

10  
2ej.



Universidad Nacional Autónoma  
de México

Facultad de Estudios Superiores  
CUAUTITLÁN



“Obtención de un Banco de Epitopos de la Proteína  
de Membrana Externa OmpC de *Salmonella Typhi*  
9, 12 Vi:d, en el Fago de Fusión fuse 2  
por Medio de Técnicas de DNA Recombinante”

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A  
LUIS ANTONIO CARREÑO SANCHEZ

Director Dr. Armando Isibasi Araujo  
Asesor QFI. Andrea A. Becerril Osnaya



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

## CONTENIDO

	Pag
INDICE DE FIGURAS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	x
SIMBOLOGIA.....	xi
RESUMEN.....	xii
I. INTRODUCCION.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
III. ANTECEDENTES.....	6
1. Fiebre tifoidea. Características y uso de vacunas.	7
2. Caracterización y aislamiento de la PNE OmpC de <i>S. typhi</i> .....	12
3. Bacteriófagos filamentosos.....	15
A. Estructura y características del virión.....	15
B. Ciclo vital.....	22
4. Uso de los fagos filamentosos como vectores de clonación.....	28
A. Vectores derivados del fago M13.....	30
B. Vectores derivados del fago fd.....	31
5. Fagos de fusión y su aplicación en el análisis de determinantes antigénicos (epitopos) de proteínas.	36
IV. METODOLOGIA.....	48
1. Estrategia experimental.....	49
2. Caracterización de la cepa bacteriana.....	50
3. Preparación del vector de clonación.....	51
4. Preparación de los insertos.....	58

	vi
5. Clonación.....	66
6. Transformación bacteriana por electroporación.....	66
7. Obtención y procesamiento de los viriones.....	68
8. Aislamiento e identificación de clonas recombinantes a proteínas de <i>S. typhi</i> 9, 12 Vi:d..	69
V. RESULTADOS.....	77
VI. DISCUSION.....	109
VII. CONCLUSIONES.....	131
VIII. REFERENCIAS.....	134

## INDICE DE FIGURAS.

FIGURA	Pag
1 MICROGRAFIA ELECTRONICA DEL FAGO fd	17
2 MAPA GENETICO DEL GENOMA DE LOS FAGOS Ff	21
3 CICLO INFECCIOSO DE LOS FAGOS Ff	23
4 CICLO REPLICATIVO DEL FAGO M13	26
5 MAPA GENETICO DE LOS VECTORES M13mp18 Y M13mp19	32
6 MAPA GENETICO DEL FAGO fd-tet	35
7 MAPA GENETICO DE LOS VECTORES fUSE	41
8 VERIFICACION DE LA PRESENCIA DEL FACTOR F <sup>+</sup> EN LA CEPA <i>E. coli</i> K91-Kan.	79
9 ENSAYO DE INFECTIVIDAD DE LA CEPA <i>E. coli</i> K91-Kan	81
10 ENSAYO DE TRANSFORMACION DE LA CEPA <i>E. coli</i> K91-Kan CON DNA RF DEL FAGO fUSE 2	82
11 CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE DNA EN GEL DE AGAROSA AL 1%.	83
12 CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE DNA EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) AL 7.5%	85
13 ANALISIS DE RESTRICCION DEL DNA FAGO fUSE 2	86
14 CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE DNA EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) AL 12%	87
15 CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE DNA EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) AL 12%.	88
16 ELECTROPORACION MEZCLA DE LIGACION FAGO fUSE 2 Y FRAGMENTOS 170 pb DNA CROMOSOMAL TOTAL <i>S. typhi</i> 9, 12 Vi:d EN <i>E. coli</i> MC1061	90

17	TITULACION SUEROS DE CONEJO ANTIPORINAS <i>S. typhi</i>	92
18	ADSORCION SUERO 1 DE CONEJO ANTIPORINAS <i>S. typhi</i>	94
19	ADSORCION SUERO 2 DE CONEJO ANTIPORINAS <i>S. typhi</i>	95
20	TITULACION DE ANTICUERPOS PURIFICADOS DEL SUERO 1 DE CONEJO ANTIPORINAS <i>S. typhi</i>	96
21	EVALUACION DEL CONJUGADO AVIDINA-PEROXIDASA	97
22	ENSAYO DE VERIFICACION DE BIOTINACION DE GAMMAGLOBULINAS ANTIPORINAS DE <i>S. typhi</i>	98
23	<i>Dot-ELISA</i> EN COLONIA DE MUESTRA DE ELECTROPORACION DEL BANCO 1 (Sonicación DNA cromosomal total) y 2 (Sonicación región 2.6 a 3.4 Kb) DE EPITOPOS DE <i>S. typhi</i> 9, 12 <i>Vi:d</i> EN <i>E. coli</i> MC1061	101
24	<i>Dot-ELISA</i> EN COLONIA DE MUESTRA DE ELECTROPORACION DEL BANCO 3 DE EPITOPOS (Sonicación y digestión Bal 31 región 2.6 a 3.4 Kb) DE <i>S. typhi</i> 9, 12 <i>Vi:d</i> EN <i>E. coli</i> MC1061	102
25	<i>Dot-ELISA</i> EN COLONIA DE MUESTRA DE AMPLIFICACION DEL PRIMER AISLAMIENTO (BIOPANNING) DEL BANCO 2 DE EPITOPOS DE <i>S. typhi</i> 9, 12 <i>Vi:d</i> EN <i>E. coli</i> K91-Kan	103
26	ELECTROPORACION. ENSAYO DE DETECCION DE FAGOS <i>fUSE 2</i> RECOMBINANTES CON ANTICUERPOS ANTIPORINAS DE <i>S. typhi</i>	105
27	PRIMERA SELECCION (BIOPANNING). ENSAYO DE DETECCION DE FAGOS <i>fUSE 2</i> RECOMBINANTES CON ANTICUERPOS ANTIPORINAS DE <i>S. typhi</i>	106
28	SEGUNDA SELECCION (BIOPANNING). ENSAYO DE DETECCION DE FAGOS <i>fUSE 2</i> RECOMBINANTES CON ANTICUERPOS	

ix

ANTIPORINAS DE *S. typhi*

107

29 ESTRUCTURA GENERAL DE LOS INSERTOS EN EL FAGO *IUSE 2.*

119

## INDICE DE TABLAS.

TABLA		PAG
I	CARACTERISTICAS DE ALGUNOS VECTORES Ff.	46
II	TITULOS DE PARTICULAS INFECCIOSAS DE FAGO <i>fUSE 2</i> CORRESPONDIENTES A CADA UNO DE LOS BANCOS EPITOPICOS DE <i>S. typhi</i> 9, 12 <i>Vi:d</i> OBTENIDOS.	100
III	CALCULO DEL TAMAÑO DE LOS BANCOS OBTENIDOS.	108



## SIMBOLOGIA.

PME	Proteínas de membrana externa.
Omp	Outer membrane protein (Proteína de membrana externa).
omp	Gene codificante de Omp.
Kdal	Kilodaltones.
Kb	Kilobase.
RF	Forma replicativa.
SSB	Single strand binding (Unión a cadena sencilla)
PEG	Polietilenglicol.
IPTG	Isopropiltiogalactósido.
lac	Lactosa.
Amp	Ampicilina.
Amp <sup>r</sup>	Resistencia a.
Tc	Tetraciclina.
Kan	Kanamicina.
Str	Estreptomina.
TU	Unidades de transducción.
SSF	Solución salina fisiológica.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
ON	Over night (toda la noche).
SSC	Solución salina de citratos.
BSA	Albúmina sérica bovina.
PBS	Buffer salino de fosfatos.
pol	polivalente.
Ag	Antígeno.
Ac	Anticuerpo.

## RESUMEN

La erradicación de la fiebre tifoidea depende en gran medida de programas de vacunación, sin embargo los intentos por obtener vacunas efectivas contra ésta enfermedad utilizando microorganismos completos no han sido del todo satisfactorios. Actualmente se sabe que proteínas de la membrana externa del agente causal llamadas porinas intervienen en la inducción de adecuadas respuestas inmunes en contra de la enfermedad (protección en el modelo murino), pero a pesar de ésto sólomente ha podido aislarse el gene codificante para la porina OmpC; es por ello que es necesario continuar con investigaciones encaminadas a estudiar las propiedades antigénicas de dichas proteínas y la influencia que éstas tienen sobre el sistema inmune. El estudio de regiones epitópicas en determinados antígenos de interés inmunológico se ha visto dificultado principalmente por las estrategias experimentales utilizadas para aislar y caracterizar con eficiencia dichos fragmentos proteicos. El uso de bancos de epitopos en fagos filamentosos han sido de utilidad en el mapeo de epitopos continuos y discontinuos en proteínas de conocida estructura tridimensional.

Con la finalidad de iniciar con el estudio de epitopos de proteínas de membrana externa involucrados en una respuesta inmune de protección utilizando técnicas de DNA recombinante, se construyeron 3 bancos de epitopos de la porina OmpC y de DNA cromosomal total de *Salmonella typhi* 9, 12 Vi:d en el fago filamentoso de fusión *fUSE 2*, el cual tiene la capacidad de

expresar en la superficie del viri3n la secuencia clonada en el gene III. Se insertaron en el sitio 3nico de restricci3n para la enzima Bgl II fragmentos menores de 100 a 170 pb, obtenidos al azar por medio de la sonicaci3n y digesti3n con la nucleasa Bal 31, de DNA cromosomal total y de fragmentos de 2.6 a 3.4 Kb derivados de la digesti3n del mismo con la enzima de restricci3n Bgl II. El aislamiento de las clonas recombinantes obtenidas por electroporaci3n a trav3s de "biopanning" fue realizado con el uso de anticuerpos antiporinas de conejo, comprob3ndose la existencia de p3ptidos de *S. typhi* en las particulas infecciosas del fago *FUSE 2* por medio de ensayos de Dot-ELISA y ELISA. El banco as3 obtenido ser3 3til posteriormente para mapear a nivel inmunol3gico las regiones pept3dicas que sean de inter3s, para finalmente aislar y caracterizar epitopos reconocidos por linfocitos B y T con el fin de estudiar su papel en una respuesta inmune espec3fica de protecci3n.

## I. I N T R O D U C C I O N

La ingeniería genética puede definirse como la manipulación deliberada de la información genética con el fin de realizar ciertos análisis a nivel de DNA, mejoramiento de determinadas especies y muy recientemente, para el estudio de algunas estructuras proteicas con miras a la obtención de vacunas. La manipulación genética de diversos organismos comenzó a ser una realidad con el descubrimiento de las enzimas de restricción clase I por Arber y clase II por Smith, Wilcox y Kelly en 1970, describiendo su alta especificidad para cortar el DNA en una secuencia de nucleótidos dada, y con la comprobación de la generación de extremos cohesivos en el DNA por su digestión con la enzima de restricción Eco RI (120). Posterior al descubrimiento de enzimas capaces de generar moléculas de DNA integras a partir de fragmentos provenientes de diversas fuentes, la clonación o generación de moléculas híbridas de DNA comenzó a ser una realidad. Posteriormente con estos descubrimientos pudo concebirse el aislamiento de genes a partir de organismos de interés, con el propósito de obtener grandes cantidades del mismo, posiblemente para la determinación química de su secuencia de bases ó para su uso en otros procedimientos, tales como caracterización de proteínas, sobreproducción de las mismas, localización cromosómica de genes, etc. Se considera que las moléculas que contienen fragmentos de DNA no emparentados, es decir, no provenientes de la misma fuente de origen, deben referirse bajo el término "DNA recombinante" (4).

Actualmente gracias a los poderosos métodos del DNA

recombinante, es posible el estudio a nivel molecular del DNA, permitiendo el aislamiento y propagación de genes específicos (7) y consecuentemente el conocimiento más profundo de ciertas estructuras proteicas de gran cantidad de microorganismos patógenos involucradas en diversos mecanismos de invasividad y en la generación de una respuesta inmunológica determinada por las mismas. Como es claro, el avance de la biología con el advenimiento de estas técnicas es enorme, y en un futuro permitirá utilizar todo éste potencial para gran variedad de propósitos, siendo la obtención de vacunas, materialmente contra todos los agentes patógenos existentes, una expectativa muy clara.

## II. O B J E T I V O S

A) Obtener un banco o librería de determinantes antigénicos de la PME OmpC de *S. typhi* 9, 12 Vi:d en el fago de fusión *fUSE 2* para posteriormente averiguar el papel que juega ésta en la inducción de una respuesta inmune de protección contra la Fiebre Tifoidea, montando con ello un precedente para dilucidar a futuro las regiones específicas del antígeno involucradas en éste efecto y poder obtener una vacuna adecuada contra ésta enfermedad.

B) Explorar el alcance del sistema de fagos filamentosos de fusión para el aislamiento de epitopos codificados en los fragmentos de DNA clonados en ellos.



### III. A N T E C E D E N T E S

### 1. Fiebre Tifoidea. Características y uso de vacunas.

La Fiebre Tifoidea es una enfermedad infecto-contagiosa causada por la bacteria *Salmonella typhi*, la cual se distingue por ser un bacilo gramnegativo de 0.5 a 0.7  $\mu$ m por 1 a 3  $\mu$ m de dimensión (103), con motilidad positiva por medio de flagelos peritricos, anaerobio facultativo, resistente a bajas temperaturas y con la capacidad de permanecer viable durante tiempos prolongados en el agua de pozos o depósitos. Se caracteriza como un parásito exclusivo del hombre y es perteneciente a la tribu *Salmonelleae* de la familia *Enterobacteriaceae*. De acuerdo a la clasificación de Kauffman-White, pertenece al grupo D en cuanto al antígeno O, compartiendo con 96 especies del género *Salmonella* los antígenos somáticos 9 ó 12 (*S. enteritidis* y *S. sendai*), conteniendo también el antígeno capsular Vi y el antígeno flagelar (H) de fase I llamado d (26).

Clínicamente la Fiebre Tifoidea se caracteriza por la aparición de fiebre continua, inflamación del intestino, formación de úlceras intestinales (principalmente en las placas de Peyer), esplenomegalia y toxemia, así como hepatomegalia (103). Las bacterias ingeridas llegan al intestino delgado desde el cual llegan a los vasos linfáticos y a continuación pasan a la sangre produciendo septicemia. Se transportan por medio de ella hacia muchos órganos, tales como hígado, vesícula biliar, médula ósea, bazo ó riñón y pueden ser causa de meningitis o neumonía. Los microorganismos se multiplican en el tejido linfoide intestinal y

se excretan por el excremento, aunque debido a las lesiones que produce en el tracto urinario, puede aparecer en orina (41); el periodo de incubación por lo general es de 10 a 14 días. Se ha verificado que la patogenicidad de *S. typhi* depende de su capacidad de permanecer viva y multiplicarse dentro de los macrófagos, de los cuales al morir es expulsada para invadir otras áreas. Además de que los macrófagos protegen las bacterias que están dentro de ellos de la acción de las defensas humoresales, hacen que la acción de los antibióticos sea más difícil (103).

En 1886, Franklin y Simmons y en 1887, Braumer y Peiper realizaron los primeros ensayos sobre la vacunación contra la Fiebre Tifoidea en animales de laboratorio, utilizando en los dos casos microorganismos vivos; esto condujo a Wrigth en Inglaterra y a Pfeiffer y Kolle en Alemania a emplear 10 años después, vacunas inactivadas por calor para su inmunización en seres humanos (26, 104).

Metchnikoff y Besredka en 1911 produjeron la enfermedad típica en chimpances, descubriendo que los animales podían ser protegidos por los antígenos O 6 Vi (39), lo que provocó que en 1925, Besredka propusiera el empleo de vacunas elaboradas con bacterias vivas atenuadas administradas por vía oral. Su efecto se estudió en seres humanos, en donde hubo muertes entre los vacunados, lo que provocó su sustitución por vacunas elaboradas con bacterias muertas (69).

En 1955, bajo los auspicios de la O.M.S., se realizaron los primeros ensayos controlados de inmunización con el fin de obtener

información confiable acerca del valor profiláctico de las vacunas; en dichas pruebas se demostró su eficacia al observarse producción de una respuesta inmune por medio de la detección de anticuerpos exclusivamente de tipo IgM contra el antígeno O (23). A pesar de éste resultado, éstas vacunas tenían el inconveniente de inducir inmunidad de corta duración, requiriendo la aplicación de 2 inmunizaciones posteriores (12). En consecuencia, ésto obligó a producir otro tipo de preparaciones del microorganismo para fines profilácticos.

Se ha estudiado el efecto protector de 2 vacunas orales en humanos, elaboradas a partir de bacterias muertas: una de ellas proveniente de una cepa dependiente de estreptomycinina (42) y la otra de una mutante pleiotrópica deficiente en UDP-4-galactosa epimerasa, que recibió el nombre de *S. typhi* Ty21a (43). Los resultados obtenidos con la aplicación de la primera cepa no fueron satisfactorios (76), mientras que la vacuna elaborada con la cepa mutante probó ser en un principio efectiva, pero desgraciadamente en estudios posteriores ésta disminuyó enormemente debido al número de dosis administradas (135).

Al fallar los intentos de obtener efectos protectores contra el microorganismo utilizando bacterias completas, se comenzaron a usar fracciones celulares de la misma. Mediante diversos estudios inmunológicos, se demostró que las proteínas de la envoltura celular de *S. typhimurium* protegían a los ratones contra la infección en grado semejante al inducido por las fracciones ribosomales obtenidas anteriormente por Vaneman (85).

En base a éstos antecedentes la región polisacarídica del LPS de *S. typhi* se extrajo con el fin de probar su efecto protector; a pesar de que los anticuerpos generados contra la molécula no fueron protectores, resultó ser un buen inmunógeno al inducir altos títulos de los mismos (78, 136). Actualmente se ha comprobado que a pesar de que se han encontrado pacientes con altos títulos de anticuerpos contra los antígenos O, H y Vi de *S. typhi* (109), ésto no guarda relación alguna con el estado de protección en la evolución de la enfermedad (98).

Se ha demostrado que la envoltura celular de las bacterias gramnegativas juega un papel muy importante en la relación huésped-parásito y que los componentes superficiales de dichas bacterias, en muchos de los casos, son los que determinan si una infección se establece o no (63). En consecuencia, ésto hizo pensar que los principales antígenos de la bacteria eran las proteínas expuestas en la superficie bacteriana.

Después de estudios encaminados a la dilucidación de la estructura y composición de la membrana externa de bacterias gramnegativas (86), se descubrió que su composición proteica era muy simple, ya que existían pocas proteínas pero en cantidades elevadas (99). Por estudios posteriores, Schnaitman demuestra la presencia de 4 proteínas principales o mayores y otro grupo de 10 a 12 proteínas denominadas menores, ya que se encontraban en menor cantidad con respecto a las proteínas principales (118). Osborn y Wu reclasificaron a las proteínas mayores en tres grupos diferentes en base a su estructura y función, destacando la proteína

modificable por el calor, la lipoproteína de Braun y las proteínas matrices o porinas (74), demostrándose que la función de éstas últimas era la de formar poros de difusión pasiva permitiendo el paso de sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular a través de la membrana, (74, 99) tales como azúcares, aminoácidos e iones inorgánicos. Así mismo se demostró que las proteínas matrices se encuentran fuertemente asociadas a la peptidoglicana, localizándose en la superficie de la membrana externa, siendo resistentes a los ataques de enzimas proteolíticas y actuando como receptores de fagos y colicinas (92).

En *S. typhi*, se han reportado que las PME están involucradas en la habilidad de la bacteria para resistir la acción del complemento y la fagocitosis (2), en el ataque e invasión de las células epiteliales (66) e intervienen en la respuesta inflamatoria (13).

En los últimos años, varios grupos de investigadores han enfocado sus estudios hacia la participación de las PME en la inducción de protección hacia las enfermedades producidas por las bacterias gramnegativas.

Frash, Buchanan y Arko, fueron los primeros en investigar la efectividad de éstas proteínas como inmunógenos protectores en estudios de protección contra *Neisseria gonorrhoeae*, demostrándose que el antígeno protector específico estaba presente en la membrana externa del microorganismo, evidenciando que las proteínas de dicha membrana estaban involucradas en la protección (17, 18). Resultados similares se han encontrado al efectuar estudios con PME de

enterobacterias (1,45, 53).

Kussi y cols. encontraron que ratones inmunizados con porinas obtenidas de una cepa rugosa de *S. typhimurium*, fueron más resistentes a la salmonelosis murina al retarlos con una cepa lisa. Para confirmar que los anticuerpos protectores obtenidos eran dirigidos hacia las porinas, adsorbieron el suero con las mismas y la protección desapareció (71).

Se ha valorado la respuesta inmune humoral hacia las PME de *S. typhi* en pacientes con diagnóstico clínico y bacteriológico de Fiebre Tifoidea, demostrándose que dichas proteínas son inmunógenas en el humano al encontrarse anticuerpos específicos contra ellas (IgG e IgM), tanto en la fase aguda como en la de convalecencia, particularmente dirigidos hacia las porinas (97).

Finalmente, Isibasi y cols. con la administración de PME de *S. typhi* 9, 12 Vi:d, indujeron protección del 100% en el modelo murino cuando se realizó el reto con la cepa homóloga de *S. typhi* Ty2 y de *S. typhimurium*, demostrándose así mismo que la inmunidad pasiva cruzada que se observaba estaba dada aparentemente por los anticuerpos dirigidos hacia las porinas (64).

## 2. Caracterización y aislamiento de la PME OmpC de *S. typhi*

En 1980, Lee y Schnaitman realizaron una comparación desde el punto de vista genético de las PME de *E. coli* y *S. typhimurium*, encontrando una gran similitud entre los genes estructurales que las codifican, incluso en su localización en el mapa genético

correspondiente (73); con ello, propusieron que éstas proteínas derivaban de un gene ancestral común para las enterobacterias. Al comparar el perfil peptídico obtenido de las porinas de *E. coli* y *S. typhimurium*, encontraron que éstas proteínas compartían pocos péptidos similares o idénticos entre sí, por lo que se propuso que las proteínas de la membrana externa de las enterobacterias derivaban de un gene ancestral común, siendo el gene de las porinas el que había sufrido mayores modificaciones durante la evolución (74).

Actualmente las PME de *E. coli* y *S. typhimurium* se han caracterizado (92); tres genes codificantes para porinas de *E. coli* han sido aislados, clonados y secuenciados: *ompC*, *ompF* y *phoE* (62, 87, 100). Para el caso de *S. typhimurium* cuatro porinas se han reportado: *OmpF*, *OmpC*, *OmpD* y *PhoE* (8, 90). Las proteínas *OmpF* y *OmpC* son reguladas por la osmolaridad y temperatura del medio de cultivo; *OmpC* se expresa a alta osmolaridad (100-300 mM NaCl), donde los niveles de *OmpF* son bajos. Las propiedades de permeabilidad de *OmpC* son similares a las de *OmpF*, excepto en que forma poros más pequeños (91).

Dos PME de *S. typhi* (35 y 36 KDal) se han purificado, demostrándose que tienen efecto lítico en glóbulos rojos y son capaces de producir canales de permeabilidad a los iones en membranas artificiales (19, 72), sugiriendo que podrían estar involucradas en la habilidad de la bacteria de penetrar células eucarióticas (61).

A pesar de que se han descubierto las propiedades de éstas PME



de *S. typhi*, no se tenía información acerca de la secuencia nucleotídica de los genes respectivos; hasta 1983, el único gene de PME del género *Salmonella* que se había caracterizado era el de la proteína no porina OmpA (40), sin embargo años más tarde, grupos independientes lograron la clonación del gene ompC de *S. typhi* empleando métodos genéticos (3), de hibridación (108) y mediante el uso de anticuerpos antiporinas (141) para después caracterizarlo por medio de su secuencia nucleotídica (107, 132).

Se encontró que el gene ompC de *S. typhi* está localizado en un fragmento de 3 Kb derivado de la digestión del DNA cromosomal con la enzima de restricción Bgl II; después de los experimentos de clonación y selección de recombinantes y de realizar el análisis electroforético de la PME de *S. typhi* que se expresaba, se encontró que la proteína OmpC migraba a 38.5 KDal y que se expresaba bajo condiciones de alta y baja osmolaridad. Esto indicó que la expresión de la proteína OmpC de *S. typhi* difiere de la expresión de la proteína análoga de *E. coli* y que podría ser relevante para la bacteria en el ambiente proporcionado por su hospedero natural (107). Se cree que ésta proteína es un excelente candidato para expresarse en el suero de pacientes con Fiebre Tifoidea, en base a que la osmolaridad del suero humano es alta (0.9% a 150mM de NaCl, equivalente a 10% de sacarosa) (94). Utilizando el gene ompC como sonda, se encontró reconocimiento del mismo en 17 cepas de *S. typhi* de casos clínicos y en cepas de referencia de *S. typhimurium* (107).

Según la secuencia nucleotídica obtenida del gene ompC, comprendido en un fragmento de 1.6Kb (Msp I - Asu II), está

compuesto de 1134 pb que corresponden a 21 aminoácidos de un péptido líder y a 377 correspondientes a la proteína madura de la porina OmpC (378 aminoácidos en total), así como de 3 regiones promotoras (P1, P2 y P3). Según estudios de comparación entre los genes ompC de *E. coli* y *S. typhi*, se encontró que existe un 92% de homología en el péptido líder y un 77% en la región de la proteína madura a nivel de nucleótidos, mientras que a nivel de la proteína, un 79% en la secuencia de aminoácidos de la proteína madura, y siendo la región del péptido líder idénticas para los dos microorganismos (108). Esto parece confirmar la hipótesis de Schnaitman (74), ya que interesantemente la región peptídica del aminoácido 331 a 349, el cual corresponde a un segmento altamente variable entre las porinas de *E. coli* OmpF, OmpC y PhoE, es conservada entre OmpC de *S. typhi* y OmpC de *E. coli* (108).

### 3. Bacteriófagos filamentosos.

#### A. Estructura y características del virión.

Los bacteriófagos o fagos filamentosos son virus infectantes de bacterias pertenecientes al tipo F según la descripción de Bradley (103), distinguiéndose por encontrarse ésta forma en virus vegetales y por ser capaces de infectar cepas bacterianas (principalmente Enterobacterias) poseedoras del factor sexual F+ (grupo Ff), siendo los virus que infectan cepas de *Escherichia coli* los estudiados a nivel fisiológico y genético. Los fagos F-específicos más estudiados son los fagos f1, fd y M13, siendo muy similares entre sí (30, 110).

Según estudios de microscopía electrónica (Figura 1), los fagos F-específicos se caracterizan por ser filamentos flexibles de estructura larga y delgada, aprox. de 890 nm de largo y de 6 a 7 nm de diámetro, distinguiéndose el genoma por ser una sola cadena circular de DNA de 6400 nucleótidos de tamaño (80, 110) y contenido en una estructura proteínica tubular llamada cápside. Dicha estructura está formada por 2700 moléculas de la proteína mayor pVIII de la cápside, así como por las proteínas pIII, pVI (localizadas en uno de los extremos de la cápside), pVII y pIX (localizadas en el extremo contrario) (125).

