



INIA  
Instituto Nacional  
de Investigaciones  
Agrícolas

**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRÍCOLAS  
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS**

# **La genoteca como herramienta de la ingeniería genética**

**Ana Teresa Guillén  
Investigador INIA-CENIAP  
Unilab. Sanidad Animal**

**Serie B - Nº 19**

**El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas** es un instituto autónomo, creado de acuerdo a la Gaceta Oficial N° 36.920 del 28 de marzo de 2000, adscrito al Ministerio de Agricultura y Tierras por decreto N° 5.379 de Gaceta Oficial N° 38.706 del 15 de Junio de 2007.

**Serie B.** De acuerdo con el Reglamento de Publicaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, aprobado por la Junta Administradora del FONAIAP en su sesión 576, celebrada el 14 de septiembre de 1999.

Serie B: corresponde a publicaciones cuyo contenido proviene de la evaluación de los resultados de investigación o la puesta en práctica de los mismos. Incluye temas tales como utilización de nuevas vacunas o la obtención y rendimientos de una nueva variedad; medidas sanitarias para la prevención de enfermedades; prácticas agropecuarias; manejo de medicamentos; pasos para tomar muestras, bien sea de suelos o de sangre, y estudios agroecológicos. Son escritos por investigadores y/o técnicos y destinados fundamentalmente a investigadores, técnicos y estudiantes de educación superior. La redacción de los trabajos es en forma descriptiva o de monografía. Toman la forma de folletos. No tienen periodicidad.

Guillen, A. 2009. La genoteca como herramienta de la ingeniería genética. Maracay, Venezuela, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 56 p. (Serie B - N° 19)



**INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES  
AGRÍCOLAS  
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS**

# **La genoteca como herramienta de la ingeniería genética**

Ana Teresa Guillén  
Investigador INIA-CENIAP  
Unilab. Sanidad Animal

INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay. Venezuela

---

**SERIE B - N° 19**

© Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas - INIA, 2009

Edif. Gerencia General del INIA

Av. Universidad, vía El Limón, Maracay, Aragua. Venezuela.

Teléfonos: (58) 243 2833155 - 2833311 - 2834321 - 2833544

Apartado postal 2103

<http://www.inia.gob.ve>

Coordinación editorial: Alfredo Romero

Asistencia editorial: Jenny Gámez

Diagramación: Sonia Piña

Impresión y encuadernación: Taller de Artes Gráficas del INIA.

Hecho el Depósito de Ley

Depósito Legal: lf22320096004290

ISBN. 978-980-318-233-5

Prohibida la reproducción total o parcial de esta obra,  
la recopilación en sistema informático, transmisión  
en cualquier medio o forma, fotocopia u otros métodos  
sin el permiso previo del INIA.

Impreso en Venezuela - Printed in Venezuela

# Contenido

- I. Introducción
- II. Elaboración de genoteca
  - a. Obtención de ADNg y ARNm
  - b. Síntesis de ADNc
  - c. Vectores
  - d. Selección de bacterias que contienen el ADN recombinante, cuando se usan plásmidos como vector
  - e. Selección de fagos recombinantes
  - f. Métodos para evaluar las genotecas
  - g. Ejemplos de genotecas
  - h. Importancia de la elaboración de una genoteca
- III. Bibliografía
- IV. Presentación



## I Introducción

Las técnicas de análisis del genoma desarrolladas a partir de los años setenta han revolucionado los conocimientos a nivel molecular de muchos procesos biológicos normales y patológicos. Actualmente, es posible localizar, identificar, amplificar y secuenciar los genes que codifican las proteínas esenciales, y los elementos reguladores de su expresión. También es factible expresar genes en sistemas apropiados, para analizar su función o producir grandes cantidades de las proteínas que codifican.

Los avances de la genética molecular han revolucionado la vida moderna porque han puesto a disposición de investigadores básicos y aplicados, cantidades ilimitadas de ácidos nucleicos con información para la construcción de moléculas de importancia clínica o industrial. Sea cual fuere la índole del ácido nucleico en estudio, este debe ser aislado y caracterizado. Para esto, debe ser generada una fuente permanente del material de manera que se disponga de cantidades suficientes para los estudios.

La caracterización molecular de un gen requiere tanto su identificación y aislamiento a partir del resto del genoma, como su ampliación para poder obtener cantidades suficientes para su análisis. Aunque es posible amplificar *in vitro* fragmentos de ADN mediante PCR, la identificación y amplificación de genes de interés se realiza muy a menudo recurriendo a técnicas que permiten multiplicar *in vivo* un gen determinado, tras la introducción de una única copia del mismo en una célula hospedadora, generalmente bacteriana. El número de copias del gen aumenta a medida que se multiplica el organismo hospedador. El proce-

so, en su conjunto, se denomina clonación molecular y se resume en los pasos siguientes:

- Se comienza con el aislamiento del ADN genómico (ADNg) de varias células, que al ser digerido con enzimas de restricción, genera una enorme cantidad de segmentos cortos de ADN, llamados fragmentos de restricción. También el ARN mensajero (ARNm) se puede usar como material de partida. Como las moléculas de ARN son excepcionalmente lábiles, difíciles para amplificar en su forma original y no pueden por si mismas ser ligadas a un vector para clonación, son convertidas en ADN por síntesis de ADN complementario (ADNc), mediante la enzima transcriptasa reversa.
- Estos fragmentos son incorporados a otras secuencias de ADN (vectores plásmidos o bacteriófagos), de modo que cada vector recibe uno de los fragmentos. Las moléculas resultantes de esta unión se denomina ADN recombinante.
- Los vectores con sus fragmentos de restricción se introducen en la célula hospedadora (bacterias principalmente, levaduras u otras células eucariotas), las cuales son sembradas en medios de cultivo para su multiplicación.
- La multiplicación de cada bacteria genera una colonia separada de las demás, de modo que en los cultivos se forman miles de colonias. Como consecuencia, cada colonia está formada por un clon de bacterias que descienden de un ancestro común, conteniendo cada clon un fragmento de restricción o molécula de ADN recombinante diferente.

