52

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

"CONSTRUCCION DE BIBLIOTECAS DE EXPRESION DE CEPAS DE *Candida albicans* SENSIBLES Y RESISTENTES A DIFERENTES DROGAS ANTIFUNGICAS".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

AMANDA GAYOSSO VAZQUEZ

DIRECTOR: DR. JOSE ANTONIO ENCISO MORENO

IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX. 2001

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

DEDICATORIA

Especialmente a **María,** mi madre por ser una mujer extraordinaria y un ejemplo a seguir en mi vida. Gracias.

A **Felix**, mi padre con todo mi cariño y eterno agradecimiento.

A mis hermanos: **Ana**, **Silvia**, **Ruby**, **María Elena**, **Leticia**, **Catalina**, **Rodrigo**, **Rosy** y **Cesar** por su gran cariño y confianza en todos los momentos de mi vida.

A mi esposo **Alberto**, con amor, por su paciencia y sobre todo por su presencia incondicional a mi lado.

A mis amigos de licenciatura **Alberto, Oscar, Pilar, Edgar, Lupita** y **Juan Antonio**.

A mis profesores y amigos **Gerardo Ortíz** y **Alfonso Boyzo**, por los momentos de paz compartidos.

A mis amigos del laboratorio de Genética Molecular de la UNAM: **Refugio, Raúl, Noé, Hugo y Rogelio**.

A mis amigas del laboratorio de Biología Molecular de la UIMEIP: **Hilda, Norma y Gloria** por su compañerismo.

Con cariño y agradecimiento especial a mi amiga **Hilda** por su amistad a prueba de balas.

Al **Dr. José Antonio Enciso Moreno**, por sus consejos y enseñanzas, por el interés en la realización de este proyecto, por la espera involuntaria, pero sobre todo por tener confianza en mi. Mil gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Antonio Enciso Moreno, por permitirme realizar este trabajo de tesis profesional, bajo su valiosa asesoría, en el laboratorio a su cargo de Biología Molecular perteneciente a la Unidad de Investigación Medica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Medico Nacional Siglo XXI, IMSS.

A la M. en C. Hilda Alicia Valdez Salazar por el apoyo técnico en la realización de este proyecto.

CONTENIDO

	Página
I.- INTRODUCCION.	1
1.1.-Antecedentes.	1
1.2.- Biología de *Candida albicans.*	2
1.3.- Aspectos clínicos de la Candidosis.	3
1.3.1.- Epidemiología.	3
1.3.2.- Cuadro clínico.	5
1.3.3.- Diagnóstico.	6
1.3.4.- Tratamiento.	8
1.4.- Biología Molecular de *Candida albicans.*	9
1.4.1.-Bibliotecas de expresión	10
II.- JUSTIFICACION.	15
III.- OBJETIVO.	16
IV.- MATERIAL Y METODOS.	17
4.1.- Diagrama de flujo.	17
4.2.- Muestras biológicas.	18
4.3.- Cultivo de levaduras y obtención de esferoplastos.	19
4.4.- Extracción de RNA total.	19
4.4.1.- Cuantificación espectrofotométrica de RNA total.	20
4.4.2.- Separación electroforética de RNA total.	21
4.5.- Purificación de mRNA.	21
4.5.1.- Cuantificación espectrofotométrica de mRNA	22
4.6- Síntesis de cDNA.	22
4.6.1.- Síntesis de la primera cadena de cDNA.	22
4.6.2.- Síntesis de la segunda cadena de cDNA.	23
4.6.3.- Cuantificación de síntesis de 1ª cadena.	24
4.6.4.- Separación electroforética de síntesis de 1ª cadena.	24

4.7.- Preparación del cDNA de doble cadena para su clonación. 25
4.7.1.- Reparación de fragmentos de cDNA. 25
4.7.2.- Adición del adaptador *Sal I*. 25
4.7.3.- Digestión con *Not I*. 26
4.8.- Fraccionamiento por tamaño del cDNA. 26
4.8.1-Análisis electroforético de cDNA fraccionado por tamaño 27
4.9.- Ligación del cDNA al plásmido *pSPORT I*. 28
4.9.1.- Electroporación de los productos de clonación. 29
4.10.- Plaqueo y tamizaje de clonas recombinantes. 29
4.10.1.- Selección de recombinantes. 30
4.11.- Amplificación de bibliotecas construidas en plásmidos. 30
4.11.1.- Amplificación en medio semi-sólido. 30
4.12.- Ligación de cDNA al fago λ gt22A. 31
4.12.1.- Empacamiento *in vitro* del cDNA ligado. 31
4.13.- Preparación de las células césped *E. coli* Y1090. 31
4.14.- Plaqueo y selección de las clonas recombinantes en λ gt22A. 32
4.15.- Amplificación de las bibliotecas construidas en λgt22A. 33
V.- RESULTADOS. 34
5.1.- Rendimiento celular. 34
5.2.- Obtención de RNA total. 35
5.2.1.- Análisis electroforético de RNA total. 36
5.3.- Obtención de RNA mensajero. 37
5.4.- Producción de síntesis de primera cadena. 38
5.4.1.- Análisis electroforético de síntesis de primera cadena 41
5.5.-. Fraccionamiento por tamaño del cDNA. 42
5.5.1.- Análisis electroforético del cDNA seleccionado por tamaño del grupo de cepas resistentes. 46
5.5.2.- Análisis electroforético del cDNA seleccionado por tamaño del grupo de cepas sensibles. 47
5.6.- Títulos de bibliotecas de cDNA.. 48
VI.- DISCUSIÓN. 49

VII.- REFERENCIAS. 53

VIII.- ANEXOS. 59

8.1.- Soluciones. 59

8.2.- Equipo. 62

8.3.- Medios de cultivo. 63

8.4.- Abreviaturas. 64

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.

CUADROS :

#		Pag.
1.	Patrones de resistencia y serotipo presentados por las cepas de *Candida albicans*.	18
2.	Rendimientos celulares por mililitro de cepas de *Candida albicans*.	34
3	Concentraciones de RNA total obtenido de las cepas.	35
4	Obtención de RNA mensajero.	37
5	Valores de cpm obtenidos en la síntesis de primera cadena de cDNA	38
6	Cuantificación de fragmentos de cDNA separados por cromatografía en cepas sensibles.	43
7	Cuantificación de fragmentos obtenidos por cromatografía para el grupo de cepas resistentes.	44

FIGURAS

#		Pag.
1	Mapa geonómico y de restricción del vector de expresión λgt22A.	13
2	Mapa geonómico y de restricción del vector de expresión pSPORT 1	14
3	Corrimiento electroforético de RNA total obtenido de cepas de *Candida albicans*.	36
4	Análisis de síntesis de primera cadena de cDNA.	41
5	Análisis electroforético del fraccionamiento por tamaño del cDNA para el grupo de cepas resistentes.	46
6	Análisis electroforético del fraccionamiento por tamaño de cDNA del grupo de cepas sensibles.	47

I. INTRODUCCIÓN.

1.1.-Antecedentes.

El término "micosis oportunista", es utilizado para designar a los hongos que viven normalmente como saprófitos en el ambiente, o en cavidades naturales de los animales y los seres humanos, son termotolerantes y tienen la capacidad de sufrir cambios bioquímicos y morfológicos al entrar en contacto con organismos que presentan deficiencias en sus sistemas de defensa [1]. El género *Candida* está considerado como uno de los hongos causantes de estas micosis. *Candida albicans* pertenece a la familia *Criptococcaceae* y es agrupado dentro de los hongos imperfectos *Deuteromycetes*; sus especies son levaduras ubicuas, presentes en plantas, en la flora normal del tracto alimenticio y en zonas mucosas de humanos [2,27,29].

Los primeros datos sobre este género fueron aportados por Hipócrates (460 a 377 a.C.), quien describió placas blanquecinas en la boca de pacientes débiles y en recién nacidos [1,27], desde entonces se han escrito una serie de informes acerca de este hongo, incrementándose su frecuencia de aparición en los últimos años, debido principalmente, al aumento en el uso de drogas inmunosupresivas y a la propagación del SIDA [1,3,4,5,6]. Este hongo, de distribución cosmopolita, es el responsable de un gran número de infecciones en humanos, las cuales van desde leves hasta severas infecciones en piel, uñas, tracto urinario, esófago, boca, vagina y otros tejidos, siendo *C. albicans* la levadura más comúnmente aislada en pacientes inmunocomprometidos [1,2,9,10,29].

En general, *C. albicans* ha cobrado importancia, debido al aumento en la frecuencia de su aislamiento en muestras clínicas [1,4,5,6,8,22] y al desarrollo de resistencia contra varios de los antimicóticos más comúnmente usados en el tratamiento clínico, entre los que se encuentran algunos azoles como fluconazol, ketoconazol, itraconazol y 5-Fluorocitocina (5-FC) [8,12,13,14].

1.2.- Biología de *Candida albicans*.

En la actualidad se han descrito más de 81 especies en el género *Candida*, algunas de las cuales son causantes de enfermedades en humanos (1,2). Dentro de las más importantes se encuentran *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* y *C. albicans*; siendo esta última la más frecuente y la más virulenta [1,2,8,27].

Dentro de su género, *Candida albicans* es la especie más comúnmente aislada de muestras intrahospitalarias [2,4,5,6,9,27]. Junto con la mayoría de los hongos patogénicos humanos, *C. albicans* es un hongo oportunista descrito como pleomórfico, por presentar bajo diferentes condiciones microambientales, distintas formas morfológicas. Es capaz de crecer como un brote de células de levadura, como una hifa elongada o como una pseudohifa. Su forma de crecimiento saprofítica habitual, es similar al de una levadura unicelular gram (+) sin cápsula, con células redondas-elipsoidales que tienen un diámetro promedio de aproximadamente 4 μm; en cultivo se observan de color blanco, claramente demarcadas, lisas, brillantes y cremosas [2,8,9,10,27].

Candida albicans se reproduce por gemación y posee un genoma diploide que no muestra ciclo sexual [3]. Una de sus características principales de diferenciación, con respecto a otras especies, es la aparición del tubo germinal en suero bovino fetal, el cual se forma en tan solo 3 horas a 37°C [2,3,8,10,27].

1.3.- Aspectos clínicos de la Candidosis.

1.3.1.- Epidemiología.

Las levaduras del género *Candida* son consideradas como patógenos de humanos, causantes de enfermedades localizadas, diseminadas o sistémicas, en hospederos normales con deficiencias en inmunidad, ya sea celular (caquexia, SIDA) o humoral (leucemia, mieloma), o en hospederos inmunodeprimidos [1,2,4,8,9,10,27]. Estos hongos se ven favorecidos en su crecimiento por procesos invasivos, catéteres intravasculares, terapias inmunosupresivas consecutivas a la administración de glucocorticoides y quimioterapia, inmadurez celular, inmunodeficiencia, granulocitopenia, hiperalimentación parenteral, quemaduras graves, etc.[1,2,10,27]

Candida albicans infecta principalmente al hombre y a otros animales de sangre caliente, como es el caso de monos, cabras, caballos, cerdos, carneros, bovinos, ratones, ratas, conejos, pollos, patos, pavos, palomas, cotorros, gaviotas y gorriones entre otros.[27]

Un estudio realizado por Beck-Sagué y Cols. en los Estados Unidos, durante el período de 1980-1990, describe un total de 30,477 infecciones fúngicas nosocomiales; de las cuales, 59.7% fueron debidas a *C. albicans* [4]. Por otra parte, Vázquez y Cols., colocan a *Candida* spp. como el cuarto organismo más

comúnmente aislado en cultivos de sangre provenientes de pacientes hospitalizados, con una mortalidad de fungemia por *C. albicans* de aproximadamente 80-85% [5].

En México, el Instituto Mexicano del Seguro Social reporta en su Atlas Epidemiológico de 1985-1990, un total de 205 egresos por micosis en hospitales de zona y 11,050 consultas totales por micosis, en niños menores de 1 año de edad durante 1990 [11].

Candida produce el 25% de las micosis superficiales, se presenta principalmente, en recién nacidos, con un índice del 4 al 18% ; la forma bucal predomina en menores de 10 años de edad y en mayores de 60 años, en especial en mujeres. La vulvovaginitis es responsable del 20 al 30% de las enfermedades ginecológicas; 50% de los casos se observan entre los 20 y 30 años de edad, siendo *C. albicans* el causante principal de vaginitis; ya que alrededor del 75% de todas las mujeres la presentan por lo menos una vez en su vida [1]. *Candida albicans* puede afectar del 13 al 21% de quienes usan anticonceptivos hormonales y del 15 al 47% en las embarazadas, con predominio durante el tercer trimestre. Además *C. albicans* se presenta entre el 80 y el 90% de los enfermos con SIDA y en particular, en México se ha observado en un 54% de los casos con predominio en boca y esófago [1,29].

