI. Mezcla de reacción para la ligación de vector sin inserto.....	22
VII. Mezcla de reacción para la ligación de vector sin ligasa.....	22
VIII. Mezcla de reacción para el PCR de colonia.....	24
IX. Mezcla para el gel de acrilamida al 18%.....	27
X. Lecturas de concentración del plásmido.....	31
XI. Lecturas de la concentración de esat-6	32

I. INTRODUCCION

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más antiguas y una de las principales causas de muerte en adultos del mundo, principalmente en los países en vías de desarrollo, siendo responsable de 8 millones de nuevos casos infecciosos y aproximadamente 2 millones de muertes anuales. La tuberculosis es una enfermedad mundial que ataca a cualquier persona, ya que no distingue edad, raza o sexo. En años recientes el aumento de la incidencia se le atribuyen a la epidemia del Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) especialmente en países en vías de desarrollo, así como el surgimiento de cepas multirresistentes a antibióticos, éstas han contribuido al resurgimiento de tuberculosis en humanos (Pixteren *et al.*, 2000).

La tuberculosis es una enfermedad producida por *Mycobacterium tuberculosis*, que se localiza principalmente en los pulmones y se identifica por la presencia de tubérculos y necrosis caseosa. (Pacheco. C. 1992.)

En 1995 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que la tuberculosis era una emergencia global, la primer designación hecha por la Organización. La OMS predica que entre el 2000 y 2020 aproximadamente mil millones de personas serán infectados con tuberculosis y 35 millones de personas morirán por esta enfermedad (<http://www.w3.whosea.org/tb/worldtoday.htm>).

Se estima que una tercera parte de la población mundial está infectada por *Mycobacterium tuberculosis* (Figura 1). Así mismo la aparición de 10

millones de nuevos casos y los dos millones de defunciones anuales causados por esta patología hacen de esta enfermedad un problema difícil de salud pública.

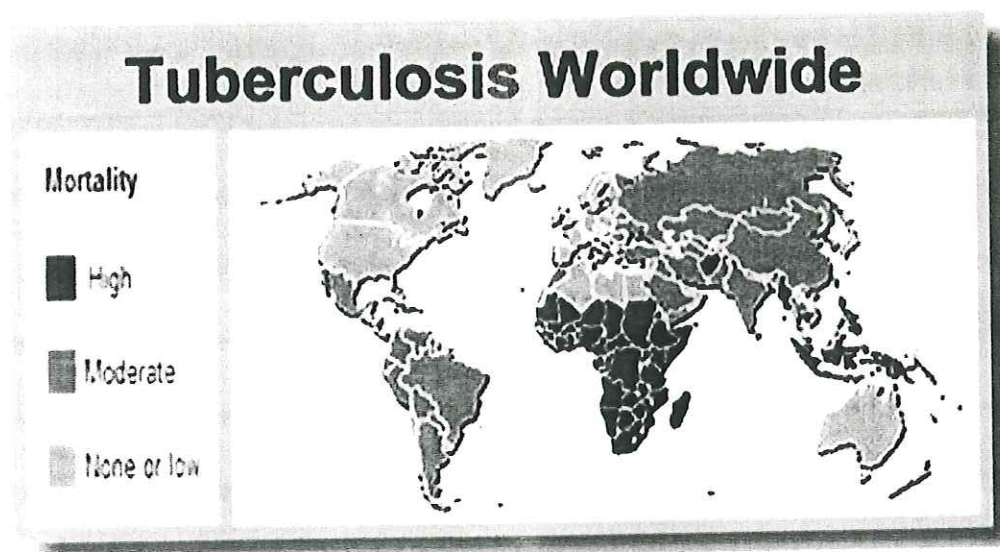


Figura 1. Mapa mundial de la propagación de tuberculosis
(www.dshs.state.tx.us/tcid/facts.shtml).

En México, la tuberculosis se ha mantenido en el decimoquinto lugar como causa notificada de enfermedad, y con relación a las cifras de mortalidad se encuentra dentro de las primeras 20 causas de muerte en el país. Se reportan aproximadamente 20,000 casos nuevos de tuberculosis al año que condicionan alrededor de 6000 fallecidos. Así mismo, al igual que en otros países, el problema de VIH/SIDA, la diabetes, desnutrición, la migración, las adicciones y la resistencia en fármacos antituberculosos han venido a agravar el perfil de la tuberculosis en México, particularmente por la falta de seguimiento y control de los programas y la falta de adhesión de los pacientes, lo cual a

favorecido el resurgimiento de cepas resistentes a los tratamientos convencionales.

Aunque actualmente se dispone de fármacos antituberculosos, la mejor solución a largo plazo son las medidas preventivas (Villalba, C. 1999).

La vacuna BCG fue desarrollada por Calmette y Guérin a partir de una cepa de *Mycobacterium bovis*, que fue subcultivada cada tres semanas durante 13 años con un total de 231 pases, hasta que perdió su virulencia. Es una cepa no patógena pero si inmunogénica, cuyo mosaico antigénico es casi idéntico al de *M. tuberculosis*. La primer vacuna viva atenuada fue utilizada por vía oral en París en 1921. A partir de 1974 a 1992 la vacunación con BCG fue incluida en el programa ampliado de vacunación de la OMS en la mayoría de los países. Actualmente se ha establecido sin lugar a dudas su inocuidad y que su administración evita las complicaciones graves de la primoinfección tuberculosa natural, debido a la inmunidad específica generada por este bacilo de virulencia atenuada (Pacheco, C. 1992)

En los últimos años, los avances tecnológicos han permitido el desarrollo e implementación de nuevas metodologías que hacen menos complicada la identificación de agentes causales de enfermedades infecciosas entre ellas la de tuberculosis.

Es evidente que se requieren de nuevas técnicas para el diagnóstico de esta enfermedad, así como buscar la cura o el control a la dispersión de la misma.

I.1 Descripción de *Mycobacterium tuberculosis*.

El agente causante de la tuberculosis en humanos pertenece al Complejo tuberculoso, el cual fue aislado por Robert Koch en 1882. Koch encontró que el, también conocido, bacilo tuberculoso estaba asociado constantemente con dicha enfermedad (Zinsser, 1976).

Dentro de este complejo se encuentran especies del género *Mycobacterium*, en la que se incluyen especies como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. microti*, los cuales pertenecen a la familia Mycobacteriaceae, del orden Actinomycetales. Este grupo de micobacterias están altamente relacionadas por sus características bacteriológicas (Navarro-Armenta, 2004).

El bacilo tuberculoso es delgado, recto o ligeramente curvo, en forma de vara con sus extremos redondeados (Figura 2, ilustración de *M. tuberculosis*). Varía en tamaño de 0.2 a 0.5 μm de ancho y de 1 a 4 μm de longitud (Zinsser, 1976).

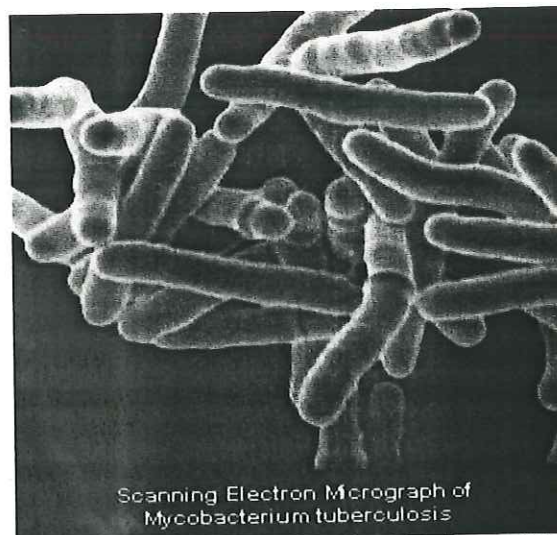


Figura 2. *Mycobacterium tuberculosis* (<http://www.niaid.nih.gov/dir/labs/lhd/barry.htm>)

M. tuberculosis es altamente contagioso y aerotransportado, se desarrolla en presencia de oxígeno, crece lentamente y posee una pared celular cerosa, hidrofóbica y con alto contenido de lípidos (Landeros-Sanchez, 2000). Se distingue de otras micobacterias por no poseer pigmento, produce niacina y nitratos siendo sensible a isoniazida, resiste la decoloración por ácido y alcohol por lo que es referido como bacilo ácido alcohol resistente (<http://drscopecom/privados/pac/pediatria/pb15/tuberculosis.html>).

La estructura y funcionamiento de la pared celular permite a la micobacteria sobrevivir dentro de las células inmunes llamados macrófagos, creando una relación parte por la naturaleza química y las funciones biológicas de los constituyentes de la envoltura de la célula bacteriana compuesta por una membrana plasmídica, pared y capsula (Landeros-Sanchez, 2000).

El bacilo tuberculoso tiene como huésped principal al humano, no obstante, infecta a ganado: vacas, cerdos, venados, conejos, llamas, camellos, gatos y ratones, lo cual complica el control de la tuberculosis (Navarro-Armenta, 2004).

La infección se dispersa mediante contacto directo de persona a persona, ya sea por estornudo, tos y contacto directo (Figura 3).

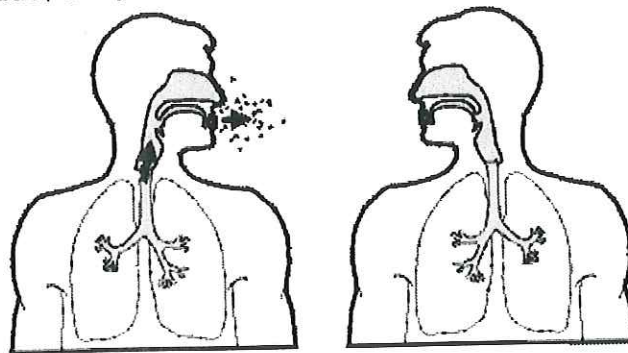


Figura 3. Demostración de contagio en humano (www.cpmc.columbia.edu/tbcpp/abouttb.html).

Al ser inhalado el bacilo tuberculoso, puede alcanzar los bronquios terminales y el alveólo, evadiendo los mecanismos locales de defensa, iniciando su multiplicación; una vez fagocitado por los macrófagos alveolares, continúa su replicación dentro del alveólo; de aquí se diseminan a través de los canales linfáticos a los nódulos linfáticos regionales y posteriormente hace una diseminación hematógena; en esta etapa la infección puede evolucionar hacia la enfermedad, puede reactivarse varios años después, o como sucede en la mayoría de los casos la inmunidad limita el crecimiento del bacilo y el paciente permanece asintomático.

Dentro de la sintomatología se incluyen malestar, pérdida de peso, sudoración nocturna, tos crónica (en ocasiones con hemoptisis), dolor en la cavidad torácica, deficiencias al respirar y señales de neumonía.

Además de afectar las vías respiratorias también se pueden producir lesiones en órganos y tejido tales como la laringe, huesos, riñones, meninges, intestinos y pericardio (Navarro-Armenta, 2004).

Debido a que los síntomas son fácilmente confundibles con otras enfermedades respiratorias, es difícil diagnosticar la tuberculosis. Una diagnosis temprana es crucial para prevenir la dispersión de dicha infección y se requieren nuevos métodos más específicos para hacerlo (Pixteren, *et al*, 2000).