En términos generales, la colección de estos clones, suficientes en número para que contenga cada gen presente en la célula de origen que se estudia, se denomina **genoteca**. Las diferentes etapas para su elaboración serán consideradas a continuación.



## II Elaboración de genoteca

La genoteca puede ser de ADN genómico (ADNg) o ADN complementario (ADNc). La primera es una colección de fragmentos de ADN genómicos clonados en un vector, que en conjunto representan la totalidad del ADN o genoma de un organismo. A partir de este tipo de genoteca se podrá seleccionar el clon que posea un ADN recombinante específico y cultivarlo posteriormente para amplificarlo (De Robertis y col., 1998; Peñafiel y García, 2001; Izquierdo, 2001).

La genoteca de ADNc es el conjunto de clones obtenidos a partir de los ARN mensajeros (ARNm), por lo que comprenderán una selección del total de genes de la célula, ya que sólo aquellos genes que están siendo expresados son transcritos al ARNm. Una vez que la información esté disponible en la forma de genoteca de ADNc, los segmentos procesados individualmente podrán ser aislados y examinados con relativa facilidad (Stratagene, 2000; Izquierdo, 2001).

### a) Obtención del ADN y ARNm

Los insertos pueden ser esencialmente de dos tipos: fragmentos de ADNg y ADNc obtenido a partir del ARNm.

El ADN total de la célula, que con frecuencia es requerido como una fuente de material para obtener genes a ser clonados, puede ser procedente de cultivo de bacterias, células de origen vegetal y animal o procedente de otro tipo de organismo a estudiar.

Las técnicas de ruptura de las células pueden dividirse en métodos físicos, con los cuales las células se rompen por fuerzas mecánicas y métodos químicos, donde la lisis celular es llevada a cabo por exposición a agentes químicos que afectan la integridad de las barreras celulares. La lisis química involucra generalmente un agente que ataca la pared celular, en el caso que la

haya, y otro que destruye la membrana celular. Para la bacteria *Escherichia coli* y organismos relacionados, el ablandamiento de la pared celular se lleva a cabo por lisozimas, etilendiaminotetraacético (EDTA), o una combinación de ambos. Las lisozimas digieren compuestos polímeros que son los que le dan rigidez a la pared celular. El EDTA remueve los iones magnesio que son esenciales para preservar la estructura de las envolturas celulares y también inhibe enzimas celulares que podrían degradar el ADN. El debilitamiento de la pared celular con lisozimas o EDTA es suficiente para causar la ruptura de la célula, pero usualmente un detergente como el 3-sodio-1-duodecil -2-sulfato (SDS) ayuda en el proceso de lisis al remover las moléculas de lípidos y, por lo tanto, causar la ruptura de las membranas celulares. Una vez lisada la célula, se remueven los detritus insolubles. Componentes como paredes celulares digeridas parcialmente pueden ser removidas por centrifugación, quedando el extracto celular como un líquido sobrenadante. Para eliminar proteínas remanentes se puede usar fenol o una mezcla de fenol cloroformo en proporción 1:1. Estos solventes orgánicos precipitan las proteínas y dejan los ácidos nucleicos (ADN y ARN) en solución acuosa. Para eliminar el exceso de ARN de la solución acuosa se usa la enzima ribonucleasa. Para concentrar el ADN de la muestra, el método más usado es la precipitación con etanol, en presencia de sal (cationes monovalentes de  $\text{Na}^+$ ) y a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  o menos. El precipitado puede ser recolectado por centrifugación y luego redisolto en un volumen adecuado de agua. Aunque los pasos básicos de purificación del ADN son los mismos, cualquiera que sea el organismo, algunas modificaciones son consideradas de acuerdo a las características de las células que se usen (Brown, 1990).

Para su clonación, los fragmentos de ADN deben tener dimensiones determinadas y limitadas. El tamaño del ADN<sub>g</sub>, sea procarionota o eucarionota, es muy superior al máximo posible para un inserto. Por ello, la clonación de genes a partir de ADN<sub>g</sub> requiere el aislamiento previo del ADN y su ruptura en fragmentos de ta-

maño adecuado, mediante el uso de endonucleasas de restricción.

Para el aislamiento de ARN se puede usar una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol Reagent), basado en el mejoramiento del método de Chomczynski y Sacchi de 1987 (GIBCO™ BRL, 1999). Durante la homogeneización y lisis de la muestra, el Trizol mantiene la integridad del ARN. La adición de cloroformo seguido de centrifugación, separa la solución en una fase acuosa y una fase orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa y es recuperado por precipitación con alcohol isopropílico. El ARN aislado con Trizol está libre de proteínas y contaminación con ADN. A partir del ARN total se aísla el ARNm poli (A) utilizando una resina oligo (dT) (Brown, 1990; GIBCO™ BRL, 1999; Stratagene, 2000; Lewin, 2001).

Para la realización de genotecas de ADNc, se debe realizar la síntesis de los ADNc a partir de los ARNm obtenidos.

## **b) Síntesis del ADNc**

La síntesis de los ADNc se logra utilizando un cebador oligo (dT), de 12-18 nucleótidos de largo, el cual se une a la colas poli (A) del extremo 3' de las moléculas de ARNm de células eucariotas y la acción de la enzima transcriptasa reversa, la cual sintetiza una cadena complementaria de ADN por cadena de ARNm existente (Figura 1).