En el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) el comportamiento de *Candida* como agente patógeno en la génesis de sepsis neonatal, se mostró estable hasta 1992. En el período de 1993-1994, se presentó un incremento notorio en el número de casos, ubicándose en el segundo lugar como causa de

sepsis neonatal en este Instituto. Bermúdez Salazar [31], realizó un estudio en el INPer sobre clasificación de especies de levaduras causantes de sepsis neonatal, encontrando que de un total de 45 casos, entre enero de 1993 y diciembre de 1994, el 40% de los casos correspondieron a *Candida albicans*, seguida de *C. parapsilosis* (28.9%) y *C. guilliermondii* (11.1%); demostrando que *C. albicans* es la especie principalmente asociada a sepsis por levaduras.

1.3.2.- Cuadro clínico.

Con base al tipo de infección que se presenta en un individuo, las candidosis han sido clasificadas en localizadas; diseminadas y profundas; sistémicas y alérgicas [27]; aunque también es común clasificarlas en base al lugar donde se localizan, proporcionando así una orientación más útil de las características clínicas de la enfermedad [1].

Candida albicans puede afectar cualquier tejido y sus manifestaciones clínicas dependen del órgano afectado; así es posible encontrar candidosis orofaringeas, esofágicas, gastrointestinales, peritoneales, vaginales, de vías respiratorias y urinarias; de hueso, articulación y músculo; cardiacas, del sistema nervioso central, oftálmicas y cutáneas entre otras [1,2,9,10,27]

En boca, normalmente se presenta enrojecimiento y hay placas mucosas de color blanco aperlado en la superficie de la lengua, pudiendo formar una pseudomembrana adherente, compuesta de células epiteliales descamadas, leucocitos, queratina, tejido necrótico y depósitos de alimento; las blastosporas y formas de pseudohifas abundan, aunque rara vez penetran el estrato córneo; estas lesiones pueden ser asintomáticas, o bien, llegar a presentar sensación de

quemadura, sequedad de boca y sabor metálico. En la quelitis angular, comúnmente conocida como boqueras, se presentan dolor, eritemas y fisuras en la comisuras de la boca.

La candidiasis esofágica es consecuencia de la extensión de una infección a partir de la cavidad bucal, el síntoma principal es la disfagia, presentándose también náuseas, vómitos y hemorragia del tubo digestivo. En las afección gástrica existe perforación y puede sobrevenir peritonitis.

La forma sistémica de la candidosis es de las más graves y puede afectar al aparato urinario y a los riñones, el endocardio, las meninges e incluso produce queratitis. En candidiasis peritoneal a veces hay distensión abdominal, fiebre y vómito, siendo común la infección localizada.

En las vaginitis se presenta inflamación; leucorrea blanquecina (flujo), espesa y grumosa; prurito intenso, sobre todo premenstrual y extensión de las lesiones a vulva y periné. La mucosa vaginal muestra placas blanquecinas, amarillentas o pseudomembranosas.

1.3.3.- Diagnóstico.

Debido a los problemas causados por este patógeno, se han desarrollado métodos fenotípicos para la identificación y tipificación de cepas de *C. albicans,* entre los que se encuentran la serotipificación, la morfología, la biotipificación y la resistotipificación. Por un lado, los métodos fenotípicos empleados en la identificación de esta levadura presentan problemas tales como dificultad en la ejecución, la estandarización, la variabilidad de corrida a corrida, cambios de patrones fenotípicos con el almacenamiento, la reproducibilidad, la complejidad en

la elaboración y la susceptibilidad a cambios en los resultados para una serie de variables [2,3,8,15,16]. Por lo anterior, la falta de marcadores moleculares específicos para la identificación rápida y precisa de esta levadura, se ha convertido en un objetivo primordial dentro del campo de la Biología molecular para identificar y contrarrestar a este patógeno oportunista.

El examen directo se practica a partir de un exudado, esputo, escamas, raspado de uñas, o centrifugado de orina. También pueden realizarse frotis o tinción de gram en muestras obtenidas de lesiones, donde se observan abundantes esporas redondeadas u ovales de 2 a 4 μm de diámetro, blastosporas y pseudohifas, o hifas verdaderas obteniéndose así un resultado preliminar muy útil [1,2,10,27]. Así también, el material puede ser recuperado por raspado de las placas mucosas o cutáneas para su cultivo posterior, el cual se logra a temperatura ambiente, en medios habituales como agar de dextrosa Sabouraud simple o bien complementado con cloramfenicol para evitar la contaminación por bacterias [1,2,27].

La identificación de *C. albicans* es más rápida que la de otras especies del genero, su crecimiento es relativamente rápido y de 14 a 48 horas después, se puede observar el crecimiento de colonias lisas, blandas, brillantes, de color blanco y ligeramente beige; las cuales con el tiempo se vuelven plegadas, rugosas o membranosas con los centros de las levaduras invaginados. Para distinguir esta especie de las demás del género, se realizan diferentes pruebas, siendo la más característica la filamentación o tubo germinal, la cual consiste en poner en contacto un inoculo de la levadura con suero bovino fetal, incubando a 37 °C

durante 3 horas; observándose al microscopio la presencia de tubo germinativo, característico de *C. albicans*, este también puede ser presentado por otras especies, pero ocurre en mayor tiempo.

Por otra parte, las pruebas basadas en fermentación y asimilación de carbohidratos (prueba de API), también han sido implementadas para la detección de éste hongo. Las pruebas serológicas basadas en anticuerpos contra *Candida*, no han tenido mucho éxito [1,22,27,30], debido a la discrepancia de resultados y a la dificultad para su identificación.

1.3.4.- Tratamiento.

Actualmente se cuenta con antimicóticos en presentaciones como tabletas orales, ungüento, gotas, gel, suspensión, talco y tabletas vaginales; las drogas antifúngicas utilizadas generalmente contra *Candida* son nistatina, clotrimazol, violeta de genciana, anfotericina B, flucitosina, itraconazol, miconazol y ketoconazol [1,12,27] La selección del fármaco apropiado o de una combinación para el tratamiento contra la candidosis depende de la localización y de la magnitud de la infección.

A pesar de que se cuenta con ésta gama de medicamentos, *Candida albicans* está empezando a mostrar resistencia a algunos de éstos antifúngicos. Auger y Cols [13] han reportado en un estudio de 666 pacientes en Canadá, hasta un 11 3% y un 49.7% de resistencia a 5-FC por parte de cepas con serotipos A y B respectivamente.

En México, Gutiérrez Guevara [12] encontró un 47% de resistencia a azoles (ketoconazol, itraconazol, fluconazol), en 60 cepas de *Candida albicans*

analizadas; siendo la mayoría de los aislados resistentes a ketoconazol (13/60) y ninguno de éstos con resistencia a anfotericina B. En general, poco se sabe acerca del genoma de *C. albicans* y de las moléculas que le confieren resistencia contra las diferentes drogas usadas en su tratamiento.

1.4.- Biología Molecular de *Candida albicans*.

En este organismo, la expresión de genes, se manifiesta inicialmente como un transcrito de RNA mensajero (mRNA), el cual es subsecuentemente traducido a una molécula proteínica. Esta proteína puede presentar características tales como antigenicidad o bioactividad, cuya producción es posible investigar experimentalmente. Los ensayos más confiables y sensibles de que se dispone actualmente, para reconocer la presencia de RNAs específicos, incluyen métodos basados en la hibridación RNA-DNA (Northern) y en la reacción en cadena de la polimerasa a partir de RNA (RT-PCR), así como métodos para reconocer la presencia de proteínas, tales como la inmunoprecipitación, el Western y el análisis de inmunofluorescencia. Los mRNAs representan una gran fuente de información del microorganismo, de tal modo que si éstos fueran conjuntados en una biblioteca de expresión genómica, el estudio de las moléculas de interés de *C albicans* se vería ampliamente facilitado.

Candida albicans presenta un genoma diploide sin ciclo sexual, algunos de sus genes son parecidos a los de *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que muchos de los genes de *Candida* han sido clonados, por la vía de complementación con mutaciones de *S. cerevisiae* y más recientemente han sido expresados directamente en *Escherichia coli*. Entre algunos de los genes que han sido

aislados de éste hongo, se encuentran el gen de la lanosterol 14 α-demethylase (ERG16), aspartylprotease (PRA1), β-tubulina (TUB2) y el gene CDR1, entre otros. El gene CDR1 ha sido caracterizado y se sabe que confiere resistencia múltiple a antifúngicos[35,36,37]

1.4.1.- Bibliotecas de expresión.

Las bibliotecas genómicas son colecciones de clonas recombinantes que teóricamente contienen todas las secuencias del genoma original construidas en plásmidos o bacteriófagos. Una de sus utilidades básicas, es el aislamiento de un gene o región genómica de interés y su producción en grandes cantidades, para su posterior estudio, así como la elaboración de mapas genéticos.

Los eventos básicos, requeridos para la construcción de una genoteca son:

- Generar fragmentos de DNA de un tamaño adecuado.
- Ligar estos fragmentos a un vector de clonación apropiado.
- Introducir la molécula recombinante dentro de una célula capaz de replicarse.
- Por último, tener un método de selección para las clonas que contienen el DNA foráneo.

Así mismo, es posible la construcción de bibliotecas de cDNA, las cuales representan copias de poblaciones de mRNA presentes en un organismo o tejido en particular, comúnmente los insertos clonados son de tamaños pequeños (1-3 Kb)

Estas bibliotecas son clonadas en vectores que permiten la expresión de proteínas recombinantes y son mantenidas usualmente en una cepa receptora de

E coli. Estas bibliotecas pueden ser clasificadas ampliamente como direccionales o al azar, donde todos los miembros de una biblioteca direccional contienen cDNA insertados y clonados en una orientación específica, relativa a la polaridad transcripcional de los mRNAs originales; así los miembros de una biblioteca al azar contienen cDNA insertado y clonado en cualquier orientación. Las bibliotecas direccionales son construidas para expresar genes clonados, permitiendo que la proteína híbrida expresada, contenga la secuencia correcta de aminoácidos y así pueda ser detectada inmunológicamente, al utilizar un anticuerpo específico que reconoce a la proteína original. Generalmente, el vector aporta un promotor específico y de alta afinidad para garantizar la expresión de la proteína de interés. Todos los miembros de una biblioteca direccional son potencialmente capaces de expresar antígenos, a diferencia de las bibliotecas al azar, en las cuales solamente cerca del 50% de las clonas contienen cDNA insertado en la orientación correcta para su expresión.

En general, se prefieren las bibliotecas de cDNA a las genómicas como una fuente de genes clonados por el hecho de no contener intrones ya que las clonas obtenidas son una representación directa de las secuencias codificadas. Por otra parte, los bancos de cDNA son más fáciles de tamizar, ya que contienen un número menor de clonas, al estar libres de intrones y, además, cada clona de cDNA contiene una sola secuencia de mRNA, disminuyendo así, el número de señales falsas. Además el cDNA presenta la capacidad de expresarse en bacterias, pudiendo estar sujeto al control transcripcional de un promotor procarionte.

Las bibliotecas de cDNA son comúnmente clonadas en el vector λgt11, el cual es capaz de producir un polipéptido especificado por un fragmento de DNA insertado. Las bibliotecas de fagos clonadas en λgt11 pueden ser seleccionadas con sondas de cDNA, oligonucleótidos, etc. y esto permite aislar secuencias de DNA que codifican los antígenos contra los cuales las sondas son dirigidas.

El vector λgt22A es derivado de λgt11, tiene un tamaño de 42.73 Kb y contiene un sitio de clonación múltiple dentro del gen lac Z, acepta insertos de hasta 8.2 Kb, contiene el gen lac 5 para la selección de clonas (azul/blanco) y puede expresarse selectivamente cuando se propaga en células E. coli Y1090 (Figura 1).

Otro vector de clonación utilizado para la construcciones de bancos de cDNA es el plásmido pSPORT I, el cual es un vector de expresión multifuncional, utilizado para la clonación de cDNA, para la transcripción *in vitro* y para algunos procesos en bibliotecas de substracción. Este, contiene un sitio único de clonación múltiple con 19 sitios para endonucleasas de restricción, incluyendo un sitio único Not I-Sal I. Esta flanqueado por los promotores de la RNA polimerasa SP6 y T7. Además presenta un promotor *lac* inducible, para la expresión de genes clonados y una copia del gene represor, *lac* por lo que las proteínas de fusión son sintetizadas únicamente en presencia de IPTG (Figura 2).