Los fagos filamentosos son resistentes a la acción de la mayoría de las proteasas, tripsina y pronasa, pero su infectividad se ve afectada por ficina, subtilisina y papaína. El virión es sensible al calentamiento por encima de los 80°C, al tratamiento ultrasónico y a solventes tales como cloroformo y detergentes como el dodecil sulfato de sodio (SDS). Así mismo, la partícula es estable bajo condiciones extremas de pH, temperatura y sal (20).

Los estudios iniciales a nivel genético de los fagos filamentosos fueron realizados por Pratt, quien colectando mutantes ámbar y sensibles a temperatura las clasificó por análisis estandar de complementación en 8 grupos, distinguiendo gran variedad de regiones con las cuales identificó la existencia de varios genes (tales como la mutante letal condicional amSH1 que representaba al gene VIII) responsables de la codificación de varias proteínas existentes en el virión (105,106). Años mas tarde, mediante el desarrollo de técnicas de secuenciación para DNA (117), fue posible

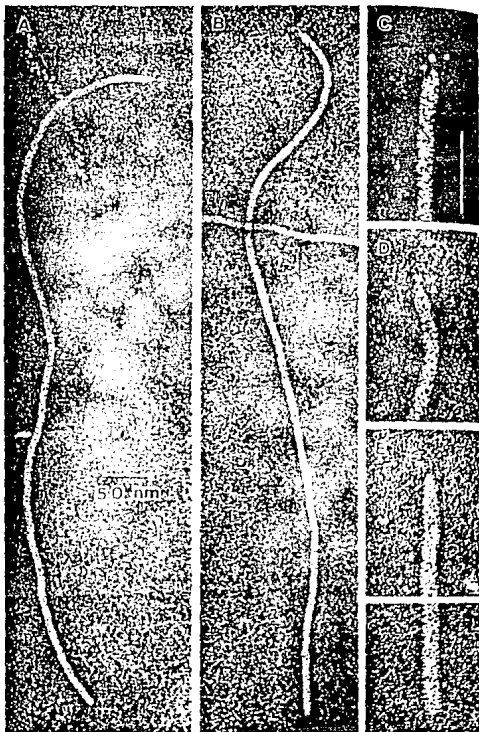


FIGURA 1. MICROGRAFIA ELECTRONICA DEL FAGO fd. A y B. Viriones completos en los cuales se observa el complejo de adsorción al pelo sexual bacteriano. C y D. Detalle del complejo de adsorción. E. Aspecto del virión después del tratatamiento con subtilisina (20).

obtener la secuencia completa de su genoma, descubriéndose que el DNA de los fagos M13 y f1 están constituidos por 6407 nucleótidos, mientras que el del fago fd se compone de 6408 nucleótidos (10, 11, 131). Hill y Petersen (58) encontraron que la secuencia del fago f1 difiere en 52 nucleótidos con la respectiva del fago M13 y en 186 nucleótidos con la del fago fd, lo que representa un 98% de similitud entre las 3 secuencias (11) y con lo cual hace suponer que los 3 fagos se han derivado de un antecesor común (58); así mismo el porcentaje del uso de los mismos codones es muy similar. A pesar de que la secuencia de la proteína mayor de la cápside ha mostrado ser casi la misma para los tres virus (a excepción de un aminoácido), estos pueden distinguirse entre sí a través de procedimientos serológicos (115).

Durante el ciclo reproductivo, después de su entrada a la bacteria, los fagos filamentosos pueden producir progeñe 10 min. después de la infección bajo condiciones ideales, pero se puede llegar a alcanzar equilibrio en la producción de partículas 30 min. después y permanecer como parásitos persistentes durante muchas generaciones. Pratt y col observaron que la infección de células con mutantes del fago fueron usualmente letales para la bacteria, observándose excepciones cuando las mutaciones se encontraban a nivel del gene II, en las cuales se observaba una baja producción de todas las proteínas codificadas por el genoma. Estas observaciones sugirieron que un balance en el crecimiento y generación de nuevas partículas del fago era necesario para la supervivencia de la bacteria. Así mismo, partiendo del hecho que la

infección del fago hacia la bacteria continua indefinidamente y que las células infectadas continúan creciendo y dividiéndose, la síntesis del DNA viral debía continuar al mismo nivel que al inicio de la infección. Por otro lado, se ha encontrado que la frecuencia de recombinación entre partículas infecciosas de éste tipo de virus es muy baja en comparación con la frecuencia observada (1-5%) en partículas de fago del doble de tamaño (20).

Actualmente se sabe que debido a la alta multiplicidad de la progenie generada por estos virus, se producen partículas defectuosas o mutantes interferentes (DI) que son acumulables (51, 57). La presencia de éste tipo de partículas se manifiesta de tres formas: el título de las partículas infecciosas producidas en un ensayo disminuye notablemente, las partículas defectuosas se acumulan en grandes cantidades (detectables en ensayos de microscopía electrónica, electroforesis de las partículas completas o en gradientes de sacarosa) y finalmente las placas producidas tienen una peculiar apariencia (60). Las partículas DI o "minifagos" contienen un DNA circular mucho más pequeño que el normal, lo que muestra que éste ha sufrido una gran delección de material genético, produciendo en consecuencia gran cantidad de partículas no infecciosas.

A pesar de que "estados de acarreamiento" de fagos ha sido reportado, ninguno de los bacteriófagos filamentosos F-específicos producen estados de lisogenia verdaderos, aun a pesar de que bajos niveles de partículas infecciosas han sido aislados a partir de bacterias que aparentemente no han sido infectadas (20).

El material genético de los fagos filamentosos codifica para 10 proteínas codificadas por 10 genes respectivamente, de los cuales 5 codifican para proteínas estructurales del virión, 3 para proteínas necesarias en la síntesis del DNA del fago y 2 para proteínas involucradas en el ensamble del virión (20). Así mismo, se localiza una región la cual no codifica para estructuras proteicas, observada por primera vez por Vovis (133), pero que contiene señales de iniciación y síntesis de ambas cadenas de DNA durante el proceso de replicación, de iniciación en la formación de la cápside y finalmente en la terminación de la síntesis del RNAm (11). En éste tipo de fagos, el DNA ocupa en cierto modo más del volúmen central del virión, como ocurre con el fago f1 (20). Finalmente, se han definido dos operones en éste tipo de fagos, uno de ellos formado por los genes V, VII y IX (123) y el otro por los genes III, VI y I (106).

El mapa genético del genoma de estos fagos ha sido descrito por varios investigadores (figura 2); los genes descritos fueron ordenados por Lyons y Zinder (79) y mapeados mediante las proteínas conocidas al someter lisados de células infectadas a electroforesis (54) ó por análisis del producto *in vitro* de la reacción de síntesis de proteínas dirigida por DNA's de fagos mutantes o de cepas silvestres (68, 88).

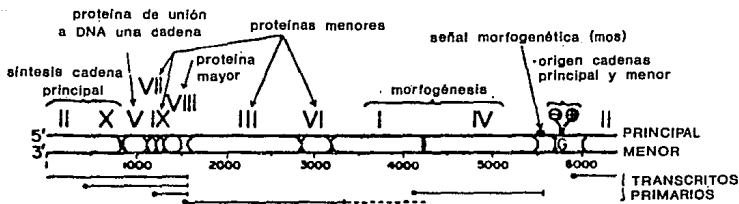


FIGURA 2. MAPA GENETICO DEL GENOMA DE LOS FAGOS Ff. La figura representa la molécula de doble cadena RF linealizada después de su digestión con la enzima Hpa I. La posición de los números corresponden al sistema de Beck y Zink (11), siendo la posición 1 la primera base después del sitio de rompimiento Hpa I. Los transcritos encontrados in vivo son representados en líneas, representando el punto la iniciación de la transcripción y la barra vertical su terminación (125).



## B. Ciclo vital.

El ciclo replicativo de los bacteriófagos filamentosos es muy particular, distinguiéndose de la mayoría de los fagos líticos o lisogénicos por su capacidad de reproducirse dentro de la bacteria huésped sin producir un efecto de lisis o muerte bacteriana. Dentro del mismo se distinguen diversas etapas:

- Adsorción. Los fagos F-específicos requieren de la presencia del pelo sexual para ser adsorbido y así poder adherirse a la punta de ésta proteína. La adsorción es dependiente de una fuente de energía de la célula y puede ocurrir a 0°C ó en presencia de inhibidores del proceso respiratorio (80). Este proceso es llevado a cabo por la proteína codificada por el gene III, la cual forma una estructura de adsorción localizada en uno de los extremos del virión (ver figura 1c) junto con la proteína pVI, siendo la función de ésta última desconocida en el fenómeno de adsorción. Se han propuesto varios modelos para explicar la entrada del material genético del fago a la bacteria, tales como la conducción del DNA del fago a través del pelo sexual hasta entrar al citoplasma de la bacteria (16), la retracción del pelo sexual durante éste periodo conduciendo a la partícula infecciosa a la superficie de la célula (80) y ciclos de retracción y relajación del pelo sexual durante éste periodo. Sin embargo, no existen evidencias contundentes sobre éstos modelos.

- Entrada. Una vez que el virión ha atacado a la célula, comienza la fase de eclipse en la cual, parte de las proteínas de la cápside se desorganizan liberando parcialmente el DNA y

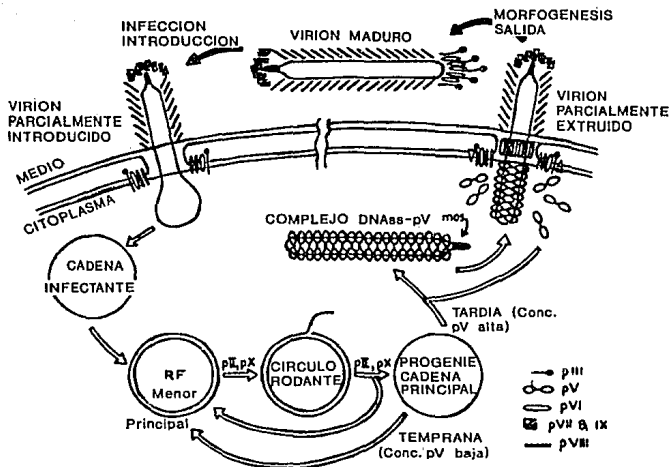


FIGURA 3. CICLO INFECCIOSO DE LOS FAGOS Ff. Los viriones maduros no han sido dibujados a escala con el fin de enfatizar la estequiometría y localización de las proteínas menores. Se sabe que la secuencia señal morfogénica *mos* está localizada en el extremo pVII/pIX del virión. La localización de las proteínas pVI, pVII y pIX, los detalles de la estructura del sitio de penetración del virión, la existencia de un complejo específico en el sitio de salida del mismo y la función de la proteína pX en la replicación, son detalles no comprobados (125).

haciéndose con ello susceptible de un ataque nucleolítico. Se ha demostrado que la entrada del virión a la bacteria está supeditada a la presencia de tres receptores proteicos para colicinas codificados por los genes *tolQ*, *tolR* y *tolA*, y que a la entrada del virión a la célula, el 50 al 60% de la proteína mayor de la cápside llega a asociarse con la membrana interna de la célula infectada, llegándose a recuperar el 55% de la misma en el momento de la salida de la progenie (20).

- Replicación del DNA. El mecanismo de replicación para los fagos F-específicos es poco usual en comparación con los modelos conocidos de replicación. Este proceso ocurre en 3 fases, las cuales involucran la participación de la región IG.

- 1a. fase. Esta comienza con la síntesis de la cadena complementaria del DNA durante el proceso de entrada. En éste periodo sólomente proteínas de la bacteria, tales como SSB, DNA polimerasa III, RNA polimerasa, DNA ligasa y DNA polimerasa I, son requeridas para esta síntesis, la cual inicia con la unión de un "primer" de RNA de 30 nucleótidos cerca de la base del loop C (figura 4); posteriormente la holoenzima DNA polimerasa III comienza la síntesis del DNA para finalmente ser removido el "primer" de su sitio y originarse una mella (nick). La molécula covalentemente circular relajada originada es llamada DNA RF IV, el cual es convertido en DNA RF I (superenrollado) por la DNA girasa (20). Así mismo durante éste periodo, las moléculas RF sirven como plantilla (templado) para la síntesis de RNAm, los cuales codifican para las proteínas pI a pX del fago.

- 2a. fase. Esta consiste en la producción de numerosas moléculas hijas de DNA RF (cientos por célula 10 min. después de la infección), iniciándose la síntesis en el lugar de la mella en el DNA, originada durante la 1a. fase, por medio del mecanismo del "círculo rodante". Algunos aspectos de éste proceso involucran sólo la participación de las proteínas pII y pX del fago y gran cantidad de enzimas de la bacteria (20).

- 3a. fase. Esta fase resulta en la producción de grandes cantidades de DNA circular de una sola cadena, susceptibles de ser empacados para producir viriones maduros. Esta comienza con la acumulación elevada en la bacteria de la proteína pV codificada por el fago. En este estadio, la gran mayoría de las cadenas sencillas de DNA generadas no funcionan como templados, sino que están destinadas a la formación de complejos muy largos y delgados con la proteína pV, parecidos a la partícula infecciosa, formando los precursores intracelulares de la progenie de los viriones; así mismo, la síntesis del DNA RF del fago decrece importantemente a solo un par de copias por célula (20, 125).

- Morfogénesis. Los fagos filamentosos son los únicos virus de bacterias de los que se tiene conocimiento que su mecanismo de morfogénesis es disperso, ya que no existen partículas infecciosas dentro de la célula, ensamblándose éstas dentro de la membrana interna de la bacteria y saliendo de ella sin provocar cambios importantes en su estructura y función y por lo tanto, sin afectar su viabilidad. Esta fase comienza con la formación del complejo DNA-pV al unirse por cada 3 ó 5 nucleótidos en el DNA, una molécula

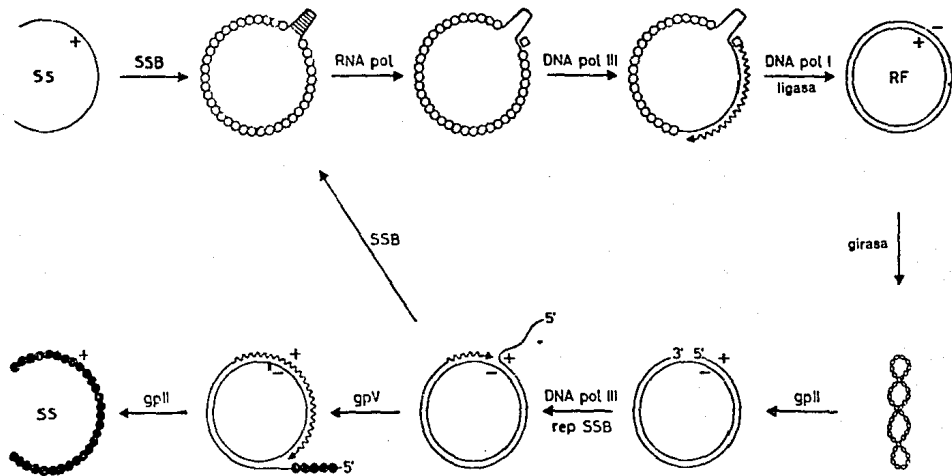


FIGURA 4. CICLO REPLICATIVO DEL FAGO M13. La parte superior muestra la síntesis discontinua de la cadena no codificante (-), mientras que la inferior muestra la síntesis continua de la cadena codificante (+). ○ SSB; □ Primer de RNA; ● gpV. (20).

de la proteína pV, formando una estructura parecida a la de la partícula infecciosa. Se ha descubierto que cada complejo formado, en adición a las 1300 a 1600 moléculas de la proteína pV, contiene de 1 a 3 moléculas de la proteína SSB de *E. coli* y una proteína de 11000 Dal que no es codificada por el propio bacteriófago (49). La orientación del DNA en el virión es dirigida por un gran "loop" llamado *mos*, el cual está localizado en la región IG del DNA del fago (figura 3) y en el extremo del virión formado por las proteínas pVII y pIX (125), siendo éste extremo el último en entrar a la célula durante la infección y el primero en salir de la bacteria durante la morfogénesis. El ensamble del virión ocurre en zonas de adhesión de la membrana llamadas "placas de Bayer", sitios en los cuales la membrana interna y externa de la bacteria se encuentran cercanos (9); se ha reportado que éstos sitios se incrementan en células infectadas por el fago f1, lo cual sugiere que la asociación de éstos con el ensamble de los fagos filamentosos es funcional. Con ello, los fagos son ensamblados en la cápside y directamente liberados hacia el exterior sin pasar por el periplasma (77). El ensamble de las partículas requiere de las proteínas menores de la cápside pVIII, pVII y pIX (figura 3), de la participación de las proteínas pI y pIV no estructurales del fago y de gran cantidad de funciones de la bacteria que aun no han sido identificadas (113, 114). Las proteínas de la cápside son sintetizadas como moléculas precursoras con 23 residuos de aminoácidos extra, localizados en el extremo amino terminal y que constituyen el "péptido señal", el cual debido a sus propiedades

hidrofóbicas causan la inserción de la proteína en la membrana celular; posteriormente, durante o después de la inserción, el péptido señal es separado de la proteína precursora por una enzima peptidasa. Después de la formación del complejo DNA-pV, éste es transportado a través de la membrana celular donde las proteínas de la cápside insertadas en ella junto con la proteína *fip* de la bacteria, desplazan la proteína pV del DNA para integrarse finalmente al mismo y formar la cápside; a pesar de éste proceso, algunas moléculas de DNA son expulsadas al exterior de la bacteria sin ninguna cubierta (20).

Las bacterias infectadas no son lisadas por la producción de partículas infecciosas del fago, incluso continúan con su crecimiento, el cual es súmamente mas lento en comparación con células que no han sido infectadas; esto explica el porque éste tipo de fagos forma placas turbias, a diferencia de fagos líticos que generan placas claras.

#### **4. Uso de los fagos filamentosos como vectores de clonación.**

La primera evidencia de que los fagos filamentosos podrían usarse como vectores de clonación, derivó de la observación de que mutantes por delección de éstos fagos se acumulaban durante su propagación, y que el tamaño del virión mutante estaba en proporción directa con el tamaño de la mutación que contenía, ya fuera por efecto de delección o por inserción (37, 38, 51).

Todos los genes de los fagos filamentosos son esenciales, sin

embargo existe una región de aprox. 500 nucleótidos localizada entre los genes II y IV en la cual segmentos de DNA pueden ser insertados. Esta región no codificante (IG) es indispensable, por lo tanto la inserción de segmentos extraños de DNA en ella puede afectar en forma importante la replicación del genoma del fago (figura 2). Afortunadamente los fagos que contienen secuencias extrañas a su genoma en ésta región, acumulan mutaciones en los genes II o V que llegan a compensar los cambios provocados en la replicación (34). Actualmente todos los vectores de uso común contienen éstas mutaciones.

Ya que el DNA de cadena sencilla no es sustrato para la gran mayoría de enzimas de restricción y ligasas, los segmentos de doble cadena de DNA's extraños son insertados en la forma RF del DNA del fago. Esta forma (DNA circular de doble cadena) puede ser fácilmente purificada de bacterias infectadas, manipulada en la misma forma que una entidad plasmídica y reintroducida a células competentes por procedimientos estandar. Así mismo, éste tipo de moléculas puede generar partículas de fago que contienen sólo una de las dos cadenas del DNA extraño; de hecho, la única cadena de DNA que se ensambla en forma de virión es la cadena codificante (cadena +) (116).

Una de las ventajas de éste tipo de vectores, es su alta capacidad de propagación ( $10^{12}$  UFP/ml) y la alta seguridad de que el DNA insertado se encuentra en una forma conveniente de aislamiento (virión). Así mismo estos vectores han sido utilizados para la determinación de secuencias nucleotídicas de gran variedad



de aislamientos primarios y para llevar a cabo experimentos de mutagénesis dirigida. Las partículas recombinantes del fago pueden ser separadas del resto de componentes celulares bacterianos por simple centrifugación o por precipitación con polietilenglicol, lo que permite un gran enriquecimiento de las secuencias de interés y efectiva purificación de las partículas infecciosas en comparación de otros métodos (125).

#### A. Vectores derivados del fago M13.

Estos vectores fueron desarrollados por Messing y col. (82) introduciendo un segmento de DNA codificante para señales regulatorias y para los primeros 146 aminoácidos del gene *lacZ* de *E. coli*, (enzima beta-galactosidasa), en la región comprendida entre los genes II y IV del DNA del fago M13, dando origen al vector M13mpl y con ello a la serie *mp*. Las clonas recombinantes se identificaban por medio de la formación de placas incoloras en presencia de IPTG y del cromógeno X-gal, a diferencia de las no recombinantes que desarrollaban placas de color azul (52).

A pesar que el fragmento del operón de *lac* de *E. coli* localizado en la región IC del vector M13mpl contenía sitios de clonación muy útiles, Messing y col. utilizaron la mutagénesis dirigida en la región de *lacZ* con el fin de construir una serie de vectores derivados del M13mpl, generando múltiples sitios de clonación (83, 84).

Este tipo de vectores han sido utilizados desde entonces, siendo actualmente los más comunes dentro de la serie *mp*, los

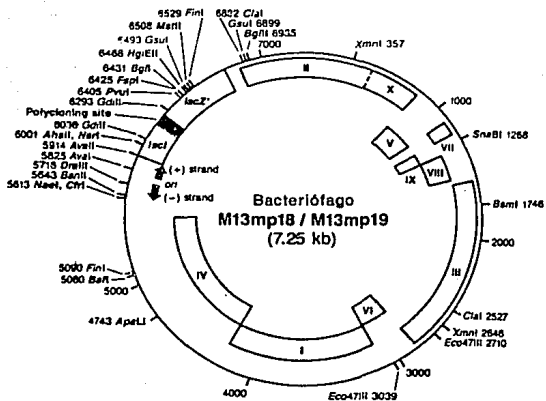
vectores M13mp18 y M13mp19 (figura 5), los cuales contienen 13 diferentes sitios únicos de clonación y de los que se ha determinado su secuencia nucleotídica (138). Una de sus desventajas más importantes es la generación de deleciones de una parte del fragmento de DNA clonado cuando se sobrepasa el tiempo de incubación para la propagación del bacteriofago, ya que bajo éstas condiciones el inserto es inestable (116).

Los fragmentos utilizados en la construcción de la serie *mp* de los vectores del fago M13 han sido también insertados en un plásmido mutante derivado del plásmido pBR322, creando una familia de vectores plasmídicos llamados pUC (138) los cuales contienen los mismos sitios de clonación que la serie *mp*, con la característica adicional de contener una región codificante para Amp<sup>r</sup>.

#### B. Vectores derivados del fago fd.

Se ha descrito la generación de vectores de clonación en fagos filamentosos capaces de proporcionar resistencia a ciertos antibióticos cuando estos infectan cepas bacterianas, con lo cual la bacteria adquiere la propiedad de crecer bajo presión selectiva (125).

Vovis y Ohsumi aislaron partículas transductantes que conferían resistencia a Tc, después de inducir la infección de una cepa de *E. coli* F' que contenía el plásmido no conjugativo pSC101 (que confiere resistencia a Tc) con el fago f1. Esto provocó la recombinación entre estas dos entidades extracromosomales dando como resultado la generación de partículas llamadas VO-1 y VO-2,



#### Sitios de policonación

##### M13mp18

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	7	8						
Thr	Met	Asp	Thr	Asn	Asp	Ser	Ser	Val	Pro	Gly	Asp	Pro	Leu	Glu	Ser	Thr	Cys	Arg	His	Ala	Ser	Leu	Ala	Leu	Ala
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCC	TCC	GTA	CCC	GGG	GAT	CCT	CTA	GAG	TCC	ACC	TCC	AGG	CAT	GCA	AAC	TTC	GCA	CTG	GCC
				EcoRI		SacI		KpnI		SmaI XmaI		BamHI		XbaI		SalI AccI HincII		PstI		SphI		HindIII			

##### M13mp19

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	9	8	7	8					
Thr	Met	Asp	Thr	Pro	Ser	Leu	His	Ala	Cys	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Asp	Pro	Arg	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Ala	
ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	GCA	AQC	TTC	CAT	GCC	TGC	AGG	TCC	ACT	CTA	GAG	GAT	CCC	CCG	GTA	CCC	AGC	TCC	AAT	TCA	CTG	GCC
				HindIII		SphI		PstI		SalI AccI HincII		XbaI		BamHI		SmaI XmaI		KpnI		SacI		EcoRI				

FIGURA 5. MAPA GENETICO DE LOS VECTORES M13mp18 Y M13mp19. Se muestran los genes, la localización de los sitios de restricción y de los sitios de clonación (116).

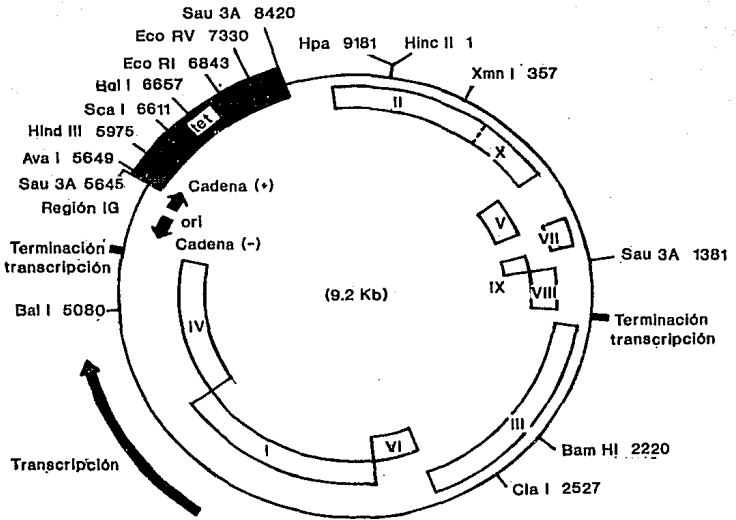
las cuales fueron caracterizadas extensivamente, localizándose los sitios en donde el genoma del plásmido se había insertado en la región IG y el gene VIII (134). Posteriormente Herrmann en 1978, menciona que una vez que un transposón ha sido insertado en la secuencia de un fago, como aprox. sucedió con el experimento de Vovis, podría ser que ésta inserción provocara la aparición de gran cantidad de sitios de clonación donde podrían insertarse secuencias de interés, aunque se ha demostrado que el transposón es inestable por sí mismo y que podría perderse en un momento determinado (56). A pesar de la observación anterior, se continuaron con investigaciones encaminadas a obtener partículas de fagos que confirieran resistencia a algún antibiótico en forma estable.