En kits comerciales como el elaborado por Stratagene, el primer oligo (dt) posee un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción Xho I.

Si la doble cadena de ADNc contiene uno o más sitios de reconocimiento para la enzima de restricción que se use, ésta pudiera ser clivada y subsecuentemente clonada en dos o más fragmentos, haciendo difícil el aislamiento y análisis de ADNc completos.

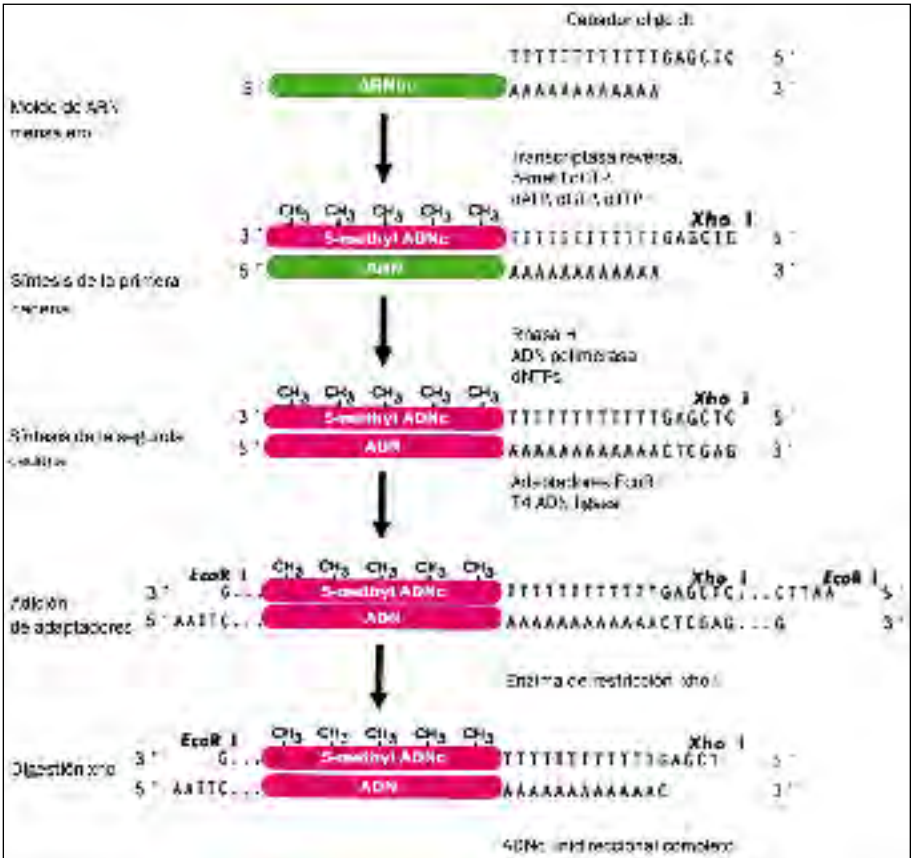


Figura 1. Síntesis de ADNc (Adaptado del Zap-cDNA Síntesis Kit. Instruction Manual. Stratagene, 2000)

Para evitar esto, la primera cadena de ADNc debe ser metilada. De esta forma, los sitios de restricción dentro de la molécula de ADNc quedarían protegidos del clivaje.

Una vez que la primera cadena de ADNc ha sido sintetizada, el ARNm, miembro de la molécula híbrida, es parcialmente degradado por el tratamiento con ribonucleasas H. Los fragmentos remanentes de ARN sirven como cebadores para la ADN polimerasa I de *E. coli*, la cual sintetiza una segunda cadena de

ADN, utilizando como molde a la primera, generando moléculas de ADNc con extremos romos. Esta segunda cadena es idéntica al ARNm original.

Luego que se ha producido la síntesis de la segunda cadena de ADN, se incorporan adaptadores EcoRI. La doble cadena de ADNc se incuba con los adaptadores, en presencia de la enzima bacteriófago T4 ADN ligasa, enzima que cataliza la unión de los adaptadores a los extremos romos de las moléculas de ADNc.

En el proceso de unión de los adaptadores a los extremos romos de las moléculas de ADNc, es importante que la reacción de ligación se haga en el menor volumen. La concentración molar de los adaptadores debe ser de al menos 100 veces más que la de los terminales de ADNc, para minimizar la unión de los extremos romos de las moléculas de ADNc entre ellos mismos.

Luego, la enzima Xho I actúa en su sitio de reconocimiento, produciendo extremos cohesivos. De esta forma, los fragmentos de ADN de doble cadena resultantes pueden ser ligados al vector en el sentido Eco RI – Xho I y efectuarse la clonación.

Los extremos de las moléculas que portan los adaptadores son fosforilados con la enzima bacteriófago T4 polinucleótido kinasa para ser ligados al vector desfosforilado apropiado, el cual debe haber sido previamente clivado con enzimas de restricción que generen extremos cohesivos compatibles con los de los adaptadores.

Finalmente, antes de que el ADNc sea insertado en el vector, los adaptadores que no se unieron y los productos de bajo peso molecular, creados por la acción de la enzima de restricción sobre los adaptadores, deben ser removidos en columnas de cromatografía.

Los clones de ADNc obtenidos son representativos del ARNm presente en la preparación original (Sambrook y col., 1989; Brown, 1990; Stratagene, 2000; Lewin, 2001, Izquierdo, 2001).