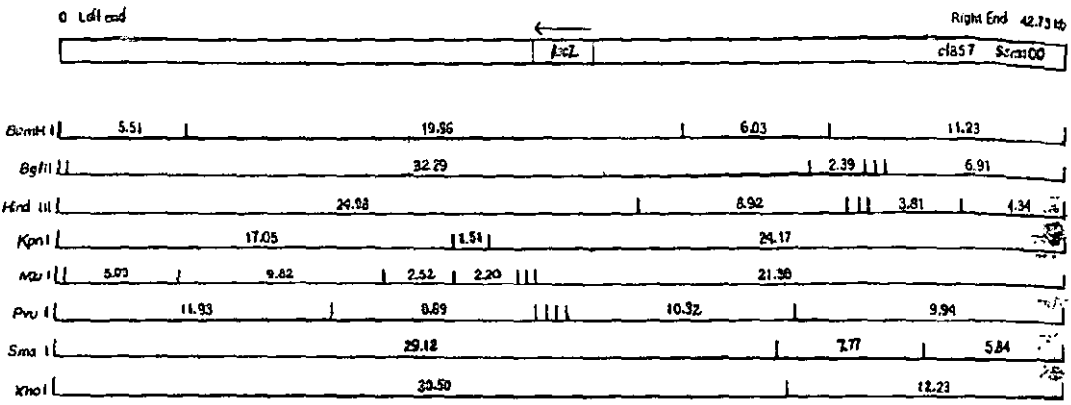

Figura 1. Mapa genómico y de restricción del vector de expresión λ gt 22A. El tamaño de este vector es de 42.73 Kb, aceptando la clonación de fragmentos con un tamaño de hasta 8.2 Kb

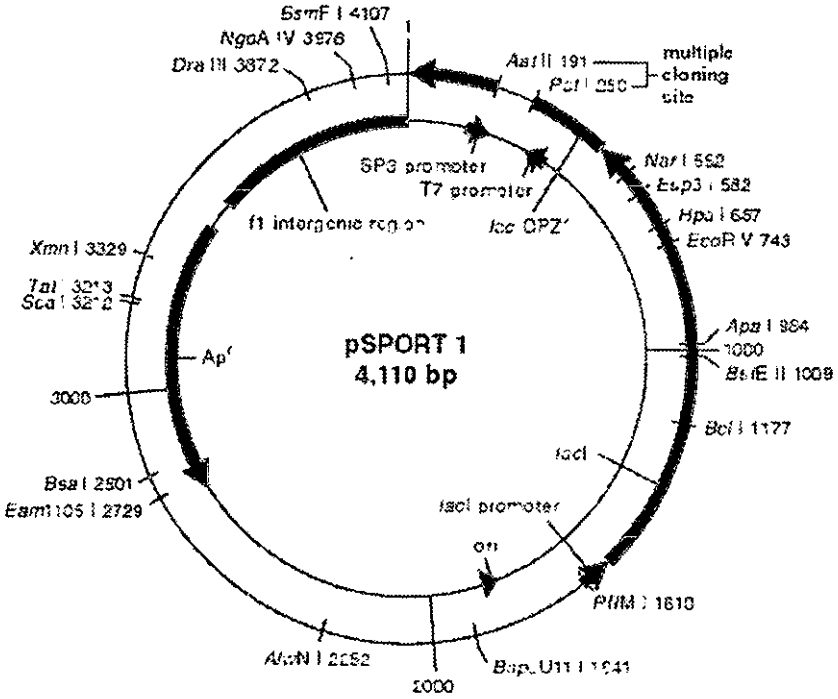

Figura 2. Mapa genómico y de restricción del vector de expresión pSPORT 1. Este vector es un plásmido con un tamaño de 4,109 pb, contiene un sitio múltiple de clonación con un sitio único Not I - Sal I.

II. JUSTIFICACION.

Debido a las dificultades que se presentan en el estudio del genoma de *Candida albicans*, como los altos niveles de resistencia a diferentes antimicóticos que está presentando actualmente, a su importancia clínica y a los problemas existentes para la caracterización de éste microorganismo, una alternativa viable, es la elaboración de una biblioteca de cDNA, tanto de aislados de *Candida albicans* resistentes, como sensibles a diferentes antimicóticos, esto nos puede ayudar a entender los mecanismos de patogenicidad de este hongo y a aclarar como suceden los procesos de resistencia a las diferentes drogas; mediante el aislamiento de los genes que codifican para ésta resistencia.

Adicionalmente, sería posible el aislamiento y la secuenciación de los genes responsables del serotipo de los aislados de *C. albicans* (relacionado con resistencia) y así lograr la elaboración de una sonda molecular que facilitara la detección de éste.

III. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- Construir bibliotecas de expresión de cepas de *Candida albicans* sensibles y resistentes a cuatro diferentes drogas antifúngicas: ketoconazol, itraconazol, fluconazol y anfotericina B.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Construir bibliotecas de expresión de cepas de *C. albicans* sensibles y resistentes a cuatro antifúngicos, utilizando como vector de clonación el plásmido *pSPORT-I.*

- Construir bibliotecas de expresión de cepas de *C. albicans* sensibles y resistentes a cuatro antifúngicos, utilizando como vector de clonación el DNA de fago λgt 22A.

IV. MATERIAL Y METODOS.

4.1.- Diagrama de flujo para elaboración de una biblioteca de expresión.

La metodologia necesaria para elaborar una biblioteca de expresión se resume en el siguiente diagrama:

Cultivo de levaduras resistentes o sensibles a diferentes antimicóticos
⇩
Formación de esferoplastos
⇩
Extracción de RNA total, cuantificación y corrimiento electroforético
⇩
Purificación de Poly(A)$^+$, cuantificación y corrimiento electroforético
⇩
Síntesis de la primera cadena de cDNA
⇩
Síntesis de la segunda cadena de cDNA
⇩
Cuantificación y separación electroforética de la primera y la segunda cadena de cDNA
⇩
Fraccionamiento de subpoblaciones de cDNA
⇩
Clonación molecular

⇗	⇖
Empacamiento *in vitro*	Transformación
⇩	⇩
Titulación	Titulación
⇩	⇩
Biblioteca en λgt 22A	Biblioteca en pSPORT

4.2.- Muestras biológicas.

En este estudio se utilizaron ocho cepas de levadura, de las cuales, cuatro fueron aislados de *Candida albicans* sensibles y cuatro aislados resistentes a los antimicóticos: anfotericina B, fluconazol, ketoconazol e itraconazol. Dichas cepas fueron obtenidas del grupo de aislados caracterizados en el Departamento de Infectología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI [12], (cuadro 1).

Cuadro 1. Patrones de resistencia y serotipo presentados por las cepas de *Candida. albicans.*

No. cepa	Serotipo	ANTIFÚNGICOS			
		N	F	I	K
4	B	S	S	R	R
5	A	S	S	S	S
16	B	S	R	S	R
30	A	S	S	S	S
32	A	S	S	R	S
42	A	S	S	S	S
85	B	S	S	S	S
89	A	S	R	S	R

(N = Anfotericina B, F = Fluconazol, K = Ketoconazol,
I = Itraconazol. R= Resistente y S = Sensible).

4.3.- Cultivo de levaduras y obtención de esferoplastos.

El cultivo de las levaduras y obtención de los esferoplastos se realizó mediante el método descrito por Ausubel y Cols.[24], con las modificaciones siguientes. cada aislado de *C albicans* se sembró por dilución en una placa de agar de dextrosa Sabouraud (BIOXON) y se incubó de 24 a 48 h a 37 °C. Se tomó una colonia por aislado (diámetro aproximado = 1 mm) y se inoculó en un tubo Falcon de 50 ml con 15 ml de caldo de dextrosa Sabouraud, incubando otras 24 h a 37 °C con agitación a 200 rpm, periodo en el cual el cultivo se encontraba en fase de crecimiento logarítmico. El cultivo se expandió en 50 ml de caldo de dextrosa Sabouraud, incubándolo en las mismas condiciones, hasta alcanzar nuevamente la fase de crecimiento logarítmico. Posteriormente, el número de células por mililitro, se cuantificó espectrofotométricamente (1 UDO_{600nm} = $3x10^7$ cel/ml). Las células fueron sedimentadas por centrifugación a 3,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, lavadas con PBS 1M y sedimentadas nuevamente.
Para la formación de esferoplastos, al paquete celular obtenido, se le agregaron 50 µl de liticasa (SIGMA) disuelta en sorbitol (0.3 mg/ml de liticasa por cada 1-$2x10^8$ cel/ml) y 50 µl de β-mercaptoetanol 0.28 M (MERCK), homogenizando e incubando 1 h a 37 °C con agitación constante (200 rpm). La suspensión se centrifugó 15 min a 3,000 rpm a temperatura ambiente y el paquete celular, fue recuperado y almacenado a –70 °C hasta su utilización posterior en la extracción de RNA.

4.4.- Extracción de RNA total.

Para la extracción de RNA total, el paquete celular de cada aislado de *C albicans*, conteniendo aproximadamente 10^7 células/ml, fue homogeneizado, con 15 ml de TRIZOL (GIBCO BRL) e incubado 5 min a temperatura ambiente. al término de la incubación se le agregaron 3 ml de cloroformo al 100% (SIGMA Chemical). Esta mezcla fue agitada vigorosamente por 2 min y se transfirió a un tubo Corex de 30 ml, centrifugándola 15 min a 12,000 rpm a 4 °C. La fase acuosa se recuperó en un tubo nuevo y se mezcló con 1 volumen de cloroformo al 100% homogeneizando fuertemente y centrifugando a 12,000 rpm a 4 °C, durante 15 min. El sobrenadante se recuperó y mezcló con 1 volumen de isopropanol frío al 100 % (MERCK).

incubando 15 min en hielo para precipitar el RNA. Esta mezcla se centrifugó bajo las mismas condiciones, decantando e invirtiendo el tubo para eliminar de la pastilla los residuos de etanol. Para eliminar las sales, la pastilla fue lavada con 15 ml de etanol frío al 75%, agregándolo suavemente por las paredes y centrifugándolo nuevamente. Finalmente el paquete de RNA fue recuperado, posteriormente se resuspendió en 0.6 ml de amortiguador de elusión TES 1 X. De esta mezcla se tomaron dos alícuotas, una para su cuantificación y otra para su separación electroforética, el resto se mantuvo a –70 °C hasta su utilización en la purificación de RNA poliadenilado [poly $(A)^+$].

4.4.1.- Cuantificación espectrofotométrica de RNA total.

Para la cuantificación del RNA total obtenido, se tomó una alicuota de 10 µl de cada una de las muestras y se realizó una dilución 1:100 con amortiguador TE a la que se le midió la absorbancia a 260 nm y a 280 nm, utilizando la siguiente fórmula para estimar la cantidad de RNAtotal.

$$RNA_{total} = (A_{260})\ (40\mu g/ml/A_{260})\ (100)\ (0.6\ ml)$$

Donde:

A_{260} = Absorbancia de la solución a 260 nm

40 $\mu g/ml/A_{260}$ = Factor de conversión

100 = Factor de dilución

0.6 ml = Volumen total de resuspensión.

Cociente = A_{260}/A_{280}. (El cociente entre las lecturas a 260 y 280 nm da una estimación de la pureza del RNA, considerándose preparaciones adecuadas las que presentan un rango entre 1.9-2.0) [25,26,28].

4.4.2.- Separación electroforética de RNA total en geles de agarosa-formaldehído.

La separación electroforética se realizó en geles de agarosa al 1.5 %, MOPS y formaldehído al 2 % (GIBCO BRL), utilizando como amortiguador de corrida MOPS 1 X. Cada muestra de 10 μg de RNA fue deshidratada por centrifugación al vacío durante 5 min y se le adicionaron 10 μl de amortiguador de muestra (NBSB 1 X), desnaturalizando por calentamiento a 65 °C por 5 minutos. A cada muestra se le adicionó 1 μl de bromuro de etidio [1 μg/μl] (GIBCO BRL), posteriormente las muestras se enfriaron en hielo y fueron aplicadas en los pozos del gel, corriendo la electroforésis a 5V por cada centímetro de longitud del gel, deteniendo la corrida hasta que el amortiguador de muestra migró aproximadamente hasta el 80% de la longitud del gel. Finalmente éste fue observado en un transiluminador, para verificar la calidad e integridad del RNA total, con una lámpara de luz ultravioleta a 200 nm (Figura 3).

4.5.- Purificación de mRNA.

Debido a que la calidad del mRNA rige la cantidad máxima de secuencias de información que pueden ser convertidas en cDNA, se siguió un proceso de purificación del mRNA a partir de RNA total. El mRNA fue purificado con oligo (dT) celulosa, que es la matriz más comúnmente utilizada para seleccionar RNA poliadenilado [poly (A)$^+$], el cual representa entre el 0.5% y el 2% del RNA total celular.