II. ANTECEDENTES

II. 1 Tipos de diagnóstico de tuberculosis.

Existen varios métodos de diagnóstico para la tuberculosis, pero lamentablemente la especificidad de estas pruebas son bajas, especialmente en países en vías de desarrollo; así como la identificación de infecciones para el tratamiento. El diagnóstico se sigue basando en metodologías clásicas de laboratorio como es la tinción de Ziehl-Neelsen o medios de cultivo que se utilizan para el crecimiento de las microbacterias. La tinción ofrece una baja sensibilidad ya que se requiere de una cantidad considerable (10,000 bacilos/ml) y aun así pueden ocurrir resultados negativos o no representativos para el diagnóstico. Por otra parte, los cultivos bacterianos pueden obtener resultados después de 12 semanas, lo que hace muy tardado el diagnóstico.

La identificación de individuos infectados para el tratamiento es extremadamente difícil, ya que es basada en uno de los métodos tradicionales de diagnóstico que es la prueba de la tuberculina o PPD. Por ser la única marca de infección por *Mycobacterium tuberculosis*, la prueba de la tuberculina es ampliamente utilizada para confirmar la presencia de tuberculosis y estimar la potencia de la enfermedad en estudios epidemiológicos (Vekemans *et al.* 2001). Esta prueba se basa en una inyección intradérmica que contiene derivados de proteínas purificadas (PPD, por sus siglas en inglés), se aplica en la parte interior del antebrazo, con el bisel de la aguja hacia arriba; se debe producir una pequeña elevación de la piel de 6 a 10 mm de diámetro, la lectura debe

realizarse a las 48 o 72 horas. La reacción que se presenta en el área de aplicación produce una leve inflamación o induración. Una reacción igual o mayor a 5 mm de induración, se considera positiva en niños menores de 5 años sin antecedentes de aplicación de BCG, en niños con factores de riesgo como inmunosupresión y en pacientes en contacto reciente con enfermos tuberculosos no tratados. Una reacción igual o mayor a 10 mm de induración, se considera positiva en pacientes menores de cinco años o pacientes inmunocomprometidos. Una reacción igual de 15 mm o más de induración es positiva en cualquier individuo sin factores de riesgo. Lamentablemente, PPD contiene muchos antígenos que son ampliamente compartidos entre las micobacterias, por lo que presenta una baja especificidad (Doherty, *et al*, 2002).

La desventaja es que PPD no distingue entre micobacterias no tuberculosas del ambiente (NTM, por sus siglas en inglés) o la vacuna del Bacilo Calmette-Guerin o BCG *M. bovis*, sin embargo, no se descarta la ayuda de PPD para el diagnóstico de tuberculosis. Por lo tanto, es necesario encontrar un nuevo agente con mayor especificidad que PPD en la detección de tuberculosis (Pixteren *et al.*, 2000).

Actualmente se ha utilizado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés Polymerase Chain Reaction) para la identificación molecular de micobacterias, con esta técnica se multiplica una región específica de ADN de *Mycobacterium tuberculosis*; por lo cual se utilizan iniciadores que hibridan de manera específica, dicha región implicada en la patogenicidad; como lo es el

gen MTP40 el cual fue amplificado para detectar específicamente *M. tuberculosis*, ya que se puede diferenciar este patógeno del resto del complejo de micobacterias (Laniado *et al.* 2001).

Este tipo de diagnóstico tiene una alta sensibilidad; sin embargo, requiere de equipo y entrenamiento costoso, lo que hace que su disponibilidad sea restringida (Moran *et al.*, 2000).

Recientemente, la identificación de regiones en el genoma de *M. tuberculosis* que están ausentes en la vacuna del Bacilo Calmette-Guerin BCG y la mayoría de las micobacterias no tuberculosas del ambiente (NTM) proveen una nueva oportunidad para el diagnóstico de dicha enfermedad. A esta región se le conoce como región RD1 (Región de delección), se pensó que fue la delección primordial que ocurrió durante el paso serial de *M. bovis* a *M. bovis* BCG, y a causa de esto, se piensa que fue reponsable de la atenuación de dicha micobacteria. Dentro de esta región se encuentra el complejo que codifica para el antígeno de secreción temprana 6 (ESAT-6), el cual originalmente fue aislado y purificado de una fracción de bajo peso molecular en filtrados de medio de cultivo para crecimiento de *M. tuberculosis* (Gey van Pittius *et al.* 2001). Dicho antígeno ha demostrado resultados innovadores para su uso como un agente de inmunodiagnóstico (Doherty *et al.* 2002).

Esta proteína ESAT-6 tiene un bajo peso molecular de 6.0 KDa y está codificada por un gen de 315 pb (Brandt *et al.*, 2000).

La técnica southern blot del ADN genómico ha demostrado la presencia

de genes de *esat-6* en *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. bovis*. Mientras que estos genes no pudieron ser demostrados en ninguna vacuna de BCG, ni en NTM con algunas excepciones como *M. kansasii*, *M. szulgai* y *M. marinum*, con ésto se pudo demostrar que ESAT-6 tiene la capacidad de discriminar entre pacientes con tuberculosis de individuos vacunados con BCG y pacientes con *M. avium* (Pixteren *et al.* 2000).

Por ésto se ha propuesto que la respuesta inmune de ESAT-6 sea usado para diagnosis de tuberculosis. Aunque no ha sido desarrollada una prueba dérmica para uso humano; algunos países industrializados han mostrado altas respuestas del interferon-gama (IFN- γ) in vitro a ESAT-6 en pacientes con tuberculosis, pero no en individuos sanos o no vacunados con BCG (Vekemans *et al.* 2001).

En Etiopía, se han observado respuestas similares en pacientes con tuberculosis; sugiriendo que las infecciones con *M. tuberculosis* y la ausencia de la enfermedad, pueden inducir respuestas altas a ESAT-6 (Idem).

III. HIPOTESIS

Mediante la utilización de técnicas especializadas de biología molecular, es posible aislar el gen codificante para el antígeno de secreción temprana (ESAT-6) así como la expresión y purificación de la proteína recombinante, lo cual será de gran utilidad para el diagnóstico de tuberculosis, ya que este antígeno es específico para el complejo tuberculosis y puede diferenciar entre la vacuna del Bacilo Calmette-Guérin (BCG, por sus siglas en ingles) y la cepa infectante.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general:

- Clonar el gen que codifica para esat-6, expresar y purificar el antígeno de secreción temprana 6 recombinante en *E. coli*.

IV.2 Objetivos particulares:

- Aislar el gen que codifica para esat-6 por medio de PCR.
- Clonar el gen aislado en un vector de expresión.
- Expresar y purificar la proteína recombinante por medio de cromatografía líquida de alta presión (CLAP) de las siglas en inglés HPLC.

V. MATERIALES Y METODOS

V. 1 Aislamiento y purificación del vector pComb3x.

Este vector fue empleado para clonar el gen de interés (esat-6) por las características que presenta dentro de su genoma, en la figura 4 se puede observar un esquema del vector utilizado. Este vector de expresión facilita el aislamiento y estudio de proteínas solubles seguidas de selección. Contiene sitios de reconocimiento por la enzima *Sfi* I, lo cual permite la clonación direccional de genes que hayan sido digeridos con esta enzima, cual fue el caso de esat-6. En su genoma presenta secuencias que codifican para dos péptidos marcadores en su término carboxilo. Cuando se clona un gen en fase, en su extremo 3' tiene un tallo de 6 histidinas lo cual facilita la purificación de proteínas solubles por medio de cromatografía de afinidad y un epítipo de 9 aminoácidos de la hemaglutinina (HA) del virus de influenza que permite detectar de manera indirecta las proteínas por medio de anticuerpos anti-HA comerciales (Barbas *et al.*, 2001) (Figura 4).

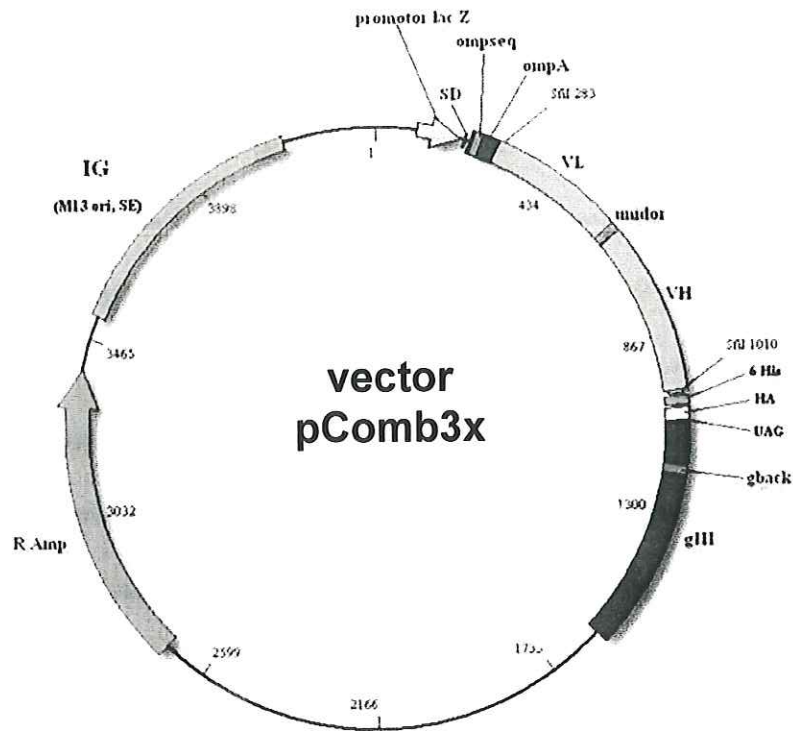


Figura 4. Vector de expresión utilizado para la clonación del antígeno de secreción temprana 6.

El proceso de aislamiento se describe a continuación:

En 6 ml de medio de cultivo Luria-Bertani (LB) suplementado con carbencilina a una concentración final de 0.5mg/ml se agregó una colonia de *E. coli* XL1-blue que contiene el vector pComb3x y se puso a crecer durante 12 horas toda la noche a 37°C en agitación a 250 rpm.

Después de las 12 horas el cultivo se pasó a tubos de 1.5 ml y se centrifugó durante 30 segundos a 14000 rpm, dejando así el sedimento y descartando el sobrenadante.

Siguiendo el protocolo de QIAprep Spin Miniprep Kit® se le agregaron 250

μl de buffer de resuspensión para resuspender el sedimento y pasarlos a tubos de 1.5 ml.

Al sedimento resuspendido se le agregaron 250 μl de buffer de lisis invirtiendo los tubos 4 veces para que se mezclaran bien.

Se agregaron 350 μl de buffer de neutralización invirtiendo los tubos, para así centrifugarlos durante 10 minutos a 13000rpm en la microcentrífuga. Se recolectó el sobrenadante.

Se colocó el sobrenadante en la columna por decantación y se centrifugó durante 30 segundos, se descartó el sobrenadante.

Para lavar se le agregaron 0.5 ml de buffer de unión y se centrifugó durante 30 segundos descartando el sobrenadante.

Por último se le agregaron 0.75 ml de Buffer de Lavado y se centrifugó durante 30 segundos descartando el sobrenadante.

Se paso la columna a tubos nuevos de 1.5 ml para eluir el ADN agregando 50 μl de H₂O estéril y centrifugando los tubos durante 1 minuto para recolectar la muestra de plásmido purificado.

V. 2 Cuantificación del plásmido pComb3x por medio de espectrofotometría.

Se utilizó un espectrofotómetro Biorad® para realizar esta cuantificación. Ajustando el factor de dilución a 50.