### c) Vectores

Para que un fragmento de ADN (ADN foráneo o inserto) quede permanentemente presente en la célula hospedadora y su descendencia, es necesario que vaya unido a otras secuencias de ADN que confieran al conjunto la capacidad de autorreplicación, y que permitan, además, diferenciar fácilmente las células que se han transformado captando el ADN, de las que no lo han hecho. Por ello, es necesario unir *in vitro* los fragmentos de ADN que se quieren clonar a una molécula de ADN denominada vector, con capacidad de ser introducida, replicada y seleccionada en las células hospedadora (Peñafiel y García, 2001). Entonces, el vector es el vehículo que transporta un gen dentro de la célula receptora y es responsable de su replicación.

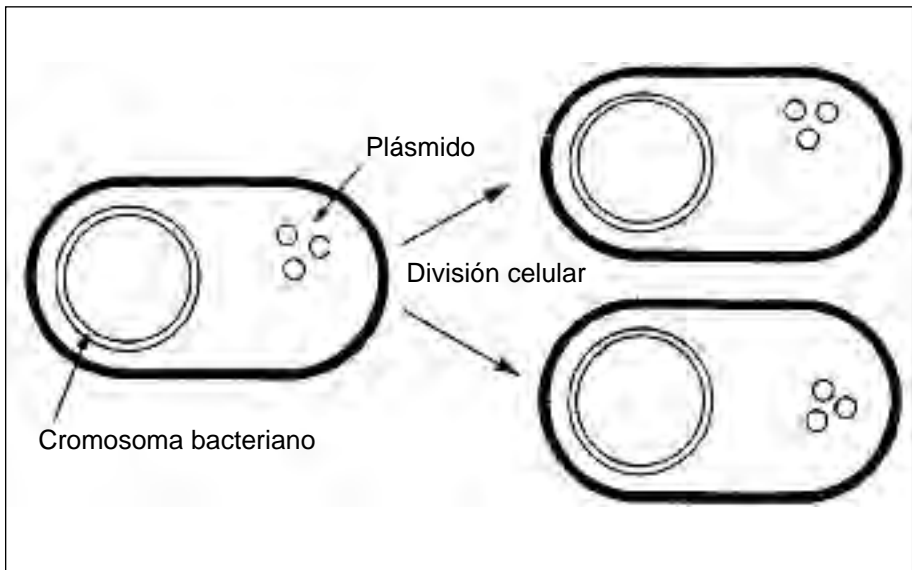
Para que una molécula de ADN actúe como un vehículo para la clonación de genes debe poseer algunas características:

- Ser capaz de replicarse dentro de la célula receptora, de tal manera que numerosas copias de la molécula de ADN recombinante se puedan reproducir y pasar a las células hijas.
- Un vehículo para clonación necesita ser pequeño, menor de 10 Kb en tamaño, que permita la incorporación del inserto y su entrada en la célula. Moléculas más grandes tienden a romperse durante la purificación y son más difíciles de manipular.
- Poseer marcadores para la selección de las bacterias que los capten.
- Poseer una o varias secuencias de restricción en donde las endonucleasas de restricción actúen generando extremos para ligar los insertos.

Las dos clases de moléculas de ADN que satisfacen estos criterios son: plásmidos y bacteriófagos (Brown, 1990 ; Peñafiel y García, 2001).

## Los plásmidos

Son pequeñas moléculas circulares de ADN de doble cadena que se replican en las bacterias con independencia del cromosoma bacteriano. Sin embargo, cuentan con enzimas y proteínas codificadas por el hospedador para su replicación y transcripción (Figura 2).



**Figura 2. Replicación de plásmidos no integrativos (Fuente: Brown, 1990).**

Estos vectores casi siempre transportan uno o más genes y con frecuencia estos genes son responsables por características muy útiles expresadas por la bacteria receptora. Ejemplos de éstas son: la habilidad de sobrevivir en concentraciones de antibióticos normalmente tóxicas tales como cloranfenicol y ampicilina, frecuentemente debida a la presencia en la bacteria de un plásmido que transporta genes de resistencia a antibióticos (Figura 3).