Para el aislamiento del mRNA, se utilizaron 300 mg (peso seco) de oligo (dT) celulosa por cada 0.5 mg de RNA total. El RNA total extraído y resuspendido anteriormente en 600 μl de amortiguador TES, fue calentado a 65 °C por 5 min y después enfriado rápidamente en hielo. A dicho material se le adicionaron 60 μl de NaCl 5 M (MERCK) mezclándolo y agregándolo directamente a un tubo eppendorf, que contenía oligo (dT) celulosa, previamente hidratado en 1ml de NaOH 0.1 M por cada 0.5 g de oligo (dT) celulosa en polvo. La suspensión se mezcló e incubó 10 min a 37 °C con agitación periódica del tubo por inversiones suaves. La celulosa fue sedimentada durante 5 min a 3,000 rpm, el sobrenadante se removió

y se guardó en un tubo etiquetado como "RNA total" (esta fracción contenía RNA no unido, mucho del cual es RNA ribosomal). El sedimento fue lavado con 1 ml de amortiguador TNES 1X por inversiones suaves del tubo y la celulosa se sedimentó nuevamente bajo las mismas condiciones. El sobrenadante obtenido, se removió y se adicionó nuevamente al tubo marcado como RNA total y el sedimento fue lavado ahora con 1 ml de DEPC-agua fría por inversiones suaves. Este tubo fue guardado en frío y la celulosa se sedimentó por centrifugación bajo las condiciones ya descritas, el sobrenadante obtenido se colocó en un tubo marcado como "lavado de agua". Para liberar el mRNA de la celulosa, al sedimento se le adicionaron 400 μl de DEPC-agua, mezclando suavemente e incubando 5 min a 65°C. A continuación la celulosa se sedimentó y el sobrenadante se removió y fue guardado en un tubo Falcon de 15 ml marcado como "poly $(A)^+$ RNA". Estos últimos pasos, se repitieron dos veces más y se combinaron las tres fracciones de DEPC-agua (1200 μl). Finalmente el poly $(A)^+$ RNA así obtenido, se cuantificó espectrofotométricamente.

4.5.1.- Cuantificación espectrofotométrica de mRNA

Para la cuantificación espectrofotométrica de poly$(A)^+$RNA, se realizó una dilución 1:10 con amortiguador TE. La absorbancia de la solución se midió a 260 nm y a 280 nm, se calculó la producción total de mRNA por la misma fórmula utilizada para el RNA total

4.6- Síntesis de cDNA.

4.6.1.- Síntesis de la primera cadena de cDNA.

Las moléculas de mRNA purificado, pueden servir como un molde para la conversión enzimática de ésta molécula, relativamente inestable de una sola cadena, en moléculas mucho más estables de doble cadena (DNA complementario: cDNA), las cuales además, pueden ser clonadas.

Así, en la síntesis de la primera cadena de cDNA se utilizó el iniciador-adaptador Not-1 como molde, dando así el elemento asimétrico necesario para la obtención de clonas direccionales (la secuencia de Not I es 5'-pGACTAGT

TCTAGA TCGCGA GCGGCCGC CC $(T)_{15}$ -3'). La elaboración de las bibliotecas de expresión se llevó a cabo utilizando el Sistema Lambda "SUPER SCRIPT™" para síntesis de cDNA (GIBCO BRL).

Cinco microgramos de la solución de poly $(A)^+$ fueron precipitados y recuperados por centrifugación a 14,000 rpm, durante 10 min; el paquete de mRNA fue lavado con 500 µl de etanol frío al 75 % y centrifugado por 5 min, secando el paquete de mRNA por centrifugación al vacío con calor durante 5 min. El paquete seco de poly$(A)^+$ se disolvió cuidadosamente con 5 µl de DEPC-agua y se mezcló con 2 µl de adaptador *Not I* [0.5µg/µl]; dicha mezcla se calentó 10 min a 65°C y después se enfrió rápidamente en hielo, se centrifugó unos segundos para colectarla y en seguida se homogeneizó suavemente con 4 µl de amortiguador de 1ª cadena 5 X, 2 µl de DTT 0.1M, 1 µl de dNTP-mezcla 10 mM y 1 µl de (α-^{32}P) dCTP [10 µCi/µl]. La solución fue colectada con una centrifugación suave y su temperatura se equilibró mediante una incubación de 2 min a 42 °C. Finalmente a la mezcla se le adicionaron 5 µl de la enzima Super Script RT [10 U/µl] homogenizando suavemente e incubando 1 h a 42 °C. Transcurrido este tiempo, la reacción fue detenida colocando el tubo de reacción en hielo. De ésta mezcla se retiraron 2 µl de muestra, los cuales se agregaron a un tubo eppendorf marcado como "síntesis de primera cadena" (SPC), previamente preparado con 43 µl de EDTA 20 mM (pH 7.5) y 5 µl de tRNA como acarreador, solución que sirvió para cuantificar la producción de la síntesis de primera cadena mediante un gel alcalino.

4.6.2.- Síntesis de la segunda cadena de cDNA.

La secuencia primaria del mRNA es sintetizado como una segunda cadena de secuencia antiparalela de DNA, utilizando la primera cadena de cDNA como un molde. Esta síntesis es catalizada por una DNA-polimerasa I en combinación con una RNasa H y una DNA ligasa, todas de *E. coli.*

Al material de la síntesis de primera cadena restantes (18 µl), se le agregó en frío 93 µl de DEPC-agua, 30 µl de amortiguador de segunda cadena 5X, 3 µl de

dNTP-mezcla 10 mM, 1 µl de *E.coli* DNA ligasa [10 U/µl], 4 µl de *E. coli* DNA polimerasa I [10 U/µl] y 1 µl *E. coli* RNasa H [2 U/µl]; la reacción se mezcló por inversiones lentas del tubo y se incubó 2 hrs a 16 °C.

4.6.3.- Cuantificación de los productos de la síntesis de primera cadena.

La producción total de la reacción de síntesis de primera cadena, es calculada en base a la cantidad de radioactividad ácido precipitable y es cuantificada en un contador de centelleo líquido.

De los 50 µl de mezcla guardados en la síntesis de primera cadena y marcados como SPC se tomaron 4 alícuotas de 5 µl que fueron colocadas en filtros de fibra de vidrio compuestos por un cilindro absorbente y un disco de papel (GFC SKATRON). Los 30 µl restantes de SPC se almacenaron nuevamente en hielo hasta su análisis en un gel de agarosa alcalino. A dos alícuotas de los discos, no se les lavó y fueron usados como control y a los otros dos se les realizaron cuatro lavados con 75 µl de TCA al 10 % / NaPPi 0.1 % frío (SIGMA Chemical). Cada uno de estos dos discos fue lavado con 75 µl de etanol al 100 %, para evaluar la marca incorporada en el cDNA. En seguida, se removieron y desecharon los cilindros absorbentes del filtro y los discos se dejaron secar a temperatura ambiente por 5 min, para después trasladar cada filtro a un vial de centelleo al cual se le agregó 2 ml de líquido de centelleo (Du Pont Biotechnology Systems) y se procedió a cuantificar en un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments).

4.6.4.- Separación electroforética de los productos de síntesis de 1ª cadena de cDNA en geles alcalinos.

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% complementado con EDTA 2 µM y 0.03N NaOH (MERCK). Este se dejó equilibrar de 15 a 20 min. Los 30 µl restantes del SPC fueron mezclados con 0.5 volúmenes de NH_4OAc 7.5 M (GIBCO BRL) y 2 volúmenes de etanol al 100% frío, dejándose incubar por 30 min a -20 °C, esta reacción se centrifugó 10 min a 14 ,000 rpm a 4 °C, desechando el sobrenadante y eliminando los residuos de etanol del precipitado de cDNA por centrifugación al vacío durante 10 min (Speed Vac. SavantInst). El precipitado fue resuspendido en 10

µl de amortiguador de muestra 1X para geles de agarosa alcalinos. La separación electroforética se llevó a cabo a 1.8 volts por cada centímetro de longitud del gel, hasta que el colorante recorrió las 2/3 partes de éste. Una vez concluida la corrida, el gel fue cubierto por dos hojas de papel Whatman 3MM y fue secado por calor en un secador de geles al vacío, para posteriormente exponerlo en completa obscuridad a una película de rayos X sensible al azul (Eastman Kodak Company) por 16 hrs a -20 °C, revelando posteriormente la placa (Figura 4).

4.7.- Preparación de los fragmentos de cDNA para su clonación.

4.7.1.- Reparación de los fragmentos de cDNA.

Después de la síntesis de segunda cadena, para la reparación de los fragmentos, a la reacción se le agregaron 2 µl de T4 DNA polimerasa [5U/µl] y se incubó 5 min a 16 °C, para posteriormente detener la reacción en hielo adicionándole 10 µl de EDTA 0.5 M. A continuación, se realizó una extracción fenólica, agregando 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), homogenizando perfectamente, centrifugando 5 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente y una vez separadas las fases, se recuperaron 140 µl de la fase acuosa (superior). El cDNA se precipitó con 0.5 volúmenes de NH_4OAc 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol frío al 100%, incubando durante 30 min a -20 °C. Esta mezcla fue centrifugada durante 10 min a 14,000 rpm a 4°C. Concluida la centrifugación, se removió cuidadosamente el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 0.5 ml de etanol al 70% mezclando suavemente sin resuspender, centrifugando nuevamente bajo las mismas condiciones durante 5 min. El sobrenadante se desechó y los residuos de etanol en el precipitado fueron eliminados por centrifugación al vacío durante 5 min.

4.7.2.- Adición del adaptador *Sal I* al cDNA.

El adaptador *Sal I* es utilizado para aumentar la eficiencia de ligación del cDNA al vector de clonación, creando extremos cohesivos en éste (la secuencia del adaptador Sal I es 5´- TCGACCCACGCGTCCG-3´

3´- GGGTGCGCAGGCp-5´

Al precipitado de cDNA se le adicionó en hielo 25 µl de DEPC-agua, 10 µl de amortiguador T4 DNA ligasa 5X, 10 µl de adaptador Sal I [1 µg/µl] y 5 µl de enzima T4 DNA ligasa [1U/µl], homogenizando perfectamente la mezcla e incubando toda la noche a 16 °C. Terminada la incubación se realizó una extracción fenólica, tomando 45 µl de la fase acuosa y precipitando el cDNA con 0.5 volúmenes de NH_4OAc 7.5 M y 2 volúmenes de etanol al 100% frío, incubando 30 min a -20 °C. La mezcla fue homogeneizada suavemente y centrifugada 10 min a 14,000 rpm a 4°C. Concluida la centrifugación se removió cuidadosamente el sobrenadante y el precipitado fue lavado con 0.5 ml de etanol frío al 70%. El sobrenadante fue desechado y los residuos de etanol eliminados por centrifugación al vacío con calor durante 10 min

4.7.3.- Digestión con *Not I*.

La acción de la endonucleasa de restricción *Not I* permite formar extremos cohesivos, al cortar la secuencia correspondiente dentro de la región que contiene el adaptador de clonación *Sal I* presente en el cDNA.

Así el precipitado de cDNA fue mezclado en frío con 41 µl de DEPC-agua, 5 µl de amortiguador para Not I (10X) y 4 µl de enzima *Not I* [15 U/µl] (Gibco B.R.L). Esta reacción se mezcló perfectamente y se incubó por 2 h a 37 °C. A continuación fue mezclada con 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por 20 seg. en vortex, centrifugando 5 min a 14,000 rpm a temperatura ambiente. Una vez separadas las fases, se tomaron 45 µl de la fase acuosa y se mezclaron con 0.5 volúmenes de NH_4OAc 7.5 M y 2 volúmenes de etanol al 100% frío, centrifugando 10 min a 14,000 rpm a 4°C, desechando el sobrenadante y dejando así el precipitado listo para su fraccionamiento por tamaño.

4.8.- Fraccionamiento por tamaño del cDNA en columnas de sephacryl.

Este procedimiento optimiza el fraccionamiento por tamaños de cDNA mediante la utilización de una columna de filtración Sephacryl S-500 HR.

La columna de sephacryl fue montada en un soporte universal, permitiendo que drenara el exceso de etanol presente en la columna antes de su uso.

Esta fue lavada con 800 µl de amortiguador TEN, repitiendo este paso tres veces más equilibrar la columna. Posteriormente, la pastilla de cDNA fue resuspendida en 100 µl del amortiguador y fue adicionada totalmente en el centro de la columna, recuperando la solución eluída en un tubo eppendorf. A la columna se le adicionaron 100 µl de amortiguador TEN, colectando completamente el fluido en un tubo marcado con el número 2. La columna se llenó nuevamente con 100 µl de amortiguador TEN, el material de elución se colectó por gotas, una en cada uno de 18 tubos eppendorf de 1.5 ml preparados previamente. Los tubos fueron incubados en hielo y el volumen de cada uno de ellos se cuantificó con ayuda de una micropipeta, determinando las cuentas por minuto (c.p.m.) de cada una de las muestras en el contador de centelleo líquido, para finalmente, realizar los cálculos correspondientes para la selección de las muestras apropiadas para la clonación. De cada una de las muestras se tomó por separado una alicuota de 2 µl para realizar una electroforésis y analizar los tamaños de los cDNA fraccionados, eligiendo aquellos de alto peso molecular y alta concentración para ligarlos al vector de clonación.

4.8.1.-Análisis electroforético de cDNA fraccionado por tamaño.

El cDNA obtenido por fraccionamiento fue separado en un gel de agarosa al 1%, utilizando TBE 1X como amortiguador de corrida.