Nogura y Takanami obtuvieron transductantes del fago fd que conferían resistencia a Kan de la misma forma que Vovis, pero utilizando bacterias que contenían el plásmido pML21; seleccionaron los transductantes que poseían un segmento de aprox. 3100 pb para análisis dándose cuenta que los sitios de inserción para cada fago eran diferentes, lo que sugirió que el segmento se comportaba como un transposón (96). Estudios in vivo llevados a cabo con el transposón Tn5 (Kan<sup>r</sup>) y el fago fd, demostraron que éste último adquiriría la capacidad de conferir resistencia a dicho antibiótico con su infección a alguna cepa bacteriana. Se observó que el tamaño del DNA del fago aumentaba en un 80% cuando el transposón se insertaba íntegramente y se demostró que en fagos no defectuosos, los sitios de integración del transposón se encontraban en la región IG (55).

Zacher, mediante la inserción de un fragmento de 2.8 Kb de la digestión del transposón Tn10 (codificante para Tc<sup>r</sup>) con la enzima Bgl II en el fago fd, obtuvo un fago híbrido que confería resistencia a tetraciclina a las células infectadas por el mismo, dando como resultado la aparición de colonias resistentes a la acción del antibiótico; dicha construcción fue llamada fago "fd-tet" (140). Se descubrió también que éste vector podía ser propagado en forma semejante a un plásmido independientemente de la función del fago, y que los fragmentos insertados en el sitio de clonación (Bam HI en el gene III) podían ser de diversos tamaños (2.5 a 6 Kb). Mediante la localización del segmento del transposón insertado en el DNA del fago fd, y la determinación del mapa de restricción característico del fago fd-tet (figura 6), aunado al no. de partículas que se obtenían en comparación con otros vectores, se llegó a la conclusión de que el fago fd-tet era defectuoso en la síntesis de DNA en el proceso de replicación, produciendo aprox. 10 copias del fago por cada célula infectada en fase estacionaria (126). Esta característica fue ventajosa, en el sentido de disminuir al mínimo la cantidad de mutantes espontáneos generados por pérdida de DNA durante el proceso de amplificación de viriones (116).

Al igual que Zacher, para construcciones posteriores se utilizaron fragmentos de plásmidos obtenidos por su digestión con enzimas de restricción, dando origen a vectores que conferían resistencia a diversos antibióticos (Tabla 2).

Actualmente se disponen de diversos vectores de éste tipo y



**FIGURA 6. MAPA GENETICO DEL FAGO fd-tet.** Se muestran los genes, los sitios de restricción y la posición del fragmento derivado del transposón Tn10 (Región Tet) (140).

que incluso dieron origen a los fagos filamentosos de fusión.

**5. Fagos filamentosos de fusión y su aplicación en el análisis de determinantes antigénicos (epitopos) de proteínas.**

A principios de la década de los 80's comenzaron a hacerse estudios acerca de la importancia que tenían las proteínas capsídicas de los fagos filamentosos en el ensamble de los mismos, y del aprovechamiento de éstas en el diseño de nuevos vectores involucrados en la expresión de proteínas.

En 1981 se reportó la construcción del vector de clonación *fKN16*, que parecía tener grandes ventajas en la clonación de segmentos de DNA de interés de tamaño considerable, ya que se habían obtenido rendimientos muy favorables de transformantes cuando se introducían en éste vector segmentos de un tamaño de 6.67 a 9.46 Kb, algo que no se había logrado anteriormente con otros vectores. Las características más importantes de éste vector eran la baja capacidad de infección que poseía, a pesar de ser un vector derivado del fago filamentoso *fd-tet* ( $10^{-8}$  veces menos) (140), la conservación de las funciones necesarias para el ensamble del virión, y mas importantemente, la relación que poseía la delección realizada en el gene III (507 pb) con el fin de introducir un sitio de clonación adecuado, con el proceso de infección (93). Estos resultados provocaron la realización de investigaciones subsecuentes enfocadas al estudio del papel que jugaba el gene III

en el ciclo vital del fago.

Anteriormente se había caracterizado a la proteína pIII como una proteína menor de la cápside, codificada por el gene III, y localizada en uno de los extremos del virión (105). Actualmente se sabe que el gene III codifica para una proteína de 406 aminoácidos de aprox. 42,000 daltons de peso molecular, sintetizada con un péptido señal de 18 aminoácidos (47), siendo requerida para la terminación y estabilización del virión en el ensamble del mismo, y súmamente importante y esencial para el proceso de infección a la bacteria. La proteína forma una protuberancia en uno de los extremos del fago (figura 1c), la cual por acción de subtilisina, puede ser removida produciendo una partícula no infecciosa e inhibiéndose por éste efecto, la unión del fago al pelo sexual de la bacteria (50). La proteína contiene dos dominios ricos en glicina, los cuales consisten en varias repeticiones de la secuencia glu gly gly gly ser consideradas como responsables de gran parte de la capacidad infecciosa del fago (15).

Nelson, en estudios realizados con el vector *fKN16* y con la mutante *fCA55* del fago *fd-tet* con el uso de anticuerpos anti-pIII, llegó a la conclusión de que existían dos dominios importantes en la morfogénesis del virión: el dominio C-terminal (carboxiterminal) involucrado en el ensamble normal del virión, dando como resultado la conservación del tamaño normal del mismo, y el dominio N-terminal (aminoterminal), responsable del proceso de adsorción de la partícula infecciosa a la célula huésped. Estas observaciones demostraron que éstos dominios actuaban de forma independiente uno



de otro, ya que éstas mutantes (en la región del dominio N-terminal) podían ensamblarse como partículas normales de fago pero con la característica de haber perdido su capacidad infecciosa (24).

Actualmente se sabe que el dominio N-terminal de la proteína pIII, confiere a la célula infectada cambios importantes en su membrana, incluyendo incrementada sensibilidad al desoxicolato, incrementada tolerancia a las colicinas y pérdida del pelo sexual; ésta última propiedad previene la superinfección de la bacteria por otros fagos Ff ó específicos para cepas masculinas. Así mismo, el dominio C-terminal consta de 23 aminoácidos hidrofóbicos que sirven como un ancla a la membrana para sujetar la proteína en la membrana interna de la bacteria infectada con el fin de ensamblarse posteriormente al virión durante el proceso de ensamble (14).

Los resultados obtenidos por Nelson, conyevieron a la observación inmediata de que posiblemente aminoácidos extraños a la secuencia original de la proteína pIII, podrían insertarse entre los dos dominios sin abolición de la capacidad infecciosa y sin alteración del proceso de morfogénesis (125). En 1985 se reportó la comprobación experimental de éstas observaciones al obtener clonas recombinantes del fago filamentososo f1 a la endonucleasa de la enzima de restricción EcoRI, después de insertar un fragmento de 171 pb del gene de ésta enzima entre las regiones codificantes del gene III para los dos dominios, comprobando posteriormente la expresión de la proteína de "fusión" generada en la superficie del virión por su reconocimiento inmunológico con anticuerpos antiendonucleasa

EcoRI. La expresión de la proteína extraña como proteína de "fusión", se aprovechó para enriquecer más de 1000 veces las clonas recombinantes sobre los fagos ordinarios por medio del uso de anticuerpos específicos, otorgando con ello una ventaja enorme en el aislamiento y caracterización eficaces, tanto del gene de interés, como de la proteína codificada por el mismo. Debido a éstas características, ésta construcción fue denominada "fago de fusión" (124).

Las expectativas del uso de estos vectores como vehículos adecuados para el aislamiento de genes de interés fueron alcanzadas por de la Cruz y col. al clonar secuencias de un epitopo repetitivo del circunsporozoito de *Plasmodium falciparum* (NANP) que anteriormente había sido probado como un inmunógeno protector en modelos animales (59), entre los dos dominios de la proteína del gene III del fago f1. Los fagos de fusión resultantes (*fPf1* a *fPf12*) fueron utilizados posteriormente para inmunizar modelos animales (conejos y ratones) junto con adyuvante de Freund, detectándose la estimulación de una respuesta inmune en ellos al observarse la producción respectiva de anticuerpos en contra de la proteína recombinante, encontrándose incluso, que los títulos de éstos después de la inmunización con fagos recombinantes, era comparable o algunas veces superior al obtenido después de la inoculación con péptidos conjugados de la misma secuencia. Así mismo, se podían obtener grandes cantidades de antígeno sin sofisticados procedimientos de purificación, y comparando el proceso de obtención de proteínas sintéticas o de proteínas

recombinantes bacterianas, el producto podía ser purificado a un costo mínimo (28).

A partir de estos resultados, se desencadenaron una serie de investigaciones encaminadas al perfeccionamiento de los vectores para la producción de fagos de fusión. Una de las primeras construcciones reportadas, fueron los vectores *fUSE*, los cuales se caracterizaron por trasladar el sitio de clonación de entre los dos dominios de la proteína pIII, a 2-3 aminoácidos debajo del extremo N-terminal cerca del sitio de proteólisis del péptido señal, con lo cual la mayoría de la secuencia del gene III era ininterrumpida por los insertos, reduciendo los efectos de los mismos en la función de la proteína pIII y expresándose en la parte más expuesta de ésta (101, 119, 121). Estos vectores derivados del fago *fd-tet* (figura 7), aunado a su propagación como un plásmido en medio de cultivo conteniendo Tc, son seleccionables por anticuerpos específicos conservando clonas raras que son reconocidas por anticuerpos de una vasta librería de determinantes antigénicos, a comparación del vector de expresión *lambda gt11* en el que algunas clonas se perdían y, en muchas ocasiones, el tamaño del banco obtenido representaba grandes problemas en el aislamiento de las clonas de interés (139). Estos vectores, que al igual que su antecesor no provocaban la muerte bacteriana durante su morfogénesis (126), fueron probados con insertos de un tamaño de 20 a 335 pb (promotor RNA polimerasa fago T<sub>7</sub>, gene lacZ, y el inserto NANP) resultando en la expresión de éstos cuando restablecían la fase de lectura adecuada del gene III (constituyendo el banco del fago), provocando consecuentemente

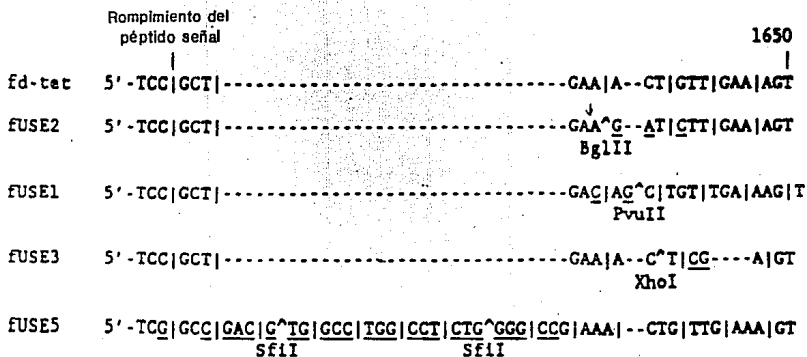


FIGURA 7. MAPA GENETICO DE LOS VECTORES fUSE. Se muestra un diagrama comparativo de los sitios de clonación localizados en ellos y del efecto en la fase de lectura provocado por su generación, en relación al fago de origen (fd-tet) (101, 119, 127, 130).

que los insertos que fallaban en éste efecto eran no productivos, correspondiendo a la obtención de fagos no infecciosos.

Junto con el desarrollo de estos vectores, fue introducido un procedimiento para la purificación por afinidad de los fagos de interés; en éste, el banco obtenido era hecho reaccionar con anticuerpos biotinados dirigidos contra el producto del gene clonado, para posteriormente ser atrapado el complejo antígeno-anticuerpo en un soporte conteniendo estreptavidina, purificándose así la clona de interés en su forma infecciosa. Este procedimiento, llamado "biopanning" (119), explota la fuerte unión biotina-estreptavidina para incrementar la obtención en la eficiencia de clonas, reduciendo el requerimiento en la cantidad de anticuerpos comparado con el procedimiento de purificación de Smith (124). Mediante este método pudieron aislarse las clonas obtenidas de una mezcla conteniendo un exceso de  $10^8$  TU de fagos sin ningún inserto, obteniendo mediante posterior amplificación y nueva selección de éstas, un enriquecimiento hasta de  $10^6$  en el número de partículas infecciosas de interés. Así mismo, ésta selección por afinidad resultó ser mucho más fácil y efectiva que el aislamiento y análisis de numerosas clonas por procedimientos clásicos.

Todos estos resultados desencadenaron en la aplicación inmediata de los fagos de fusión como posibles vehículos para proteínas de interés inmunológico y sobre todo, en el estudio de regiones epitópicas derivadas de proteínas de interés.

A pesar de los adelantos en la determinación de la función de gran cantidad de moléculas, el estudio de la antigenicidad de las

proteínas se ve dificultado por el tamaño y la complejidad de las mismas; actualmente se sabe que las bases estructurales de la antigenicidad de las proteínas está basada en la influencia de la posición espacial de determinados aminoácidos, y en aquellos casos en los que se conoce completamente la estructura de la proteína, se han podido localizar con precisión regiones reconocidas por anticuerpos específicos, llamadas determinantes antigénicos o epitopos (6). Los epitopos de proteínas antigénicas han sido clasificados en continuos (secuenciales) y discontinuos (conformacionales); los continuos, compuestos de residuos inmediatamente cercanos entre sí en la secuencia polipeptídica, mientras que los discontinuos formados de residuos distantes en la misma pero adyacentes en superficie proteínica (conformación espacial del epitopo) (12). Con el fin de identificar éstas regiones se han desarrollado gran cantidad de metodologías, pero la tecnología existente ha tenido gran cantidad de limitaciones prácticas.

A través de estudios realizados por medio de síntesis de mezclas de péptidos y de ensayos inmunológicos en los que se probó la capacidad de éstos de unir anticuerpos dirigidos en contra de determinados antígenos proteicos, se encontraron péptidos que imitaban a epitopos discontinuos determinados anteriormente en el antígeno original. A estas secuencias se les llamo "mimotopos", ya que imitaban al determinante antigénico original de tal forma que podían ser reconocidos por el anticuerpo específico correspondiente (44).

Basados en los resultados anteriores y en la observación de que los determinantes antigénicos de proteínas corresponden a estructuras de 10 a 20 aa. (112), Scott y Smith reportaron la creación de un "banco de epitopos" en el fago de fusión *fUSE 5* mediante la clonación de oligonucleótidos degenerados de 33 pb con la secuencia Asp Gly Ala (NNK)<sub>6</sub> Gly Ala Ala Gly Ala (donde N = G, A, T, C y K = G, T), conteniendo una mezcla de fagos de fusión que expresaban  $4 \times 10^7$  diferentes péptidos, aislandose clonas mediante el uso de dos anticuerpos monoclonales específicos para el determinante antigénico Asp Phe Leu Glu Lys Ileu de la proteína miohemeritrina (MHR) (119). El análisis de algunas clonas resultantes, mostró que los péptidos obtenidos eran marcadamente similares al epitopo natural; esto llevó a la observación, junto con las consideraciones de Geysen (44), que en algunos casos epitopos discontinuos podían ser imitados por péptidos cortos y que similarmente podía ser posible imitar determinantes antigénicos en hormonas, citocinas, virus y otros ligandos que específicamente se unen a receptores u otras proteínas (sustratos enzimáticos). Así mismo, el banco epitópico creado, podía ser de utilidad en el mapeo de epitopos continuos y aun en la identificación de epitopos discontinuos en proteínas de conocida estructura tridimensional; más aun, con el uso de la purificación por afinidad con suero de pacientes infectados con virus, parásitos o bacterias, podrían identificarse péptidos que distinguieran entre una y otra cepa o bien, servir como inmunógenos protectores (vacunas) (28).

Otras construcciones similares, comprobaron la utilidad de

éste tipo de tecnología en la creación de bancos de epitopos; Cwirla reportó la creación de un banco de epitopos de hexapéptidos N-terminales mediante la clonación en el vector *fAFF1* (Tabla II) de oligonucleótidos degenerados, tal como en el caso anterior, con el fin de aislar péptidos semejantes a un determinante antigénico N-terminal continuo de 4 aminoácidos de la beta-endorfina, mostrando con ello que los ligandos pueden ser identificados a pesar de no tenerse información concerniente a la especificidad del anticuerpo, y que es posible imitar proteínas de interés inmunológico con péptidos no relacionados (25). Análogamente otra construcción realizada en el vector *M13LP67*, derivado del fago *M13mp19* (Tabla I), fue utilizada para buscar péptidos que pudieran unirse a estreptavidina, lográndose aislar nueve diferentes péptidos de los que no se tenía conocimiento que se uniesen a éste compuesto, inhibiéndose su unión al adicionar biotina; con éstos resultados se verificó la eficiencia del sistema en la determinación de secuencias peptídicas imitadoras de ligandos no peptídicos (32).

Así mismo, la utilidad de este sistema en el aislamiento de epitopos de proteínas de interés se ha visto con la creación de un banco epitópico en el fago de fusión *fUSE 1* de las proteínas Gag p17 y p24 del virus HIV, aislándose diversas clonas mediante el uso de anticuerpos monoclonales y revelándose en ellas la presencia de una proteína de 65 KDal mediante Western blot (130).

En los últimos años los fagos filamentosos han sido utilizados principalmente para el estudio de regiones peptídicas de interés inmunológico, pero recientemente se ha reportado su uso como



Vector	Lac <sup>a</sup>	SC	MS	Detección
Ff silvestre		AvaI		Placa
M13mp18,19	Si	EcoRI		Ambos
fd-tet		HindIII	Tc	Colonia
fKN16, fBH16		BamHI	Tc	Colonia
fam-tet		BamHI	Tc	Colonia
fd11		EcoRI		Placa
fd 101		PstI	Ap	Colonia
fd 103		PstI	Ap, Cm	Colonia
fd 104		XhoI	Kan	Colonia
fd 106		SmaI	Ap, Cm	Colonia
M13bla		PstI	Ap	Colonia
M13bla/cat		EcoRI	Ap, Cm	Colonia
fUSE 1,2,3,5		PBXS	Tc	Colonia
M13LP67	Si	KpnI		Placa
fd-CAT1		PstI, XhoI	Tc	Colonia
fAFF1		BstXI	Tc	Colonia

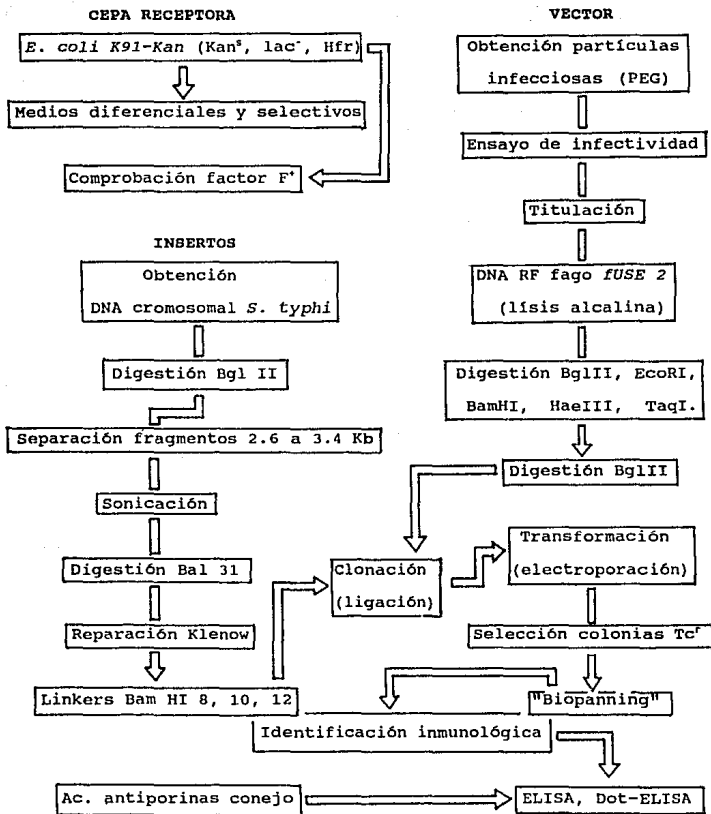
**TABLA I. CARACTERISTICAS DE ALGUNOS VECTORES Ff.** Lac<sup>a</sup>: puede ser detectado por esta característica; SC: sitios de clonación; P: PvuII, B: BglII, X: XhoI, S: SfiI; MS: marcadores de selección; Tc: tetraciclina; Ap: Ampicilina; Cm: Cloranfenicol; Kan: Kanamicina. (25, 32, 80, 119, 125, 143).

anticuerpos al ser introducidos genes de la región variable de inmunoglobulinas del anticuerpo D1.3 dirigido contra lisozima, en la región del gene III del fago de fusión *fd-CAT1* (Tabla I). Los resultados de ésta construcción revelaron que las partículas infecciosas recombinantes a estos genes poseían el mismo patrón de reactividad que el anticuerpo D1.3 (81).

Debido a todos los usos mencionados, los fagos filamentosos de fusión podrían también considerarse en un futuro, como buenos candidatos para el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos, debido a la imitación de la modulación fisiológica de ligandos naturales por parte de mimotopos obtenidos en estos bancos.

#### IV. M E T O D O L O G I A

## 1. Estrategia experimental.



## 2. Caracterización de la cepa bacteriana.

a) **Característica lac<sup>-</sup>.** Se prepararon placas de los medios Verde Brillante, EMB y Mackonkey (67), en las cuales se sembró por dilución la cepa *E. coli* K91-Kan (Hfr-Cavalli thi  $\lambda$  Kan<sup>-</sup> lac<sup>-</sup>) (101) proveniente de un cultivo en medio sólido donado por el Dr. G. P. Smith, junto con un control positivo de *E. coli* polivalente II (lac<sup>-</sup>) donado por la QFI. A. Becerril, para después proceder a su incubación a 37°C por 18-24 hrs.

b) **Resistencia a kanamicina.** Se prepararon placas de agar LB (116) con el antibiótico correspondiente a una concentración final de 100 ug/ml (127), para posteriormente sembrarse por dilución en éste medio las cepas *E. coli* K91-Kan, *E. coli* MC1061, (F<sup>-</sup> strA thi Kan<sup>s</sup>) y *E. coli* K802 (F<sup>-</sup>Kan<sup>s</sup>) y proceder a su incubación a 37°C por 24 hrs.

c) **Presencia del factor F<sup>+</sup>.** Se adicionó un inóculo de *E. coli* K91-Kan a 2 ml de caldo LB Kan (100 ug/ml), incubándose ON a 37°C; posteriormente se inocularon 50 ml de caldo A (Caldo LB suplementado con 10 mM MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 0.2% Glucosa) con 0.5 ml del cultivo anterior, incubando a 37°C a 200 rpm en agitación constante hasta alcanzar la fase log (3-4 hrs). El cultivo obtenido se guardó en hielo 10 min para después centrifugarse a 5000 rpm 10 min a 4°C, desechando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla cuidadosamente en 0.5 ml de medio A preenfriado en hielo, agregándose 2.5 ml de medio B preenfriado en hielo para finalmente

mezclar con cuidado sin vortex hasta la completa resuspensión de la bacteria (células competentes). Se dividieron las células competentes en alícuotas de 200 ul, utilizándose varias de ellas para la transformación y guardándose el resto a  $-70^{\circ}\text{C}$  (95). Para el proceso de transformación, se tomaron 200 ul de células competentes y fueron mezcladas inmediatamente con 1 y 5 ul de una sol. de DNA Rf del fago M13mp19 (donadas por el M. en C. G. Ramírez) e incubándose de 1-1.5 hrs en hielo a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente las células se sometieron a un pulso de calor a  $42^{\circ}\text{C}$  por 70 seg para después colocarse en hielo inmediatamente después por 2 min; finalmente las células se colocaron en 3 ml de agar suave YT previamente fundido y preenfriado a  $55^{\circ}\text{C}$ , mezclándose y vertiéndose homogéneamente en placas de agar LB. Después de esperar la solidificación del agar suave, se incubaron las placas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 hrs.

### 3. Preparación del vector de clonación.

a) Obtención y propagación de viriones del fago *fUSE 2*. Se adicionó 1 ul de una sol. de fago *fUSE 2* con una concentración de  $10^{10}\text{TU}$  (donado por el Dr. G. P. Smith), a 300 ul de un cultivo ON de *E. coli K91-Kan* incubándose la mezcla a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 hrs sin agitación. Por otro lado, se inocularon 50 ml de caldo LB con *E. coli K91-Kan*, el cual se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  a 200 rpm durante 4 hrs; posteriormente el cultivo se centrifugó a 5000 rpm 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . La pastilla así obtenida se resuspendió en 3 ml de caldo LB estéril y fue mezclada junto con las células infectadas por las partículas infecciosas del fago (cultivo ON) y colocadas en 100 ml de medio LB

estéril, dejándose en agitación constante (50-60 rpm) durante 1 hr a 37°C; posteriormente se aumentó la agitación a 200 rpm incubando ON a la misma temperatura. El cultivo obtenido se centrifugó a 5000 rpm 10 min a 4°C, recuperándose el sobrenadante y guardándose la pastilla a 4°C para la obtención del DNA RF. Al sobrenadante obtenido, se le adicionaron 0.15 partes del volúmen de una sol. de PEG/NaCl (16.7%/3.3 M stock), homogeneizando suavemente la mezcla por lo menos durante 100 inversiones; la mezcla resultante se colocó en el congelador 20 min para posteriormente dejarlo a 4°C ON. y centrifugar la mezcla a 17000 rpm 30 min, a 4°C. La pastilla obtenida se resuspendió en 1 ml de solución TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA) para incubación en baño de agua a 70°C durante 1 hr; después del calentamiento, se agregaron 150 ul (0.15 partes) de sol. PEG/NaCl mezclándose con suavidad durante mínimo 100 inversiones y dejándose en hielo durante 4 hrs. La mezcla se microcentrifugó a 14000 rpm durante 20 min a 4°C y la pastilla así obtenida, fue finalmente resuspendida en 200-300 ul de TE y guardada a -20°C.

- **Ensayo de infectividad.** Se realizó un ensayo de transformación con una sol. de DNA RF de fago M13mp19 de 2 mg/ml en *E. coli* K91-Kan, obteniéndose placas opacas en la superficie del agar después de la incubación correspondiente. Con el fin de obtener un control positivo para el ensayo, se seleccionó la placa más aislada y se picó en el centro de la misma con un capilar adelgazado estéril, colocándose inmediatamente en un tubo conteniendo 1 ml de caldo LB estéril y dejándose de 1-2 hrs a temp. amb. (difusión de las partículas del fago fuera del agar). Por otro

lado, se inocularon 5 ml de medio LB estéril con una colonia aislada de *E. coli* K91-Kan proveniente de un cultivo en placa de agar LB de 24 hrs de incubación, dejándose incubar de 6 a 8 hrs a 37°C a 200 rpm. Las células se guardaron a 4°C hasta su utilización. Para la obtención de las partículas infecciosas correspondientes, se inoculó un tubo conteniendo 2 ml de medio LB estéril con 50 ul de células obtenidas del cultivo anterior y con 100 ul (0.1 partes) de la suspensión de fagos derivadas de una placa, para posteriormente dejar en incubación de 5-6 hrs a 37°C en agitación constante. Finalmente se centrifugó el cultivo a 14000 rpm durante 5 min recuperándose el sobrenadante y guardándose a -20°C (116).