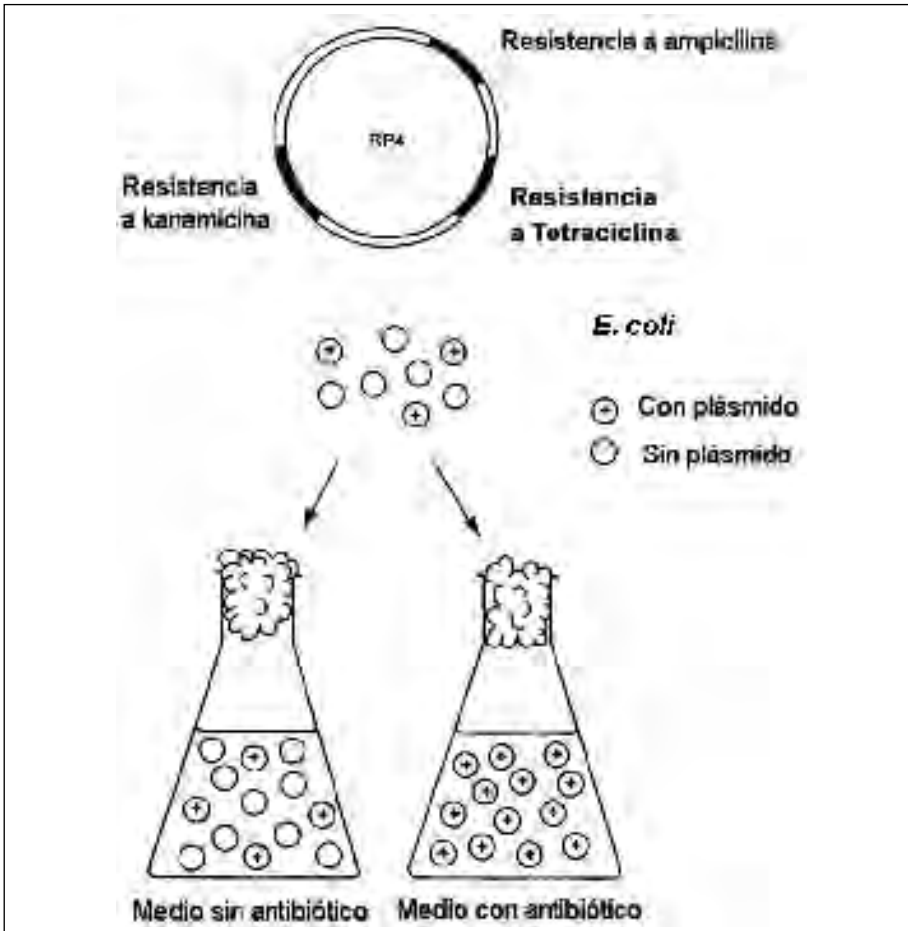
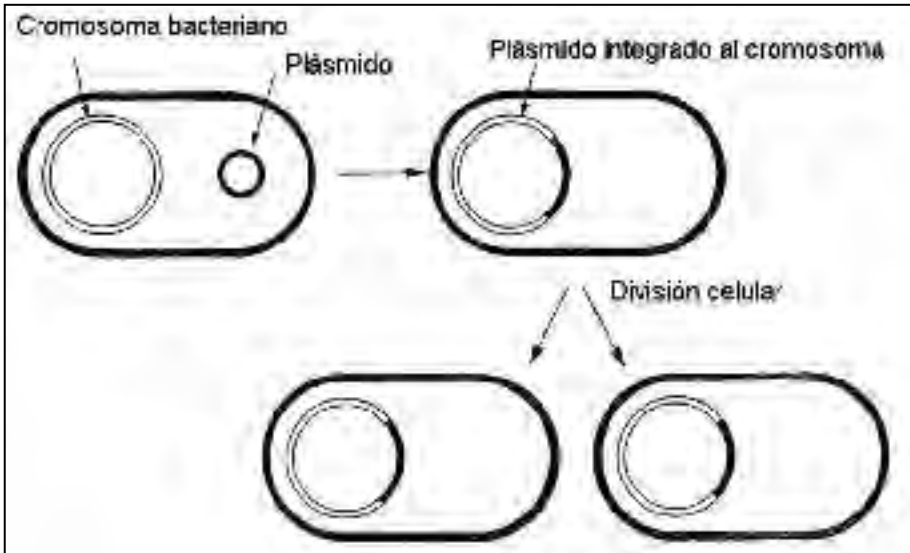


Figura 3. Uso de resistencia a anticuerpos como marcadores de selección para el plásmido RP4. (Fuente: Brown, 1990).

Producción de antibióticos, degradación de compuestos orgánicos complejos, restricción y modificación de enzimas. Algunos plásmidos son capaces de replicarse por insertarse en el cromosoma de las bacterias formando los llamados episomas (Figura 4), los cuales pueden ser mantenidos establemente en esta forma a través de numerosas divisiones celulares para que en algún estado volver a existir como elementos independientes



(Sambrook y col., 1989; Brown, 1990; Lewin, 2001; Peñafiel y García, 2001). Por su seguridad y fácil manejo, han sido una importante herramienta de trabajo en la clonación molecular.



**Figura 4. Episoma (Fuente: Brown, 1990)**

Como se mencionó anteriormente, es importante el tamaño del vehículo de clonación, siendo ideal el menor a 10 kb. El rango de los plásmidos va desde aproximadamente 1.0 kb para los más pequeños y sobre los 250 kb para los más grandes (Cuadro 1), de manera que solo unos pocos son útiles para clonación. Sin embargo, los plásmidos más grandes pueden ser usados para clonación, bajo ciertas condiciones de adaptación.

En cuanto al número de copias de un plásmido individual dentro de una célula bacteriana, este puede variar desde uno (especialmente en las moléculas grandes) hasta 3.000. En forma general, un vehículo de clonación útil necesita estar presente en la célula en copias múltiples de manera que se pueda obtener grandes cantidades de ADN recombinante (Brown, 1990; Izquierdo, 2001).

**Cuadro 1. Tamaño de diferentes plásmidos**

Plásmido	Tamaño (kb)
PBR322	4,36
PUC18 y 19	2,69
PUC118 y 119	3,2
PSP64 y PSP 65	3
PGEM-3 y 4C	2,87
PGEM-3Z	2,74
PGEM-3Zf (-)	3,2
ColE1	6,36
RP4	54
F	95
TOL	117
PTiAch5	213

***Fuente: Sambrook y col., 1989; Brown, 1990.***

Los primeros plásmidos usados como vectores de clonación fueron pSC101 (Cohen y col. 1973), ColE1 (Hershfield y col. 1974) y PCR1 (Covey y col. 1976). Su versatilidad era limitada, se replicaban poco o portaban marcadores de selección inservibles. Ninguno de ellos contenía más de dos sitios de restricción que pudieran ser usados para clonación. El primer plásmido que combinaba estas características deseables era el pBR313 (Bolívar y col., 1977a,b), con dos marcadores de selección tet<sup>r</sup> y amp<sup>r</sup> y un número útil de sitios de restricción. Sin embargo, era muy largo y más de la mitad de su ADN no jugaba un rol como vector. La primera fase de desarrollo de plásmidos como vectores terminó con la construcción de pBR322 (Bolívar y col., 1977 b), un plásmido de 4.36 kb del cual la mayoría de las secuencias innecesarias fueron eliminadas. Este plásmido se convirtió en el vehículo de clonación más ampliamente usado y mucho de los plásmidos

vectores que se usan hoy, son descendientes directos de éste (Balbás y col., 1986).