Cada una de las alícuotas de cDNA (2 µl) se mezcló con 3 µl de agua destilada y 1 µl de amortiguador de muestra Endo-R-Stop (6X) se utilizó como marcador de peso molecular el DNA del fago λ marcado con ^{32}P y digerido con la enzima de restricción *Hind* III (Gibco BRL). La separación electroforética se realizó usando un voltaje de 50 a 75 volts hasta que el amortiguador de muestra migró aproximadamente hasta las 2/3 partes de la longitud del gel. Una vez concluida la corrida, el gel fue cubierto con dos hojas de papel Whatman 3MM y fue secado con calor en un secador de geles al vacío para después exponerlo a una película radiográfica durante 8 horas a –70 °C (Figuras 5 y 6).

Con base a los análisis de resultados, se seleccionaron las fracciones de cDNA apropiadas para ser clonadas, la suma de éstas debieron de completar al menos

30 ng. Estas fracciones fueron reunidas hasta lograr colectar 10 y 20 ng, para su clonación en los vectores *pSPORT I/Not I/Sal I* y *λgt22A/Not I/Sal I* respectivamente.

4.9.- Ligación del cDNA en *pSPORT I/Not I/Sal I.*

La clonación del cDNA fue realizada en el plásmido *pSPORT I* digerido con *Not I/Sal I* y la transformación celular se realizó mediante electroporación usando células *E. coli* competentes ELECTROMAX DH10B (GIBCO BRL).

Para la ligación en este vector se utilizaron 10 ng de cDNA, los cuales fueron precipitados con 5 μl de tRNA de levadura [1 μg/μl] (como acarreador), 0.5 volúmenes de NH_4OAc [7.5M] y 2 volúmenes de etanol frío al 100%, mezclando cuidadosamente e incubando 10 min en hielo; posteriormente la suspensión se centrifugó a 14,000 rpm a 4 °C durante 10 min. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó dos veces con 0.5 ml de etanol al 70%, repitiendo la centrifugación por 5 min. El sobrenadante fue desechado y el precipitado de cDNA se secó por centrifugación al vacío durante 10 min y finalmente se resuspendió en 10 μl de amortiguador TEN. A esta solución se le adicionaron 4μl de amortiguador para ligación 5X, 1 μl de plásmido pSPORT 1 cortado con *Not I-Sal I* [0.25μg/μl], 4 μl de DEPC-agua y 1 μl de T4 DNA ligasa [1U/μl]. La mezcla se incubó toda la noche a 16 °C.

Terminada la incubación, el material fue precipitado con 5 μl de tRNA de levadura [1 μg/μl], 0.5 volúmenes de NH_4OAc 7.5 M y 2 volúmenes de etanol al 100%, incubando 30 min a -20 °C. Posteriormente el material se colectó a 14,000 rpm a 4°C durante 10 min El sobrenadante se removió y el precipitado fue lavado con etanol al 70 %, secado y finalmente resuspendido en 5 μl de agua destilada estéril.

4.9.1.- Electroporación de los productos de clonación.

Ya que las nuevas moléculas recombinantes no pueden reproducirse por sí mismas, es necesario introducirlas en una célula hospedera, capaz de replicarse y producir copias de sí misma.

Los 5 µl de ligación fueron mezclados con 50 µl de células ELECTRO MAX DH10B (GIBCO BRL).

De la mezcla anterior de células-vector, se resuspendieron 25 µl equivalentes a > $1x10^{10}$ células competentes y la suspensión se depositó entre los electrodos de una cámara de micro electroporación fría (Mod. 11613-064. GIBCO BRL), la cual fue colocada en un sistema de electroporación Cell-Porator 11609-013 (GIBCO BRL) ajustando el controlador de voltaje a las condiciones recomendadas por el proveedor (400V, 2.5 kv. a una capacitancia de 330 µF con baja impedancia). El voltaje se aplicó una sola vez, bajo las condiciones definidas y posteriormente se removió la cámara de microelectroporación, verificando que las células se encontraran resuspendidas dentro de los electrodos (ya que de no ser así, el voltaje aplicado debió ser excesivo y las células estarían destruidas). Una vez verificadas las células, se le agregó a la suspensión 1 ml de medio S.O.C. (GIBCO BRL) a temperatura ambiente, lavando las células de los electrodos suavemente. La suspensión celular fue transferida a un tubo de polipropileno usando una pipeta Pasteur de vidrio estéril. La suspensión fue incubada a 37 °C durante 1 h con agitación constante de 225 r.p.m.

4.10.- Plaqueo y tamizaje de clonas recombinantes.

Para el plaqueo de las clonas recombinantes, se realizaron cuatro diluciones seriadas de la mezcla de electrotransformación, 1:10, 1:100, 1:1,000 y 1:10,000, en volúmenes finales de 500µl con medio SOC. Se esparció una alícuota de 100 µl de cada dilución en placas de Luria ampicilina; utilizando por cada placa, de 5 a 10 perlas de vidrio de 4 mm para ayudar a homogenizar la distribución del cultivo. Una vez absorbidas las diluciones en las placas, se incubaron toda la noche a 37 °C. Después de la incubación, se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (ufc) obtenidas.

4.10.1.- Selección de recombinantes.

Una vez determinados los títulos de las bibliotecas, se seleccionó la dilución que produjo aproximadamente 200 ufc. El plaqueo se repitió, pero ahora utilizando cajas de LB, complementadas con X-gal [75-100 μg/ml] IPTG [1 mM] como inductor de expresión y ampicilina [100 μg/ml] como marcador de selección. La incubación se realizó bajo las condiciones ya descritas.

Concluida la incubación, se cuantificó el número de colonias azules y blancas (recombinantes) y se calculó el porcentaje de ufc recombinantes para definir el tamaño de las bibliotecas construidas en plásmidos.

4.11.- Amplificación de las bibliotecas construidas en plásmidos.

Una vez tituladas las bibliotecas, se plaqueó el volumen correspondiente a $0.5\text{-}5\times10^5$ ufc distribuidas en 10 cajas Petri de 150mm, con medio LB complementado con ampicilina [100 μg/ml], incubando a 37 °C hasta que una capa celular densa (crecida por 6-12 hrs promedio) fue visible. Las placas fueron cubiertas con 15 de medio SOC aproximadamente, agitándolas para ayudar a desprender la capa celular. Las bacterias crecidas fueron colectadas en un solo tubo, repitiéndose ésta operación hasta recuperar el mayor número de células posibles. Esta suspensión fue incubada a 37 °C por 1 h, con agitación constante.

4.11.1.- Amplificación en medio semi-sólido.

La amplificación fue realizada en tubos Falcon de 50 ml, cada uno con un máximo de 30,000 colonias por tubo. Se preparó LB 2X con agarosa SeaPrep de bajo punto de fusión (FMC) y se equilibró a 37 °C, adicionándole ampicilina [100 μg/ml]. Esta mezcla se fraccionó en muestras de 25 ml en tubos Falcon de polipropileno de 50 ml y se incubaron en un baño de agua fría por 20-60 min . Concluido este tiempo, los tubos se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Después de la incubación, el contenido de los tubos se vertió en una botella para centrifugación de 500 ml y las células fueron empastilladas a 8,000 rpm a temperatura ambiente durante 20 min. El paquete celular obtenido se resuspendió

en un volumen total de 75 ml de medio Luria y se le adicionaron 25 ml de glicerol estéril. Esta mezcla fue distribuida en criotubos y se almacenó a -70 °C.

4.12.- Ligación de cDNA al fago λ gt22A.

Para la ligación en este vector se requirió de 20 ng de cDNA, los cuales fueron precipitados con 5 μl de tRNA [1 μg/μl] de levadura. 0 5 volúmenes de NH_4OAc [7.5 M] y 2 volúmenes de etanol al 100%, incubando en hielo por 10 min El cDNA se recuperó por centrifugación a 14,000 rpm 10 min a 4 °C y fue lavado con 0.5 ml de etanol al 70%, centrifugando por 5 min. El precipitado (20 ng cDNA), se secó con centrifugación al vacío, adicionandole posteriormente 1 μl de amortiguador de ligación (5X), 2 μl de λgt22A cortado con *Not I-Sal* I [0.25μg/μl] y 1 μl de DEPC-agua, permitiendo que el precipitado se hidratara completamente, antes de agregarle 1 μl de T4 DNA ligasa [1U/μl]; la mezclada se incubó 16 horas a 16 °C.

4.12.1.- Empacamiento *in vitro* del cDNA ligado.

El empacamiento de la ligación se realizó usando el kit de empacamiento *in vitro* de Amersham (Amersham Life Science), el cual consta de dos tubos que contienen extracto celular derivado de dos fagos lisogénicos inducidos, cuyos profagos acarrean mutaciones complementarias en los genes requeridos para conjuntar partículas de fago maduras.

Los dos extractos celulares del kit fueron mezclados con los 5 μl de la reacción de ligación y se incubaron de 2 a 4 h a 20 °C. Posteriormente, ésta suspensión (aproximadamente 500 μl) se mezcló con 470 μl de amortiguador SM, manteniéndose en hielo hasta el proceso de titulación.

4.13.- Preparación de las células césped *E. coli* Y1090.

La cepa de *E. coli* Y1090 (GIBCO BRL) fue utilizada como célula césped para el crecimiento de fagos.

Estas células césped fueron crecida a partir de un disco sólido de bacterias mezcladas con gelatina (BACTi Disk). Al disco, se le adicionaron 200 μl de medio

SOC estéril y se incubó por 10 min a 37 °C. Se sembró una alícuota de ésta muestra en una placa de LB que contenía tetraciclina [100 μg/ml] incubándose 24 h a 37 °C Del cultivo anterior se tomó una colonia aislada y se sembró en 10 ml de LB que contenía tetraciclina [100 μg/ml], $MgCl_2$ 10 mM y 0.2% de maltosa, incubándose 24h a 37 °C.

4.14.- Plaqueo y selección de las clonas recombinantes contenidas en λ gt22A.

Se realizaron 4 diluciones seriadas de las bibliotecas, de 10^{-1} a 10^{-4} en volumen final de 100 μl con amortiguador PDB, el resto de fago sin diluir se almacenó a 4 °C.

Posteriormente se prepararon cuatro tubos de ensaye marcados como 10^{-1} a 10^{-4}, cada uno con 300 μl de células *E. coli* Y1090 y a cada tubo se le transfirió 10 μl de la dilución correspondiente. La mezcla de células-fagos se incubó a 37°C durante 30 min, a continuación se adiciono 3 ml de top agar fundido y equilibrado a una temperatura 50 °C. Cada mezcla se vertió en una placa de LB-agar y se distribuyó completamente sobre la superficie de ésta, una vez solidificada, se incubó en posición invertida durante toda la noche a 42 °C. Después de la incubación, se cuantificaron las unidades formadoras de placa (ufp) visibles en cada cultivo.

Se seleccionó la dilución en la que se formaron de 100-200 ufp y se repitió para ésta el proceso de infección y titulación utilizando placas de agar LBTmix (X-gal 75-100 μg/ml e IPTG 1 mM), en lugar de placas de LB-agar. Terminada la incubación, se cuantificó el porcentaje de recombinantes que correspondió a las colonias blancas y se realizaron los cálculos correspondientes para determinar los títulos de ufp/ml y finalmente el tamaño de las bibliotecas de cDNA realizadas en fagos.

4.15.- Amplificación de las bibliotecas construidas en el fago λgt22A.

Las bibliotecas construidas en el vector λgt22 pueden ser amplificadas en cepas de *E. coli* Y1090*hsd*R, las cuales acarrean un plásmido (pMC9: pBR322 *lacI*^{a}) que expresa el represor *lac* y previene la síntesis de proteínas de fusión.
Para la amplificación de las bibliotecas se mezclaron 0.5-5x10^5 ufp con 600 μl de células de *E. coli Y1090hsdR* y se incubaron por 30 min a 37 °C, a continuación se adicionaron 8 ml de top-agar. Esta mezcla fue vertida a una placa de 150 mm de LB agar conteniendo $MgCl_2$ 10mM, se incubó de 4 a 6 horas a 37 °C. Después de la incubación, el césped bacteriano fue cubierto con 15 ml de PDB y se colocó en agitación constante a temperatura ambiente durante 2 h. El PDB se colectó cuidadosamente y se transfirió a un tubo corex de 30 ml para eliminar los desechos por centrifugación a 7,000 g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante fue transferido a un tubo Falcon cónico de 15 ml, adicionándole 100 μl de cloroformo al 100%, se homogenizo vigorosamente por 15 seg. Finalmente, se agregó di-metil-sulfóxido a una concentración final de 7% y las bibliotecas fueron alicuotadas y almacenadas a 4 °C.

V. RESULTADOS.

5.1.- Rendimiento celular.

Con el objeto de calcular la cantidad de trizol necesarios para la máxima obtención de RNA total se cuantificó el número de células de cada cultivo de las ocho cepas analizadas por espectrofotometría.