- **Realización del ensayo.** Se realizó un cultivo de *E. coli* K91-Kan en 5 ml de caldo LB hasta alcanzar su fase log., centrifugándose a 5000 rpm a temp. amb. y resuspendiéndose en 3 ml de SSF estéril, manteniendo las células a 37°C durante todo el ensayo. Se mezclaron 100 ul de células resuspendidas junto con 200 ul de un cultivo de 6-7 hrs de *E. coli* K91-Kan mezclado con 20 y 40 ul respectivamente de la suspensión de fagos *fUSE 2* obtenida anteriormente. El control positivo fue mezclado con 200 ul de suspensión bacteriana. Posteriormente el control y los cultivos de fago *fUSE 2* fueron incubados 10 min a 37°C (adsorción del fago), mezclándose homogéneamente al término de la incubación con 3 ml de agar suave TB y vaciándose en placas de medio LB con Tc (20ug/ml) solo los cultivos de fago *fUSE 2*. Se permitió la solidificación del agar para posteriormente incubar a 37°C por 24 hrs.

- **Titulación.** Se obtuvo un cultivo en fase log. de *E. coli*



K91-Kan en 50 ml de caldo LB como anteriormente se ha descrito, para resuspenderse en 3 ml de SSF estéril después de su centrifugación a 4000 rpm 10 min, manteniéndose el cultivo siempre a 37°C durante todo el ensayo. Así mismo, se realizaron diluciones de la sol. de fagos *fUSE 2* obtenida anteriormente en microplacas estériles de 96 pozos de fondo redondo, tomando 100 ul de cada dilución en SSF (diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-14}$ ). Posteriormente se agregaron 100 ul de la suspensión bacteriana a cada dilución incubándose 10 min a temp. amb., para finalmente agregar 100 ul de medio LB suplementado con 0.2 ug/ml de Tc e incubar las placas 30 min a 37°C. Al término de ésta, la mezcla se colocó en 3 ml de agar suave TB estéril, fundido y preenfriado a 55°C y se vació inmediatamente en placas de agar LB Tc (20ug/ml), repartiéndose homogéneamente. Se permitió la solidificación del agar para proceder a la incubación a 37°C por 24-48 hrs (127).

b) Obtención de DNA RF del fago *fUSE2*. Las células obtenidas de la amplificación del fago *fUSE 2* (inciso a), fueron resuspendidas en 20 ml de NaCl 10 mM, centrifugándose a 6000 rpm 10 min a 4°C, para después resuspenderse con vortex en 8 ml de SET (20% sacarosa, 50 mM Tris pH 7.6, 50 mM EDTA) hasta formar una suspensión homogénea, agregándose un "espatulazo" de lizosima y 50 ul de RNasa para colocar la mezcla 30 min en hielo. En seguida se añadió una mezcla recién preparada de sol. de lisis (8 ml de NaOH 0.4 N y 8 ml de SDS al 2%), mezclando con suavidad durante 5 min y colocando la mezcla en baño de hielo por 15 min. Se añadieron 12 ml

de acetato de sodio 3 M pH 5 previamente enfriado (33) dejándose la mezcla en hielo por 30 min más; la mezcla resultante se centrifugó 20 min a 17000 rpm a 4°C, recuperando el sobrenadante en un tubo de limpio para agregar 1 vol. de isopropanol, mezclando perfectamente por inversión y colocando la mezcla de 1-2 hrs a -20°C. Posteriormente la suspensión se centrifugó durante 10 min a 10000 rpm a 4°C, desechando el sobrenadante y dejando secar la pastilla en campana de flujo laminar. Finalmente se resuspendió el precipitado en 1-3 ml de TE, agregándose 10 ul de RNAsa, incubando 30 min a 37°C para después extraer varias veces con una mezcla 1:1 fenol-cloroformo en tubos Eppendorff por el método de "doble espin" (127) hasta la desaparición de la interfase lechosa. En seguida se extrajo 2 veces con cloroformo, recuperándose la fase acuosa y adicionándose 0.1 partes de acetato de amonio 7.5 M e inmediatamente después 3 vol. de etanol absoluto. La mezcla resultante se colocó a -20°C ON, para después centrifugar a 14000 rpm durante 15 min a temp. amb., lavándose la pastilla 2 veces con 1 ml de etanol al 70%. Finalmente la pastilla se secó en una campana de flujo laminar y se resuspendió en 300 ul de agua inyectable (33, 111, 116). Para comprobar la existencia de DNA en la sol. final, se mezclaron 3 ul de la misma con 5 ul de STOP MIX (5 M Urea, 10% glicerol, 0.5% SDS, 0.025% xilencianol, 0.025% azul bromofenol) colocando la mezcla en minigel de agarosa al 0.7%, realizando el corrimiento electroforético correspondiente y revelando con bromuro de etidio. La concentración de DNA en la sol. fue determinada por espectrofotometría a 260 nm (116). Para

verificar que el DNA obtenido confería resistencia a Tc (*fUSE*), se realizó una transformación bacteriana en la cepa usada con el método anteriormente descrito.

c) **Caracterización del DNA RF del fago *fUSE* 2.** Conociendo el mapa de restricción del fago *fUSE* 2, se procedió a digerir el DNA obtenido con las siguientes enzimas de restricción:

Digestión Eco RI	10ul DNA RF <i>fUSE</i> 2 (5ug)
	2ul Buffer Eco RI 10X
	2ul BSA 10X
	5ul agua inyectable
	1ul enzima Eco RI (14U/ul).
Digestión Bam HI	10ul DNA RF <i>fUSE</i> 2 (5ug)
	2ul Buffer Bam HI 10X
	2ul BSA 10X
	5ul agua inyectable
	1ul enzima Bam HI (18U/ul).

Las mezclas anteriores se dejaron en incubación a 37°C durante más de 18 hrs en tubos Eppendorff cerrados herméticamente (21). Para verificar la digestión total del DNA en ensayo, se tomó 1 ul de cada digestión mezclándose con 5 ul de STOP MIX y colocando en gel de agarosa al 0.7% para electroforesis junto con un marcador de fago lambda (donado por la M. en C. Rossana Pelayo) digerido con la enzima Hind III (21). Después de la verificación de la total digestión del DNA y del tamaño resultante de esa digestión, se procedió a obtener un patrón electroforético experimental del DNA

del fago *fUSE 2* con las enzimas de restricción Taq I y Hae III. Las mezclas de digestión fueron las siguientes:

Digestión Taq I

10ul DNA RF *fUSE 2* (5ug)  
 2ul Buffer Taq I 10X  
 2ul BSA 10X  
 5ul agua inyectable  
 1ul enzima Taq I (20U/ul)

Digestión Hae III

10ul DNA RF *fUSE 2* (5ug)  
 2ul Buffer Hae III 10X  
 2ul BSA 10X  
 5ul agua inyectable  
 1ul enzima Hae III (16U/ul)

En seguida se dejaron las mezclas en incubación a 37°C por 24 hrs, verificando la totalidad de las digestiones por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 7.5% al fin de la incubación, y realizando el análisis de las bandas resultantes junto con controles del plásmido pUC 9 digerido con las enzimas Eco RI, Hae III y Taq I.

d) Digestión del vector de clonación con la enzima Bgl II.

Para verificar la existencia de un sitio único de restricción a la enzima Bgl II en la secuencia nucleotídica del fago *fUSE 2* (101), se realizó la siguiente mezcla de digestión:

Digestión Bgl II

50ul DNA RF *fUSE 2* (5ug)  
 6ul Buffer Bgl II 10X  
 6ul BSA 10X

## 1ul enzima Bgl II (20U/ul)

Se procedió a la incubación de la mezcla durante 24 hrs a 37°C (21), verificándose la digestión total del DNA por una electroforesis en agarosa al 0.7%, junto con un control de fago lambda Hind III. Después de la observación del DNA en el minigel, se procedió a extraer un par de veces la mezcla de digestión con una mezcla 1:1 fenol-cloroformo, recuperando la fase acuosa cada vez y extrayendo finalmente 2 veces con cloroformo; a la fase acuosa resultante se adicionó 0.1 partes de acetato de amonio 7.5 M e inmediatamente después 3 vol. de etanol absoluto, mezclando perfectamente y dejando la mezcla a -20°C por 24 hrs. Posteriormente la mezcla fue centrifugada 20 min a 14000 rpm, lavándose la pastilla resultante 3 veces con etanol al 70%, secándose en campana de flujo laminar y resuspendiéndose en 50 ul de agua inyectable. Esta sol. fue guardada a -20°C hasta su uso.

**4. Preparación de los insertos.**

a) **Obtención de DNA cromosomal de *S. typhi* 9, 12 Vi:d.** Se inocularon 3 ml de caldo LB estéril con *Salmonella typhi* 9, 12 Vi:d proveniente de un cultivo en caja de agar BHI de 24 hrs, dejándose en incubación ON a 37°C a 200 rpm. Al término del periodo de incubación, el cultivo se vació por completo en un matraz Erlenmeyer conteniendo 250 ml de caldo LB estéril para posteriormente proceder a incubar el cultivo en agitación constante a 200 rpm a 37°C durante 10 a 12 hrs más. El cultivo así obtenido, fue centrifugado 10 min a 7000 rpm resuspendiendo la pastilla en 20

ml de TE (Tris-EDTA 50-20 mM) centrifugando nuevamente y recuperar solo el paquete celular. La pastilla obtenida fue resuspendida en 8 ml de TE para adicionar los siguientes reactivos: 1 ml de sol. de SDS al 10% (disuelto en TE 50-20 mM), 50 a 100 ul de pronasa (5 mg/ml, incubada previamente 1 hr. a 37°C), 50 ul de RNasa y un "espatulazo" de lizosima; ésta mezcla se homogenizó cuidadosamente sin vortex y se incubó de 4 hrs ON a 37°C hasta la observación de una sol. clara y viscosa (indicación de lisis celular bacteriana). En seguida se procedió a extraer la mezcla con un volúmen de mezcla fenol-cloroformo, agitando sin vortex y centrifugando a 7000 rpm 10 min para finalmente recuperar la fase superior (acuosa); el proceso de extracción se repitió hasta verificar que la interfase se encontraba completamente transparente. A la fase acuosa resultante se le adicionaron 0.1 partes del volúmen de acetato de amonio 7.5 M enfriado para posteriormente agregar 3 vol. de etanol absoluto preenfriado y mezclar perfectamente. El DNA precipitado fue capturado cuidadosamente con una varilla de vidrio y lavado 3 veces con etanol al 70% por inmersión para después resuspenderlo en 0.5 ml de agua inyectable para proceder a su almacenamiento a -20°C. Finalmente la concentración de DNA en la sol. fue determinada espectrofotométricamente a 260 nm (33, 111, 116).

b) Digestión DNA cromosomal de *S. typhi* 9, 12 Vi:d con la enzima de restricción Bgl II. Con el fin de obtener la región de 3Kb que contiene al gene ompC (108), se realizó la siguiente mezcla de digestión:

DNA cromosomal de <i>S. typhi</i>	100ul
Agua inyectable	100ul
Buffer Bgl II 10X	22ul
BSA metilada 10X	22ul
Enzima Bgl II (20U/ul)	2ul

Hecha la mezcla, se procedió a su incubación a 37°C ON, verificándose la digestión total del DNA cromosomal por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

c) Separación de los fragmentos de 2.6 a 3.4 Kb. Después de la verificación de la digestión total del DNA cromosomal, se realizó un gel preparativo de agarosa al 0.8% colocando como controles los plásmidos pUC 9 (138) digerido con la enzima Eco RI (2.6 Kb) y pKGS (70) digerido con la enzima Bgl II (3.4 Kb), colocados en un solo carril. El corrimiento electroforético se realizó en una cámara vertical con buffer TBE 1X (116) y con un voltaje de 90 volts. Posteriormente, el gel fue sumergido durante 5 seg en una sol. diluida de bromuro de etidio y enjuagada de inmediato con agua corriente. El gel fue observado por periodos menores a 5 seg a 366 nm (UV). Se localizaron los marcadores y posteriormente se cortó el gel a la misma altura de los mismos al nivel del DNA cromosomal digerido de *S. typhi*, obteniéndose con ello los fragmentos de 2.6 a 3.4 Kb (116). El DNA contenido en el fragmento de agarosa fue extraído del mismo utilizando papel de nylon (Gene Screen) (142) con el siguiente protocolo:

Se tomó un tubo Eppendorff de 1.5 ml al cual se le hizo un

orificio pequeño en la parte más baja, colocándose en el interior del tubo un cucurucho de papel nylon, el cual se humedeció con 200 ul de buffer de elución (0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7.5), dejándose en reposo por 10 min. Los fragmentos de agarosa obtenidos del gel preparativo, fueron colocados en pequeños trozos dentro del papel junto con 200 ul más de buffer de elución y centrifugándose a 5000 rpm por periodos cortos (20 seg) y largos (5 min), recibiendo el filtrado en varios tubos Eppendorff de la misma capacidad. Al término de la centrifugación, el filtrado se extrajo 2 veces con mezcla fenol-cloroformo, para finalmente recuperar la fase acuosa y extraer una vez más con cloroformo; posteriormente se adicionaron 0.1 partes de acetato de amonio 7.5 M y 3 vol. de etanol absoluto previamente enfriado, procediéndose a dejar 2 días a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 30 min a 14000 rpm, desechándose el sobrenadante, lavando 2 veces con etanol al 70%; y secando la pastilla para resuspender en 150 ul de agua inyectable, almacenándose a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para verificar la presencia de DNA en la sol., se tomaron 2 ul de la sol. obtenida anteriormente, para realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0.7%.

d) **Sonicación del DNA obtenido.** Para determinar las condiciones de sonicación adecuadas de potencia y tiempo para la obtención al azar de fragmentos de tamaño mínimo lo menos dañado posible, se realizaron ensayos con otros DNA's. Los DNA's utilizados fueron: plásmido pUC 9 digerido con la enzima de



restricción Eco RI, produciendo un DNA lineal de 2.6 Kb y DNA cromosomal total de *S. typhi* 9, 12 Vi:d sin digerir; el protocolo fue el siguiente: se resuspendieron 3 ul de una sol. de 1.6 mg/ml de pUC 9 Eco RI en 197 ul de buffer SSC 1X (48), obteniéndose soluciones de DNA conteniendo aprox. 5 ug de DNA en total; 30 ul de DNA cromosomal (1 mg/ml) se mezclaron con 170 ul de buffer SSC 1X, obteniéndose soluciones con 30 ug de DNA en total. Se tomaron éstas dos sol. para cada condición ensayada de sonicación, utilizando 50 y 100 watts de potencia y de 1 a 12 min de sonicación con intervalos de reposo de 1 min en hielo entre cada uno de ellos (48). Posterior a la sonicación, se agregaron 0.1 partes de acetato de amonio 7.5 M y 3 vol. de etanol absoluto, mezclando perfectamente y dejando en baño de hielo por 24 hrs a -20°C; todas las sol. (1 por condición) se centrifugaron 20 min a 14000 rpm desechando el sobrenadante para secar y resuspender en 20 ul (pUC 9) y en 50 ul (DNA cromosomal) de agua inyectable. Para visualizar el efecto del proceso de sonicación sobre el DNA lineal y el DNA cromosomal de *S. typhi*, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5% a 200 volts, revelando finalmente con sol. de bromuro de etidio al 0.5% y observando el DNA a 366 nm. Después del análisis de los resultados obtenidos, se decidió sonicar el DNA obtenido anteriormente (2.6 a 3.4 Kb) a las condiciones resultantes.

e) Ensayo de digestión con la nucleasa Bal 31. El DNA cromosomal resultante de la sonicación (aprox. 120 ul), fue

precipitado con etanol y acetato de amonio en hielo seco de 4 a 5 hrs para posteriormente resuspenderse en 100 ul de agua inyectable. De ésta muestra se tomaron 80 ul para hacer la siguiente mezcla de digestión:

DNA cromosomal sonicado	80ul
Buffer Bal 31 5X	20ul
Enzima Bal 31 (2.5U/ul)	2ul

La mezcla fue incubada a 37°C (21), tomándose una muestra de 14 ul cada minuto hasta 8 min y detener la reacción enzimática con 5 ul de EDTA 2 M en cada ocasión. Para visualizar el efecto de la digestión enzimática, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, colocándose las muestras junto con un control del mismo DNA sin digerir. Después de la determinación de las condiciones adecuadas para la digestión, se realizó el ensayo con el DNA de la región de 3 Kb anteriormente sonicado. La mezcla de digestión utilizada fue la siguiente:

DNA región 3 Kb sonicado	70ul
Buffer Bal 31 5X	20ul
Agua inyectable	9ul
Enzima Bal 31 (2.5U/ul)	1ul

Después del periodo de incubación, se agregó la cantidad suficiente de EDTA 12 M para detener la reacción para finalmente extraer con mezcla fenol-cloroformo una vez y después extraer con cloroformo una vez por el método de "doble espin" (127). Finalmente se precipitó con etanol-acetato de amonio durante 2 días a -20°C. Después de su centrifugación y posterior lavado con etanol al 70%,

el DNA resultante se resuspendió en 80 ul de agua inyectable para su uso posterior.

f) Reparación del DNA con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de E. coli. Se realizaron las siguientes mezclas de reacción (65):

DNA Cromosomal sonificado	60ul	DNA región 3Kb sonificado	60ul
Buffer cinasa T <sub>4</sub> 10X	8ul	Buffer cinasa T <sub>4</sub> 10X	8ul
dNTP's 2mM	2ul	dNTP's 2mM	2ul
ATP 10X	8ul	ATP 10X	8ul
Enzima Klenow (8.3U/ml)	1ul	Enzima Klenow (8.3U/ml)	1ul
Enzima pol. cinasa T <sub>4</sub>	1ul	Enzima pol. cinasa T <sub>4</sub>	1ul

DNA región 3Kb sonificado dig. Bal 31	50ul
Buffer cinasa T <sub>4</sub> 10X	6ul
dNTP's 2mM	2ul
ATP 10X (1mM)	6ul
Enzima Klenow (8.3U/ml)	1ul
Enzima pol. cinasa T <sub>4</sub> (2U/ul)	1ul

Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37°C durante 1hr para después ser extraídas 2 veces con mezcla fenol-cloroformo y una vez con cloroformo (doble espín) y posteriormente ser precipitadas con la adición de acetato de amonio y etanol absoluto al ser enfriadas en baño de hielo ON. Al término del proceso de enfriamiento, se centrifugaron las sol. a 14000 rpm durante 30 min, lavándose la pastilla 2 veces con etanol al 70% para secarse y ser

resuspendida en 50 ul de agua inyectable estéril.

g) Ligación con linkers Bam HI de 8, 10 y 12 pb y digestión con la respectiva enzima de restricción (136, 137). Se realizaron las siguientes mezclas de reacción (3 viales):

DNA reparado y fosforilado	50ul
Linker BamHI 8pb (10pmol/ul)	5ul
Linker BamHI 10pb (12pmol/ul)	4.2ul
Linker Bam HI 12pb (16pmol/ul)	3ul
Buffer ligasa T <sub>4</sub> 10X	8ul
ATP 1X (0.1mM)	7ul
Enzima ligasa T <sub>4</sub> (2U/ul)	1ul

Después de mezclar perfectamente, se procedió a una incubación a temp. amb. por 24 hrs para posteriormente adicionar 1 ul más de enzima ligasa y 8 ul de ATP 1X y proceder a una incubación a 16°C aprox. por 18 hrs más. Las mezclas de reacción se colocaron en un baño de agua a 65°C durante 10 min para después adicionar 6 ul de buffer 10X de la enzima Bam HI y 1 ul de dicha enzima y continuar con una incubación a 37°C ON. Al final de la incubación, se extrajeron las sol. con mezcla fenol-cloroformo 2 veces y una vez con cloroformo (doble espín), para precipitar el DNA existente mediante la adición de acetato de amonio y etanol absoluto al ser enfriada la mezcla. Finalmente la mezcla obtenida se centrifugó a 14000 rpm durante 30 min para posteriormente ser lavada la pastilla 1 vez con etanol al 70%, secarse y ser resuspendida en 50 ul de agua inyectable estéril (116).

### 5. Clonación.

Se realizó la siguiente mezcla de reacción:

INSERTO (DNA-linkers)	10ul
Fago <i>fUSE2</i> Bgl II (9.2Kb)	3ul
Buffer ligasa $T_4$ 10X	70ul
DTT 10X (1M)	10ul
Agua inyectable	465ul

Hecha la mezcla, se procedió a incubarla a 50-60°C por 1 min para adicionar:

ATP 10X	70ul
BSA 10X	70ul
Enzima ligasa $T_4$ (2U/ul)	2ul

Posteriormente se procedió a una incubación a temp. amb. por 24 hrs para después adicionar 1 ul más de enzima ligasa y dejar en incubación a 16°C por 18 hrs más. Terminada la incubación, se adicionaron 77.7 ul de acetato de sodio 3 M y 466 ul de isopropanol colocando las sol. en hielo seco durante 1 hr y centrifugar durante 30 min a 14000 rpm para desechar el sobrenadante y lavar la pastilla 2 veces con etanol al 70%, y finalmente resuspender el DNA resultante en 20 ul de agua inyectable (116, 127).

### 6. Transformación bacteriana por electroporación.

a) Preparación de células electrocompetentes. Se inocularon 5 ml de caldo LB Str (100 ug/ml) con una asada de *E. coli* MC1061, incubándose el cultivo a 37°C ON a 200 rpm de agitación constante; al día siguiente, 2 matraces Erlenmeyer (2 litros) conteniendo 500

ml de "super medio" (32g peptona, 20g extracto de levadura, 5g de NaCl/litro, pH 7.5 con NaOH) fueron inoculados con 2.5 ml del cultivo ON obtenido anteriormente, dejándolos en incubación a 37°C a 200 rpm por espacio de 4 hrs. Al final del proceso, se colocaron los matraces en un baño de hielo durante 30 min para posteriormente continuar con su centrifugación a 6000 rpm durante 20 min a 4°C (a partir de este momento, todo el proceso se realizó a 4°C). El sobrenadante resultante fue desechado y la pastilla resuspendida en 500 ml de sol. de HEPES 1 mM preenfriado para centrifugar de nuevamente y volver a resuspender en 500 ml más de HEPES 1 mM y volver a centrifugar a las mismas condiciones. La pastilla así obtenida fue resuspendida en 20 ml de glicerol estéril al 20% preenfriado para después centrifugar las células a 6000 rpm por 20 min a 4°C, desechando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en 2 ml de glicerol al 20% preenfriado. Finalmente, la suspensión obtenida fue repartida en alicuotas de 50 ul guardándose las células a -70°C hasta su utilización (127).

**b) Electroporación.** Se mezclaron 50 ul de células electrocompetentes junto con 20 ul de mezcla de clonación en celdas de 0.4 mm previamente enfriadas en hielo seco, colocándolas en el aparato de electroporación (BioRad) y sometiénolas a un choque eléctrico por 5 milisegundos a 2.5 KV, 25 ufd, 200 ohms; inmediatamente después, se añadieron 2 ml de medio SOC Tc (Caldo LB adicionado con 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucosa, 0.2 ug/ml Tc) y transfiriendo la mezcla a un tubo estéril de 10 ml; se procedió a

una incubación a 37°C durante 30 min a 200 rpm para finalmente platear todo el cultivo en agar LB Str Tc (200 ul/placa) e incubar las placas resultantes a 37°C durante 72 hrs hasta verificar la presencia de colonias bacterianas. Durante este proceso se realizó un control positivo de transformación, electroporando 2 ul de DNA RF del fago *fUSE 2* (127).

#### **7. Obtención y procesamiento de los viriones (banco).**

Después de verificar la presencia de colonias bacterianas en las placas de medio selectivo, se colocaron 10 ml de medio TBS (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) estéril en cada una de ellas, dejándolas en reposo a temp. amb. durante 15 min. Posteriormente se resuspendieron las colonias bacterianas, recuperando la suspensión resultante y lavando cada una de las placas con 10 ml mas de medio TBS, mezclando esta sol. de lavado con la suspensión anterior. Finalmente se conjuntaron todas las sol. de lavado de una sola ligación para posteriormente centrifugarse a 6000 rpm durante 20 min; la pastilla resultante, fue resuspendida en 2 ml de caldo LB Str Tc y guardada en tubos estériles a 4°C para su posterior analisis por Dot-ELISA, mientras que a el sobrenadante recuperado, se adicionaron 0.15 partes de PEG/NaCl estéril, homogeneizando mínimo 100 veces y congelando los tubos resultantes ON, para posteriormente obtener los viriones correspondientes y resuspender éstos en 300 ul de TE estéril (127).

**8. Aislamiento e identificación de clonas recombinantes a proteínas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d.**

**a) Obtención de anticuerpos anti-porinas.**

- **Ensayo de inmunización.** Los anticuerpos dirigidos contra porinas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d fueron obtenidos por medio de la inmunización de conejos Nueva Zelanda hembras de aprox. 4 Kg de peso con una emulsión de porinas (0.6 mg) obtenidas por el método de Nikaido (94) y adyuvante completo e incompleto de Freund mediante el siguiente esquema de inmunización realizado por el MVZ Arturo Guerrero.

Día	Vía	Mezcla
1	Subcutánea	Porinas + Adyuv.Comp.Freund
10	"	"
14	"	"
7 meses sin inmunización		
1	Subcutánea	Porinas + Adyuv.Incom.Freund
1 mes sin inmunización		
1	Subcutánea	Porinas + Adyuv.Incom.Freund

Al final de la última inmunización, se realizó un sangrado por la vena marginal de la oreja 8 días después, obteniéndose 12 ml de sangre de la cual se obtuvieron aprox. 5 ml de suero. El título de anticuerpos anti-porinas del suero obtenido se determinó por un ensayo de ELISA indirecta.

- **Adsorción del suero con proteínas de membrana externa de *E. coli*.** Se inocularon 125 ml de caldo LB con una asada de un cultivo en caja de agar LB de 24 hrs. de *E. coli* K91-Kan, incubándose a



37°C por espacio de 7-8 hrs en agitación constante a 200 rpm. Al final de la incubación, el cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min, obteniéndose una pastilla que fue resuspendida en 9 ml de SSF estéril y dividiéndose por partes iguales en 3 tubos. Cada uno de los tubos fue sometido a sonicación con 200 watts de potencia hasta que la viscosidad de la suspensión desapareció por completo, centrifugándose posteriormente 10 min a 6000 rpm. La pastilla así obtenida en cada uno de los tubos, fue resuspendida respectivamente en 500 ul de agua destilada estéril (sonicado crudo). En seguida se agregó el contenido de cada uno de ellos a 5 ml de suero hiperinmune para después incubar la mezcla a 37°C en posición horizontal en agitación constante a 50-60 rpm durante 4 hrs. Al término de la incubación, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 6000 rpm recuperándose el sobrenadante para volver a repetir el proceso 2 veces más a partir de la adición del sonicado crudo. Finalmente para evaluar la efectividad del proceso de adsorción, se realizó un ensayo de ELISA utilizando como antígeno porinas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d y proteínas de membrana externa de *E. coli* K91-Kan.