La tendencia de los próximos años fue perfeccionar los vectores para reducir su tamaño al mínimo y expandir su capacidad de aceptar fragmentos de ADN foráneos, generados por clivaje con un amplio rango de enzimas de restricción. Los plásmidos pequeños son preferidos por varias razones: primero, la eficiencia de transformación es inversamente relacionada al tamaño del plásmido. Es un factor limitante cuando el plásmido excede 15 kb de tamaño. Los plásmidos más pequeños permiten insertar segmentos grandes de ADN foráneo. Segundo, los plásmidos más grandes son más difíciles de caracterizar por mapas de restricción. Tercero, debido a que los plásmidos más grandes se replican en menor número de copias, el rendimiento del ADN foráneo disminuye y la intensidad de la señal obtenida es reducida, cuando las colonias son seleccionadas por hibridación. Así en los años 70 y comienzos de los 80, vectores derivados de pBR322 fueron construidos con la ausencia de secuencias auxiliares, involucradas en el control de número de copias y movilización. Los más conocidos de éstos son: pAT153 (Twigg y Sherratt, 1980), pBR327 (Soberón y col., 1980) y pXf3 (Hanahan, 1983). Al mismo tiempo, el número de sitios útiles de clivaje de las enzimas de restricción dentro del plásmido fue expandido y su distribución fue racionalizada. Casi todos los vectores contienen ahora una serie de sitios de clonación, que consisten en secuencias reconocidas por las enzimas de restricción comúnmente usadas en experimentos de clonación (sitios de policlonaje). En la mayoría de los casos, estos sitios de restricción son únicos y no se encuentran en otro sitio del plásmido. Estas secuencias suministran una variedad de blancos que pueden ser usados, solos o en combinación, para clonar fragmentos de ADN generados por clivaje con una o con un gran número de enzimas de restricción. Los fragmentos insertados en un sitio de restricción pueden frecuentemente ser recuperados por la acción de una enzima de restricción que cliva en un sitio próximo (Sambrook y col., 1989).

Aunque el tamaño de los insertos que se pueden clonar en la mayoría de los plásmidos es de aproximadamente 5 kb (Brown, 1990), actualmente existen diversos plásmidos disponibles, que permiten la clonación de insertos de hasta 15 Kb, los cuales contienen fuertes promotores que generan grandes cantidades de ARNm complementario a las secuencias clonadas de ADN foráneo. Se trata entonces de vectores de expresión, los cuales son diseñados para expresar proteínas foráneas que no están relacionadas a ninguna secuencia procariota. En otros casos, ellos generan proteínas codificadas, parte por el vector y parte por el segmento clonado del ADN foráneo.

Recientemente, la construcción de plásmidos ha involucrado la incorporación de secuencias auxiliares que han permitido, entre otras cosas: reconocimiento visual de clones recombinantes por pruebas histoquímicas, selección directa de clones recombinantes y expresión de una gran cantidad de proteínas foráneas.

Los fragmentos más fáciles para clonar tienen terminales sobresalientes o cohesivos no complementarios entre sí, generados por digestión con dos enzimas de restricción diferentes. Debido a la presencia de sitios de policlonación, es posible encontrar un vector que contenga sitios de restricción que son compatibles con el terminal del fragmento de ADN foráneo. El fragmento de ADN foráneo es entonces insertado en el vector, por un proceso conocido como clonación direccional. Como ejemplo, el vector pUC19 puede ser digerido con BamHI y HindIII, y después de la digestión, el fragmento largo del vector puede ser separado del resto del sitio de múltiple clonación por electroforesis en gel o cromatografía de exclusión molecular. Este vector entonces puede ser ligado a un segmento de ADN foráneo que tiene terminales cohesivos compatibles con los generados por BamHI y HindIII en el vector. El recombinante circular resultante es entonces usado para transformar bacterias *E. coli*, confiriéndole resistencia a ampicilina (Figura 5). Debido a la falta de complementariedad entre los terminales sobresalientes de BamHI y HindIII,

el vector no puede circularizarse eficientemente. Entonces, las células bacterianas resistentes a la ampicilina contienen plásmidos que poseen segmentos de ADN foráneo que forman puentes entre los sitios BamHI y HindIII. Diferentes combinaciones de enzimas pueden ser usadas dependiendo del segmento de ADN foráneo.