Las lecturas de cada cultivo se realizaron a 600 nm, tomando en cuenta que $1UDO_{600nm} = 3x10^7$ células/ml.

De esta manera se realizaron varios cultivos de cada cepa, hasta tener la cantidad suficiente para reunir un mínimo de 3 mg de RNA total. Los rendimientos celulares se presentan en el cuadro 2 y cada pastilla celular fue obtenida de un cultivo inicial de 50 ml.

Cuadro 2. Rendimientos celulares por mililitro de cepas de *Candida albicans*.

CEPA	LECTURA DO_{600nm}	Células/ml ($x10^7$)
4	2.62	7.86
5	2.75	8.26
16	2.50	7.51
30	2.50	7.50
32	2.56	7.69
42	2.55	7.67
85	2.55	7.66
89	2.55	7.65

5.2.- Obtención de RNA total.

El RNA total obtenido de cada una de las cepas manejadas se cuantificó por espectrofotometría a 260 y 280nm, obteniéndose los valores presentados en el cuadro 3, donde se indican las concentraciones en µg de RNA, mediante la fórmula mencionada en material y métodos (pag. 21).

Cuadro 3. Concentraciones de RNA total obtenido de las cepas de *C. albicans.*

Muestra	D.O. 260 nm	D.O. 280 nm	Relación 260/280 nm	RNA[µg/µl]	µg totales
4	0.493	0.249	1.979	1.97	788.8
5	0.866	0.421	2.05	3.464	1,385.6
16	0.445	0.202	2.202	1.78	623
30	0.440	0.215	2.04	1.76	704
32	0.415	0.199	2.085	1.66	664
42	0.474	0.236	2.0	1.895	758.4
85	0.710	0.348	2.04	2.84	1,136
89	0.533	0.225	2.368	2.132	916.76

Cabe mencionar que se realizaron varias extracciones de RNA total de las diferentes cepas y se mezcló para hacer un sólo grupo de cepas sensibles y otro de cepas resistentes hasta alcanzar una concentración de 3mg de RNA total en cada uno.

5.2.1.- Análisis electroforético de RNA total.

Para evaluar la integridad de RNA total purificado de cada grupo de cepas, se realizó un corrimiento electroforético en un gel de agarosa formaldehído (1.5-2.7% respectivamente) de acuerdo al protocolo descrito en material y métodos. Los resultados del análisis electroforético para grupo de cepas resistentes y sensibles se muestran en la figura 3.

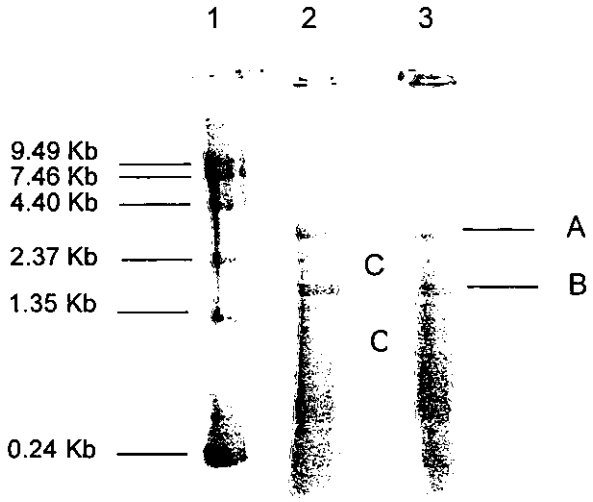

Figura 3. Corrimiento electroforético de RNA total obtenido de cepas de *Candida albicans*. El RNA total obtenido de las cepas se separó en un gel de agarosa-formaldehído (1.5% y 2.6%) y fue teñido con bromuro de etidio (0.05μg/ml.) En el carril número 1 se observa el marcado de peso molecular para RNA, en carril 2 y 3 el RNA total de las cepas sensibles y resistentes a los diferentes antimicóticos, respectivamente. Denotándose dos bandas correspondientes a las dos subunidades ribosomales (A y B respectivamente). Las bandas observadas a lo largo de los carriles corresponden a poblaciones de RNA mensajero (C).

5.3.- Obtención de RNA mensajero.

Los rendimientos de RNA mensajeros obtenido después de la purificación por unión a oligo dT celulosa son mostrados en el cuadro 4, así como su recuperación a partir del RNA total, recordando que el mRNA corresponde al 0.5-2 % del RNA total. Para este cálculo se realizó una dilución 1:10 con amortiguador TE, utilizando la siguiente fórmula:

$$mRNA\ (\mu g) = (A_{260})\ (40\mu g/ml/DO_{260})(10)(1.2\ ml)$$

donde A_{260} = Absorbancia de la solución a 260 nm.

$40\mu g/ml/DO_{260}$ = Factor de conversión para RNA:

10 = Factor de dilución.

1.2 ml = Volumen total de resuspención.

Substituyendo:

$$mRNA\ (\mu g) = (0.0051)\ (40\mu g/m)(10)(1.2\ ml)$$

$$= 2.45\ \mu g \text{ para el grupo de las cepas resistentes.}$$

$$mRNA\ (\mu g) = (0018)\ (40\mu g/m)(10)(1.2\ ml)$$

$$= 8.64\ \mu g \text{ para el grupo de las cepas sensibles.}$$

Cuadro 4. Obtención de RNA mensajero.

Grupo de cepas	Lectura 260 nm	RNA total (mg)	Recuperación de mRNA (%)	mRNA (µg)
Resistentes	0.0051	3.312	0.076	2.45
Sensibles	0.018	2.521	0.342	8.64

5.4.- Producción de síntesis de primera cadena.

Para la síntesis de primera cadena se partió de 2.45 y 5 μg de mRNA para las cepas resistentes y sensibles respectivamente.

Para poder rastrear la síntesis de la primera cadena de cDNA se utilizó uno de los dNTPs marcado con 10 μCi de ^{32}P (dCTP), tomando una alicuota de 2μl al final de la reacción. De esta manera se pudo medir la cantidad de radiactividad ácido precipitable mediante un contador de centelleo líquido y los valores de las cpm obtenidas en la síntesis de la primera cadena se observan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Valores en cpm obtenidos de las síntesis de primera cadena de cDNA

Cepas de *C. albicans* sensibles.		**Cepas de *C. albicans* resistentes.**	
Filtro	**cpm**	**Filtro**	**cpm**
1-sin lavar	169,445	1-sin lavar	180,194
2-sin lavar	159,256	2-sin lavar	173,889
Σ	328,701	Σ	354,083
1-lavado	5,046	1-lavado	12,520
2-lavado	4,428	2-lavado	10,656
	Σ 9,475		Σ 23,176

La producción de la primera cadena del grupo de resistentes, fue calculada a partir de la cantidad de radioactividad ácido precipitable, obteniendose la actividad específica (AE) del radioisótopo en la reacción, mediante el empleo de la siguiente fórmula:

$$AE\ (cpm/pmol\ dCTP) = \frac{X cpm\ total/10\ \mu l\ equivalentes}{200 pmol\ dC\ TP/10 \mu l}$$

donde X es igual a la sumatoria de las cpm obtenidas de los filtros sin lavar

$$\therefore \quad AE_{resistentes} = \frac{354{,}083\ cpm/10\mu l}{200 pmol\ dCTP/10\mu l}$$

$$AE_{resistentes} = 1{,}770.415 cpm/pmol\ dCTP$$

La cantidad de cDNA es determinada usando la siguiente ecuación y tomando en cuenta que se partió de 2.5 μg de RNAm y que los dos filtros lavados nos dieron una sumatoria de 23,176 cpm.

$$cDNA\ en\ \mu g = \frac{(23{,}176 cpm)(50\mu l/10\mu l)(20\mu l/2\mu l)(4 pmol\ dNTP/pmol\ dCTP)}{(1{,}770.415\ cpm/pmol\ dCTP)(3{,}030\ pmol\ dNTP/\mu g\ cDNA)}$$

$$Cantidad\ de\ cDNA\ en\ \mu g = \frac{4{,}635{,}200}{5{,}364{,}357.4} =$$ **0.864μg de primera cadena de cDNA del grupo de resistentes**

El porcentaje de conversión de síntesis de primera cadena resulto ser de λ un **37%** y fue obtenido mediante el cociente de la división de los μg de primera cadena de cDNA que se obtuvieron y los μg de RNAm que se utilizaron como molde.

$$\text{Porcentaje de conversión} = \frac{0.864\mu g \text{ de cDNA}}{2.3\mu g \text{ de mRNA}} \times \frac{100}{1} = \mathbf{37.57\%}$$

Los resultados obtenidos en la síntesis de la primera cadena para el conjunto de cepas sensibles son los siguientes:

$$\therefore\ AE_{sensibles} = \frac{328{,}701 cpm/10\mu l}{200 pmol\ dCTP/10\mu l}$$

$$AE_{sensible} = 1{,}643.505\ cpm/pmol\ dCTP$$

$$\text{cDNA en } \mu g = \frac{(9{,}474 cpm)(50\mu l/10\mu l)(20\mu l/2\mu l)(4 pmol\ dNTP/pmol\ dCTP)}{(1{,}643.505\ cpm/pmol\ dCTP)(3{,}030\ pmol\ dNTP/\mu g\ cDNA)}$$

$$\text{cDNA en } \mu g = \frac{1{,}894{,}800}{4{,}979{,}820.1} = \mathbf{0.380\ \mu g\ de\ primera\ cadena\ de\ del\ grupo\ de\ cepas\ sensibles.}$$

$$\text{Porcentaje de conversión} = \frac{0.380\ \mu g \text{ de cDNA}}{5\ \mu g \text{ de RNAm}} \times \frac{100}{1} = \mathbf{7.6\%}$$

5.4.1.- Análisis electroforético de los productos de síntesis de primera cadena.

Una alícuota de 30 μl de síntesis de primera cadena de cDNA tanto del grupo de cepas sensibles, como del grupo de resistentes, fue corrida en un gel de agarosa alcalino al 1.5 %,con el objeto de observar su patrón electroforético y así verificar la calidad del material sintetizado. Este se presenta en la figura 4.

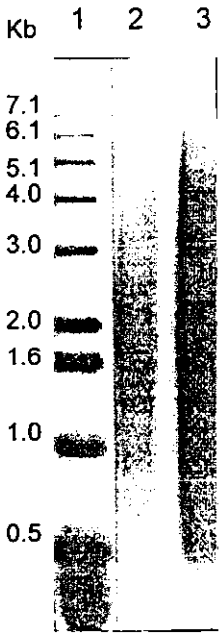

Figura 4. Análisis de síntesis de primera cadena de cDNA. Corrimiento electroforético en gel alcalino de agarosa al 1.5% de una alícuota de primera cadena de cDNA marcada con ^{32}P, secado y expuesto en una placa de rayos X. El carril 1 presenta el marcador de peso molecular, 2 y 3 representan el patrón de la síntesis de primera cadena del grupo de cepas sensibles y resistentes de C. *albicans* respectivamente; observándose un material de alto peso molecular y de gran concentración.

5.5.- Fraccionamiento por tamaño del cDNA.

Con el fin de eliminar residuos de adaptadores u otros fragmentos que puedan interferir en la ligación del cDNA al vector y seleccionar al DNA por mayor tamaño para su clonación, este fue pasado por una columna de cromatografía.

El cDNA se eluyó por una columna de sefacril S-500. Esta se lavó y las fracciones obtenidas fueron recolectadas. De estas, se seleccionaron las fracciones en las cuales se detectaron cpm y que no rebasaran un volumen sumatorio de 550 µl, tal como se explica en material y métodos. Los valores de cada muestra se observan en el cuadro 6 y 7.

Cuadro 6 .-Cuantificación en de los fragmentos de cDNA separados por cromatografía del material obtenido de las cepas sensibles.

No. de tubo	Volumen (µl)	Sumatoria de volúmenes (µl)	cpm	Cantidad de cDNA (ng)	Concentración de cDNA (ng/µl)
1	90	90			
2	105	195			
3	30	225			
4	31	256			
5	30	286			
6	34	310			
7	27	337	4972	15.97	0.591
8	22	359	12584	40.43	1.837
9	27	386	15113	48.55	1.798
10	30	416	20902	67.15	2.23
11	30	446	22565	72.50	2.416
12	33	479	22656	72.79	2.205
13	33	512	22591	72.58	2.199
14	33	545	22697	72.92	2.209
15	25	570			
16	29	599			
17	31	630			
18	31	661			
19	33	694			
20	36	730			

Cuadro 7 .- Cuantificación de los fragmentos de cDNA obtenidos por cromatografía para el grupo de cepas resistentes.