Se tomaron 98 µl de agua destilada para leer el blanco, a ese blanco se le agregaron 2 µl de muestra. Se realizaron varias lecturas a 260 nm de la muestra para sacar un promedio de la concentración final.

V. 3 Digestión del plásmido pComb3x.

Teniendo la concentración final de plásmido se calculó la mezcla de reacción final para la digestión. En la tabla I se muestra la mezcla de reacción para la digestión del plásmido.

Tabla I. Mezcla de reacción para la digestión del plásmido.

Componente	cantidad
H ₂ O	14 µl
Sfi 1	6 u
Buffer 10x	2.5 µl
ADN	7.5 µl o 1µg

Ya hecha la reacción se dejó en el termociclador a 50°C durante 6 horas, y el vector digerido se corrió en un gel de agarosa al 1% para purificarlo de nuevo.

V. 4 Diseño de Iniciadores.

Para poder diseñar los iniciadores específicos para el aislamiento del gen que codifica para ESAT-6 es necesario tener primero la secuencia de este gen, y con la secuencia que reconoce la enzima que sera utilizada, en este caso *Sfi* I, se pueden identificar la secuencia para los iniciadores.

Secuencia de esat-6:

5' GAT TGC GGA GAT CCC ATG ACA GAG CAG CAG TGG AAT TTC GCG
GGT ATC GAG GCC GCG GCA AGC GCA ATC CAG GGA AAT GTC ACG
TCC ATT CAT TCC CTC CTT GAC GAG GGG AAG CAG TCC CTG ACC AAG
CTC GCA GCG GCC TGG GGC GGT AGC GGT TCG GAG GCG TAC CAG
GGT GTC CAG CAA AAA TGG GAC GCC ACG GCT ACC GAG CTG AAC
AAC GCG CTG CAG AAC CTG GCG CGG ACG ATC AGC GAA GCC GGT
CAG GCA ATG GCT TCG ACC GAA GGC AAC GTC ACT GGG ATG TTC
GCA TAG GAA GCT TGG GAA TC 3'

Secuencia de iniciadores

esat-6/sfi Sentido
↓ corta *Sfi* I
5'TAA GGC GGG GCC CAG CCG GCC ACA GAG CAG CAG TGG AAT TTC 3'

esat-6/sfi Antisentido
Corta *Sfi* I ↓
5'TAG TGG AGC AGG CCG GCC TGG CCT GCG AAC ATC CCA GTG ACG TT3'

V. 5 Aislamiento y purificación del antígeno de secreción temprana 6

Para aislar el gen que codifica para *esat-6* se utilizó ADN genómico de *M. tuberculosis*, provenientes de bacterias clínicamente aisladas en el Hospital General de la Ciudad de Tijuana, Baja California.

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del gen. Las condiciones que se utilizaron y la mezcla de reacción fueron las siguientes (Tabla II y III).

Tabla II. Condiciones de reacción para aislar el gen que codifica para ESAT-6

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	5'	1
94°C	15"	
56°C	45"	30
72°C	1'	
72°C	10'	1

Tabla III. Mezcla de reacción para aislar el gen que codifica para ESAT-6

Componente	Cantidad
H ₂ O	16.37 µl
dNTP's	2 µl; 2.5µM
MgCl ₂	5 µl
Buffer 10x	2.5 µl
ADN genómico	100 ng
Iniciador sentido	0.75 µl; 20 µM
Iniciador antisentido	0.75 µl; 20 µM
Taq polimerasa	0.625 u

Nota: estas cantidades son para reacciones de 25µl. Cada amplificación lleva su respectivo control negativo.

Ya amplificado el gen se corrió en un gel de agarosa al 2% para observar la banda esperada de aproximadamente 300 pb.

Observando la banda se pasó a la purificación de esat-6 con el Kit de extracción de gel. Para ésto se realizó otro PCR para reamplificar esat-6 para obtener una cantidad considerable y que la purificación fuera buena.

Se hizo un gel preparativo de agarosa al 2% y se le agregaron los 500µl de muestra con la cantidad de buffer de cargado necesaria para tal cantidad de muestra. Se debe correr aproximadamente 45 minutos y se cortó la banda para separarlo de todo el gel, se pasó a tubos eppendorf y se pesaron. Se le agregaron 3 volúmenes de buffer QG para cada volumen de gel (100mg-300 µl). Se incubaron los tubos a 50°C durante 10 minutos para que el gel se disolviera completamente, para ayudar a que ésto pasara, se agitó cada 2-3 minutos durante la incubación. Ya disuelto se tornó de un color amarillento, de aquí se le agregó 1 volumen de isopropanol y se mezcló.

La muestra se pasó a la columna de purificación y se centrifugó por un minuto y se descartó el sobrenadante. Se le agregó a la columna del buffer QG 500 µl y se centrifugó por un minuto. Para lavar se le agregaron 750 µl de buffer PE a la columna y se centrifugó por un minuto. Se descartó el sobrenadante y se volvió a centrifugar para eliminar restos de buffer.

La columna se pasó a otro tubo eppendorf para eluir la muestra, se le agregó 50 µl de H₂O destilada y se centrifugó a 14,000 rpm en la centrifuga eppendorf 5415C durante un minuto.

V. 6 Cuantificación de esat- 6 por medio de espectofotometría.

Se realizó lo mismo que para la cuantificación del plásmido. Se tomaron 98 μl de H_2O para leer el blanco y a eso se le agregaron 2 μl de la muestra y se leyó a 260 nm, igual se tomaron varias lecturas para sacar el promedio.

V. 7 Digestión de esat- 6

Ya teniendo la concentración del gen se calculó la mezcla de reacción para la digestión y fue la siguiente (Tabla IV).

Tabla IV. Mezcla de reacción para la digestión de esat-6.

Componente	Cantidad
H_2O	105.4 μl
Sfi 1	1 μl
Buffer 10x	20 μl
ADN	73.6 μl

Ya teniendo la reacción hecha se pasó al termociclador y se incubó a 50°C durante 6 horas, ya digerido se corrió la muestra en un gel de agarosa al 2% para volverlo a purificar.

V. 8 Purificación del plásmido pComb3x y esat- 6 digeridos por el método de congelamiento y maceración.

Se hicieron dos geles preparativos para el vector y el gen, se dejaron correr aproximadamente entre 45 minutos y 1 hora para separar bien las bandas

que no son de interés. Se cortaron las bandas para dividir las en 2 tubos eppendorf y se colocaron a -80°C por 30 minutos. Ya congeladas las bandas se homogenizaron para extraerles el mayor líquido posible. Esto se repitió las veces que fueron necesarias para recuperar la mayor cantidad de líquido, donde se encuentra el ADN suspendido. El siguiente paso fue precipitar el ADN con acetato de sodio 3M pH 4.8, se le agregó el 10% del volumen de la muestra y 2.2 volúmenes de etanol al 100% por cada volumen de la muestra y se colocaron a -80°C por 2 horas. Se centrifugó a 14,000 rpm en la centrifuga eppendorf 5415C por un minuto y se descartó el sobrenadante para lavar con el etanol al 70%, se repitió otra centrifugación y se descartó el sobrenadante para eliminar los restos de etanol, se resuspendió el sedimento en 50 μl de dH_2O . Teniendo el gen y el vector purificados se consideraron listos para la ligación de ambos.

V. 9 Ligación del vector pComb3x mas esat- 6 y su electroporación.

La cantidad de vector que se utilizó fueron 110 ng y 130 ng para el inserto. Se realizaron tres ligaciones para poder tener control negativo, la primera fue vector mas inserto, la segunda fue el vector con ligasa sin inserto y el tercero fue el vector sin ligasa. Las mezclas de reacción fueron las siguientes (Tablas V, VI y VII).

Tabla V. Mezcla de reacción para la ligación de vector mas inserto.

Componente	Cantidad
Inserto 130ng	13 μ l
Vector 110ng	1 μ l
Buffer	4 μ l
T4 ligasa	1 μ l; 20 U
H ₂ O	2 μ l

Tabla VI. Mezcla de reacción para la ligación de vector sin inserto.

Componente	Cantidad
Inserto 130ng	-
Vector 110ng	1 μ l
Buffer	4 μ l
T4 ligasa	1 μ l; 20 U
H ₂ O	14 μ l

Tabla VII. Mezcla de reacción para la ligación de vector sin ligasa.

Componente	Cantidad
Inserto 130ng	-
Vector 110ng	1 μ l
Buffer	4 μ l
T4 ligasa	-
H ₂ O	15 μ l

Ya teniendo todas las reacciones preparadas se dejaron reaccionar toda la noche a 4°C para continuar con la electroporación.

Las cepas que se utilizaron para la transformación fueron *E.coli* TOP-10, se mezclaron 50 μ l de las cepas y 5 μ l de la ligación y se colocaron en hielo para que las bacterias no se murieran, las celdas para electroporar debieron de estar previamente frías ya que ahí se pasaron las ligaciones, cada una con su respectiva celda, ahí recibieron el choque eléctrico del electroporador Biorad ®

que se utilizó (a este proceso se le conoce como electroporación). Inmediatamente después de la transformación se pasaron las bacterias a tubos cónicos con 3 ml de medio SOC, se preparó de la siguiente manera: en 950 ml de H₂O destilada se le agregaron 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0.5 g de NaCl, se mezclaron bien hasta que se disolvieron y se ajustó el pH con NaOH, ya teniendo el pH ajustado se llevó a 1 L con H₂O destilada. Se esterilizó en la autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos a 121°C. Después de esterilizarlo se dejó enfriar un poco y se le agregaron 10 ml de MgCl₂ 1 M esteril. Se tomaron 50 ml del medio y se le agregó 1 ml de glucosa 1 M esteril para dejarlo a una concentración de 20 mM. Ya preparado el SOC se pusieron a crecer en agitación a 250 rpm durante 1 hora a 37°C las bacterias. Después de la hora se tomaron 50 µl se pasaron a tubos cónicos con 3 ml de medio SB (Super Broth) que se preparó de la siguiente manera: se combinaron 32 g de triptona, 20 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 5 ml de NaOH 1 N, se llevó a 1 L con H₂O destilada y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos a 121°C, después de esterilizar se dejó enfriar para agregarle el antibiótico carbencilina a una concentración final de 100 µg/ml. Se dejaron en agitación a 250 rpm los tubos para dejarlo creciendo toda la noche a 37°C.

V. 10 Tamizado (screening)

Se prepararon cajas petri con medio LB (Luria Bertani) donde se mezclaron 15 g de agar, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 1ml de NaOH, se aforó a 1L con H₂O destilada, se esterilizó a 15 libras de presión durante 15 minutos a 121°C, el medio se dejó enfriar para agregarle carbencilina a una concentración final de 100 µg/ml. El medio se vertió en las cajas, cuando solidificaron, se sembraron ahí las bacterias ya transformadas para dejarlas en la incubadora toda la noche a 37°C. y después empezar la búsqueda por la clona que si tuvo el inserto. Las cantidades fueron 10 µl y 100 µl por cada ligación. Para buscar que bacteria presentaba el inserto se tuvo que hacer un PCR de colonias, se seleccionaron al azar las 15 colonias y la mezcla de reacción fue la siguiente (Tabla VIII).