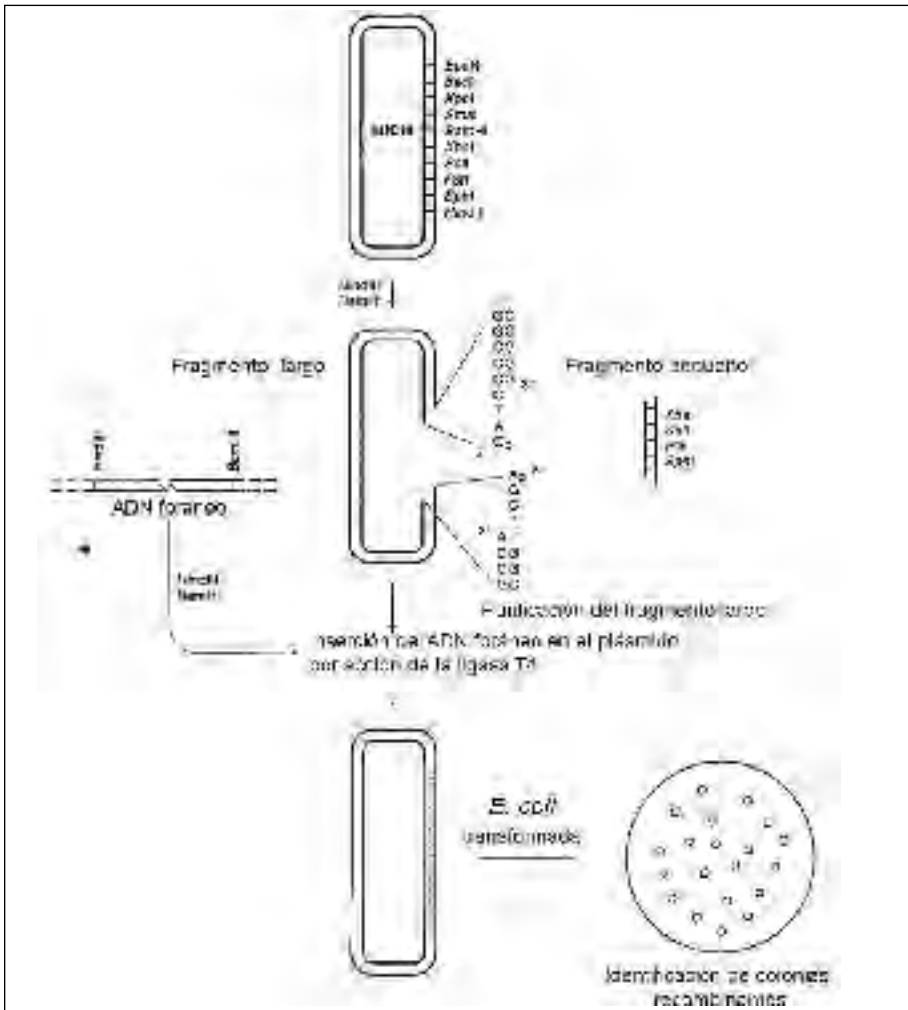
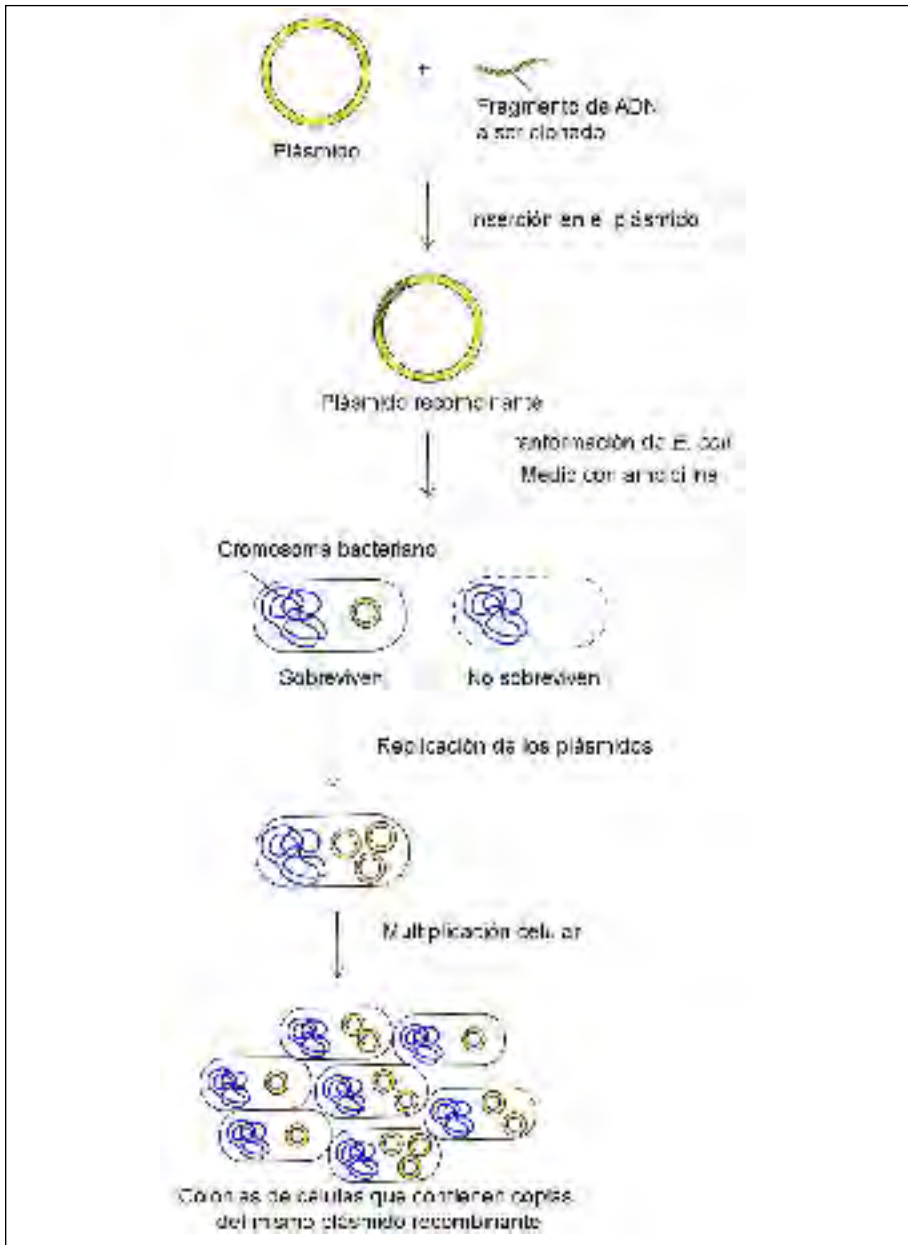


Figura 5. Clonación direccional en el plásmido (Fuente: Sambrook y col., 1989).