- Adsorción del suero con viriones del fago *fUSE 2*. A el suero recuperado de las adsorciones anteriores (aprox.3 ml) se adicionaron 50 ul de una suspensión de fagos *fUSE 2* con un título de  $10^{10}$  TU/ml, para mezclar e incubar a 37°C durante 30 min en posición horizontal. Al término de la incubación, se procedió a una incubación ON (12 hrs) a 4°C en posición vertical y centrifugación al final del proceso a 14000 rpm durante 10 min para recuperar el

sobrenadante y realizar una prueba de ELISA con el fin de comprobar que la adsorción tuvo éxito.

b) **Purificación de gamma-globulinas (101).** Se colocó el volúmen total de suero adsorbido anteriormente (3 ml) en un vaso de precipitados junto con un agitador magnético para proceder a su homogenización por un periodo de 10 min. En seguida se agregó gota a gota 1/3 del volúmen de suero de una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1.5 ml) sin detener la agitación, continuándola 30 min más. Al término de la agitación, se procedió a centrifugar la mezcla por 10 min a 2000 rpm, desechándose el sobrenadante y resuspendiendo perfectamente la pastilla obtenida en el volúmen original de suero (3 ml) con SSF estéril. El proceso a partir de la adición de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  se repitió 2 veces más resuspendiéndose el precipitado finalmente en 3 ml de SSF estéril para posteriormente colocar ésta mezcla en un tubo de diálisis y proceder a dializar contra una solución de PBS durante 2 días a 4°C en agitación constante. Finalmente se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry.

c) **Biotinación (127, 129).** La fracción de las gammaglobulinas obtenida anteriormente se dializó contra una solución de  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M durante 24 hrs a 4°C en agitación constante, recuperando la mezcla resultante y colocando 1 ml de ésta junto con 10 ul de una sol. de biotina (Ester de N-hidroxisuccinimido d-Biotina) 0.1 M disuelta en dimetilformamida (1.3 mg en 760 ul de DMFM), para

finalmente dejar en incubación 2 hrs a temp. amb. en agitación constante. Posteriormente se agregaron 500 ul de buffer de etanolamina 1 M (pH 9, ajustado con HCl) dejándose reaccionar por espacio de 2 hrs a temp. amb. en agitación constante. Finalmente se procedió a dializar la mezcla anterior contra una sol. de Tris-HCl 0.1 M pH 7.4 durante 24 hrs a 4°C bajo agitación constante (101). Al final de la diálisis, se procedió a dializar nuevamente la mezcla contra PBS a 4°C en agitación constante ON para finalmente almacenar a 4°C.

- **Comprobación de la biotinación.** Se elaboró un conjugado avidina-peroxidasa para así detectar la presencia de biotina en los anticuerpos a través de una prueba de ELISA, de la siguiente forma: se disolvieron 2.5 mg de avidina en 0.5 ml de buffer de fosfatos 0.1 M pH 6.8, mezclándose con una sol. de 5 mg de peroxidasa que anteriormente había sido disuelta en 0.5 ml del mismo buffer. A ésta mezcla se agregaron 50 ul de una sol. de glutaraldehído al 1%, dejando la mezcla de reacción por espacio de 3 hrs a temp. amb. Posteriormente se procedió a una diálisis contra PBS durante toda la noche a 4°C, para finalmente recuperar la sol. y preservarla a 4°C (129).

- **Evaluación del conjugado.** Se colocaron diversas sol. de biotina (de 100 ug/ml a 0.78 ug/ml) en una placa de 96 pozos para ELISA, para posteriormente agregar diversas diluciones del conjugado (de 1:10 a 1:2000) y revelar con o-fenilendiamina.

- **Realización de la prueba.** Se realizó una prueba de ELISA en placas de 96 pozos, colocando como antígeno porinas de *S. typhi* 9,

12 Vi:d, como primer anticuerpo gammaglobulinas biotinadas y el conjugado avidina-peroxidasa obtenido anteriormente para revelar con o-fenilendiamina.

**d) Selección (Biopanning).**

- **Sensibilización del soporte con estreptavidina.** En una caja de Petri de plástico (Falcon) de 35 X 10 mm, se colocó 1 ml de buffer  $\text{NaHCO}_3$  0.1 M de pH no ajustado y 10  $\mu\text{l}$  de una sol. de estreptavidina a una concentración de 1 mg/ml en el buffer anterior, para posteriormente colocar la caja cerrada en una cámara húmeda toda la noche a 4°C. Posteriormente se procedió a colocar 10 ml de sol. bloqueadora (5 mg/ml BSA dializada, 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.2) dejando en incubación a temp. amb. por espacio de 1 hr sin agitación. Finalmente se recuperó ésta sol. y la placa se lavó 3 veces con 6 ml cada vez de una sol. de lavado TBS/Tween 20 (200 vol. TBS, 1 vol. Tween 20) por espacio de 5 min cada una bajo agitación constante.

- **Realización de la prueba.** Por otra parte, se mezclaron 50  $\mu\text{l}$  de sol. de fagos de cada ligación (a excepción del banco de DNA cromosomal total sonificado del cual se adicionaron 20  $\mu\text{l}$ ) recuperados de la electroporación junto con 5  $\mu\text{l}$  de gammaglobulinas biotinadas, dejando en incubación 1 hr a 37°C y posteriormente toda la noche a 4°C horizontalmente. Al final del proceso de incubación, se colocó 1 ml de una sol. de TBS/Tween 20 mezclando perfectamente y colocando de inmediato la mezcla en la placa sensibilizada con estreptavidina para proceder a una agitación a 50-60 rpm durante 15

min a temp. amb. En seguida la mezcla anterior se descartó y se procedió a 10 lavados exhaustivos con sol. de lavado por espacio de 5 min cada uno bajo agitación constante, para finalmente secar las cajas en campana de flujo laminar, colocar 800 ul de buffer de elución (1 mg/ml BSA dializada, 0.1 N HCl pH 2.2) y proceder a una agitación constante de 50-60 rpm a temp. amb. durante 20 min. Finalmente el eluido fue neutralizado inmediatamente con 48 ul de una sol. de Tris 2 M de pH no ajustado, para después proceder a la amplificación de los fagos contenidos en el eluido (101, 127).

- **Amplificación.** Los eluidos procedentes del biopanning, fueron colocados en 2 ml de un cultivo ON de *E. coli* K91-Kan en medio LB Kan e incubados a 37°C durante 48 hrs de 50-60 rpm de agitación constante. En seguida se inocularon 200 ml de medio LB Kan con el cultivo obtenido anteriormente para proceder a su incubación a 37°C ON a 200 rpm. Finalmente al término de la incubación, se tomó una muestra de 5 ml de cada una de las amplificaciones para realizar las pruebas de detección, centrifugándose el resto de la masa celular a 7000 rpm y proceder con la obtención de partículas infecciosas del fago con el sobrenadante obtenido de dicha amplificación y posteriormente determinar su título.

e) **Detección inmunológica.**

- **Dot-ELISA.** De la muestra bacteriana derivada de la electroporación, se realizó una dilución 1:200 en 2 ml de caldo LB de cada una de las ligaciones, plateándose 200 ul de la dilución en

una caja de agar LB Str Tc y colocándose en incubación a 37°C durante 18 hrs. Después de verificar el desarrollo de colonias separadas en el medio de cultivo, se procedió a colocar papel de nitrocelulosa (PNC) (6 cm por lado) por encima de ellas, verificando que éste estuviese en contacto directo con las colonias bacterianas. Posteriormente se incubaron las placas en forma invertida durante 24 hrs a 4°C, para seguidamente realizar el levantamiento correspondiente y colocar el papel en una caja de Petri de vidrio junto con 5 ml de una sol. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% por espacio de 5 min sin agitación. Al término del proceso, se realizaron 3 lavados con PBS, cada uno de ellos por espacio de 5 min con agitación constante, para posteriormente adicionar 4 ml de una dilución de anticuerpos antiporinas 1:200 en sol. de bloqueo (PBS-gelatina 2%) y proceder a su incubación a 37°C por espacio de 1.5 hrs. En seguida se realizaron 5 lavados con sol. de lavado (PBS-Tween 20), para realizar un lavado final con PBS. Al término de éstos, se procedió a colocar 5 ml de una sol. de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% durante 5 min sin agitación; posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS (5 min cada uno en agitación constante) para adicionar 4 ml de una dilución 1:5000 de conjugado anticonejo polivalente en sol. de bloqueo y proceder a su incubación a 37°C durante 1 hr. Al término de la incubación, se realizaron 5 lavados con sol. de lavado y finalmente un lavado con PBS para después adicionar 4 ml de sol. de sustrato (5 mg Diaminobencidina, 10 ml PBS, 50 ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dejando reaccionar en oscuridad por espacio de 15 min hasta verificar la aparición de señal en el PNC y deteniendo la reacción

con lavados de agua destilada .

- ELISA. Después de la determinación del título de los fagos de interés, se procedió a realizar una prueba de ELISA indirecta, sensibilizando placas de 96 pozos con  $10^{10}$  TU/pozo de partículas infecciosas del fago *FUSE 2*, utilizando gammaglobulinas antiporinas de conejo en diversas diluciones y conjugado polivalente anticonejo.

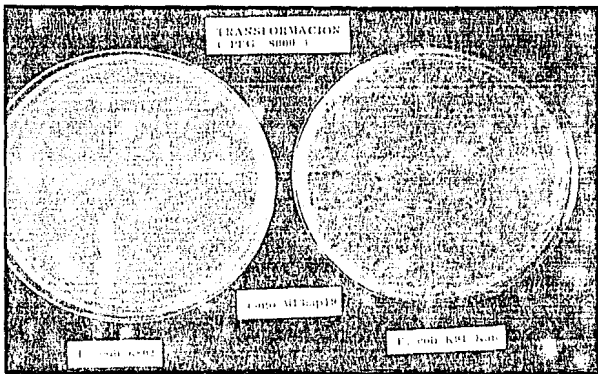
## V. R E S U L T A D O S



a) **Características de la cepa *E. coli* K91-Kan.** Después del proceso de incubación en las placas de medio selectivo EMB, MacKonkey y Verde Brillante se observó desarrollo de colonias lac<sup>+</sup> de la cepa *E. coli* K91-Kan considerablemente inhibidas en su desarrollo a comparación del control positivo. El color característico en cada uno de los medios de cultivo de la cepa positiva no fue observado en la cepa investigada. Esto indicó que la cepa *E. coli* K91-Kan no poseía la característica lac<sup>+</sup>. Así mismo se comprobó que ésta cepa es resistente a kan al verificarse su crecimiento normal en el medio selectivo correspondiente, aun a altas concentraciones del antibiótico.

La presencia del factor sexual F en esta cepa fue verificado, después del proceso de transformación con PEG realizado con el fago M13mp19, por medio de la aparición de placas opacas de tamaño homogéneo en el césped de bacteria colocado en el medio de cultivo, a comparación de una cepa *E. coli* K802 (F<sup>+</sup>) en la cual no se observó el desarrollo de las mismas. Esto fue indicativo de que la cepa *E. coli* K91-Kan era susceptible de infección con el fago filamentososo M13mp19 y por lo tanto con cualquier otro fago filamentososo infeccioso (figura 8). La eficiencia de transformación para éste método fue de  $5 \times 10^3$  transformantes/ug de DNA.

b) **Caracterización del vector de clonación *fUSE 2*.** Posterior a la obtención de las partículas infecciosas del fago *fUSE 2* por medio de su precipitación con PEG, se realizó un ensayo de infectividad mezclando bacterias infectadas y normales para

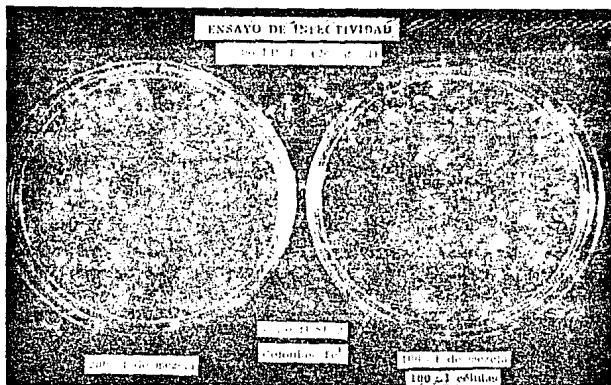


**FIGURA 8. VERIFICACION DE LA PRESENCIA DEL FACTOR F<sup>+</sup> EN LA CEPA E. coli K91-Kan.** Después del proceso de transformación de las cepas *E. coli* K91-Kan y *E. coli* K802 con 1 ul de DNA RF del fago M13mp19 (2mg/ml), se verificó la presencia de placas opacas sola en la primera de ellas. El medio utilizado fue agar LB.

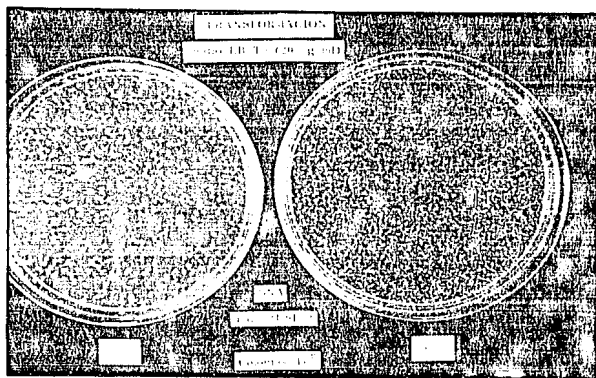
observar el efecto de amplificación del fago. Se observó al final del ensayo en todos los casos investigados únicamente la aparición de colonias resistentes a Tc sin que llegaran a desarrollarse placas opacas como en el caso del control positivo, a pesar de probarse 3 diferentes soluciones del bacteriófago *fUSE 2* (figura 9).

La obtención del DNA RF del fago *fUSE 2* por medio del tratamiento de lisis alcalina, se verificó en la solución obtenida por medio de una electroforesis en agarosa (figura 11), para finalmente determinar su concentración espectrofotométricamente a 260 nm contra un blanco de agua destilada, siendo ésta de 2.4 ug/ul. El DNA así cuantificado fue utilizado para realizar una transformación en la cepa *E. coli K91-Kan* con el fin de investigar si la característica de resistencia al antibiótico observada por la infección con partículas del fago provenía de la transferencia del DNA del mismo a la bacteria; esto se verificó al final del experimento con la aparición de colonias resistentes a Tc (figura 10).

El DNA RF del fago *fUSE 2* fue caracterizado inicialmente al digerirse por separado con las enzimas de restricción Eco RI, Bam HI y Bgl II, originándose después del tratamiento enzimático, una banda única de aprox. 9.2 Kb de tamaño comparable con la segunda banda del control de tamaño lambda Hind III (figura 11). Posteriormente, al realizarse el patrón de restricción característico del DNA RF del fago *fUSE 2* con las enzimas de restricción Taq I y Hae III, se verificó la existencia de diversas



**FIGURA 9. ENSAYO DE INFECTIVIDAD DE LA CEPA *E. coli* K91-Kan.** Después de mezclar soluciones de partículas infecciosas del fago *fUSE 2* provenientes de sobrenadantes de células  $Tc^r$  con cultivos de la cepa *E. coli* K91-Kan en fase log, se verificó el desarrollo de numerosas colonias  $Tc^r$  en agar LB Tc (20 ug/ml) al cabo de 24 hrs. de incubación. Los títulos de las soluciones utilizadas fueron:  $2 \times 10^{12}$ ,  $3.1 \times 10^{10}$  y  $6.8 \times 10^9$ .



**FIGURA 10. ENSAYO DE TRANSFORMACION DE LA CEPA *E. coli* K91-Kan CON DNA RF DEL FAGO *fUSE* 2.** Por medio del uso de 1 y 5 ul de DNA RF del fago *fUSE* 2 (2.4 ug/ml) con el metodo de Nishimura (ver metodología), se obtuvieron numerosas colonias Tc<sup>r</sup>, después de su incubación a 37°C por 24 hrs. en agar LB Tc (20 ug/ml).

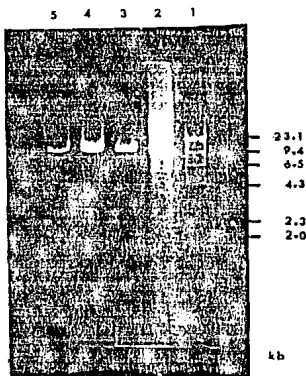


FIGURA 11. CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE DNA EN GEL DE AGAROSA AL 1%. Digestión enzimática del DNA RF del fago *fUSE 2*. Carriles: 1. Marcador de DNA del fago lambda cortado con la enzima Hind III; 2. DNA RF del fago *fUSE 2*; 3. Digestión con la enzima Eco RI; 4. Digestión con la enzima Bam HI; 5. Digestión con la enzima Bgl II. En las digestiones enzimáticas, se observa la generación de una banda de tamaño similar a la segunda banda del marcador (9.4 Kb), desapareciendo las bandas observadas en el DNA sin digerir (carril 1), a excepción del carril 4 (posible digestión parcial).

bandas de tamaños determinados que fueron comparadas con una predicción hecha por computadora de los fragmentos resultantes de la digestión con éstas dos enzimas (figuras 12, 13).

c) Obtención de los insertos y clonación. El DNA cromosomal de *S. typhi* 9, 12 Vi:d fue cuantificado espectrofotométricamente, resultando en una concentración de 1 mg/ml; una parte de éste fue aprovechado para los ensayos de sonicación junto con una solución de un DNA lineal del plásmido pUC 9 digerido con la enzima de restricción Eco RI (1.6 mg/ml). Posterior a la sonicación de estos DNA's y a la observación del tamaño de los fragmentos generados por la misma en PAGE, se determinó que una disminución gradual en el tamaño del DNA era sólo observada a 50 Watts y que el tamaño mínimo que se podía obtener era de aprox. 170 pb no importando el tamaño original del DNA en ensayo; el tiempo mínimo requerido para la obtención de la reducción máxima del tamaño del DNA fue de 8 minutos (figura 14), y a pesar de que el tiempo de sonicación se aumentó en un 50% más (12 min. en total), no se observó mayor reducción en el tamaño observado.

Al término de la digestión con la nucleasa Bal 31 en los fragmentos generados por sonicación y de la posterior observación de los fragmentos obtenidos por PAGE, se observó disminución a menos de 100 pb en el tamaño de los mismos después de una incubación de 3 min. a 37°C con la enzima, no observándose DNA en el corrimiento electroforético a una incubación mayor en presencia de la enzima (figura 15).

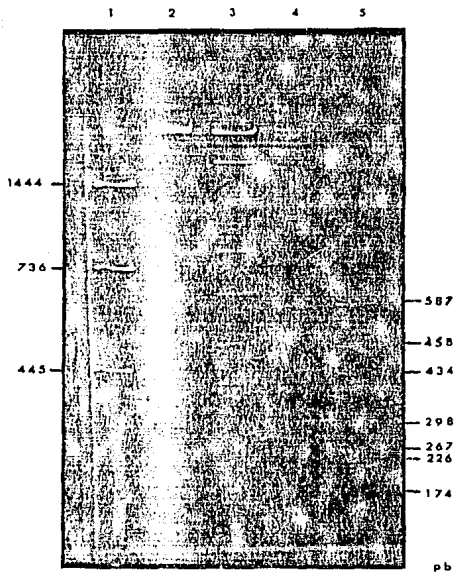


FIGURA 12. CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE DNA EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) AL 7.5%. Caracterización del DNA RF del fago *FUSE 2*. Carriles: 1. Marcador de DNA del plásmido pUC 9 cortado con la enzima Taq I; 2. Plásmido pUC 9 cortado con la enzima Eco RI (2.6 Kb); 3. Digestión enzimática del DNA RF *FUSE 2* con la enzima Hae III; 4. Digestión enzimática del DNA RF *FUSE 2* con la enzima Taq I; 5. Marcador de DNA del plásmido pUC 9 cortado con la enzima Hae III.



## ANALISIS DE SITIOS DE RESTRICCIÓN.

Hecho en la secuencia nucleotídica completa del fago *FUSE2*.

Número total de bases: 9183.

Lista de cortes por enzima.

Ava I	:	5649																				
Bam HI	:	2220																				
Bgl I	:	6657																				
Bgl II	:	1638																				
Eco RI	:	6843																				
Eco RV	:	7330																				
Hae III	:	1397	2246	2555	5083	5241	5347	5416	6047	6398												
		6773	7009	7145	7385	7837	8091	8502	8605	8957												
Hind II	:	6281	7504	8205	8404																	
Hind III	:	5975																				
Sau 3A	:	1381	1638	1713	2220	5645	5954	6505	7126	7423												
		7966	8056	8100	8369	8390	8420															
Sca I	:	6611																				
Taq I	:	336	988	1127	1508	1949	2528	2815	4834	6295												
		6603	6847	7401	7432	7590	7680	7863	8046	8199												
		8459	8816																			
Xba I	:	7529																				

Número total de cortes: 66

Lista de enzimas por número de cortes.

Taq I	:	20	Xba I	:	1	Bgl II	:	1	Eco RI	:	1
Hae III	:	18	Bam HI	:	1	Sca I	:	1			
Sau 3A	:	15	Hind III	:	1	Bgl I	:	1			
Hind II	:	4	Eco RV	:	1	Ava I	:	1			

Lista por tamaño de fragmentos (pb)<sup>1</sup>.

Taq I	:	31	90	139	153	158	183	183	244	260												
		287	308	357	381	441	554	579	652	703												
		1461	2019																			
Hae III	:	69	103	106	126	136	158	240	309	324												
		324	352	375	411	452	658	849	1623	2528												

FIGURA 13. ANALISIS DE RESTRICCIÓN DEL DNA FAGO *FUSE 2*. Se muestra el tamaño de los fragmentos resultantes de la digestión con las enzimas de restricción Taq I y Hae III<sup>1</sup>.

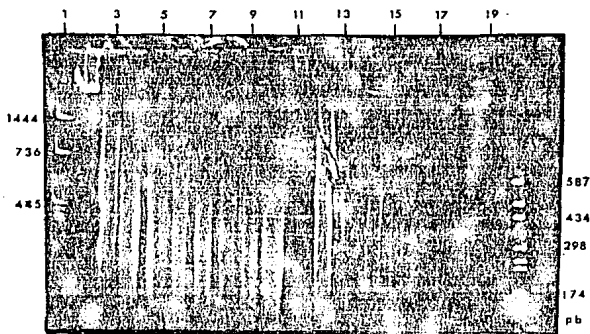
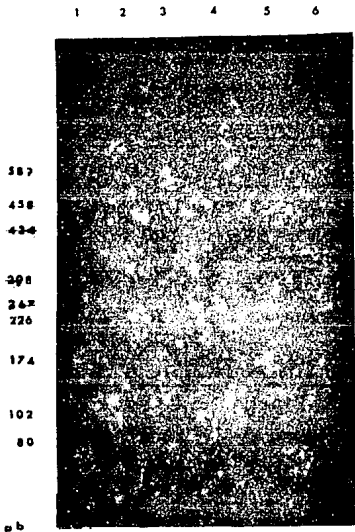


FIGURA 14. CORRIMIENTO ELECTROFORETICO DE DNA EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) AL 12%. Ensayo de sonicación para DNA y determinación de condiciones experimentales. Sonicación a 50 Watts de potencia. Carriles: 1. Marcador plásmido pUC 9 Taq I; 2. plásmido pUC 9 Eco RI (2.6 Kb); 3-10. Sonicación plásmido pUC 9 de 1 a 8 min.; 11. DNA cromosomal *S. typhi* 9, 12 *Vi:d*; 12-19. Sonicación DNA cromosomal *S. typhi* 9, 12 *Vi:d* de 1 a 8 min.; 20. Marcador plásmido pUC 9 Hae III.

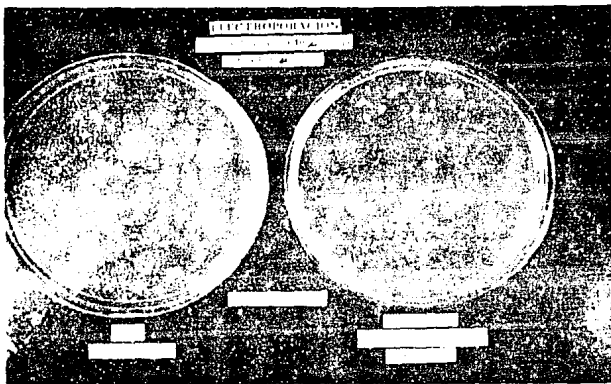


**FIGURA 15. CORRIMIENTO ELECTROFORÉTICO DE DNA EN GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE) AL 12%. Ensayo de digestión de DNA cromosomal *S. typhi* 9, 12 Vi:d con la nucleasa Bal 31. Determinación de condiciones experimentales. Carriles: 1. Marcador plásmido pUC 9 Hae III; 2. Digestión Bal 31 1 min.; 3. Digestión Bal 31 2 min.; 4. Digestión Bal 31 3 min.; 5. Digestión Bal 31 4 min.**

Finalmente el DNA cromosomal de *S. typhi* 9, 12 Vi:d así como los fragmentos de 2.6 a 3.4 Kb del gel preparativo del DNA cromosomal de *S. typhi* digerido con la enzima Bgl II, fueron sonicados por 8 min. a 50 watts de potencia y digeridos con la enzima Bal 31 durante 3 min. a 37°C (a excepción del DNA cromosomal sonificado).

Posterior a los procesos de reparación de los fragmentos correspondientes con el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y de la creación de extremos cohesivos con la enzima Bam HI después de la ligación con linkers, se decidió no determinar la concentración de DNA de cada uno de los procesos, puesto que se contaba con muy poca cantidad de los mismos para tal efecto, además de considerar que la cantidad utilizada para tal determinación era significativamente importante para obtener una mayor diversidad del banco. Los linkers para Bam HI fueron añadidos con 10 veces de exceso molar (50 pmol) en relación a la molaridad supuesta de los fragmentos reparados (debido a la heterogeneidad de su secuencia). Así mismo la ligación de tales insertos, realizada por duplicado para cada tipo de inserto, no fue verificada después del proceso de clonación.

**d) Electroporación y procesamiento de viriones.** Las mezclas de clonación realizadas por duplicado para cada tipo de inserto fueron mezcladas para transformar las células correspondientes por medio de electroporación debido a un reducido número de celdas. Después del proceso de transformación y de la incubación correspondiente en



**FIGURA 16. ELECTROPORACION MEZCLA DE LIGACION FAGO FUSE 2 Y FRAGMENTOS 170 pb DNA CROMOSOMAL TOTAL *S. typhi* 9, 12 Vi:d EN *E. coli* MC1061. Después de la correspondiente incubación en agar LB Tc (20 ug/ml) Str (100 ug/ml) de las células electroporadas, se observó crecimiento bacteriano. La electroporación con DNA RF del fago FUSE 2, resultó en la aparición de incontables colonias bacterianas pequeñas (izquierda).**

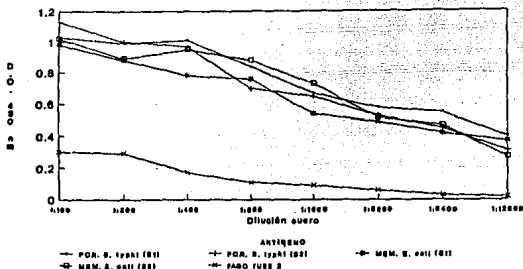
el medio selectivo adecuado, se observó el crecimiento de colonias resistentes a Str y Tc en número variable para cada tipo de inserto (figura 16), pero menor al obtenido con el control positivo (DNA RF fago fUSE 2), siendo incontables las colonias obtenidas por caja, por lo que la eficiencia de transformación no pudo ser calculada.