No. de tubo	Volumen (µl)	Sumatoria de volumenes (µl)	cpm	Cantidad de cDNA (ng)	Concentración de cDNA (ng/µl)
1	105	105			
2	98	203			
3	84	287			
4	103	390			
5	34	424	12,584	40.43	1.18
6	31	455	21,730	69.81	2 25
7	27	428	23,940	76 91	2.84
8	22	504	30,200	97 02	4.41
9	31	535	32,932	105 80	3.41
10	33	568			
11	25	593			
12	29	622			
13	28	650			
14	22	672			
15	32	704			
16	27	731			
17	29	760			
18	33	793			
19	29	822			
20	34	856			

Una vez que se determinó que muestras cumplian con los dos parámetros establecidos para la cuadro anterior (presencia de cpm y un volumen no mayor a 550 µl), se calculó la concentración de cDNA de doble cadena, en base a las cpm obtenidas mediante la siguiente fórmula.

$$\text{cDNA (ng)} = \frac{(\text{X cpm})(2)(4\text{pmoldNTP/pmol dCTP})(1{,}000\text{ng/}\mu\text{g ds cDNA})}{\text{AE (cpm/pmol dCTP})(1{,}515\text{pmol dNTP/}\mu\text{g ds cDNA})}$$

donde X cpm = cpm obtenidas de una fracción de las muestras selecciona.

Calculo para la muestra número 7 del grupo de cepas sensibles (cuadro 6):

$$\text{cDNA(ng)} = \frac{(4972\text{cpm})(2)(4\text{pmol dNTP/pmol dCTP})(1{,}000\text{ng/}\mu\text{g dc cDNA})}{(1{,}643\,505\text{cpm/pmol dCTP})(1{,}515\text{ pmol dNTP/}\mu\text{g dc cDNA})}$$

$$\text{cDNA(ng)} = \frac{39\,776\,000}{2\,489\,910\,075} = 15\,97 \text{ ng de dc cDNA para la fracción \# 7}$$

Lo mismo se hizo para las muestras siguientes y los ng obtenidos se reportaron en la cuadro 6 y 7, en la 5ª columna

Por otro lado la concentración de cDNA de las fracciones seleccionadas para clonar, se obtuvieron dividiendo los ng de dc cDNA obtenidos para cada fracción entre los µl correspondientes, este resultado fue reportado en la 6ª columna de los cuadros 6 y 7

5.5.1.- Análisis electroforético del cDNA seleccionado tamaño del grupo de cepas resistentes.

Las fracciones de cDNA seleccionados, por la presencia de material radiactivo, fueron separadas por electroforesis en un gel de agarosa 1%-TBE 1X a un voltaje de 50-75V, para después secar el gel y exponerlo en una placa autorradiográfica, obteniéndose el patrón de la figura 5.

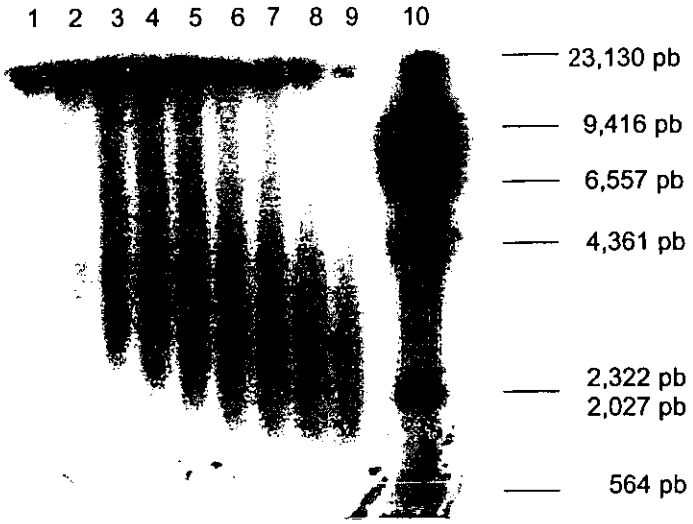

Figura 5. Análisis electroforético del fraccionamiento por tamaño de cDNA para el grupo de cepas resistentes. El cDNA marcado con ^{32}P, fue fraccionado utilizando una columna de sefacril S-500. Alícuotas de 2 μl por fracción fueron separadas en un gel de agarosa al 1%, utilizando como marcador de peso molecular λ/Hind III marcado con ^{32}P (carril 10). En los carriles 1-9 se presentan las diferentes fracciones correspondientes a las muestras del cuadro 7.

5.5.2.- Análisis electroforético del cDNA seleccionado tamaño del grupo de cepas sensibles.

El mismo procedimiento de electroforesis se realizó con el grupo de cepas sensibles, observándose el patrón de la figura 6.

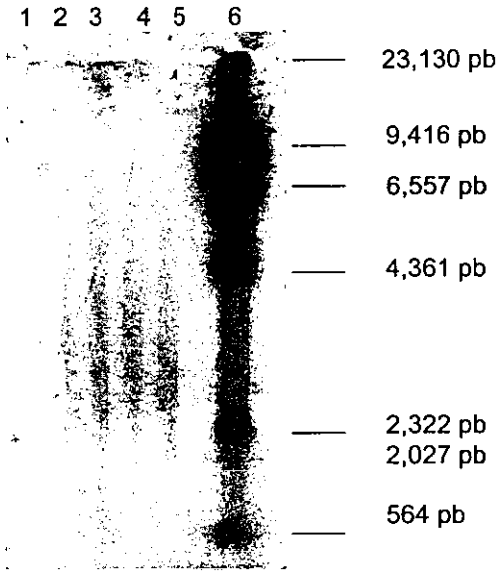

Figura 6. Análisis electroforético del fraccionamiento por tamaño de cDNA del grupo de cepas sensibles. La autorradiografía muestra los cDNAs separados en base a su tamaño, resueltos en un gel de agarosa al 1%-TBE 1X, de los carriles 1-5 se observan el cDNA fraccionado seleccionado para su clonación y que corresponden alas muestras 5-10 del cuadro 6. En el carril 6 se localiza el marcador de peso molecular ^{32}P-Hind III/λ.

Basándose en los datos obtenido en las cuadros 6 y 7 y los patrones observados en las figuras 5 y 6, se eligieron las fracciones a utilizarse en la clonación
Las fracciones del grupo resistente, seleccionadas para la ligación del cDNA al vector, corresponden a las observadas en los carriles 6 a 8 en la figura 5; y las del grupo sensible son aquellas marcadas como 2 a 5 de la figura 6

5.6.- Títulos de bibliotecas de CDNA.

De acuerdo a las unidades formadoras de placa y de colonia, obtenidas en las diluciones seriadas, realizadas para cada una de las bibliotecas de CDNA, se calculo el título de estas, al igual que el porcentaje de recombinantes

Títulos de bibliotecas clonadas en pSPORT I /Not I / Sal I.

BIBLIOTECA	ufc/ml	% RECOMBINANTES
C. albicans resistentes	7.52×10^5	98.2
C. albicans sensbles	2.50×10^5	95.0

Títulos de bibliotecas clonadas en λgt22A/Not I / Sal I.

BIBLIOTECA	ufc/ml	% RECOMBINANTES
C albicans resistentes	1.9×10^6	73 6
C albicans sensibles	2.85×10^6	97 0

VI. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue construir bibliotecas de expresión de cepas de *Candida albicans* sensibles y resistentes a cuatro antimicóticos. Como ya se indicó, este tipo de bibliotecas se elaboran a partir de moléculas de mRNA, las cuales son posteriormente convertidas en cadenas de DNA complementario. El mRNA representa una proporción del RNA total del 0.5 al 2 %, por lo que su obtención es quizá el suceso más importante de este proceso.

En este estudio optamos por la utilización del reactivo Trizol, para la obtención del RNA total. Con este reactivo Chomezynski [33]encuentra de un 25 a un 50 % más de eficiencia en el aislamiento total de RNA y mRNA de β-actina en células y tejido mamario de humanos, en comparación con el método convencional de tiocinato de guanidina-cloruro de cesio (GT-CsCl).

Aún con la eficiencia de este reactivo, obtuvimos concentraciones bajas de RNA total, debido probablemente, a la manipulación excesiva del RNA, que como se sabe, es una molécula altamente propensa a la degradación si no es mantenida en un ambiente libre de RNAsas. Otro factor que pudo haber afectado el rendimiento, es el almacenamiento prolongado en refrigeración, en el que se mantuvieron las cepas, ya que su actividad metabólica no se encontraba totalmente suspendida, por otra parte, la producción de desechos metabólicos

pueden crear ambientes tóxicos para las células, menguando así el número inicial de levaduras.

Aunque las preparaciones comerciales de las transcriptasas reversas son cada vez más puras y eficientes, presentan problemas en la síntesis de la primera cadena por su actividad de RNAsa H, por lo que era altamente probable que esta actividad destruyera el molde de mRNA de la cadena de RNA:cDNA, lo que resulta en la terminación de la síntesis del cDNA o bien en moldes de mRNA copiados parcialmente. [38,25,28] Por este motivo decidimos utilizar la enzima Super Script RT (Gibco B.R.L.), la cual presenta nula actividad de RNAsa H. Esto permitió que la síntesis de cDNA para la construcción de las bibliotecas de expresión de *C. albicans* fuera más eficiente y confiable, como se puede observar en el corrimiento electroforético de la síntesis de 1ª cadena, en donde la mayoría de los cDNA producidos son de alto peso molecular.

La clonación de los cDNAs de las bibliotecas, se realizó en el vector de clonación λgt 22A, que es un derivado de λgt 11. Este vector se prefirió a λgt 10, ya que este último sólo permite el tamizaje con sondas de ácidos nucleicos. Por su parte λgt 22A es un vector de expresión que nos permite la clonación direccional del cDNA y es capaz de producir un polipéptido específico por el fragmento de cDNA insertado; por lo cual estas bibliotecas pueden ser tamizadas con sondas de anticuerpos. Además el represor que contiene (tsCI) es sensible a la temperatura por lo que es posible regular la replicación y expresión de las proteínas de fusión.

Cuando este tipo de vectores son transfectados en células hospederas apropiadas, como Y1090, la transcripción y síntesis de estas proteínas pueden ser anuladas en la ausencia del IPTG, ya que es un inhibidor del represor lac presente en λgt22A.[39,40]

El vector de expresión pSPORT 1, utilizado también en la elaboración de nuestras bibliotecas, nos permite, gracias a los promotores T7 y SP6, que flanquean el sitio múltiple de clonación, que los cDNAs clonados puedan ser transcritos en cualquier sentido. Además gracias a estos promotores fuertes que contiene, podemos asegurar altos niveles de transcripción continua y controlada.[39,41]

Como ya mencionamos, *Candida albicans* es un patógeno que ha provocando un mayor interés en los últimos años por su presencia en pacientes inmunosuprimidos. El contar con los antígenos recombinantes de este hongo, permitiría realizar ensayos de identificación más específicos y eficientes, como podrían ser los ensayos de Wester bloth, en los cuales se utilizarían sueros de pacientes y también nos dá la posibilidad de tener diagnósticos más oportunos y precisos. Además, el hecho de utilizar estos vectores permitió identificar fácilmente las clonas recombinantes mediante la diferenciación de color en las placas, generado por la presencia del gen lac Z.

Los títulos de recombinantes en λgt 11 obtenidos en nuestro estudio, son muy parecidos a los presentados por Young R.[20], quien obtuvo en levaduras, al igual que este trabajo, títulos del orden de 10^6 clonas/μg de mRNA.

Finalmente, a pesar de que existen bibliotecas de cDNA de *C. albicans*[42,43,44], en México no existen informes de la construcción de estas; por lo cual, el tenerlas disponibles, nos da la oportunidad, entre otras cosas, de iniciar el estudio de los diferentes mecanismos de resistencia a azoles que presenta *Candida*, en la población Mexicana, dichos mecanismos, son diferentes a los presentados con otros antimicóticos en otros países como Estados Unidos.[35,37,42]

VII. REFERENCIAS

1 Arenas R (1995) Micología médica ilustrada Editorial Interamericana, Mc. Graw-Hill. México D.F.

2 Ballows A, Hauster WJ, Hermann KL, Isenberg HD and Shadomy HJ (1991) Manual of Clinical Microbiology. Fifth Edition. American Society for Microbiology. Washington DC.

3 Prasad R (1991) *Candida albicans*: Cellular and Molecular Biology. Editorial Springer-Verlag. Alemania.

4 Beck-Sagué CM, Jarvis WR and the National Nosocomial Infections Surveillance System (1993) Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980-1990. The Journal of Infectious Diseases. 167:1247-1251.

5 Vázquez JA, Sánchez V, Dmuchowski C, Dembry LM, Sobel JD and Zervos MJ (1993) Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: An epidemiologic study. The Journal of Infectious Diseases. 168:195-201.

6 Fisher JF, Chew WH, Shadomy S, Duma RJ, Mayhall CG and House WC (1982) Urinary tract infections due to *Candida albicans*. Reviews of Infectious Diseases. 4:1107-1118.

7 Pacheco RA, Araujo HL, Cashat CM, Samudio DG, Avila FC y Santos JI (1993) Endocarditis por *Candida* en el primer año de vida. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 50:157-161.