Tabla VIII. Mezcla de reacción para el PCR de colonia

Componente	Cantidad
Colonia	1
dNTP's 2.5mM	2.5 µl
MgCl ₂	5 µl
Buffer 10x	4 µl
Iniciador sentido	0.75 µl; 20mM
Iniciador antisentido	0.75 µl; 20mM
Taq polimerasa	0.625 u
H ₂ O	10 µl

Nota: las reacciones son de 20µl para cada clona

De las clonas que salieron positivas (con el inserto) se pusieron a crecer de nuevo en tubos cónicos en medio SB con carbencilina toda la noche en agitación

a 250 rpm a 37°C y se sembraron en cajas LB con carbencilina para tener el respaldo de las colonias positivas.

V. 11 Expresión del Antígeno de Secreción Temprana – 6.

En matraces estériles de 150 ml se pusieron 50 ml de medio SB con carbencilina y se le agregaron 50 µl del cultivo de cada clona, se dejaron en agitación a 250 rpm durante 2 horas. Después de las dos horas se empezó a leer en el espectrofotómetro la densidad óptica del cultivo que debe ser 0.7ua ya que es el óptimo crecimiento en el estado exponencial de las bacterias, y así se empezó la inducción aplicándole IPTG (isopropil β-D-tiogalactosido) y se dejó creciendo toda la noche en agitación a 250 rpm a 37°C. Se tomaron los cultivos y se pasaron a tubos cónicos de 50 ml, para así centrifugarlos en la centrífuga refrigerada 30 minutos a 3000 rpm, los sobrenadantes se pasaron a otro tubo para congelarlos y los sedimentos se utilizaron para la extracción periplásmica. Los sedimentos se resuspendieron en 100 µl de buffer Spherplast 1X y se colocaron en frío durante 20 minutos después se centrifugó a 15 minutos y el sobrenadante se recolectó en otro tubo. Los sedimentos se resuspendieron en 100 µl de MgSO₄ y se colocaron en hielo otros 20 minutos, se repitieron los mismo pasos que anteriormente y se juntó el sobrenandante de esta segunda centrifugación con el sobrenandante de la primera y el sedimento se pudo descartar.

V. 12 ELISA de expresión.

Este pocedimiento es recomendable realizarlo ya que puede diferenciar por medio de colorimetría si existió expresión, ya que se genera un complejo antígeno-anticuerpo. En una placa de ELISA se colocaron 50 µl en cada pozo por triplicado de las muestras obtenidas de la expresión. Se dejaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se desechó la muestra y se colocó a cada pozo 150 µl BSA (albumina serica bovina) al 3% y se dejó toda la noche a 4°C. Se desechó el BSA al 3%, y se colocaron 50 µl de anticuerpo anti HA diluido 1:2000 en BSA al 1%, se incubó 1 h a 37°C, después se lavó 5 veces con PBS 1X (solución salina de fosfatos) con Tween 20 al 0.5% y dos lavados con H₂O destilada. Se le agregó a cada pozo para revelar buffer de peroxidasa y se dejó en la oscuridad hasta que los pozos presentaron un color distinto.

V. 13 Gel de acrilamida y Western Blot

Para la separación de las proteínas se preparó un gel de acrilamida , en donde la concentración del gel fue de 18% ya que el tamaño de la proteína es pequeño, 6 KDa. Las concentraciones fueron las siguientes para 10 ml de gel (Tabla IX).

Tabla IX. Mezcla para el gel de acrilamida a la concentración de 18%.

Componentes	Separador	Concentrador
Acrilamida 30%	6 ml	1.3 ml
Buffer Tris-Cl/SDS pH 8.8	2.5 ml	-
Buffer Tris-Cl/SDS pH 6.8	-	2.5ml
SDS 10%	100 μ l	100 μ l
Persulfato de amonio PSA 10%	50 μ l	50 μ l
TEMED	40 μ l	15 μ l
H ₂ O	1.4 ml	6ml

Primero se mezclaron los componentes para hacer el gel separador, primero se colocó el H₂O destilada en un tubo cónico, se le agregó el buffer Tris-Cl/SDS, SDS al 10% y la acrilamida al 30%, esto es porque al mezclar el PSA y el TEMED inmediatamente empieza la polimerización del gel, entonces estos dos se agregan al final, agregando el TEMED al final, ya para verter la mezcla a los vidrios que son el molde para el gel, cuando se solidificó se mezclaron los componentes para el gel concentrador con las mismas condiciones que lo anterior, se vertió encima del gel separador, igual se dejó solidificar. Ya hecho el gel se pasó a la cámara de electroforesis para montarlo.

Las muestras que se corrieron fueron las mismas que se utilizaron para hacer el ELISA de expresión. Se tomaron 15 μ l de muestra y 2.5 μ l de buffer de cargado y se calentaron 5 minutos a 50°C para desnaturalizar las proteínas. De ahí se cargaron en el gel ya montado en la cámara y se corrieron a 60 volts

durante 5 horas aproximadamente.

Ya teniendo el gel, en vez de teñirlo se utilizó para el western blot. Esto fue porque western blotting puede detectar una sola proteína de interés en una mezcla de un sin número de proteínas, así como información acerca de cuanta proteína se ha acumulado en una célula. Este método depende de la utilización de un anticuerpo dirigido contra la proteína deseada, tal es el caso también de la expresión por medio de ELISA.

Se preparó el buffer de electrotransferencia combinando 14.9 g de glicina 39 mM, 2.9 g de tris-base 48 mM y 0.19 g de SDS 0.04 %, se le agregó 100 ml de metanol, se trajo a 500 ml con H₂O. Se vertió dentro de la cámara, el gel y una membrana de celulosa que tiene carga positiva, se colocaron entre dos filtros y se metieron a la cámara para empezar con la transferencia, se dejó ahí toda la noche. Se sacó la membrana de la cámara y se puso en un recipiente con BSA 3 % tapado en agitación durante 4 horas para bloquear. Después de las 4 horas se le agregó BSA 1% con el anticuerpo anti HA 1:3000 y se dejó en agitación durante 3 horas y 1 h en la incubadora a 37°C. Se le dieron 5 lavados a la membrana con Tween al 0.5%.

Fue necesario medir la membrana para calcular la cantidad de sustrato que se le iba a agregar. La membrana de celulosa midió 48 cm², Se prepararon 0.25 ml de reactivo/cm², por lo tanto, se mezclaron 9 ml de H₂O más 1ml de opti-4CN y 0.2 ml de opti-4CN sustrato. Ya preparado el sustrato se le aplicó a la membrana y se dejó 30 minutos en agitación hasta que desarrollo color.

V. 14 Purificación del Antígeno ESAT-6 por medio de HPLC.

La purificación de la proteína se realizó por medio de HPLC, al igual que la separación de las demás proteínas presentes en la muestra. Esto se hizo mediante una columna analítica Vydac C-18, con una precolumna Zorbax C-18. Se inyectó dentro de la columna 20 μ l de muestra a la columna en un aparato HPLC (agilent 110). La muestra se eluyó a temperatura ambiente durante durante 60 minutos, bajo un gradiente lineal de 0 a 60% de amortiguador B (ácido trifluoroacético: TFA al 0.12%, con acetonitrilo al 0.5%) con un incremento de 1% de amortiguador B por minuto, con el flujo de 1 ml por minuto. La detección de las proteínas se realizó a una longitud de onda de 230nm. En la figura 5 se puede observar el funcionamiento del HPLC.

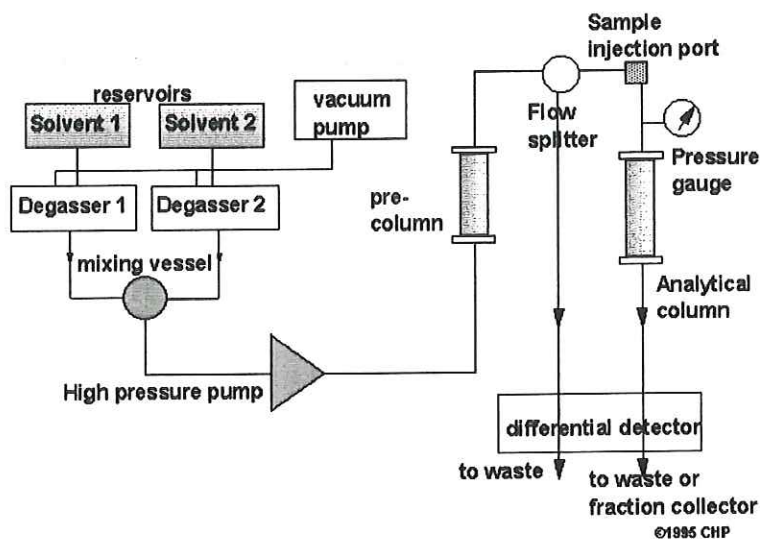


Figura 5. Esquema del funcionamiento del HPLC.
(<http://www.elchem.kaist.ac.kr/vt/chmed/sep/lc/hplc.htm>)

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VI. 1 Obtención y Purificación del plásmido pComb3x.

Se puede observar que en el gel de agarosa al 1% (figura 6) donde se corrieron 10 μ l de muestras del vector aislado, esto para tener la seguridad de que se aisló el vector o hacer una estimación de la cantidad de pares de bases que lo conforma. Según la escalera la banda del plásmido es de 5000 pares de bases aproximadamente, ya teniendo ésto le siguió la purificación, en donde se eliminaron los restos celulares quedando puro el ADN del plásmido, en este proceso si se llega a perder una cantidad considerable de muestra.

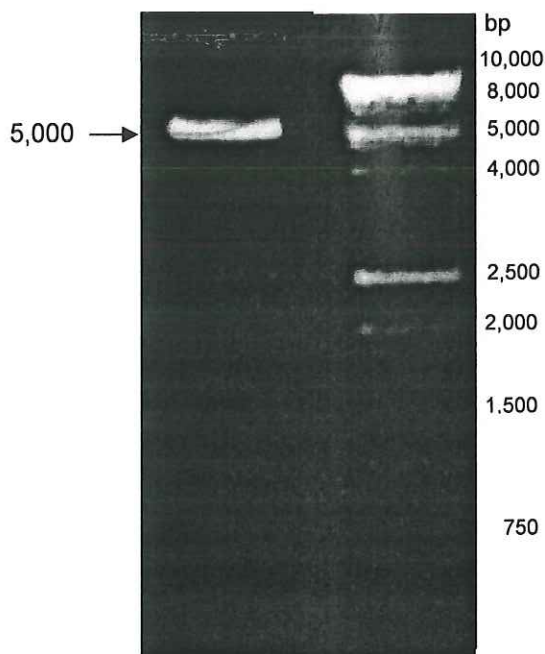


Figura 6. Gel de agarosa al 1%. En el carril derecho marcador Benchtop 1 kb ADN. Carril izquierdo plásmido purificado de 5 kb.

Existieron ciertas complicaciones a la hora de aislar el vector, típicamente los primero intentos no tuvieron resultados positivos, o el control negativo resultaba ser positivo, obviamente se tomaron en consideración estos falsos resultados para analizarse con determinación y así poder corregir el error. Después de varios intentos, se aisló con éxito.

VI. 2 Cuantificación del plásmido.

La razón del por qué se realizaron varias lecturas es que en ocasiones no es confiable el espectrofotómetro porque siempre hay variaciones en cada lectura por eso es recomendable hacer varias lecturas y sacar un promedio. Estas fueron las lecturas de la concentración del plásmido a 260 nm (Tabla X).