En la tabla II se muestran los títulos (TU) de los viriones obtenidos para cada tipo de inserto electroporado.

#### e) Sistema de detección.

- **Sueros hiperinmunes.** Después de la obtención de sueros hiperinmunes de conejo hacia porinas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d, el título de anticuerpos antiporinas de los mismos se determinó por un ensayo de ELISA indirecta, obteniéndose lecturas de 0.3 - 0.5 unidades de absorbancia (figura 17) con 250 ng de porinas en una dilución 1:12,800 de los sueros en ensayo y utilizando conjugado pol. anti-conejo en una dilución 1:10000 anteriormente determinada. Así mismo se observó un reconocimiento antigénico de estos sueros hiperinmunes hacia membranas totales de *E. coli* JM103 en ensayos de ELISA, obteniéndose similares lecturas de densidad óptica para éste antígeno aun a bajas diluciones del suero en ensayo (figura 17). Posterior al proceso de adsorción de estos sueros con membranas totales de *E. coli* JM103 con el fin de disminuir la señal que aparecía en los ensayos de detección anteriores, se observó una baja considerable en la señal de reconocimiento hacia membranas de *E. coli* JM103 de aprox. un 40-50%, sin perderse la magnitud original de la señal observada hacia porinas de *S. typhi*. En base

# TITULACION ELISA



Ac antiporinas (conejo)  
S1: Suero 1  
S2: Suero 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1.03	0.99	1.01	0.84	0.67	0.58	0.55	0.40	0.07	0.15	0.26	0.19	A
1.13	1.00	0.97	0.70	0.48	0.53	0.45	0.31	0.12	0.15	0.26	0.17	B
0.98	0.88	0.78	0.76	0.54	0.49	0.42	0.37	0.18	0.16	0.17	0.19	C
1.02	0.89	0.95	0.88	0.73	0.52	0.47	0.27	0.15	0.13	0.20	0.15	D
0.30	0.29	0.17	0.11	0.09	0.06	0.09	0.02	0.01	0.01	0.19	0.13	E

FIGURA 17. TITULACION SUEROS CONEJO ANTIPORINAS *S. typhi*. Ag: Porinas *S. typhi* 2.5 ng/pozo (A y B), membranas *E.coli* JM103 250 ng/pozo (C y D), fago *fUSE 2*  $10^{12}$  TU/pozo (E). Columnas 1 a 8 dilución suero (Suero 1: A, C y E; Suero 2: B y D), 9 y 10 Control Ag, 11 y 12 Control Ac. Conjugado pol. anticonejo 1:10000.

a la mejor discriminación en la señal hacia porinas de *S. typhi* y membranas de *E. coli*, se eligió el suero no. 1 para su uso posterior en los ensayos de detección (figura 18). De manera análoga no se observó originalmente una señal significativa de los sueros hiperinmunes hacia partículas infecciosas del fago *fUSE 2*, procediéndose de cualquier manera a la adsorción correspondiente de los mismos; posteriormente mediante ensayos de ELISA, no se observó ningún cambio significativo en la señal de detección entre los sueros adsorbidos con el fago y los normales (figuras 18, 19).

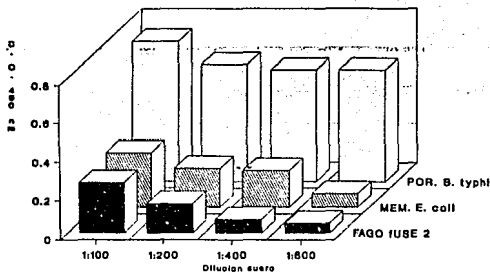
Después de la verificación en la reducción de señal de los sueros con los antígenos anteriormente mencionados, al realizar la purificación correspondiente de inmunoglobulinas se observó una disminución considerable de aprox. 3 a 4 veces en la señal de reconocimiento hacia membranas de *E. coli*, manteniéndose sin variación considerable la señal hacia porinas de *S. typhi* (figura 20).

- **Biotinación.** Posterior a la elaboración del conjugado avidina-peroxidasa, se procedió a verificar su eficacia en el reconocimiento de biotina en ensayos de detección de ELISA, verificándose la señal mas alta y adecuada cuando éste se utilizaba a diluciones muy bajas (1:10, 1:20) (figura 21), pero observándose una discriminación suficiente para denotar entre la presencia o no de biotina en los anticuerpos biotinados anteriormente (figura 22).



# ADSORCION ELISA

94



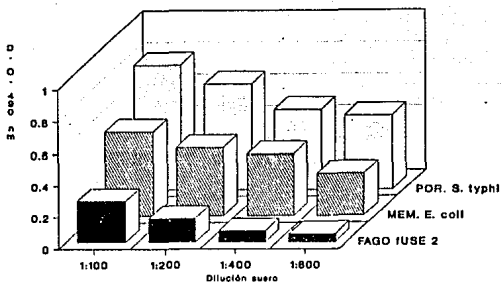
Ac antiporinas (conejo)  
SUERO 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
0.23	0.28	0.20	0.13	0.22	0.19	0.10	0.07	0.01	0.01	0.03	0.01	A
0.78	0.08	0.60	0.01	0.57	0.60	0.57	0.60	0.01	0.00	0.03	0.01	B
0.30	0.21	0.17	0.13	0.09	0.08	0.07	0.04	0.01	0.02	0.04	0.04	C

**FIGURA 18. ADSORCION SUERO 1 DE CONEJO ANTIPORINAS *S. typhi*. Ag.:** Porinas *S. typhi* 250 ng/pozo (B), membranas *E. coli* JM103 250 ng/pozo (A), fago FUSE 2  $10^{12}$  TU/pozo (C). Columnas 1 a 8 dilución suero, 9 y 10 control Ag, 11 y 12 control Ac. Conjugado pol. anticonejo 1:10000.

# ADSORCION ELISA

95



Ac antiporinas (conejo)  
SUERO 2

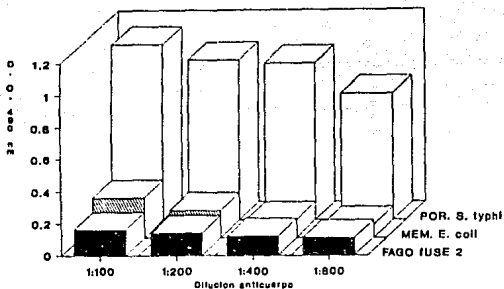
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A
0.50	0.48	0.49	0.37	0.39	0.40	0.26	0.28	0.07	0.05	0.05	0.07	B
0.80	0.77	0.64	0.67	0.51	0.49	0.44	0.48	0.00	0.08	0.08	0.05	C
0.80	0.21	0.17	0.18	0.09	0.05	0.07	0.04	0.01	0.02	0.04	0.04	

FIGURA 19. ADSORCION SUERO 2 DE CONEJO ANTIPORINAS *S. typhi*. Ag.: Porinas *S. typhi* 250 ng/pozo (B), membranas *E. coli* JM103 250 ng/pozo (A), fago *fUSE 2*  $10^{12}$  TU/pozo (C). Columnas 1 a 8 dilución suero, 9 y 10 control Ag, 11 y 12 control Ac. Conjugado pol. anticonejo 1:10000.

# ANTICUERPOS PURIFICADOS

ELISA

96



Ac antiporinas (conejo)  
SUERO 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1.08	1.11	1.00	1.01	0.97	0.98	0.84	0.76	0.07	0.15	0.07	0.09	A
0.29	0.28	0.19	0.27	0.12	0.10	0.07	0.10	0.01	0.01	0.07	0.03	B
0.16	0.16	0.14	0.14	0.12	0.13	0.09	0.12	0.00	0.00	0.01	0.03	C

FIGURA 20. TITULACION DE ANTICUERPOS PURIFICADOS DEL SUERO 1 DE CONEJO ANTIPORINAS *S. typhi*. Ag.: Porinas *S. typhi* 250 ng/pozo (A), membranas *E. coli* JM103 250 ng/pozo (B), fago *fUSE 2*  $10^{12}$  TU/pozo (C). Columnas 1 a 8 dilución suero, 9 y 10 control Ag, 11 y 12 control Ac. Conjugado pol. anticonejo 1:10000.

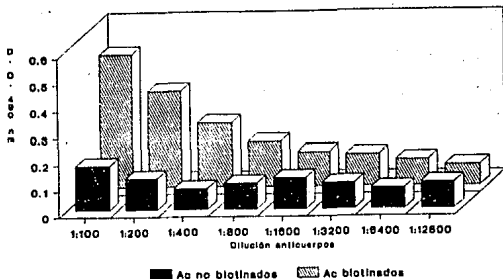
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
0.46	0.38	0.19	0.19	0.09	0.11	0.14	0.07	0.00	0.00	0.09	0.09	A
0.39	0.36	0.24	0.24	0.08	0.07	0.09	0.00	0.00	0.00	0.02	0.07	B
0.48	0.36	0.23	0.17	0.08	0.08	0.06	0.00	0.00	0.00	0.01	0.04	C
0.52	0.35	0.31	0.14	0.21	0.07	0.10	0.00	0.00	0.00	0.01	0.04	D
0.45	0.30	0.24	0.13	0.13	0.06	0.07	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	E
0.34	0.21	0.12	0.11	0.05	0.05	0.07	0.00	0.02	0.00	0.01	0.05	F
0.22	0.22	0.10	0.09	0.04	0.07	0.07	0.00	0.00	0.00	0.02	0.02	G
0.16	0.12	0.07	0.10	0.03	0.06	0.06	0.00	0.01	0.00	0.03	0.07	H

FIGURA 21. EVALUACION DEL CONJUGADO AVIDINA-PEROXIDASA. Columnas 1 a 8 Ag biotina ( $\mu\text{g/ml}$  100  $\mu\text{l/pozo}$ : 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78), 9 y 10 control Ag; 11 y 12 control conjugado. Renglones A a H dilución (1:X) de prueba del conjugado: 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1000, 2000. Revelador o-fenilendiamina.

# BIOTINACION DE ANTICUERPOS

## ELISA

98



Ac antiporinas (conejo)  
Conjugado avidina-peroxidasa

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
0.17	0.12	0.08	0.10	0.12	0.10	0.08	0.10	0.09	0.18	0.07	0.15
0.50	0.36	0.24	0.17	0.18	0.12	0.10	0.08	0.06	0.12	0.07	0.08

**FIGURA 22. ENSAYO DE VERIFICACION DE BIOTINACION DE GAMMAGLOBULINAS ANTIPORINAS DE *S. typhi*. Ag.: Porinas *S. typhi* 250 ng/pozo . Columnas 1 a 8 dilución Ac no biotinados (A) y biotinados (B), 9 y 10 control Ag, 11 y 12 control Ac. Conjugado avidina-peroxidasa 1:10. Revelador o-fenilendiamina.**

- Selección (biopanning) y detección inmunológica de las clonas recombinantes. Posterior a éste procedimiento y a la amplificación de un control negativo en la primera ronda de selección por ésta técnica (fago *FUSE 2* no recombinantes), se observó posterior amplificación de los 3 eluidos provenientes de los fagos recuperados de la electroporación así como del control negativo, situación que no se presentó cuando el procedimiento se realizó nuevamente con los fagos amplificados de la primera selección. Los títulos correspondientes a cada una de las amplificaciones se muestran en la Tabla III.

Al realizarse la prueba de Dot-ELISA en colonia en las clonas obtenidas de la electroporación, se detectó el desarrollo de manchas intensas en un gran número de las colonias investigadas en las 3 muestras provenientes de cada una de las clonaciones, a diferencia del control negativo (*E. coli* MC1061 transformada con DNA RF fago *fUSE 2*) en el cual no se observó desarrollo de manchas coloridas después del proceso de revelado (figura 23, 24). En las muestras bacterianas (*E. coli* K91-Kan) provenientes de la primera selección (biopanning), también se observó desarrollo de manchas en gran número de colonias con una intensidad comparable a las de la electroporación, con la diferencia de que el control negativo también desarrolló manchas casi de la misma intensidad (figura 25).

Finalmente, al realizar las pruebas de ELISA correspondientes a detectar señales de reconocimiento antigénico en las partículas infecciosas de los bancos obtenidos del fago *fUSE 2* por parte de los anticuerpos antiporinas de *S. typhi*, se observó tal

ELECTROPORACION.	No. colonias (dil)	TU/ml
BANCO 1	95 ( $10^{-12}$ )	$9.5 \times 10^{14}$
BANCO 2	78 ( $10^{-9}$ )	$7.8 \times 10^{11}$
BANCO 3	14 ( $10^{-9}$ )	$1.4 \times 10^{11}$
<b>PRIMER BIOPANNING</b>		
BANCO 1	14 ( $10^{-11}$ )	$1.4 \times 10^{13}$
BANCO 2	50 ( $10^{-9}$ )	$5.0 \times 10^{11}$
BANCO 3	65 ( $10^{-9}$ )	$6.5 \times 10^{11}$
<b>SEGUNDO BIOPANNING</b>		
BANCO 1	22 ( $10^{-11}$ )	$2.2 \times 10^{13}$
BANCO 2	50 ( $10^{-12}$ )	$5.0 \times 10^{14}$
BANCO 3	15 ( $10^{-12}$ )	$1.5 \times 10^{14}$

TABLA No. II. TITULOS DE PARTICULAS INFECCIOSAS DE FAGO *fuse* 2 CORRESPONDIENTES A CADA UNO DE LOS BANCOS EPITOPICOS DE *S. typhi* 9, 12 Vi:d OBTENIDOS. Banco 1. DNA cromosomal sonicado; Banco 2. Región 2.6 a 3.4 Kb sonicado; Banco 3. Región 2.6 a 3.4 Kb sonicado digestión Bal 31; dil. Dilución del ensayo de titulación; volúmen total por pozo (titulación): 100 ul (ver metodología).

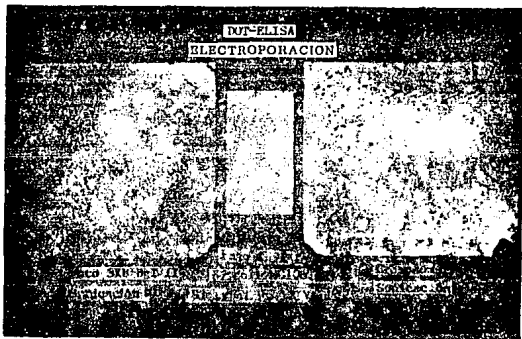


FIGURA 23. Dot-ELISA EN COLONIA DE MUESTRA DE ELECTROPORACION DEL BANCO 1 (Sonicación DNA cromosomal total) y 2 (Sonicación región 2.6 a 3.4 Kb) DE EPITOPOS DE *S. typhi* 9, 12 Vi:d EN *E. coli* MC1061. En el centro de la fotografía se muestra un control negativo de colonias de *E. coli* MC1061 Tc<sup>r</sup> transformadas con fago FUSE 2 no recombinante.



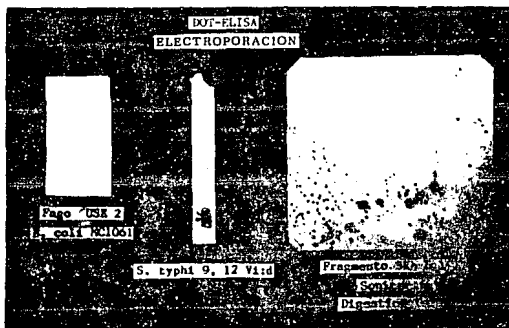


FIGURA 24. Dot-ELISA EN COLONIA DE MUESTRA DE ELECTROPORACION DEL BANCO 3 DE EPITOPOS (Sonicación y digestión Bal 31 región 2.6 a 3.4 Kb) DE *S. typhi* 9, 12 Vi:d EN *E. coli* MC1061. El control positivo se tomó de un cultivo en fase log de *S. typhi* 9, 12 Vi:d en caldo mínimo A.

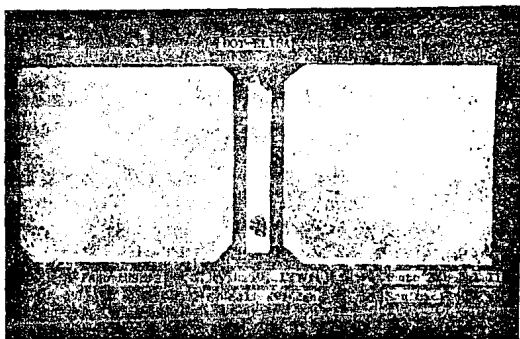


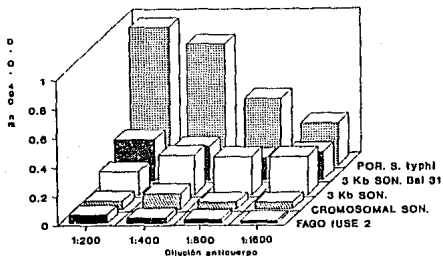
FIGURA 25. Dot-ELISA EN COLONIA DE MUESTRA DE AMPLIFICACION DEL PRIMER AISLAMIENTO (BIOPANNING) DEL BANCO 2 DE EPITOPOS DE *S. typhi* 9, 12 Vi:d EN *E. coli* K91-Kan. Se muestra un control negativo (izquierda) de colonias *E. coli* K91-Kan Tc<sup>r</sup> Kan<sup>r</sup> infectadas con fago *fUSE 2* y un control positivo (centro) de *S. typhi* 9, 12 Vi:d.

reconocimiento después de que cada uno de los bancos obtenidos pasaba por las selecciones realizadas (biopanning) a pesar de que el no. de partículas infecciosas se mantuvo constante en todos los pozos, verificándose también una gran diferencia entre la densidad óptica de tales bancos y el control negativo (fago *fUSE 2*) (figuras 26-28). Posterior a la verificación de señal positiva para los fagos obtenidos, se calculó la cantidad aproximada de fagos recombinantes diferentes contenidos en dichas soluciones (tabla III).

# ELECTROPORACION

## ELISA

105



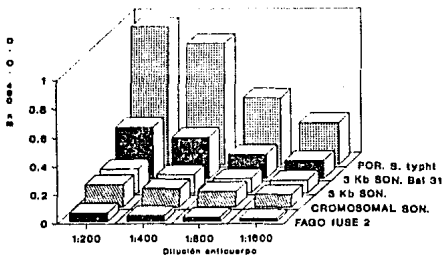
Ac antiporinas (conejo)  
Suero 1  
Antígeno IUSE 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A
1.01	0.91	0.68	0.79	0.41	0.50	0.22	0.25	0.02	0.00	0.00	0.03	
0.06	0.06	0.04	0.04	0.02	0.03	0.01	0.03	0.00	0.00	0.01	0.03	B
0.06	0.06	0.06	0.15	0.08	0.02	0.04	0.05	0.02	0.00	0.08	0.01	C
0.18	0.17	0.27	0.27	0.37	0.16	0.32	0.21	0.00	0.02	0.00	0.03	D
0.22	0.34	0.21	0.25	0.13	0.17	0.19	0.18	0.02	0.00	0.01	0.03	E

FIGURA 26. ELECTROPORACION. ENSAYO DE DETECCION DE FAGOS IUSE 2 RECOMBINANTES CON ANTICUERPOS ANTIPORINAS DE *S. typhi*. Ag.: Porinas *S. typhi* 250 ng/pozo (A), fago IUSE 2  $10^{10}$  TU/pozo (B), banco 1 (C), 2 (D), 3 (E). Columnas 1 a 8 dilución suero, 9 y 10 control Ag, 11 y 12 control Ac. Conjugado anticonejo 1:10000.

# PRIMERA SELECCION (Biopanning) ELISA

106



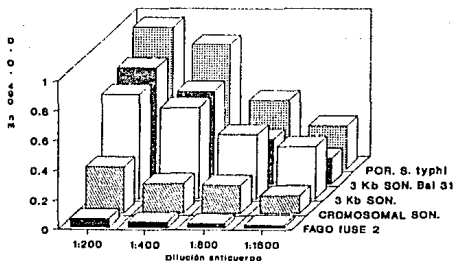
Ac anti porinas (conejo)  
Suero 1  
Antígeno FUSE 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1.01	0.91	0.88	0.79	0.41	0.80	0.32	0.25	0.02	0.00	0.00	0.03	A
0.04	0.04	0.04	0.04	0.02	0.03	0.01	0.08	0.00	0.00	0.01	0.03	B
0.13	0.16	0.13	0.13	0.10	0.12	0.09	0.09	0.07	0.10	0.06	0.06	C
0.17	0.16	0.14	0.13	0.11	0.11	0.10	0.08	0.07	0.08	0.06	0.06	D
0.23	0.24	0.22	0.23	0.16	0.17	0.14	0.12	0.06	0.06	0.06	0.07	E

**FIGURA 27. PRIMERA SELECCION (BIOPANNING). ENSAYO DE DETECCION DE FAGOS FUSE 2 RECOMBINANTES CON ANTICUERPOS ANTIPORINAS DE *S. typhi*.**  
 Ag.: Porinas *S. typhi* 250 ng/pozo (A), fago FUSE 2  $10^{10}$  TU/pozo (B), banco 1 (C), 2 (D), 3 (E). Columnas 1 a 8 dilución suero, 9 y 10 control Ag, 11 y 12 control Ac. Conjugado anticonejo 1:10000.

## SEGUNDA SELECCION (Biopanning) ELISA

107



Ac antiporinas (conejo)  
Suero 1  
Antígeno IUSE 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	A
1.01	0.91	0.88	0.79	0.41	0.50	0.32	0.25	0.02	0.00	0.00	0.03	B
0.06	0.06	0.04	0.04	0.02	0.03	0.01	0.03	0.00	0.00	0.01	0.03	C
0.32	0.30	0.14	0.24	0.18	0.20	0.13	0.11	0.01	0.01	0.06	0.02	D
0.71	0.70	0.61	0.42	0.42	0.45	0.37	0.33	0.02	0.00	0.01	0.00	E
0.77	0.78	0.64	0.37	0.29	0.28	0.17	0.15	0.00	0.00	0.00	0.04	

FIGURA 28. SEGUNDA SELECCION (BIOPANNING). ENSAYO DE DETECCION DE FAGOS IUSE 2 RECOMBINANTES CON ANTICUERPOS ANTIPORINAS DE *S. typhi*. Ag.: Porinas *S. typhi* 250 ng/pozo (A), fago IUSE 2  $10^{10}$  TU/pozo (B), banco 1 (C), 2 (D), 3 (E). Columnas 1 a 8 dilución suero, 9 y 10 control Ag, 11 y 12 control Ac. Conjugado anticonejo 1:10000.

TABLA III. CALCULO DEL TAMAÑO DE LOS BANCOS OBTENIDOS (46).

$$N = \frac{\ln(1-p)}{\ln(1-x/y)}$$

N = no. de fagos recombinantes

x = tamaño del inserto

y = tamaño del genoma

p = prob. de contener secuencia particular de DNA

En base a la fórmula, los valores sustituidos y obtenidos para cada uno de los bancos son:

a) BANCO 1 (DNA cromosomal total sonicado).

$$x = 170 \text{ pb} \quad y = 4.1 \times 10^6 \text{ pb (ref 92)} \quad N = 1.1 \times 10^5$$

b) BANCO 2 (Región 2.6 a 3.4 Kb sonicado).

$$x = 170 \text{ pb} \quad y = 2600 \text{ pb} \quad N = 68$$

$$y = 3400 \text{ pb} \quad N = 90$$

c) BANCO 3 (Región 2.6 a 3.4 Kb sonicado digestión Bal 31).

$$x = 100 \text{ pb} \quad y = 2600 \text{ pb} \quad N = 1.1 \times 10^2$$

$$y = 3400 \text{ pb} \quad N = 1.5 \times 10^2$$

Para todos los casos  $p = 0.99$ .

## VI. D I S C U S S I O N



Se ha descrito que los fagos filamentosos son capaces de infectar sólomente cepas que poseen el factor F por medio de su adsorción al pelo sexual sintetizado por las mismas (31, 110). En nuestro caso la cepa utilizada para obtener los fagos filamentosos de interés fue *E. coli* K91-Kan; mediante los experimentos realizados para determinar sus características de crecimiento en medios de cultivo selectivos y diferenciales, se encontró que en éstos últimos (Mackonkey, Verde brillante y EMB), no existió cambio en el aspecto normal de los medios de cultivo después de la respectiva incubación; ésto fue indicativo de que dicha cepa no era capaz de acidificar el medio de cultivo debido a que no es capaz de utilizar la lactosa existente en el mismo (lac<sup>-</sup>), con la consecuente no observación de cambios en el vire de los indicadores de los medios. Al observarse que dicha cepa es resistente a la acción inhibitoria de crecimiento de compuestos tales como sales biliarres y colorantes (eosina, azul de metileno y cristal violeta), se comprobó que pertenecía al grupo de las Gram<sup>-</sup>, lo cual fue comprobado con la tinción correspondiente (67). Así mismo, con la verificación de resistencia a la acción de Kan, se comprobó que a diferencia de la cepa *E. coli* K91 (125), ésta cepa presentaba una mutación importante en el gene responsable de la codificación de la enzima beta-galactosidasa y que dicha mutación confería la resistencia al antibiótico. Con estos datos pudimos comprobar que el genotipo de dicha cepa coincidía con el reportado anteriormente (101).

La presencia de placas opacas características de fagos que

producen retardamiento en la velocidad de crecimiento bacteriano después de la transformación de dicha cepa con DNA RF del fago M13mp19, indicaba que las bacterias circundantes ó vecinas a las transformadas con este DNA, fueron infectadas con partículas infecciosas completas del mismo por medio de su adsorción a proteínas de superficie bacteriana reconocidas por los fagos (factor sexual ó pelo sexual), produciendo una zona de crecimiento bacteriano disminuido (placas); con ello se comprobó que la cepa era susceptible de infección por cualquier otro fago filamentoso que necesitara de la presencia del pelo sexual para su infección (31, 110). Así mismo se comprobó que cepas bacterianas que no poseen el factor F como *E. coli* K802 (137), son resistentes a la infección con tales fagos, ya que no se observó la presencia de placas opacas sino de un cesped después del proceso de transformación.