8 Odds FC (1979) *Candida* and candidosis. University Park Press. Gran Bretaña.

9 Baron EJ and Finegold SM (1990) Diagnostic microbiology. Eighth edition. The C.V. Mosby Company. U.S.A.

10 Braude AI (1984) Microbiología clínica. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires.

11 IMSS (1993) Atlas epidemiológico del Instituto Mexicano del Seguro Social 1985-1990. México.

12 Gutiérrez GT (1995) Serotipificación y sensibilidad a cuatro antimicóticos de cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes pediátricos. Tesis para especialización en Infectología y Ecología Médica. UNAM. México.

13 Auger P, Dumas C and Joly J (1979) A study of 666 strains of *Candida albicans*: Correlation between serotype and susceptibility to 5-Fluorocytosine. Journal Infectious Diseases. 139:590-594.

14 Bart-Delabesse E, Boiron P, Carlotti A and Dupont B (1993) *Candida albicans* genotyping in studies with patients with AIDS developing resistance to fluconazole. Journal of Clinical Microbiology. 31:2933-2937.

15 Kobayashi G (1995) Molecular genetics and the diagnostic mycology laboratory. Archieves of Medical Research. 26:293-296.

16 Stevens DA, Odds FC and Scherer S (1990) Application of DNA typing methods to *Candida albicans* epidemiology and correlations with phenotype. Reviews of Infectious Diseases. 12:258-266.

17 Farrell RE Jr. (1993) RNA methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization. Academic Press. USA.

18 Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P and Darnell J (1995) Molecular cell biology. Third edition. Scientific American Books. USA.

19 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JM (1994) Molecular biology of the cell. Third edition. Garland Publishing, Inc.USA.

20 Huynh TV, Young RA and Davis RW (1985) Constructing and screening cDNA libraries in λgt10 and λgt11; in DNA cloning, a practical approach. Edited by DM Glover. IRL Press. Washington DC.

21 Sentandreu M, Elorza MV, Valentin E, Sentandreu R and Gozalbo D (1995) Cloning of cDNAs coding for *Candida albicans* cell surface proteins. Journal of Medical and Veterinary Mycology. 33:105-111.

22 Valdés SHA, (1996) Análisis molecular de diferentes aislados de *Candida albicans* usando análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD). Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México D.F.

23 Anderson J, Srikantha T, Morrow B, Miyasaki SH, White TC, Agabian N, Schmid J and Soll DR (1993) Characterization and partial nucleotide sequence of the DNA fingerprinting probe Ca3 of *Candida albicans*. Journal of Clinical Microbiology. 31:1472-1480.

24 Ausubel Frederick M, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (1989) Current protocols in molecular biology. Greene

Publishing Associates and Wiley-Interscience. USA.

25 Life Technologies (1995) Training Center Workshop. cDNA library techniques. Gibco BRL Products. Gaithersburg, MD USA.

26 Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. U.S.A.

27 Hughes WT (1992) Candidosis en: Feiging R and Cherry JD. Tratado de infecciones en pediatría. Segunda edición. Interamericana McGraw-Hill. México.

28 Bradley J, Johnson D and Rubenstein D (1995) Lecture notes on Molecular Medicine. Blackwell Science.

29 Tortora GJ, Funke BR and Case C L (1992) Microbiology: An introduction. Fourth edition. The Benjamin/Cummings Company, Inc. Redwood City, California.

30 Brawner DL (1991) Comparison between methods for setotyping of Candida albicans produces discrepancies in results. Journal of Clinical Microbiology. 29:1020-1025.

31 Bermúdez SG (1996. Identificación de especies de levaduras causantes de sepsis neonatal. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México D.F.

32 Alonso MRA (1987) Aislamiento y Caracterización de material genético de *Giardia lamblia*. Construcción de bibliotecas genómicas y de expresión genética. Tesis de Doctorado en ciencias. CINVESTAV-IPN.

34.- Chomezynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. Focus. 15:532-536

35.- Fling ME, Kopf J, Tamarkin A, Gorman JA, Smith HA, Koltin Y (1991) Analysis of a Candida albicans gene that encodes a novel mechanism for resistance to benomyl and methotrexate. Mol. Gen. Genet. 227: 318-29.

36.- Smith HA, Allaudeen HS, Whitman MH, Koltin Y, Gorman JA (1988) Isolation and characterization of β-tubulin gene from Candida albicans. Gene 63: 53-67.

37.- Ben-Yaacov R, Knoller S, Caldwell GA, Beccker JM, Koltin Y (1994) Candida albicans gene encoding resistance to benomyl and methotrexate is a multidrug resistance gene. Antimicrob. Agents. Chemother. 38: 648-52.

38.- Levin JDL, Simon BG (1993) "Factors influencing first strand cDNA synthesis by SuperScript RT" Focus. 16: 89-91.

39.- Guizar VJ, Lisker R y Armendares S (1991) Temas selectos en Biomedicina 1. Distribuidora y Editora Mexicana S.A. de C.V. México D.F.

40.- Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA and Struhl K (1992) Short protocols in molecular biology. Second Edition. Greene Publishing Associates and John Wiley and Sons. USA.

41.- Lewin B (1994) Genes V. Oxford University Press. USA.

42.- Gale C, Finkel D, Tao N, Meinke M, McClellan M, Olson J, Kendrech K And Hostetter M (1996) Cloning and Expression of a gene encoding an integrin-like protein in Candida albicans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93:357-61.

43.- Ganesan K. Banerjee A and Datta A (1991) Molecular cloning of the secretory acid proteinase gene from Candida albicans and it use as species-specific probe. Infect. Immun. 59:2972-7.

44.- Sentandreu M, Elorza MV, Valentin E, Sensandreu R and Gozalbo D (1995) Cloning of cDNAs coding for Candida albicans cell surface proteins. J. Med. Vet. Mycol. 33:105-11.

VIII. ANEXOS.

8.1.- Soluciones.

❖ Amortiguador de corrida para geles alcalinos

NaOH 30 mM

EDTA 2 mM

❖ Amortiguador de fosfato salino (PBS).

Disolver en 800 ml de agua destilada:

8.0 g de NaCl.

0.2 g de KCl.

1.44 g de Na_2HPO_4.

0.24 g de KH_2PO_4.

Ajustar a pH 7.4 con HCl. Aforar a 1 litro y esterilizar 20 min. a 121°C.

❖ Amortiguador de lisis de colonias (CLB)

Tris-HCl 50 mM pH 7.2

$MgCl_2$ 5 mM

BSA 1%

Almacenar a 4°C y adicionar al momento de usar: DNasa 1 μg/ml (de un stock 10 mg/ml) y 40 μg/ml de lisozima.

❖ Amortiguador de muestra NBSB (análisis de RNA en geles de alcalinos).

Formamida 50%.

Amortiguador MOPS 1X

Formaldehído 7%.

Azul de bromofenol 0.1%

❖ Amortiguador MOPS 10X

MOPS 200 mM, pH 7.

NaOAc 50 mM

EDTA 10 mM.

- Amortiguador PDB (Amortiguador de dilución del fago)

Tris-HCl 50 mM pH 7.5.

NaCl 100 mM.

$MgCl_2$ 10 mM

Gelatina 0.1% (w/v)

- Amortiguador TE

Tris-HCl 10 mM pH 8.0.

EDTA 1 mM pH 8.0.

- Amortiguador TES

Tris HCl 10 mM pH 7.5.

EDTA 1 mM.

SDS 0.1%.

- Amortiguador TNES

NaCl 0.5 M

Tris-HCl 10 mM pH 7.5.

EDTA 1 mM.

SDS 0.1%.

- DEPC-agua

Disolver dietilpirocarbonato a una concentración de 0.1% e incubar a temperatura ambiente toda la noche, esterilizada por autoclave 60 min. a 121°C.

- dCTP (α-^{32}P) 10 mCi/ml

DU-PONT NENSURE.

- Amortiguador SM 1 litro

5.8 g NaCl.

2 g $MgSO_4.7H_2O$

6.05 g Gelatina 2%

Ajustar pH 7.5

- Amortiguador TEN

Tris-HCl 10 mM pH 7.5.

EDTA 0.1 mM.

NaCl 25 mM.

- Amortiguador TBE 5X

54 g de Tris-base.

20 ml de EDTA 0.5M pH8.

27.5 g Acido bórico.

8.2.-Equipo.

- Incubadora con agitación. Gerhardt. Alemania.
- Espectrofotómetro. Mod. 7800 UV/VIS. JASCO CO. Singapur, Japón.
- Centrífuga clínica. Mod. RT 6000D. Sorvall, Du-Pont Instrument. U.S.A.
- Microcentrífuga refrigerada. Mod. RMC 14. Sorvall, Du-Pont Instruments. U.S.A.
- Ultracentrífuga. Sorvall RC-5B. Du-Pont Instruments. U.S.A.
- Centrifugador al vacío (Speed Vac). Savant AS160. Farmindgdale, N.Y., U.S.A.
- Baño María para tubos eppendorf (Multiblock). Mod. 2052. LAB-LINE Instruments Inc. Illinois, U.S.A.
- Cámara de electroforésis. Mod. Horizon 58. Gibco BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg MD, U.S.A.
- Fuente de poder. Mod. 250. GIBCO BRL, Life Technologies Inc. Gaithersburg MD, U.S.A.
- Transiluminador de luz UV. LKB 20011. Macrovue. Snt. Gabriel California, U.S.A.
- Secador de geles al vacío. Mod. 583. BIO-RAD
- Vortex. Mod.1192. Mistral Mixer LAB-LINE Instruments, Inc.
- Películas instantáneas para fotografía (P/N 4x5). Polaroid 55. Cambridge MA, U.S.A.).

8.3.- Medios de cultivo.

❖ L-broth (Caldo luria. Miller´s L-broth base)

Mezclar 25 g de medio por cada litro de agua. Esterilizar 15 min. a 121°C.

❖ Placas de LB ampi

Para 100 placas de 100 mm. Disolver 75 g de Millers LB base en 3000 ml de agua. Fraccionar en tres frascos con 1000 ml cada uno y adicionarles 15 g de agar y esterilizar 45 min., enfriar en baño María a 55-65°C y adicionar 2 ml de ampicilina 50 mg/ml a cada frasco, justo antes de servir el medio en cajas Petri (aproximadamente 20 ml por caja).

❖ Placas de LBampi IX

Para 50 placas de 100 mm. Disolver 25 g de Millers LB base en 1000 ml de agua, alicuotar en 2 frascos con 500 ml cada uno y adicionarles 7.5 g de agar. Esterilizar 45 min., enfriar en baño María a 55-65°C y adicionar 1 ml de ampicilina 50 mg/ml, 2.4 ml de IPTG y 2.5 ml de X-gal a cada frasco justo antes de servir, homogeneizar y vertir aproximadamente 20 ml por placa.

❖ LBTMIX

Para 50 placas de 100mm. Disolver 25 g de Millers LB base en 1000 ml de agua y alicuotar en dos frascos con 500 ml adicionándoles 7.5 g de agar a cada uno. Esterilizar 45 min. y equilibrar en baño María a una temperatura de 55-65°C. Antes de servir, adicionar a cada frasco 5 ml de Tris 1M, 5 ml de $MgCl_2$ 1M, 2.4 ml de IPTG y 2.5 ml de X-gal. Servir aproximadamente 20 ml en cada plato.

❖ Top agar

Adicionar 0.8 g de agar por cada 100 ml de L-broth, esterilizar 15 min. a 121°C

8.4.- Abreviaturas.

µCi	Micro Curie
µF	Micro Faradio
µl	Microlitro
A_{600nm}	Absorbancia medida a 600 nanómetros
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
Ci	Curie
deoR	Mutación que aumenta la aceptación de plásmidos de gran tamaño por parte de las células DH10b
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP	Deoxirribonucleosido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
EndA1	Mutación en células DH10b que incrementa ampliamente la producción y calidad del plásmido.
IPTG	Isopropyl-β-D- thiogalactopyranoside.
Kv	Kilo voltios
M	Molar
mCi	Mili Curie
mg	Miligramo
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
mrr-hsdRMS-mcrBC McrA,	Sistemas de restricción mutados en las células DH10b, permitiendo la construcción de bibliotecas más representativas.
NaCl	Cloruro de sodio

NaOH	Hidróxido de sodio
NaPPi	Pirofosfato de sodio
NBSB	Northern blot sample buffer
ng	Nanogramo
NH_4Oac	Acetato de amonio.
nm	Nanómetro
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
Poly $(A)^+$	Acido ribonucleico poliadenilado
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RecA1	Mutación en las células DH10b que aseguran la estabilidad del inserto
RNA	Acido ribonucleico
Seg.	Segundos
SPC	Síntesis de primera cadena
TAE	Amortiguador de Tris/Acetato/EDTA.
tRNA	Acido ribonucleico de transferencia
U	Unidades de enzimas de restricción.
UDO	Unidad de densidad óptica
ufc	Unidades formadoras de colonia
ufp	Unidades formadoras de placa
v	Voltios
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil-beta-D-galactopiranósido.