Tabla X. Lecturas de la concentración del plásmido.

Lectura	Concentración
1	129.8749 µg/ml
2	134.5521 µg/ml
3	139.7145 µg/ml
4	128.7222 µg/ml
Promedio	133.2159 µg/ml

VI. 3 Aislamiento y purificación del antígeno de secreción temprana – 6

Al aislar el gen esat-6 después del PCR, se corrió en un gel de 2% para observar si el aislamiento del gen fue positivo, la banda que se observó era aproximadamente de 300 pares de bases como la bibliografía lo había indicado (Figura 7). Teniendo el gen aislado se realizó otro PCR para obtener más cantidad de muestra y así pasar a la purificación de la misma.

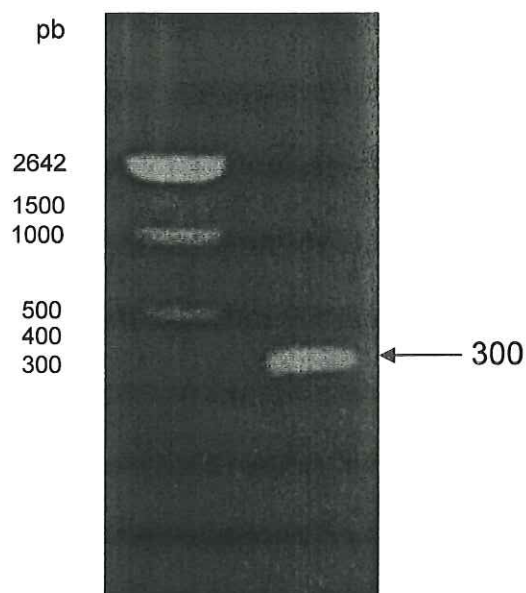


Figura 7. Gel de agarosa al 2%. En el carril izquierdo marcador de peso molecular XIV, carril derecho gen que codifica para esat-6 puro.

VI. 4 Cuantificación de esat-6

Este proceso se realizó exactamente igual para la cuantificación del plásmido. Estas son las lecturas (Tabla XI).

Tabla XI. Lecturas de la concentración de ESAT-6

Lectura	Concentración
1	32.9554 µg/ml
2	47.1377 µg/ml
3	58.2927 µg/ml
4	58.7755 µg/ml
Promedio	49.2903 µg/ml

Ya teniendo las concentraciones tanto de esat-6 y del vector se pasan al termociclador para la digestión de ambos con enzimas de restricción, en este caso fue con *Sfi1*.

VI. 5 Digestión de pComb3x y esat- 6.

La digestión es necesaria porque en este paso dentro del plásmido las enzimas de restricción cortan en donde el inserto (gen) se va a introducir dentro de su genoma para poderlo expresar. En la figura 8 se puede observar el tamaño del plásmido y una estimación a su cantidad de pares de bases, como ven no se cambia mucho el tamaño del vector utilizado porque es pequeño el fragmento que se digiere. Para esat-6 ocurrió lo mismo pero aquí es tan pequeño el fragmento digerido que ni siquiera se alcanza a percibir. En la figura 9 está el gel de agarosa al 2% con la muestra digerida de esat-6 teniendo una banda del tamaño esperado. Observando que las bandas estuvieran presentes se produjo más muestra para tener suficiente para la purificación porque siempre se pierde un poco en el procedimiento.

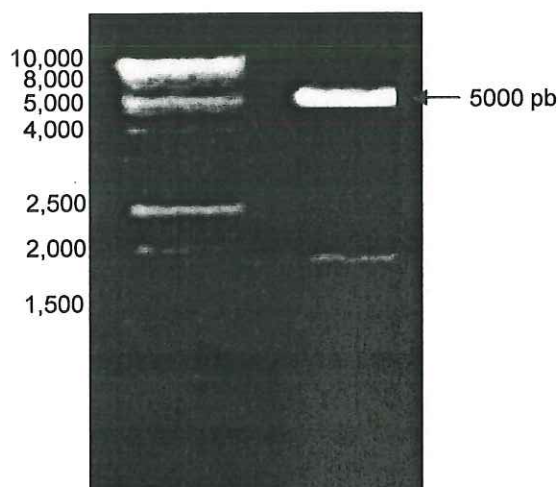


Figura 8. Carril izquierdo marcador Benchtop 1kb ADN, carril derecho plásmido digerido.

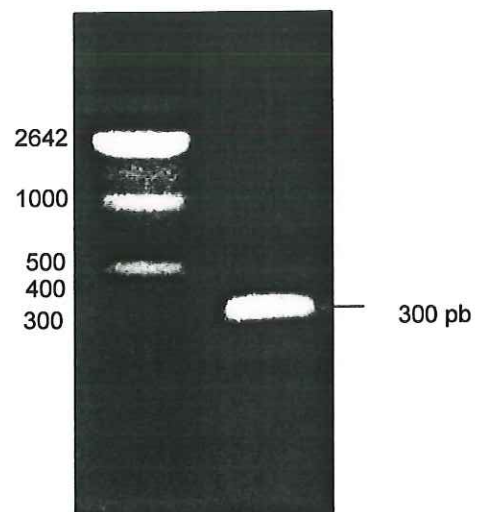


Figura 9. carril izquierdo marcador de peso molecular XIV, carril derecho esat-6 digerido.

VI. 6 Purificación del plásmido pComb3x y ESAT-6 digeridos por el método de congelamiento y maceración.

Después de la digestión se purificó de nuevo el producto para quitarle los restos de fragmentos que quedaron de ADN tanto del plásmido como del gen para que no interfirieran con la ligación. Se corrieron aproximadamente 500 μ l de muestra de esat-6, al terminar de correr la banda se cortó y se dividió en dos tubos ependorff. Después de congelarse y homogenizarse para obtener la mayor cantidad de muestra se precipitó el ADN con 30 μ l de acetato de sodio 3 M pH 4.8 y 600 μ l de etanol al 100%. Se dejaron a -80°C para precipitarlos. Se centrifugaron las muestras a 14,000 rpm durante 5 minutos y se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó para poder resuspender las muestras en 50 μ l de H_2O destilada. En la figura 10 se observa como quedó el gel preparativo, en este caso fue de esat-6 con el tamaño deseado. Para el plásmido fueron las mismas cantidades y se realizó el mismo protocolo de purificación.

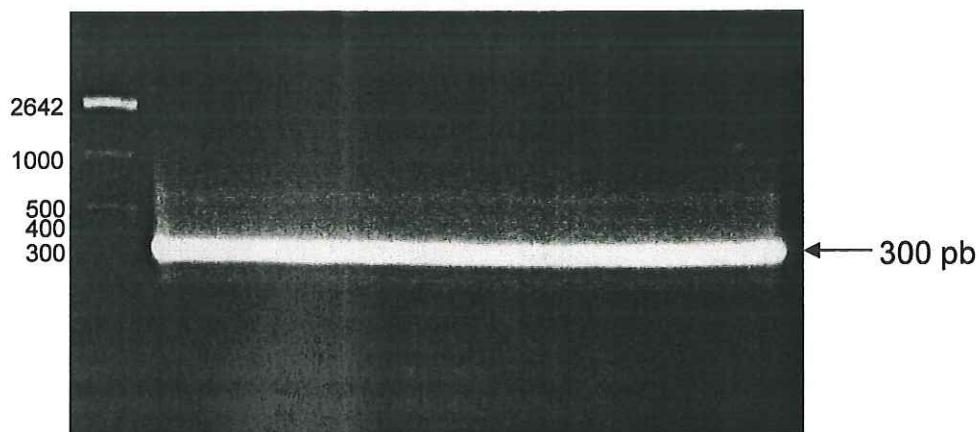


Figura 10. Gel preparativo con la muestra del gen que codifica para esat- 6, para la purificación del mismo.

Ya purificadas las muestras fue recomendable realizar otro gel de agarosa al 2% con la muestra purificada para tener la seguridad que quedó buena cantidad de muestra y una calidad favorable.

VI. 7 Tamizado (Screening)

En la metodología se mencionaron las clonas que salieron positivas para describir el procedimiento, pero aquí se explica con más detalle. Existieron muchas complicaciones a la hora de buscar las clonas positivas. En el primer intento salieron falsos positivos ya que en la muestra de vector sin ligasa a 10 µl crecieron 168 colonias y a 100 µl creció una mayor cantidad que se consideraron incontables. En el ligado solo, o sea el vector con ligasa solo crecieron 2 colonias a 10 µl y a 100 µl crecieron 4 colonias, en este caso se podían tomar como un resultado bueno, y la ligación más importante que era vector más inserto crecieron 146 colonias a 10 µl y a 100 µl crecieron tantas que no fue posible contarlas (incontables). Con ésto se analizó que no podían tomarse estos resultados como positivos por el hecho que en la muestra de vector sin ligasa hubo mucho crecimiento de colonias, en donde no debió de haber crecimiento, por otra parte, en la muestra de ligado solo, aunque fue mínimo, el resultado pero existió crecimiento. Posiblemente el resultado de este intento fué porque hubo contaminación a la hora de la electroporación o la otra razón fue una mala digestión, en donde la enzima de restricción no trabajó al óptimo o perdió actividad. Se realizaron varias ligaciones ya que no se podían obtener

buenos resultados y la última ligación que se realizó, los resultados fueron los siguientes: en el ligado de vector más inserto crecieron 25 colonias a 10 μ l y, en la muestra de ligado solo y sin ligasa no hubo crecimiento. Después de tantos intentos fallidos, se puede observar en la figura 11 el resultado positivo de las 25 colonias después de sembrar la ligación. Sin embargo, entre menos colonias existan menor es la probabilidad de encontrar una clona positiva, pero según la bibliografía con solo una clona positiva es suficiente para expresar la proteína de interés. En la figura 12 y 13 los resultados fueron como se esperaron, en las cajas no hubo crecimiento alguno.

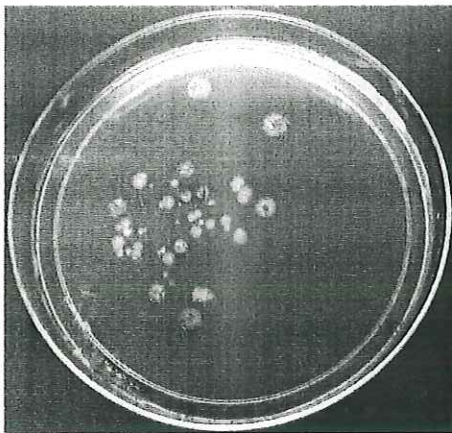


Figura 11. Top 10 crecidas después de 12h donde se encuentran las clonas positivas con inserto.

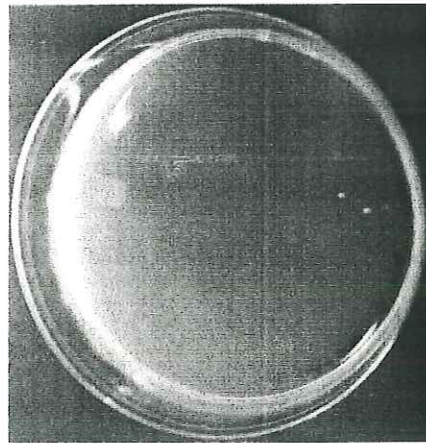


Figura 12. Caja donde se sembró el vector sin inserto con ligasa.