La presencia de colonias resistentes a Tc después del ensayo de infectividad realizado, verificó la presencia en la solución proveniente de la precipitación con PEG, de una entidad capaz de transmitir a cepas F<sup>+</sup> la propiedad de resistencia al antibiótico, comparado con el control de células sin infectar que aun seguían siendo sensibles al mismo y que por lo tanto no se observaba crecimiento alguno en el medio selectivo. La aparición de gran cantidad de colonias resistentes a Tc fue sugerente de que la entidad que transmitía la resistencia al antibiótico, podía reproducirse e infectar bacterias vecinas, pero con la característica de producir colonias bacterianas y no placas (125,

143) como en el caso del fago M13mp19. Mediante la observación subsecuente de que el DNA extracromosomal extraído de las bacterias infectadas era capaz de transformar a la cepa *E. coli* K91-Kan confiriéndole resistencia a Tc con la verificación de la aparición de colonias en el medio selectivo, se comprobó que la entidad responsable de éste efecto era un fago, ya que tanto soluciones concentradas del mismo (provenientes de sobrenadantes de infecciones y amplificaciones) como el DNA extracromosomal obtenido de bacterias resistentes a Tc, conferían resistencia bacteriana al antibiótico. La posterior observación de precipitación con PEG de sobrenadantes provenientes de crecimiento en caldo de cultivo de bacterias Tc<sup>r</sup>, verificó la existencia de partículas infecciosas.

En cuanto al vector de clonación, la generación de una banda única de aprox. 9.2 Kb con las enzimas de restricción Eco RI, Bam HI y Bgl II indicaron que existe un sitio único de corte para éstas enzimas en dicho DNA y que además se encontraba en forma circular, ya que desaparecía la serie de bandas que se observaban en el DNA RF del propio vector. En dado caso que el DNA hubiese sido lineal (como en el caso del fago lambda), habrían aparecido mínimo 2 bandas en el corrimiento electroforético, caso que no se observó. El tamaño de la banda observada después de la digestión enzimática es coincidente con el tamaño reportado para los vectores *fUSE 1, 2 y 3*, además de la existencia de un sitio único de restricción para la enzima Bgl II existente sólo en el fago *fUSE 2* (101).

El ensayo de caracterización descartó también la posibilidad de existencia de material genético extracromosomal propio de la

bacteria que pudiese conferir resistencia a Tc, mediante la transferencia por otros fenómenos como conjugación (128) a partir de posibles bacterias contaminantes. De haber existido éstas entidades en la cepa bacteriana, éstas hubiesen sido extraídas junto con el DNA RF del fago y exhibido bandas de diferentes tamaños a la banda observada en el corrimiento electroforético después de la digestión enzimática correspondiente. Debido a los resultados observados podemos decir que la cepa de donde se obtuvo el DNA RF del fago (*E. coli* K91-Kan) originalmente no posee material genético extracromosomal que provea de resistencia a Tc; sin embargo, debido al tipo de tratamiento lítico (116) para la obtención del DNA RF del fago *FUSE 2*, no podemos asegurar que el factor sexual (F) no se encuentre en plásmido y que debido al tratamiento para recuperación de plásmidos pequeños, haya sido destruido (94.5 Kb de tamaño) (92). Esta última consideración podría ser comprobada con el uso de otras técnicas (116, 122) pero debido a la observación de que la cepa siguió conservando la propiedad de ser infectada por fagos filamentosos a pesar de mantenerse por periodos largos en medio de cultivo rico y en fases estacionarias (116), fue sugerente de que la cepa *E. coli* K91-Kan poseía el factor F en el DNA cromosomal (Hfr) (125).

La digestión enzimática subsecuente del DNA obtenido con enzimas que cortan en un sitio de reconocimiento de 4 pb (Taq I y Hae III), dió origen a una serie de bandas de tamaños variables que coincidieron (en el caso de Hae III) con casi todas las bandas esperadas en la predicción (figuras 12, 13). En el caso particular

de la digestión con la enzima Taq I, se verificó la existencia de bandas de un tamaño mayor a 2.6 Kb y de una serie de bandas de diversos tamaños simulando una especie de "escalera", distinguiéndose la existencia de una banda de 2 Kb y otra de 1.4 Kb aprox. coincidentes con los fragmentos esperados. La existencia de ésta serie de bandas indica que la digestión del DNA RF del fago con la enzima Taq I, no fue completa sino parcial, generando la serie de fragmentos de tamaños diversos que se observaron en el gel correspondiente (figura 12). Muy posiblemente este efecto se debió a una falta de actividad enzimática inherente en la preparación comercial de la enzima, o bien a la existencia de impurezas en la sol. del DNA digerido. Creemos que la existencia de bandas de tamaños no coincidentes entre la predicción y el corrimiento electroforético correspondiente, se debe a que la secuencia nucleotídica del vector construida en nuestro laboratorio no es exacta a la secuencia real existente en el fago *fUSE 2*. Así mismo, la secuenciación experimental de dicho vector podría ser de mayor valor para una identificación más exacta del mismo, pero debido a los resultados arrojados por la primera digestión enzimática (figura 11), fue concluyente de que los sitios de clonación únicos coincidían con los reportados por Zacher en el vector *fd-tet* (140), y por consiguiente con el vector *fUSE 2*.

Los ensayos de sonicación realizados en dos DNA's no relacionados y de tamaños muy diferentes, resultaron en la reducción en la misma magnitud del tamaño original hasta llegar aun límite de 170 pb; ésto fue indicativo de que el rompimiento del DNA

por éste método fue completamente al azar y de que la forma (lineal o circular) o el tamaño del DNA no son factores predisponentes para la generación de fragmentos de determinado tamaño. Por lo observado en el corrimiento electroforético (figura 14), con el uso de potencias mínimas obtuvimos una reducción gradual en el tamaño, a diferencia de potencias mayores en las que no se observó dicho efecto. Esto fue sugerente de que a mayor potencia de sonicación se generaba una mayor heterogeneidad en el tamaño de los fragmentos obtenidos, así como un mayor daño en el DNA. En cuanto al efecto de resistencia de los fragmentos pequeños (170 pb) al rompimiento por sonicación subsecuente, se ha reportado que la sonicación inicial ocurre rápidamente hasta llegar a un límite en donde los fragmentos pequeños son resistentes a la sonicación, variando éste en relación directa a la potencia o amplitud utilizada en la misma (29). En cuanto a este respecto consideramos que el uso de potencias mayores para una reducción mayor de los fragmentos sería infructuosa y generaría heterogeneidad importante en los fragmentos resultantes.

Después de la verificación de la reducción del tamaño de los fragmentos obtenidos por sonicación por medio de la nucleasa Bal 31, se observó una desaparición completa de los fragmentos después de 3 minutos de digestión. La decisión de digerir los fragmentos bajo las condiciones descritas radica en ésta observación, ya que la detección del tamaño de los fragmentos generados era materialmente imposible. Muy posiblemente la no detección se deba a la rápida generación de fragmentos mucho mas pequeños con extremos o tallos de cadena sencilla de variable número de

nucleótidos de largo en un 80-90%, a diferencia de la generación en solo un 10% de fragmentos mas pequeños pero de extremos rasurados, sabiendo que la enzima degrada a una velocidad aproximada de 10 pb/min. de cada uno de los extremos de la doble cadena (116). Tomando en cuenta que un alto porcentaje de los fragmentos generados poseen extremos de una sola cadena, posiblemente eso repercutió en una menor incorporación de bromuro de etidio con la subsecuente pérdida de fluorescencia en el momento del revelado. En base a estas observaciones, es posible generar por medio de sonicación y digestión posterior con la endonucleasa Bal 31, la reducción al azar de menos de 100 pb de cualquier DNA, a comparación de los tamaños (100-300) que se han reportado anteriormente (48, 127); aun asi, bajo nuestras condiciones de trabajo fue imposible detectar el tamaño de los fragmentos generados mas allá de los 3 minutos de incubación con la enzima. Creemos que el uso de nucleasas tales como la DNasa I (5) o la propia Bal 31, reducirán aun más el tamaño de los fragmentos deseados generando una gran diversidad de éstos, siempre y cuando se cuenten con métodos de detección mas sensibles para la determinación del tamaño de los mismos.

La reparación de los extremos de los fragmentos generados por los procesos de reducción, se llevó a cabo para crear extremos rasurados que posteriormente serían ligados a oligonucleótidos sintéticos. Se ha mencionado que los procesos de reparación de los fragmentos generados provocan un aislamiento mas eficiente de DNA's del tamaño requerido por medio de corrimientos electroforéticos a

comparación de aislamientos de gran número de clonas (116), aunado a que éste proceso restaura la integridad de los fragmentos para su posterior clonación a los vectores de interés haciéndolos selectivos para su ligación a los linkers respectivos por medio del uso de la polinucleótido cinasa del fago  $T_4$ . Debido a la gran diversidad de fragmentos que fueron obtenidos, no era posible verificar el tamaño real de éstos a través de una electroforesis después de la reparación, ya que esto implicaba el uso de grandes cantidades de muestra para poder visualizarlos. En un intento por obtener la máxima diversidad posible de fragmentos que posteriormente serían clonados en el fago *fUSE 2*, aumentamos la probabilidad de éxito en la reparación por medio de la elaboración de 3 mezclas de reacción (que posteriormente fueron mezcladas) y decidimos no verificar que el proceso se había llevado a cabo.

Como podemos observar en la figura 7, la fase de lectura del gene III está alterada en los vectores *fUSE 1*, *fUSE 3* y *fUSE 5*, mas no así en el *fUSE 2*, lo cual explica que su capacidad infecciosa sea exáctamente la misma al fago f1 (127) y que los insertos que sean introducidos en el sitio de restricción Bgl II tengan que ser los adecuados para que la fase de lectura del gene III se conserve, permitiendo la completa transcripción del mismo y la consecuente producción de fagos infecciosos. Debido a que la digestión del DNA del fago *fUSE 2* en el sitio de clonación genera extremos cohesivos, era necesario realizar ligaciones de los fragmentos reparados con oligonucleótidos sintéticos que codificaran para sitios únicos de restricción (linkers), con el fin de que la estructura general de



los insertos fuera generada como lo muestra la figura 29. En éste caso, al elegirse linkers de 8, 10 y 12 miembros para la enzima de restricción Bam HI y ligados al azar a los fragmentos reparados, aseguramos la generación de fragmentos que restablecieran la fase de lectura adecuada en el momento de ser clonados en el gene III del vector y además, de que los extremos cohesivos, compatibles entre sí (22), provocaran la generación de un sitio nuevo de restricción que delimitara al inserto (Sau 3A) con la subsecuente desaparición de los dos sitios originales (Bam HI y Bgl II) en la clona generada. La adición de un exceso de linkers no fosforilados a los fragmentos reparados y fosforilados, permitió la adición de sólo un linker por cada extremo del fragmento (116), sin permitir la unión entre moléculas del mismo. Esta estrategia permitirá en trabajos subsecuentes, la caracterización del DNA de los fagos recombinantes, siendo estos resistentes a la acción de la digestión enzimática con la enzima Bgl II.

En forma análoga al proceso de reparación de los fragmentos, el proceso de ligación de linkers, la subsecuente digestión de éstos con la enzima de restricción correspondiente y su posterior ligación al vector de clonación digerido, no fueron verificadas por las razones anteriormente expuestas, además de considerar que después de cada proceso de ligación tenía que realizarse una precipitación del DNA generado con etanol y sal, proceso en el cual se pierden cantidades determinadas del mismo (111).

Debido a que los procesos de transformación bacteriana de la cepa *E. coli* K91-Kan con el fago M13mp19 daba rendimientos muy

5' GAT | CNN | ..... | NNN                    3'  
 3'            NN | ..... | NNN | CTA | G       5'

**FIGURA 29. ESTRUCTURA GENERAL DE LOS INSERTOS EN EL FAGO *fuse 2*.** La estructura mostrada corresponde a los insertos que son capaces de conservar la fase de lectura adecuada en el gene III, produciendo fagos infecciosos.

bajos, se decidió utilizar métodos mas eficientes como la electroporación (36) para asegurarnos que un alto porcentaje del DNA obtenido del proceso de clonación fuera introducido a la bacteria; además de que no conocíamos las cantidades de DNA existentes en la solución y mucho menos el porcentaje que se había ligado con éxito a los fragmentos de interés. Después de la obtención de colonias resistentes a Tc, se observó que la cantidad de transformantes obtenidos con DNA del fago *fUSE 2* cuantificado, elevó en más de 1000 veces su número en comparación con el método de PEG (95), con lo cual se verificó que un alto porcentaje del DNA adicionado en el ensayo, fue introducido a la bacteria. Con la obtención de transformantes Tc<sup>r</sup> con las muestras de ligación del vector con los diversos fragmentos, se confirmó que existía DNA en cada una de las soluciones y que éste confería resistencia bacteriana a Tc, lo que fue fuertemente sugerente de que cada una de las colonias existentes en el medio selectivo estaba infectada con partículas infecciosas del fago *fUSE 2*, pero siendo no confirmatorio de que cada una de las colonias representara una clona recombinante.

Los sueros hiperinmunes obtenidos de los animales de experimentación después de su inoculación con porinas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d, exhibieron altos títulos de anticuerpos en contra de éstas, ya que aun en diluciones muy altas de suero, éste aun seguía reconociendo a porinas; esto demostró que el esquema de inmunización es adecuado para obtener títulos altos de anticuerpos. Según las lecturas observadas en el reconocimiento de los

anticuerpos hacia membranas totales de *E. coli* JM103, existía un reconocimiento casi idéntico por parte de los sueros hiperinmunes aun en diluciones altas de los mismos. Estos resultados eran de esperarse, ya que se ha encontrado que existe gran similitud entre la secuencia peptídica entre las porinas OmpC de *S. typhi* 9, 12 Vi:d y de *E. coli* en un 79% (107), y a sabiendas que estos genes muy probablemente provienen de un antecesor común (74) es predecible que otras porinas sean similares entre sí. A pesar de que las adsorciones realizadas en los sueros disminuyeron en gran medida la señal hacia membranas de *E. coli* con la perfecta discriminación entre los dos antígenos, ésta aun seguía persistiendo. En este sentido, se han encontrado regiones áltamente conservadas entre las porinas OmpC de *S. typhi* y *E. coli* (107) y muy posiblemente entre porinas todavía no aisladas de *S. typhi* y otras ya determinadas de *E. coli*, ocasionando que el reconocimiento antigénico de éstas por anticuerpos dirigidos hacia porinas de *S. typhi*, sea similar para las porinas de los dos generos bacterianos sólomente en regiones conservadas entre las dos proteínas. Con la disminución de la señal hacia *E. coli* y la conservación de la misma hacia porinas de *S. typhi* después de la adsorción correspondiente, fue muy sugerente de que existen anticuerpos dirigidos hacia regiones específicas y únicas en las porinas de *S. typhi* que no se encuentran en las de *E. coli*. Perfiles de hidrofobicidad útiles para proteínas de membrana, se han realizado para las porinas OmpC de las dos especies, encontrándose 7 regiones variables entre las mismas (107). En suma, creemos que la señal dirigida hacia

proteínas de membrana de *E. coli* por anticuerpos antiporinas de *S. typhi* de conejo, tenderá a desaparecer conforme se vayan realizando más adsorciones de los sueros en cuestión.

La señal de reconocimiento antigénico hacia proteínas de la cápside del fago *fUSE 2* por parte de los sueros hiperinmunes antiporinas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d no fue importante, ni siquiera a bajas diluciones de los mismos y aun antes de llevarse a cabo la adsorción correspondiente del suero; ésto indicó que no existen regiones proteicas similares entre las proteínas capsídicas del fago y las porinas de *S. typhi*. Así mismo, fue indicativo de que el suero policlonal de conejo antiporinas de *S. typhi* adsorbido, era capaz de discriminar perfectamente entre proteínas capsídicas del fago, proteínas de membrana de *E. coli* y su antígeno correspondiente, teniendo mucho mayor especificidad hacia éste último.

Al realizarse los ensayos de detección de ELISA para porinas de *S. typhi* y membranas de *E. coli* con los anticuerpos purificados, se verificó una disminución importante de la señal anteriormente observada hacia proteínas de *E. coli*, incluso a diluciones de 1:800 de gammaglobulinas la señal llegaba a ser insignificante, manteniéndose casi constante la señal para porinas de *S. typhi* con un aumento de la dilución de los anticuerpos de ensayo. Con estos resultados, fue evidente de que los componentes totales del suero provocaban un aumento de la señal real de los anticuerpos adsorbidos hacia proteínas de *E. coli* cuando los ensayos se realizaban con el suero hiperinmune. Al purificar y concentrar los

anticuerpos existentes en tal suero, dichos componentes al ser separados no podían enmascarar la señal en la prueba de detección, causando la subsecuente disminución de ésta y la perfecta discriminación de los anticuerpos entre proteínas de membrana de *E. coli* y porinas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d.

Por medio de la utilización de conjugados avidina-peroxidasa, verificamos que el proceso de biotinación de los anticuerpos purificados se había llevado a cabo, a pesar de que la concentración utilizada del conjugado fue muy alta para poder detectar la señal (1:10); ésto fue indicativo de que el proceso de obtención del conjugado no es muy bueno, ya que al necesitarse altas cantidades del mismo se verifica que el proceso no permite un alto porcentaje de unión entre las dos moléculas, quedando la gran mayoría de cada una de ellas libre en solución. A pesar de que el rendimiento en la obtención del conjugado fue muy bajo, la dilución utilizada del mismo para la detección fue suficiente para discriminar perfectamente la existencia de biotina unida a los anticuerpos purificados (figura 22). Se ha reportado en protocolos anteriores que con el uso de Biotina-SS-NHS en anticuerpos IgG, resulta en la conjugación de 6 moléculas de biotina por cada molécula de anticuerpo, representando un 45% de incorporación del agente biotinante (127); en éste caso tendríamos que utilizar conjugados avidina-peroxidasa comerciales con títulos determinados para poder establecer el porcentaje de incorporación de biotina a los anticuerpos purificados, pero debido a que la señal discriminatoria del conjugado fue suficiente para comprobar la

biotinación de dichos anticuerpos, ésto no se realizó.

Mediante el empleo del "biopanning", fuimos capaces de separar de toda una población de fagos resultantes de la electroporación, fagos recombinantes a epitopos de porinas de *S. typhi* por medio de su captura través de anticuerpos de conejo antiporinas de *S. typhi* 9, 12 *Vi:d*. Por medio de la observación de que partículas infecciosas de fago *FUSE 2* podían ser amplificadas a partir de los eluidos derivados del biopanning, nos dimos cuenta que a pesar de que los lavados fueron exhaustivos, los anticuerpos podían retener y reconocer a las partículas infecciosas por si mismos, lo que fue sugerente de que los fagos se unían con una gran afinidad al anticuerpo (25) y que por lo tanto no era fácil separarlos del soporte por métodos mecánicos. Al mismo tiempo esto indicó que los fagos recuperados de la electroporación poseían proteínas no propias que les permitían ser reconocidos por anticuerpos dirigidos contra porinas de *S. typhi*, y partiendo de la observación de que estos anticuerpos no reconocían proteínas capsídicas del fago *FUSE 2* ni tampoco proteínas de membrana de *E. coli*, fue indicativo de que existían poblaciones de fagos que expresaban fragmentos de porinas de *S. typhi* 9, 12 *Vi:d* en su cápside. Estas observaciones conyevan a la conclusión de que los insertos clonados en estos fagos no cambiaron la fase de lectura del gene III produciendo fagos infecciosos y que además, fueron reconocidos por los anticuerpos correspondientes (119); se sabe que no necesariamente los insertos que restauran o conservan la fase de lectura del gene III codifican para proteínas con significado inmunológico, a pesar

de provenir de la fuente de interés (101). Así mismo cabe la posibilidad de que algunas clonas generadas en los procesos realizados, contuvieran insertos que afectaran la función de la proteína III, generando fagos afectados en su capacidad de ensamblaje y por lo tanto no viables; a éste respecto se sabe que insertos que contienen dominios de anclaje a la membrana u otros segmentos hidrofóbicos (Leu-Ala-Lau-Val) pueden detener la transferencia de la proteína III a la membrana de la bacteria infectada, provocando que éstas proteínas no sean toleradas por la bacteria con su consecuente transformación a proteínas secretorias (27).

Con estas observaciones nos dimos cuenta que tanto los procesos de reparación de los fragmentos obtenidos por sonicación, como la ligación a linkers y la respectiva clonación al fago *FUSE 2* se habían llevado a cabo con éxito, y que la transformación bacteriana de la cepa receptora (*E. coli MC1061*) por electroporación, es el método más indicado para obtener el máximo posible de clonas recombinantes.

La observación de la amplificación del fago *FUSE 2* no recombinante después de realizar el primer biopanning con una solución de bloqueo que contenía 29 mg/ml de albúmina (101), fue indicativo de que existía unión inespecífica de éstas partículas al soporte; posteriormente al decidir bajar la concentración de proteína en la sol. de bloqueo y realizar otro ensayo de selección (biopanning), observamos que el efecto desaparecía por completo. Creemos que en nuestro caso, altas concentraciones de proteína



favorecen la unión inespecífica de estos fagos al soporte con la subsecuente amplificación de los mismos y la dilución de la población recombinante de interés. A medida que se realizaban subsecuentes procesos de selección con los eluidos que se generaban en el proceso anterior, se observaba un aumento considerable en la señal de detección inmunológica; esto fue indicativo de que los fagos seleccionados sufrían un enriquecimiento considerable sobre los fagos no recombinantes en cada ocasión que se realizaba selección con ellos. Estos resultados concuerdan con el hecho de que la población de fagos obtenida del biopanning al ser sujetos a posteriores selecciones por la misma técnica, sufren un enriquecimiento posterior de aprox. 1000 veces más, dependiendo del no. de ensayo realizado, en las poblaciones que contienen los epitopos reconocidos por los respectivos anticuerpos utilizados en la selección (101, 127), además de reducir la posible pérdida de clonas no comunes (101).

Los resultados arrojados por el Dot-ELISA en bacterias transformadas con fagos provenientes de la electroporación y del primer biopanning, indicaron la presencia de clonas recombinantes del fago filamentososo *fUSE 2* dentro de las colonias bacterianas. Esta prueba fue capaz de detectar la presencia de proteínas recombinantes de los fagos en la parte externa de las colonias bacterianas, lo que fue sugerente que las proteínas recombinantes estaban enclavadas en la superficie bacteriana (20) y que muy posiblemente se tratara de la proteína pIII. Para el caso de la detección en la cepa *E. coli* K91-Kan infectada con los fagos del

primer biopanning, se observó la aparición de señal en el control infectado con fagos no recombinantes. A pesar de esto, la señal fue menor a las observadas con las muestras de los bancos, pero no fue lo suficientemente discriminatoria para diferenciar entre las colonias infectadas con fagos recombinantes y no recombinantes. Muy posiblemente este fenomeno se deba a que los anticuerpos utilizados necesitan adsorberse con proteínas de esta cepa bacteriana para eliminar la señal observada; éste caso no fue detectado para la cepa *E. coli* MC1061 infectada con los fagos recombinantes por medio de electroporación.

La detección de señales positivas hacia porinas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d en el ensayo de ELISA, son una prueba confirmatoria de que existen fragmentos de gran diversidad de porinas de *S. typhi* en los fagos filamentosos aislados, puesto que los anticuerpos de conejo utilizados son policlonales y son capaces de reconocer gran cantidad de epitopos diferentes. Sabiendo que los anticuerpos utilizados para la detección de las clonas recombinantes fueron obtenidos después de inmunizaciones subsecuentes del antígeno en animales de experimentación, la gran cantidad de anticuerpos encontrada y la gran afinidad por el antígeno, corresponde a una estimulación importante de células del sistema inmune involucradas en la síntesis de los mismos. Se sabe que éstas células son linfocitos B y que en el momento en que un antígeno es reconocido por los marcadores de superficie de los mismos, después de que estos han sido estimulados previamente produciendo anticuerpos de baja afinidad y células de memoria en una respuesta primaria, se

producen anticuerpos de alta afinidad dirigidos contra el antígeno en cuestión (respuesta secundaria) (102). En base a estas consideraciones y a la observación de que los fagos recombinantes obtenidos son reconocidos por anticuerpos de alta afinidad hacia porinas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d, damos por hecho de que existen epitopos de la porina OmpC de ésta bacteria que son reconocidos por linfocitos B. Debido a que ciertos epitopos de determinados antígenos son procesados por las células B para posteriormente ser presentados en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad a células T liberando factores solubles útiles para la estimulación de otras células, creemos que en el banco obtenido existen epitopos que sufren ésta transformación para posteriormente ser presentados a células T (102); sin embargo, la sola verificación de que los epitopos encontrados en los fagos son reconocidos por anticuerpos específicos contra porinas, no es sugerente de que esto sea completamente cierto. Así mismo no podemos descartar la posibilidad de que en el banco existan epitopos reconocidos por diversas subpoblaciones de células T, hasta que no se logre el aislamiento de los mismos por la implementación de otras técnicas.

En base al tamaño de los fragmentos insertados en el fago *fUSE* 2, podemos decir que el tamaño de los péptidos expresados en la cápside del virión es de aprox. 30 a 50 aminoácidos y que el no. de fagos recombinantes en los bancos obtenidos existen en cantidades considerables (46). Así mismo creemos que podría existir más de un solo epitopo en cada uno de los fragmentos peptídicos expresados,

presentando también gran diversidad en la conformación espacial de los mismos y que muy posiblemente existan regiones inmunodominantes de la proteína que son mas frecuentemente reconocidas por los anticuerpos (6).

Asumimos el hecho de que posiblemente no solo existan fragmentos proteicos exclusivamente de la proteína OmpC, sino de otras proteínas que fueron reconocidas por éstos anticuerpos, ya que en el caso de los 3 bancos obtenidos con fragmentos diferentes, existen regiones aun no secuenciadas y desconocidas en cuanto a las proteínas que codifican, a la función que realizan y a su localización tanto en la bacteria como en el DNA cromosomal. Lo que es concluyente en éste respecto es que los fagos obtenidos del banco derivado de la región de 3 Kb, fueron reconocidos por anticuerpos específicos dirigidos contra porinas de *S. typhi*, y que un alto porcentaje de ellos posee epitopos de la proteína OmpC, puesto que el gene que codifica para ésta se encuentra en la región de la cual se generaron los fragmentos que fueron clonados en el fago *FUSE 2*. Hasta que no se localicen los genes codificantes para el resto de las porinas que pudiese contener *S. typhi* 9, 12 Vi:d en el propio DNA cromosomal bacteriano, no podemos afirmar que los fagos aislados por los anticuerpos anti-porinas de conejo posean epitopos de otras proteínas porinas diferentes a OmpC.

En base a estas consideraciones creemos que los bancos de epitopos de *S. typhi* 9, 12 Vi:d obtenidos serán importantes para aislar péptidos y caracterizar epitopos de gran cantidad de proteínas con el uso de gran variedad de anticuerpos,

principalmente de origen humano (mapeo), realizar ensayos inmunes para investigar su capacidad inmunogénica en animales de experimentación, su uso como agentes específicos de diagnóstico contra ésta enfermedad y la muy alta posibilidad de utilizar el DNA de estos péptidos como sondas para aislar genes de gran importancia a nivel inmunológico (vacunas).