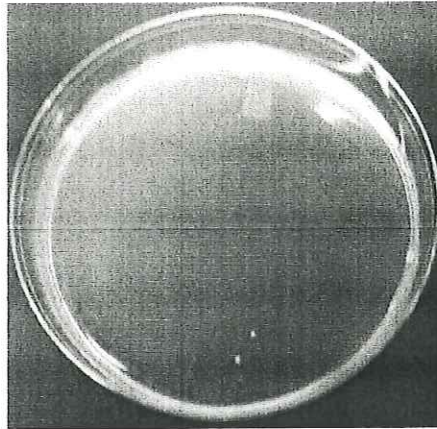


Figura 13. Caja donde se sembró el vector sin inserto y sin ligasa.

Con ésto se pudo continuar con el siguiente paso que fue el PCR de colonia para tener la certeza que realmente estaba unido el inserto al vector. Se tomaron 15 colonias al azar para el PCR, la clona 1, 2, 6 y 7 salieron positivas, por consiguiente con esas se trabajó para la expresión de las proteínas. En la figura 14 se pueden observar las bandas de cada clona en donde esta la banda de aproximadamente 300 pb que corresponde al gen de esat-6.

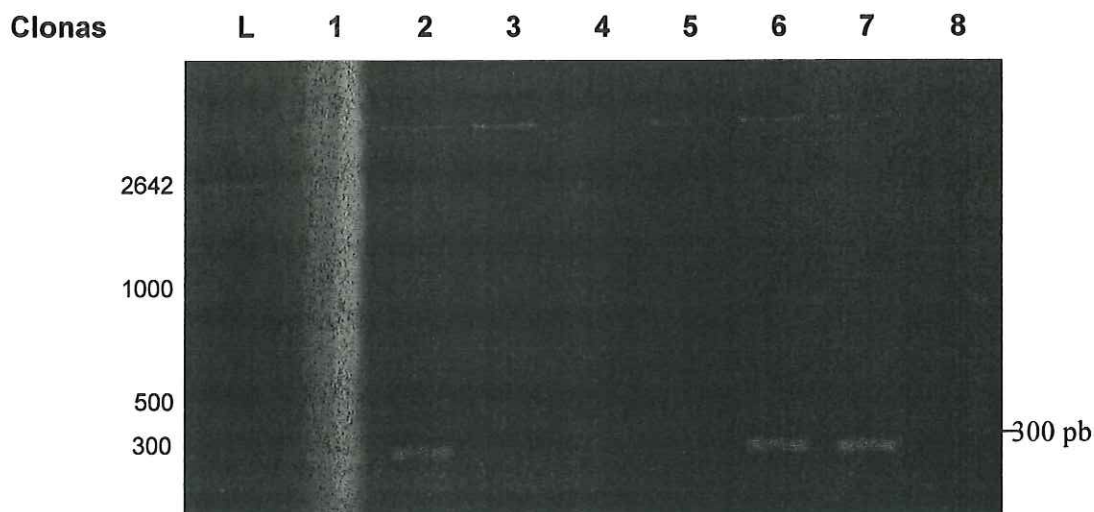


Figura 14. Gel de 2% con las clonas positivas con el inserto. El marcador no se aprecia por la resolución de la foto, pero es el marcador de peso molecular XIV.

VI. 8 Expresión del antígeno de secreción temprana 6

Después de la inducción con IPTG, y que se realizó la extracción periplásmica porque la proteína se encuentra en el periplasma de la micobacteria, se obtuvo la cantidad de 300 μ l de cada clona aproximadamente. De aquí se realizó el ELISA de expresión para verificar si las bacterias TOP-10 expresaron la proteína. El resultado del ELISA fue el siguiente: Figura 15.

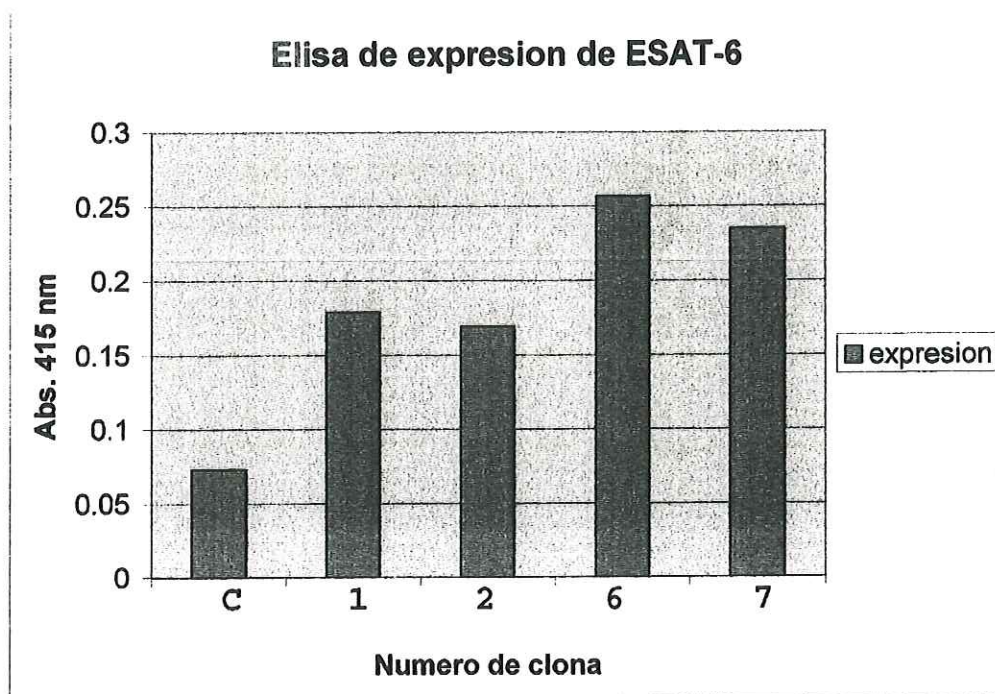


Figura 15. Gráfica con los resultados del ELISA de expresión.

Se puede observar que las clonas 6 y 7 son las que presentaron expresión, sin embargo la cantidad no fue muy alta. Como fue muy poca la cantidad lo más conveniente fue realizar un western blot para tener la seguridad que si estaba la proteína expresada. Para ésto se corrió un gel de acrilamida al 18% como se indicó en la metodología, el resultado no fue bueno ya que no se observó ninguna banda que hiciera pensar que si estaba la proteína expresada. Se repitieron los experimentos desde la inducción, ya que con el PCR exitió la seguridad que efectivamente si había clonas positivas. Se preparó nuevo IPTG pensando que quizá éste había perdido su funcionamiento de inducir la expresión, cuidando perfectamente todos los pasos del procedimiento, se realizaron dos geles de acrilamida, uno para teñirlo con azul de coommasie y el

otro para hacer otro western blot. El resultado del gel teñido fue negativo ya que no se observó la banda del tamaño esperado (figura 16).

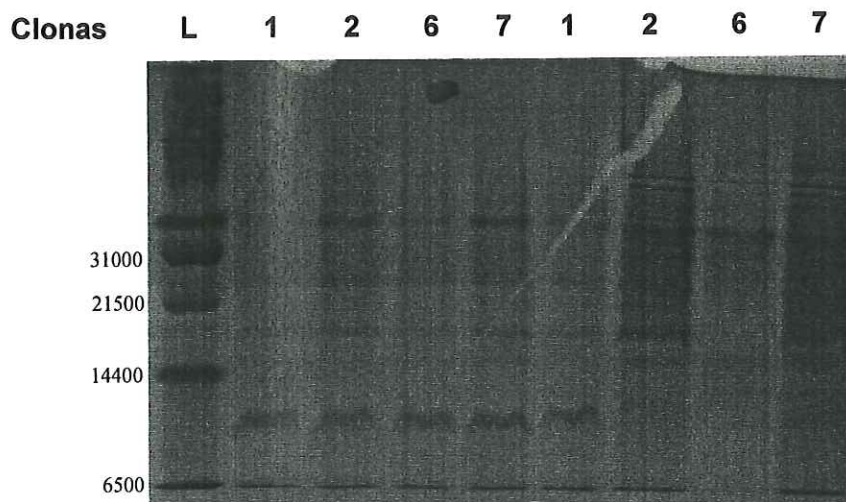


Figura 16. Gel de acrilamida al 18% sin resultados positivos

Con el otro gel se volvió a correr un western blot esperando obtener un resultado positivo pero no se observó ninguna banda parecida al tamaño de la proteína ESAT-6. No se podían obtener resultados positivos sin embargo las clonas seguían estando positivas después de someterlas varias veces al PCR. Por lo tanto se decidió continuar con la purificación por los resultados que se siguieron obteniendo, tanto del ELISA como del PCR. Esos resultados nos indicaban que sí existía expresión pero a la hora de realizar el western blot y el gel de acrilamida los resultados salían negativos, entonces se tenía el 50% de los resultados positivos y el 50% de los resultados negativos, por eso mismo se siguió con la purificación de la

proteína por medio de HPLC. Con este procedimiento se iba a tener la seguridad si hubo expresión o no.

VI. 9 Purificación del Antígeno de secreción temprana 6 (ESAT-6) por medio de HPLC.

Aun teniendo resultado positivos y negativos de que sí hubo expresión se decidió seguir con el protocolo de purificación y así observar con las gráficas que resultados se obtuvieron.

En la primera gráfica (figura 17) está la purificación del control, esto fue simplemente TOP 10' sin inducir con IPTG, porque era necesario comparar las clonas con un patrón evidentemente desigual al que iban a presentar las clonas. Después de correr la clona 1 y analizar su resultado se comparó con el control y en la gráfica se encimó con el resultado del control. Se observó lo siguiente: (figura 18) no hubo cambio alguno en ninguno de los picos, todo fue igual conforme pasaba el tiempo e iba cambiando la concentración de buffer B. Para las siguientes clonas 2, 6 y 7 los resultados fueron exactamente los mismos, sin ninguna variación. Como se puede observar en las figuras 17, 18, 19, 20 y 21.