En los últimos años se ha remarcado la importancia de la respuesta celular en contra de parásitos intracelulares como *S. typhi* (35), y la posibilidad de aislar y caracterizar epitopos reconocidos por células inmunes efectoras y moduladoras (células T) para desencadenar una respuesta mas específica y adecuada hacia éstas especies patógenas (89). Se ha visto en estudios con ratones, que el sistema de los fagos filamentosos de fusión puede ser utilizado para el mapeo y aislamiento de esta clase de epitopos, ya que se ha encontrado que la proteína del gene III del fago f1 no contiene epitopo alguno que pueda ser reconocido por células T (28).

El uso de los fagos filamentosos de fusión como vectores de expresión adecuados para la identificación, caracterización y aislamiento de proteínas de interés inmunológico está empezando a tener un gran auge, pudiendo llegar a utilizarse en un futuro como vehículos importantes para vacunas, sobre todo para la prevención de enfermedades intestinales de difícil erradicación.

## VII. C O N C L U S I O N E S

a) Se obtuvieron bancos de epitopos de 68 a  $1.1 \times 10^5$  partículas infecciosas diferentes de la proteína de membrana externa OmpC de *S. typhi* 9, 12 Vi:d en el fago filamentosos de fusión *fUSE 2*, conteniendo determinantes antigénicos reconocidos por linfocitos B de conejo, expresados en la cápside del virión y reconocidos por anticuerpos policlonales del mismo animal dirigidos específicamente hacia porinas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d en ensayos de detección inmunológica (Dot-ELISA y ELISA).

b) Es posible obtener gran cantidad de fragmentos pequeños y de gran diversidad de cualquier DNA menores a 100 pb de tamaño por medio de ensayos de sonicación y de digestión posterior con enzimas nucleasas sin importar la forma y el tamaño del DNA en cuestión.

c) La señal de reconocimiento antigénico hacia proteínas de la cápside del fago *fUSE 2* por parte de los sueros hiperinmunes anti-porinas de *S. typhi* 9, 12 Vi:d, indica que no existen regiones proteicas similares entre las proteínas capsídicas del fago y las porinas de *S. typhi*.

d) La técnica de selección de fagos recombinantes (biopanning), es capaz de separar y enriquecer de toda una población, las clonas recombinantes a epitopos de porinas de *S. typhi* por medio de uniones de alta afinidad a los anticuerpos correspondientes.

e) El sistema de expresión de los fagos filamentosos de fusión,

permite la inserción de fragmentos pequeños y de gran diversidad de cualquier DNA menores a 100 pb de tamaño en el gene III sin importar una separación y caracterización previa de los mismos, permitiendo la expresión de estructuras peptídicas de interés inmunológico.



## VIII. R E F E R E N C I A S

1. Adamus, G., M. Mulczka, E. Romanowska. 1980. "Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane protein of *Shigella sp*". *Infect. and Immun.* **30**:321-324.
2. Agüero, J., L. Aron, A.G. DeLuca, K. Timmis, F. Cabello. 1984. "A plasmid-encoded outer membrane protein TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis". *Infect. and Immun.* **46**:740-746.
3. Agüero, J., G. Mora, M., Mroczenski-Willey, M. Fernandez-Beros, L. Aron, F. Cabello. 1987. "Cloning, expression and characterization of the 36 KDa *Salmonella typhi* porin gene in *Escherichia coli*". *Microbial Pathogenesis* **3**:399-407.
4. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. Watson. 1989. Molecular biology of the cell. 2a. ed. Garland Publishing, Inc. New York and London.
5. Anderson, S. 1981. "DNA sequencing using cloned DNaseI generated fragments". *Nucl. Acids Res.* **9**:3015-3027.
6. Bach, J. 1981. Inmunología. Ed. Masson S. A. España.
7. Balbas, P., F. Bolivar. 1989. Ingeniería genética y biotecnología. Sria. Gen. O.E.A. Washington, D.C.
8. Bauer, K., R. Benz, J. Brass, W. Boos. 1985. "*Salmonella typhimurium* contains an anion-selective outer membrane porin induced by phosphate starvation". *J. Bacteriol.* **161**:813-816.
9. Bayer, M. 1968. "Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*". *J. Gen. Microbiol.* **53**:395-404.
10. Beck, E., R. Sommer, E. Auerswald, C. Kurz, B. Zink, G.

- Osterburg, H. Schaller, K. Sugimoto, H. Sugisaki, T. Okamoto, M. Takanami. 1978. "Nucleotide sequence of bacteriophage fd DNA". Nucl. Acids. Res. 5:4495-4503.
11. Beck, E., B. Zink. 1981. "Nucleotide sequence and genome organisation of filamentous bacteriophages f1 and fd". Gene. 16:35-58.
  12. Benjamin, D. 1984. Annu. Rev. Immunol. 2:67.
  13. Bessler, W., U. Henning. 1979. "Protein I and protein II from the outer membrane protein of *E. coli* are mouse beta lymphocyte mitogens". Z. Immunitaetsforsch 155:387-398.
  14. Boeke, J., P. Model, N. Zinder. 1982. "A prokariotic membrane anchor sequence: carboxyl terminus of bacteriophage f1 gene III protein retains it in the membrane". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:5200-5204.
  15. Boeke, J., P. Model, N. Zinder. 1982. "Effects of bacteriophage f1 gene III protein on the host cell membrane". Mol. Gen. Genet. 186:185-192.
  16. Brinton, C. 1965. "The structure, function, syntesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria". Trans. NY Acad. Sci. 27:1003-1054.
  17. Buchanan, T, R. Arko. 1977. "Immunity to gonococcal infection induced by vaccination with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in guinea pigs". J. Infect. Dis. 135:879-887.
  18. Buchanan, T., W. Pearce, G. Schoolnick, R. Arko. 1977.

- "Protection against infection with *N. gonorrhoeae* by immunization with outer membrane protein complex and purified pili". *J. Infect. Dis.* 136 (supl):132-137.
19. Calderon, I. S. Lobos, G. Mora. 1984. "The hemolytic effect of *Salmonella typhi* Ty2 porins". *Eur. J. Biochem.* 141:579-583.
  20. Calendar, R. 1988. The bacteriophages. Vol. 2. Plenum Press. New York.
  21. Catálogo Molecular Sigma Biology: A new dimension 1989. 1989. Sigma.
  22. Catálogo New England Biolabs. 1990-1991.
  23. Conant, N., H. Willet, D. Smith. 1971. Microbiología de Zinsser. 4a. ed. Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana. México.
  24. Crissman, J., G. P. Smith. 1984. "Gene-III protein of filamentous phages: evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis". *Virology.* 132:445-455.
  25. Cwirla, S., E. Peters, R. Barrett, W. Dower. 1990. "Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:6378-6382.
  26. Davis, B., R. Dulbeco, H. Eisen, H. Ginsberg, B. Wood. 1978. Tratado de microbiología. 2a. ed. Salvat Editores. España.
  27. Davis, N., P. Model. 1985. "An artificial anchor domain: hydrophobicity suffices to stop transfer". *Cell.* 41:607-614.
  28. de la Cruz, V., A. Lal, T. McCutchan. 1988. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage". *J. Biol. Chem.* 263 (9):4318-4322.

29. Deininger, P. 1983. "Random subcloning of sonicated DNA: application to shotgun DNA sequence analysis". *Anal. Biochem.* 129:216-223.
30. Denhardt, D. 1975. "The single stranded DNA phages". *Crit. Rev. Microbiol.* 4:161-223.
31. Denhardt, D., D. Dressler, D. Ray. eds. 1978. The single-stranded DNA phages. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.
32. Devlin, J., L. Panganiban, P. Devlin. 1990. "Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules". *Science.* 249:404-406.
33. Dillon, J., A. Nasim, E. Nestmann. 1985. Recombinant DNA methodology. John Wiley and Sons. USA.
34. Dotto, G., N. Zinder. 1983. "The morfogenetic signal of bacteriophage f1". *Virology* 130:252.
35. Dougan, G., C. Hormaeche, D. Maskell. 1986. "Live oral *Salmonella* vaccines: potential use as carriers of heterologous antigens to the immune system". *Parasite Immunol.* 9:151-160.
36. Dower, W., J. Miller, C. Ragsdale. 1988. "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation". *Nucl. Acids Res.* 16 (13):6127-6145.
37. Enea, V., K. Horiuchi, B. Turgeon, N. Zinder. 1977. "Physical map of defective interfering particles of bacteriophage f1". *J. Mol. Biol.* 111:395-414.
38. Enea, V., N. Zinder. 1975. "A deletion mutant of bacteriophage f1 containing no intact cistrons". *Virology.* 68:105-114.

39. Favela, F. 1987. "Aislamiento y caracterización de proteínas de membrana externa de diferentes cepas de *S. typhi*". Tesis licenciatura. F.E.S. Cuautitlán, UNAM.
40. Freudl, R., S. Cole. 1983. "Cloning and molecular characterization of the ompA gene from *Salmonella typhimurium*". Eur. J. Biochem. 134:497- 502.
41. Fuerst, R. 1981. Microbiología de Frobisher y Fuerst. 14a. ed. Nueva Editorial Interamericana. México.
42. Germanier, R. 1977. "Situación actual de la inmunización contra la fiebre tifoidea". Bol. of Sanit. Panam. 82:300-311.
43. Germanier, R., E. Furer. 1975. "Isolation and characterization of *S. typhi gal E mutant Ty21a*: a candidate strain a live typhoid vaccine". J. Infect. Dis. 131:553-558.
44. Geysen, H., S. Rodda, T. Mason. En Porter, R., J. Wheelan. Eds. 1986. Synthetic peptides as antigens: Ciba Foundation Symposium 119. Wiley, New York.
45. Gilleland, H., M. Parker, J. Matthews. 1984. "Use of purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomona aeruginosa* as a protective vaccine in mice". Infect. and Immun. 44:49-54.
46. Glover, D. M. 1987. DNA cloning. A practical approach. Vol. I. IRL Press, Oxford, Washington D. C.
47. Goldsmith, M., W. Konigsberg. 1977. "Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties and location in the virus". Biochemistry. 16:2686-2694.
48. Goodgal, S., M. Mitchell. 1990. "Sequence and uptake

- specificity of cloned sonicated fragments of *Haemophilus influenzae* DNA". *J. Bacteriol.* **172** (10):5924-5928.
49. Grant, R., R. Webster. 1984. "Minor protein content of the gene V protein/phage single-stranded DNA complex of the filamentous bacteriophage f1". *Virology.* **133**:315-328.
50. Gray, C., R. Brown, D. Marvin. 1981. "Adsorption complex of filamentous fd virus". *J. Mol. Biol.* **146**:621-627.
51. Griffith, J., A. Kornberg. 1974. "Mini M13 bacteriophage: circular fragments of M13 DNA are replicated and packaged during normal infections". *Virology* **59**:139-152.
52. Gronenborn, B., J. Messing. 1978. "Methylation of single-stranded DNA in vitro introduces new restriction endonuclease cleavage sites". *Nature* **272**:375.
53. Guling, P., G. McCracken, C. Frisch, K. Johnston, E. Hansen. 1982. "Antibody response of infants to cell surface exposed outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae type b* after systemic haemophilus disease". *Infect. and Immun.* **37**:82-88.
54. Henry, T., D. Pratt. 1969. "The proteins of bacteriophage M13". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **62**:800-807.
55. Herrmann, R., K. Neugebauer, H. Schaller, H. Zentgraf. "Integration of DNA fragments coding for antibiotic resistance into the genome of phage fd in vivo and in vitro". In Denhardt, D. 1978. The single-stranded DNA phages. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, New York.
56. Herrmann, R., K. Neugebauer, H. Zentgraf, H. Schaller. 1978. "Transposition of a DNA sequence determining kamamycin

- resistance into the single-stranded genome of bacteriophage fd". *Mol. Gen. Genet.* 159:171.
57. Hewitt, J. 1975. "Miniphage: class of satellite to M13". *J. Gen. Virol.* 26:87-94.
58. Hill, D., G. Petersen. 1982. "Nucleotide sequence of bacteriophage f1 DNA". *J. Virol.* 44 (1):32-46.
59. Hoffman, S., R. Wistar, W. Ballou, M. Hollingdale, R. Wirtz, I. Schneider, H. Marwoto, W. Hockmeyer. 1986. "Immunity to malaria and naturally acquired antibodies to the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*". *New Engl. J. Med.* 315:601-606.
60. Horiuchi, K. 1983. "Co-evolution of a filamentous bacteriophage and its defective interfering particles". *J. Mol. Biol.* 169:389-407.
61. Hornick, R., S. Greisman, T. Woodwaed, H. Dupont, A. Dawkins, M. Snyder. 1970. "Typhoid fever: pathogenesis and immunological control". *N. Engl. J. Med.* 282:686-96.
62. Inokuchi, K., N. Mutoh, S. Matsuyama, S. Mizushima. 1982. "Primary structure of the ompF gene that codes for a major outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12". *Nucl. Acids Res.* 10:6957-6968.
63. Inouye, M. 1979. Bacterial outer membranes biogenesis and functions. John Wiley and Sons. New York.
64. Isibasi, A., E. Calva, V. Ortiz, M. Fernández, A. Hernández, J. Kumate. 1985. "Vacunas contra la fiebre tifoidea a partir de antígenos de membrana externa". Simposio avances en el uso



- de vacunas 1885-1985. p. 109-115.
65. Jayarama Bhat, G., M. Lodes, P. Myler, K. Stuart. 1990. "A simple method for cloning blunt ended DNA fragments". Nucl. Acids Res. 19 (2):398.
66. Jouin, H., A. Staub, J. Alouf. 1984. "Isolation of an (O, H, Vi)-free immunoprotective antigen fraction with mannose receptor-like activity from *Salmonella typhi*". J. Infect. Dis. 143:106-113.
67. Koneman, E., S. Allen, V. Dowell, H. Sommers. 1985. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
68. Konings, R. 1973. "Synthesis of phage M13-specific proteins in a DNA-dependent cell-free system". FEBS Lett. 35:155-160.
69. Kumate, J. 1970. Inmunidad, inmunización y vacunas. 2a. ed. Ediciones Médicas del Hospital Infantil de México. México.
70. Kunh, I., F. Stephenson, H. Boyer, P. Greene. 1986. "Positive-selection vectors utilizing lethality of the Eco RI endonuclease". Gene 44:253.
71. Kussi, N, M. Nurminen, H. Saxen., M. Valtonen, P. Makela. 1979. "Immunization with major outer membrane proteins in experimental salmonellosis of mice". Infect. and Immun. 25:857-862.
72. Labarca, P., S. Lobos, I. Calderon, G. Mora. 1986. "Native and chemically modified porin channels from *Salmonella typhi* Ty2 in planar lipid bilayers". FEBS letters. 197:211-216.
73. Lee, D., C. Schnaitman. 1980. "Comparision of outer membrane porin proteins produced by *Escherichia coli* and *Salmonella*

- typhimurium*". J. Bacteriol. 142:1019-1022.
74. Lee, D., C. Schanaitman, A. Pugsley. 1979. "Chemical heterogeneity of major outer membrane pore proteins of *Escherichia coli*". J. Bacteriol. 138:861-870.
75. Legersky, R., J. Hodnett, H. Gray. 1978. "Extracellular nucleases of *Pseudomonas* Bal 31. III. Use of the double-strand deoxyriboexonuclease activity as the basis of a convenient method for the mapping of fragments of DNA produced by cleavage with restriction enzymes". Nucl. Acids Res. 5:1445.
76. Levine, M., H. Du Pont, R. Hornick, M. Snyder, W. Woodward, H. Gilman, J. Libonatti. 1976. "Attenuated streptomycin dependent *S. typhi* oral vaccine: potential deleterious effect of lyophilization". J. Infect. Dis. 133:424-429.
77. Lopez, J., R. Webster. 1985. "Assembly site of bacteriophage  $\phi 1$  corresponds to adhesion zones between the inner and outer membranes of the host cell". J. Bacteriol. 163:1270-1274.
78. Luderitz, O., D. Galanos, M. Lehman, E. Nurminen, E. Rietschel, M. Rosenfelder, M. Simon, O. Westphal. 1973. "Lipid A: chemical structure and biological activity". J. Infect. Dis. 128:9.
79. Lyons, L., N. Zinder. 1972. "The genetic map of the filamentous bacteriophage  $\phi 1$ ". Virology. 49:45-60.
80. Marvin, D., B. Hohn. 1969. "Filamentous bacterial viruses". Bacteriol Rev. 33:172-209.
81. McCafferty, J., A. Griffiths, G. Winter, D. Chiswell. 1990. "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains". Nature. 348:552-554.

82. Messing, J. 1983. "New M13 vectors for cloning". *Methods Enzymol.* 101:20.
83. Messing, J. R. Crea. P. Seeburg. 1981. "A system for shotgun DNA sequencing". *Nucl. Acids Res.* 9:309.
84. Messing, J., J. Vieira. 1982. "A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments". *Gene* 19:269.
85. Misfeldt, M., W. Johnson. 1978. "Identification of protective cell surface proteins in ribosomal fraction from *S. typhimurium*". *Infect. and Immun.* 24:808-816.
86. Miura, T., S. Mizushima. 1969. "Separation and properties of outer and cytoplasmic membranes in *Escherichia coli*". *Bioch. et Bioph. Acta.* 193:268-276.
87. Mizuno, T., M. Chou, M. Inouye. 1983. "A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane". *J. Biol. Chem.* 258:6932-6940.
88. Model, P., N. Zinder. 1974. "In vitro synthesis of bacteriophage  $\phi$ 1 proteins". *J. Mol. Biol.* 83:231-251.
89. Mustafa, A., F. Oftung, A. Deggerdal, H. Gill, R. Young, T. Godal. 1988. "Gene isolation with human T lymphocyte probes". *J. Immunol.* 141 (8):2729-2733.
90. Nakae, T. 1976. Communication. "Outer membrane of *Salmonella*. Isolation of protein complex that produces transmembrane channels". *J. Biol. Chem.* 251:2176-2178.
91. Nakae, T. 1986. "Outer membrane permeability of bacteria". *Crit. Rev. Microbiol.* 13:1-61.

92. Neidhardt, F., J. Ingraham, K. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H. Umberger. 1987. Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology. Vol 2. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
93. Nelson, F., S. Friedman, G. P. Smith. 1981. "Filamentous phage DNA cloning vectors: a noninfective mutant with a nonpolar deletion in gene III". *Virology*. 108:338-350.
94. Nikaido, H., M. Vaara. 1985. "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability". *Microbiol. Rev.* 49:1-32.
95. Nishimura, A., M. Morita, Y. Nishimura, Y. Sugino. 1990. "A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells". *Nucl. Acids Res.* 18 (20):6169.
96. Nomura, N., A. Oka, M. Takanami, H. Yamagishi. "Insertion of a Kanamycin-resistance gene in bacteriophage fd". In Denhardt, D. 1978. The single-stranded DNA phages. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor, New York.
97. Ortíz, V. A. Isibasi, E. García, J. Kumate. 1985. "Estudio de la inmunogenicidad de FME de *S. typhi* empleando el metodo de inmunoelectrotransferencia". *Archivos de Investigación Médica*. 16 supl. 1:6.
98. Ortíz, V., A. Isibasi, E. García, J. Kumate. 1989. "Immunoblot detection of class-specific humoral immune response to outer membrane proteins isolated from *Salmonella typhi* in humans with typhoid fever". *J. Clin. Microbiol.* 27 (7):1640-1645.
99. Osborn, M., C. Wu. 1980. "Proteins of the outer membrane of gram negative bacteria". *Ann. Rev. Microbiol.* 34:369-422.

100. Overbeeke, N., H. Bergmans, F. Van Mansfeld, B. Lugtenberg. 1983. "Complete nucleotide sequence of *phoE*, the structural gene for the phosphate limitation inducible outer membrane pore protein of *Escherichia coli* K-12". *J. Mol. Biol.* 163: 513-532.
101. Parmley, S., G. P. Smith. 1988. "Antibody selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes". *Gene.* 73:305-318.
102. Paul, W. E. 1989. Fundamental immunology. 2a. ed. Paven press, New York.
103. Pelczar, M., R. Reid, E. Chan. 1988. Microbiología. 4a. ed., McGraw-Hill, México.
104. Pérez, A., R. Cabrera. 1974. "Medidas preventivas empleadas en la infección tifoídica". *Rev. Inv. Salud Pública* XV-2:185-194.
105. Pratt, D., H. Tzagoloff, J. Beaudoin. 1969. "Conditional lethal mutants of the small filamentous coliphage M13. II. Two genes for coat proteins". *Virology.* 39:42-53.
106. Pratt, D., H. Tzagoloff, W. Erdahl. 1966. "Conditional lethal mutants of the small filamentous coliphage M13. I. Isolation, complementation, cell killing, time of cistron action". *Virology.* 30:397-410.
107. Puente, J., V. Alvarez, G. Gosset, E. Calva. 1989. "Comparative analysis of the *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* *ompC* genes". *Gene.* 83:197-206.
108. Puente, J., V. Flores, M. Hernandez. Y. Fuchs, E. Calva. 1987.

- "Isolation of an ompC-like outer membrane protein gene from *Salmonella typhi*". *Gene*. 61:75-83.
109. Rajagolapan, R., R. Kumar, N. Malaviya. 1981. "Immunological studies in typhoid fever. I. Immunoglobulins, C<sub>3</sub>, antibodies, rheumatoid factor and circulating immune complexes in patients with typhoid fever". *Clin. Exp. Immunol.* 44:68-73.
110. Ray, D. "Replication of filamentous bacteriophages". En Fraenkel-Conrat, Wagner, R. 1977. Comprehensive virology. Vol 7. Plenum Publishing Corp. New York.
111. Rodriguez, R., Tait, R. 1983. Recombinant DNA experiments: A laboratory manual. Genetics 180L, Winter Quarter.
112. Roitt, I., J. Brostoff, D. Male. 1989. Immunology. 2a. ed. Gower Medical Publishing. U. S. A.
113. Russel, M., P. Model. 1983. "A bacterial gene fip, required for filamentous bacteriophage f1 assembly". *J. Bacteriol.* 154: 1064-1076.
114. Russel, M., P. Model. 1986. "The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation and characterization of mutants thioredoxins". *J. Biol. Chem.* 261: 14997-15005.
115. Salivar, W., H. Tzagoloff, D. Pratt. 1964. "Some physical-chemical and biological properties of the rodshaped coliphage M13". *Virology*. 24:359-371.
116. Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2a. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U. S. A.

117. Sanger, F., S. Nicklen, A. Coulson. 1978. "DNA sequencing with chain terminating inhibitors". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5468.
118. Schnaitman, C. 1974. "Outer membrane proteins of *E. coli*. III. Evidence that the major protein of *Escherichia coli* III outer membrane consists of four distinct polypeptide species". J. Bacteriol. 118:442-453.
119. Scott, J., G. P. Smith. 1991. "Searching for peptide ligands with an epitope library". Science. 249:386-390.
120. Setlow, J.K., Hollaender, A. 1980. Genetic engineering: principles and methods. Vol. 2. Plenum Publishing, New York.
121. Shannon Flynn, 1991, datos no publicados.
122. Sharp, P., M. Hsu, E. Ohtsubo, N. Davidson. 1972. "Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids of *Escherichia coli*. I. Structure of F-prime factors". J. Mol. Biol. 71:471-497.
123. Simons, G., G. Veeneman, R. Konings, J. van Boom, J. Schoenmakers. 1982. "Oligonucleotide-directed mutagenesis of gene IX of bacteriophage M13". Nucl. Acids Res. 10:821-832.
124. Smith, G. P. 1985. "Filamentous fusion phage: a novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface". Science 228:1315-1317.
125. Smith G. P. "Filamentous phages as cloning vectors". En Rodriguez, R. L., D. Denhardt, eds. 1987. Vectors: a survey of molecular cloning vectors and their uses. Butterworth Publishers Stoneham MA.

126. Smith, G. P. 1988. "Filamentous phage assembly: morphogenetically defective mutants that do not kill the host". *Virology*. 167:156-165.
127. Smith, G. P. 1990. Cloning in fUSE vectors. Manual de procedimientos.
128. Smith, G. R. 1991. "Conjugational recombination in *E. coli*: myths and mechanisms". Review. *Cell*. 64:19-27.
129. Ternynck, T., S. Avrameas. 1986. Techniques immunoenzymatiques. Societe Francaise d'Immunologie. Inserm.
130. Tsunetsugu-Yokota, Y., M. Tatsumi, V. Robert, C. Devaux, B. Spire, J. Chermann, I. Hirsch. 1991. "Expression of an immunogenic region of HIV by a filamentous bacteriophage vector". *Gene* 99:261-265.
131. Van Wezenbeek, P., T. Hulsebos, J. Schoenmakers. 1980. "Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd". *Gene* 11:129-148.
132. Venegas, A., I. Gomez, I. Zaror, A. Yudelevich. 1988. "The nucleotide sequence of the *Salmonella typhi* ompC porin gene". *Nucl. Acids. Res.* 16 (15):7721.
133. Vovis, G., K. Horiuchi, N. Zinder. 1975. "Endonuclease R. Eco RII restriction of bacteriophage f1 DNA in vitro: ordering of genes V y VII, location of an RNA promoter for gene VIII". *J. Virol.* 16:674- 684.
134. Vovis, G., M. Ohsumi. "The filamentous phages as transducing particles". En Denhardt, D. 1978. The single-stranded DNA phages. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor. New York.



135. Wandan, M., C. Serie, Y. Cerisier, S. Sallam, R. Germanier. 1982. "Controlled field trial of live *S. typhi* strain Ty21a oral vaccine against typhoid: three years results". *J. Infect. Dis.* 145:292-293.
136. Warren, J., R. Hornick. 1979. "Immunization against typhoid fever". *Ann. Rev. Med.* 30:457-472.
137. Wood, W. 1966. "Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutants affecting the restriction and modification of DNA". *J. Mol. Biol.* 16:118-133.
138. Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing. 1985. "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors". *Gene* 33:103.
139. Young, R., R. Davis. 1983. "Efficient isolation of genes by using antibody probes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:1194-1198.
140. Zacher, A., C. Stock, J. Golden II, G. Smith. 1980. "A new filamentous phage cloning vector: fd-tet". *Gene.* 9:127-140.
141. Zaror, I., I. Gómez, G. Castillo, A. Yudelevich, A. Venegas. 1988. "Molecular cloning and expression in *E. coli* of a *Salmonella typhi* porin gene". *FEBS Letters* 229 (1):77-81.
142. Zhu, J., W. Kempenaers, D. Van der Straeten, R. Contreras, W. Fiers. 1985. "A method for fast and pure DNA elution from agarose gels by centrifugal filtration". *Biotechnology* 3:1014.
143. Zinder, N., J. Boeke. 1982. "The filamentous phage (F<sub>1</sub>) as vectors for recombinant DNA - a review". *Gene.* 19:1-10