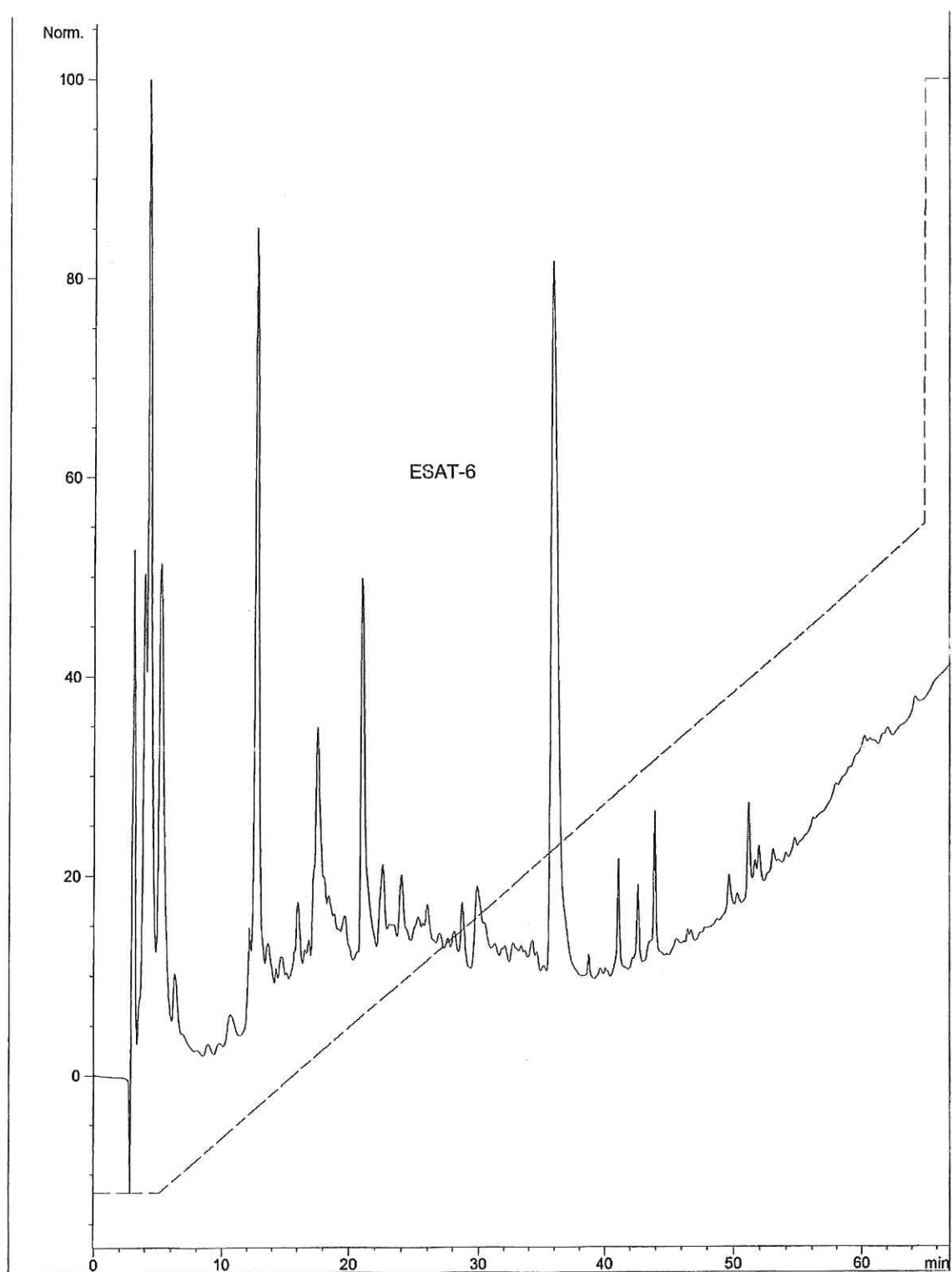


Figura 17. Muestra de top 10 sin inducir (control)

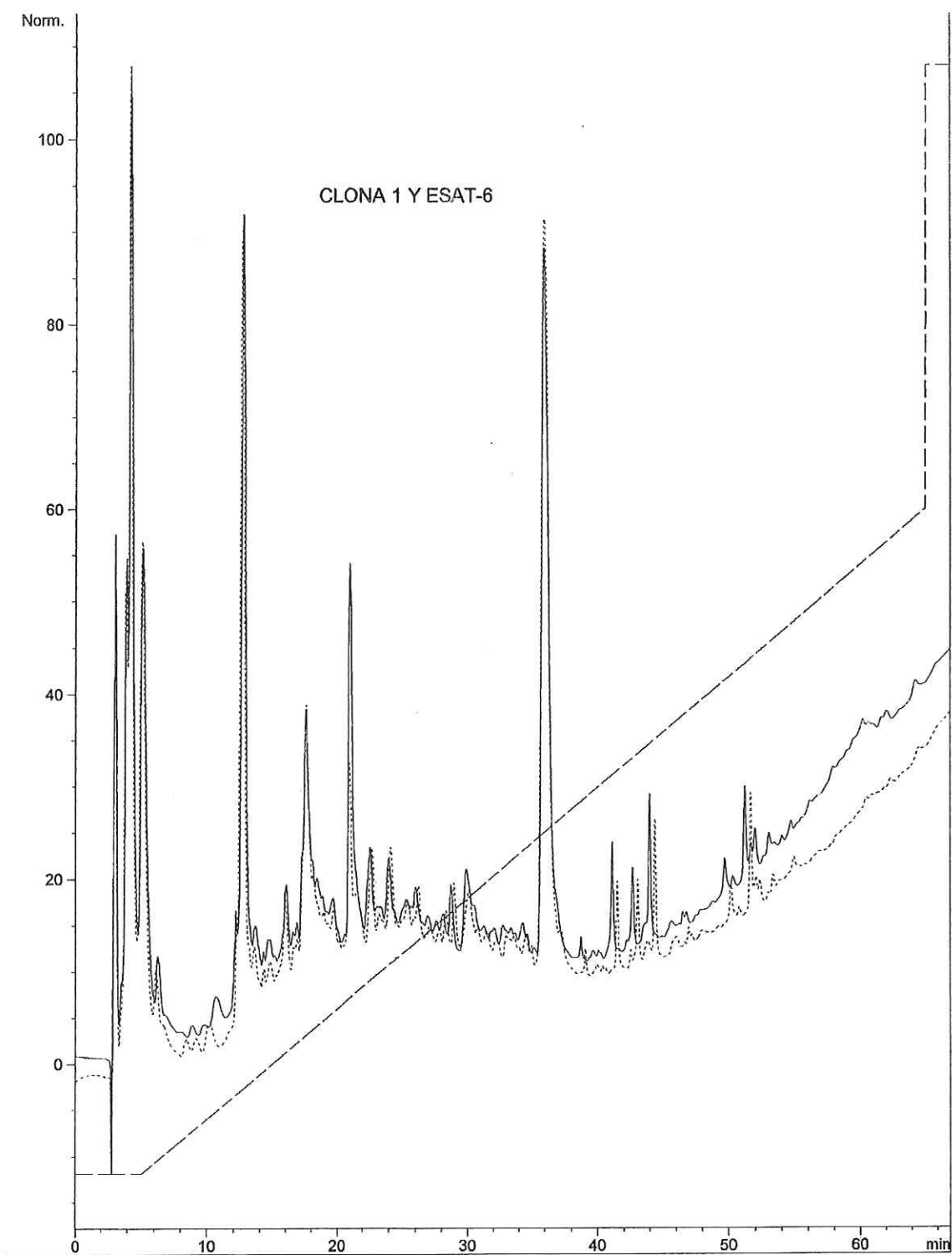


Figura 18. Grafica del resultado de la purificación con HPLC de la Clona 1 en comparación con el control.

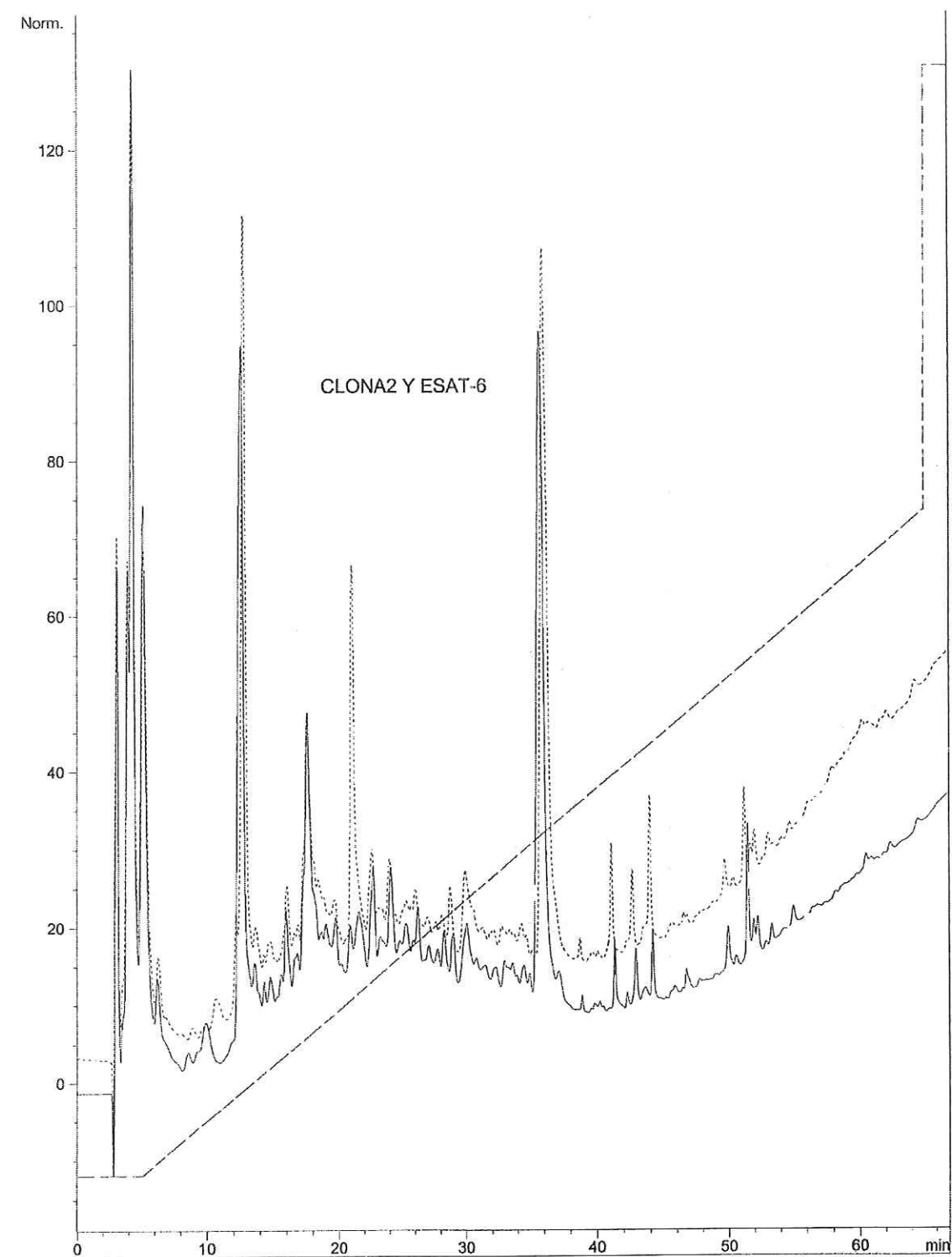


Figura 19. Gráfica del resultado de la purificación con HPLC de la Clona 2 en comparación con el control.

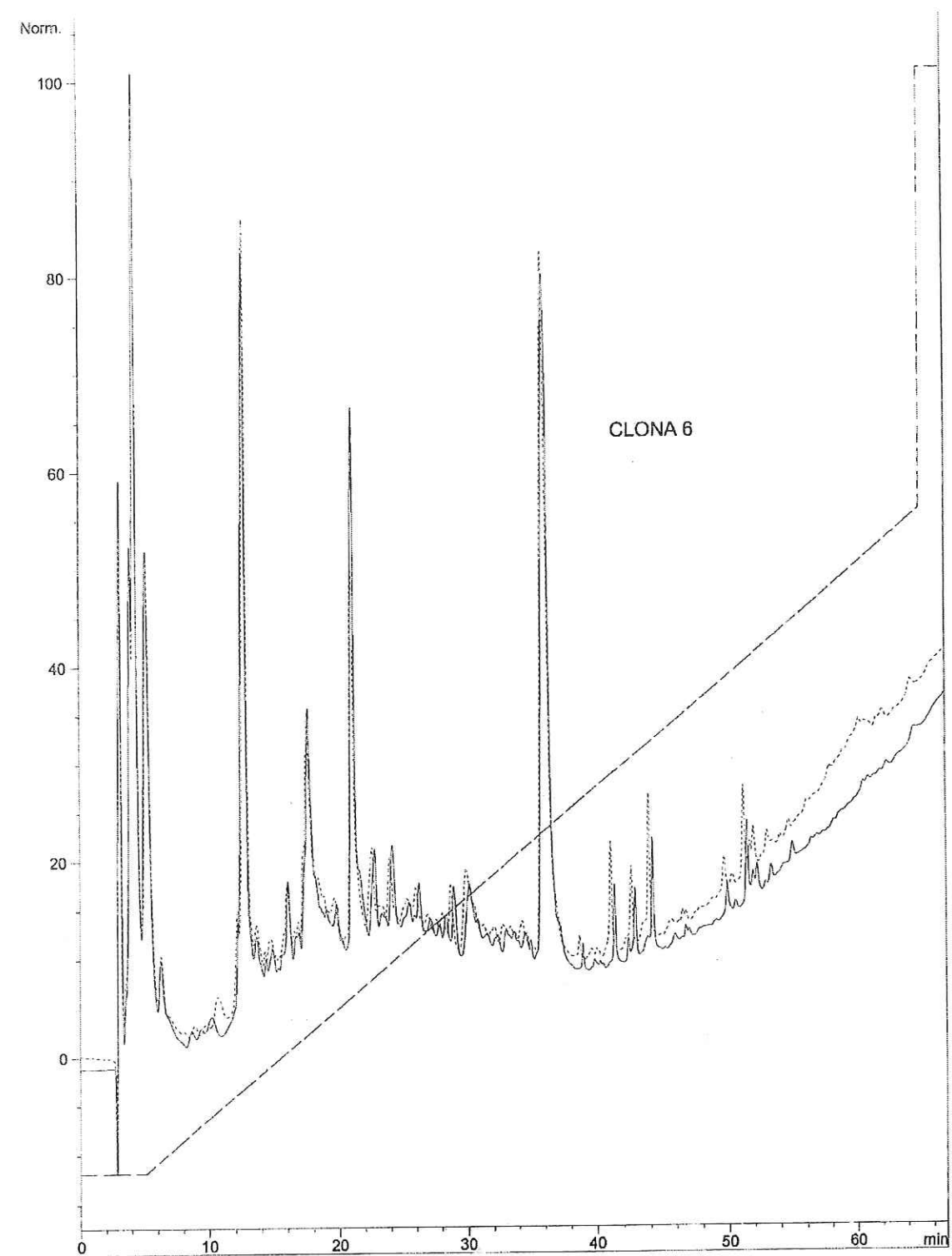


Figura 20. Gráfica del resultado de la purificación con HPLC de la Clona 6 en comparación con el control.

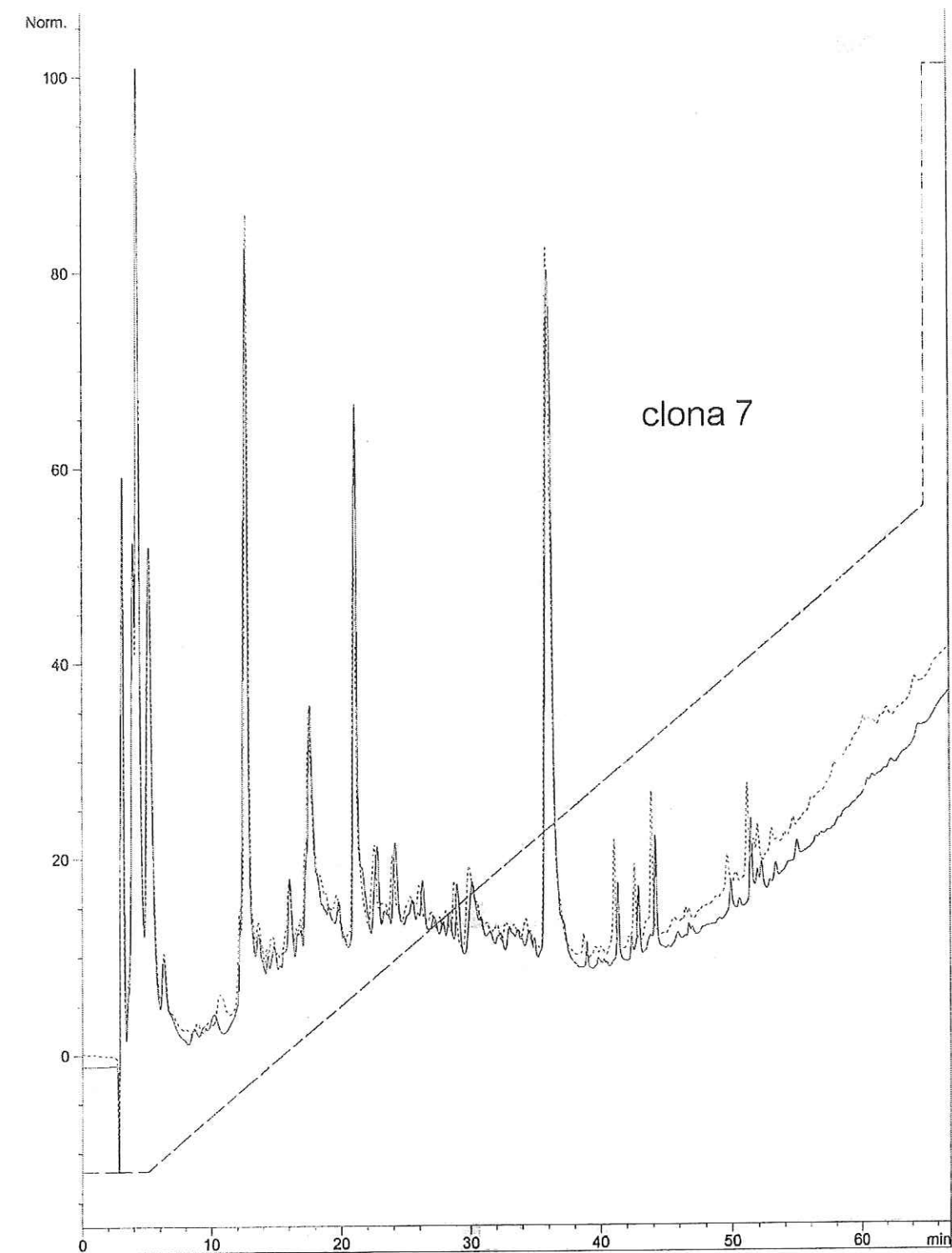


Figura 21. Gráfica del resultado de la purificación con HPLC de la Clona 7 en comparación con el control.

CONCLUSIONES

- Utilizando una muestra de *Mycobacterium tuberculosis* se logró aislar el gen que codifica para el antígeno de secreción temprana 6 (esat-6) con iniciadores específicos, por medio de PCR.
- Fue posible clonar esat-6 en un vector de expresión que fue pComb3x ya que según la literatura es el más eficiente para expresar proteínas solubles por las características que presenta, además, fue eficiente la transformación en la cepa TOP 10' ya que hubo clonas positivas.
- No se logró la purificación del antígeno de secreción temprana 6 (ESAT-6) ya que la expresión de la proteína no fue favorable, aunque en ciertos aspectos del trabajo experimental existieron indicios que sí hubo expresión, como el resultado del ELISA, todos los demás procedimientos indicaron lo contrario. Esto pudo ser porque en el PCR al estar amplificando haya ocurrido una mutación y haber cambiado un par de base por otro, esto puede causar que cambie la secuencia en un fragmento del gen y en ocasiones que sí se amplifique pero no con la secuencia que codifica para la proteína de interés.

PERSPECTIVAS.

- Seguir trabajando con este gen que codifica para el antígeno de secreción temprana 6.
- Mandar a secuenciar el gen para verificar que se encuentre en fase y así poder purificarlo.
- Expresar la construcción en otras cepas de *E. coli*.
- Teniendo la proteína purificada, este antígeno puede ser utilizado para inmunizar animales y poder obtener anticuerpos contra ESAT-6 y poderlos utilizar como prueba de diagnóstico para la tuberculosis.

BIBLIOGRAFIA

- Barbas C., D. Burton, J. Scott, G. Silverman. 2001. Phage Display a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. United States of America. pp 23-32
- Brandt L., M. Elhay, I. Rosenkrands, E. Lindblad y P. Andersen. 2000. "ESAT-6 Subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*". Infection and Immunity. 21: 791-95
- Doherty M., A. Demissie, J. Olobo, D. Wolday, S. Britton, T. Eguale, P. Ravn y P. Andersen. 2002. "Immune responses to the *Mycobacterium* specific antigen ESAT-6 using signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients". Journal of Clinical Microbiology. 21: 704-706
- Gey van Pittius N., J. Gamielien, H. Winston, G. Brown, R. Siezen y A. Beyers. 2001. "The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram- positive bacteria". Genome Biology 10: 2-8
- Landeros-Sanchez B. 2000. "Desarrollo de un ensayo de diagnóstico para la detección de *M. tuberculosis* utilizando Nested PCR". Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana Baja California. pp 71
- Laniado R., M. Rosales y A. Licea Navarro. 2001. "Diagnóstico de tuberculosis mediante detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando un sistema no comercial de reacción en cadena de la polimerasa". Revista del instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de Mexico. 1: 22-26

- Moran M., D. Acevez, P. Peña Montes de Oca y J. Corona. 2000. "Detection of *Mycobacterium tuberculosis* with polymerase chain reaction in a selected population in northwestern Mexico". Revista Panamericana de Salud Publica , 6: 389-394
- Navarro-Armenta, 2004. Desarrollo de un método de detección de *Mycobacterium tuberculosis* empleando hemoaglutinación por medio de anticuerpos recombinantes. CICESE. Tesis de maestría. Pp 20-35
- Pacheco. C, 1992. "Vacunas, Ciencia y Salud. Secretaría de Salud. México, D. F. Secretaría de Salud. Dic. Tab. Vacuna de Bacilo Calmatte y Guerin. Pp 187-201
- Pixteren L., P. Ravn, E. Agger, J. Pollok y P. Andersern. 2000. "Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10". Infection and Immunity. 7:155-160p
- Vekemans J., C. Lienhardt, J. Sillah, J. Wheeler, G. Lahai, M. Doherty, T. Corrah, P. Anderser, K. McAdam y A. Marchant. 2001. "Tuberculosis contacts but not patients have higher gamma interferon responses to ESAT-6 than do community controls in the Gambia". Infection and Immunity. 10: 6554-6557
- Villalba. J. 1999. Diez problemas relevantes de salud pública en México. Fondo de Cultura Económica. México D.F. 373.
- Zinsser, T. 1976. Microbiology. Editorial Ibeoroamericana, S.A de C.V pp 168-205

Lista de sitios de internet consultados.

<http://www.ssa.gob.mx>

<http://www.pulmonogychannel.com/tuberculosis>

<http://www.drscope.com/privados/pac/pediatrica/pb15/tuberculosis.html>

<http://www.niaid.nih.gov/dir/labs/lhd/barry.htm>

<http://www.elchem.kaist.ac.kr/vt/chmed/sep/lc/hplc.htm>

<http://www.w3.whosea.org/tb/worldtoday.htm>