La remoción del grupo 5'-fosfato con fosfatasa alcalina es frecuentemente usada para suprimir la propia ligación y circularización del plásmido. Durante la ligación *in vitro*, el bacteriófago T4 ADN ligasa cataliza la formación de un puente fosfodiéster entre nucleótidos adyacentes solo si un nucleótido contiene grupo 5'-fosfato y el otro contiene el grupo 3'-hidroxil. Entonces, la recircularización del ADN del plásmido es minimizada, removiendo el 5'-fosfato de ambas terminaciones del DNA lineal con fosfatasa alcalina. El fragmento de ADN foráneo con el grupo 5' fosfato terminal puede ser ligado eficientemente al ADN desfosforilado del plásmido.

Los fragmentos de ADN con extremos romos se ligan menos eficientemente que los que poseen extremos cohesivos, por lo que se requeriría una alta concentración tanto de bacteriófago T4 ADN ligasa, como de ADN foráneo y de plásmido en la reacción de ligación (Sambrook y col., 1989).

Una vez unidos el ADN del plásmido y el ADN foráneo, en un plásmido recombinante (Figura 6), éste se usa para transformar las bacterias. Los plásmidos recombinantes y no recombinantes son introducidos en las bacterias mediante distintas técnicas de transformación. Para esto, las bacterias son tratadas con mezclas de cationes divalentes para hacerlas temporalmente permeables a pequeñas moléculas de ADN, siendo sólo una pequeña fracción de las bacterias las que capta el ADN plasmídico, las cuales se multiplican y forman colonias (Sambrook y col., 1989; Lodish y col., 1995; Peñafiel y García, 2001).



**Figura 6. Procedimiento general de clonación de un fragmento de ADN en un plásmido (Fuente: Lodish y col., 1995).**

## Los bacteriófagos o fagos

Hasta 1983, casi todas las clonaciones de ADNc se realizaban usando plásmidos como vectores y las genotecas eran usualmente mantenidas como una colección por encima de  $10^5$  colonias bacterianas transformadas. Algunas veces esas colonias eran recolectadas, amplificadas en cultivo líquido y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . y en otras, eran mantenidas en la superficie de filtros de nitrocelulosa (Hanahan and Meselson, 1983). En ambos casos, los resultados eran insatisfactorios. Las genotecas eran difíciles de preservar sin la pérdida de viabilidad y la evaluación por hibridación con múltiples sondas radiactivas, requería la replicación de las colonias de un filtro de nitrocelulosa a otro. Este laborioso trabajo se debía realizar en corto tiempo, antes que las colonias del filtro se mancharan y fuese difícil su reconocimiento. Con la obtención más eficiente de ADNc y la disponibilidad de adaptadores, entre otros avances, se consideró posible aprovechar la alta eficiencia y reproducibilidad del empaquetamiento *in vitro* del ADN del bacteriófago  $\lambda$ , en la partícula viral. Las genotecas resultantes pueden ser amplificadas y almacenadas indefinidamente sin pérdida de viabilidad y pueden ser evaluadas fácilmente con ácidos nucleicos y antibióticos (Sambrook y col., 1989).

Los bacteriófagos son virus que infectan específicamente a bacterias. Son estructuras simples que consisten en moléculas de ADN (ocasionalmente moléculas de ARN) que transportan algunos genes, incluyendo muchos que participan en la replicación, rodeadas por una cubierta protectora o cápside, construida por moléculas de proteína.

El patrón general de infección de un fago es el siguiente:

1. La partícula del fago se adhiere a la pared celular de la bacteria e inyecta su ADN dentro de la bacteria.
2. La molécula de ADN del fago se replica, usualmente por enzimas específicas codificadas por genes del fago.



3. Otros genes del fago dirigen la síntesis de los componentes del cápside y una nueva partícula es ensamblada y liberada de la bacteria (Brown, 1990; Lewin, 2001).

Hay dos tipos de infección por parte de los fagos, ciclo lítico e infección lisogénica. El ciclo lítico (Figura 7), es de corta duración (menos de 20 minutos) y en él, el ADN circular viral se replica muchas veces, un gran número de productos de genes del bacteriófago son sintetizados, las partículas de la progenie del bacteriófago son ensambladas y la liberación de las partículas infecciosas del nuevo fago está asociada a la lisis de la bacteria (Sambrook y col., 1989; Brown, 1990; Lewin, 2001). Por lo tanto, el tratamiento de un césped bacteriano, creciendo sobre una placa de agar, con partículas infecciosas producirá placas líticas formadas por la lisis de las bacterias infectadas (Peñafiel y García, 2001).

En contraste al ciclo lítico, la infección lisogénica (Figura 8) está caracterizada por integración de la molécula de ADN del fago en el genoma de la bacteria receptora, formando el denominado profago, manteniéndose así posiblemente por muchas divisiones celulares y es heredado en forma latente e inerte, de la misma forma que los genes bacterianos. Posteriormente, el profago es liberado del genoma portador y se revierte al ciclo lítico, lisando la célula (Brown, 1990; Campbell, 2001; Lewin, 2001).

Aunque hay una gran variedad de bacteriófagos, solo el  $\lambda$  y M13 tienen un papel real como vectores de clonación. Ambos fagos son del tipo lisogénico, con la diferencia que el ADN del M13 no se integra al genoma de la bacteria y son liberados de la célula sin producir lisis (Brown, 1990 ; Campbell, 2001).



Figura 7. Ciclo lítico del bacteriófago. (Fuente: Lewin, 2001).

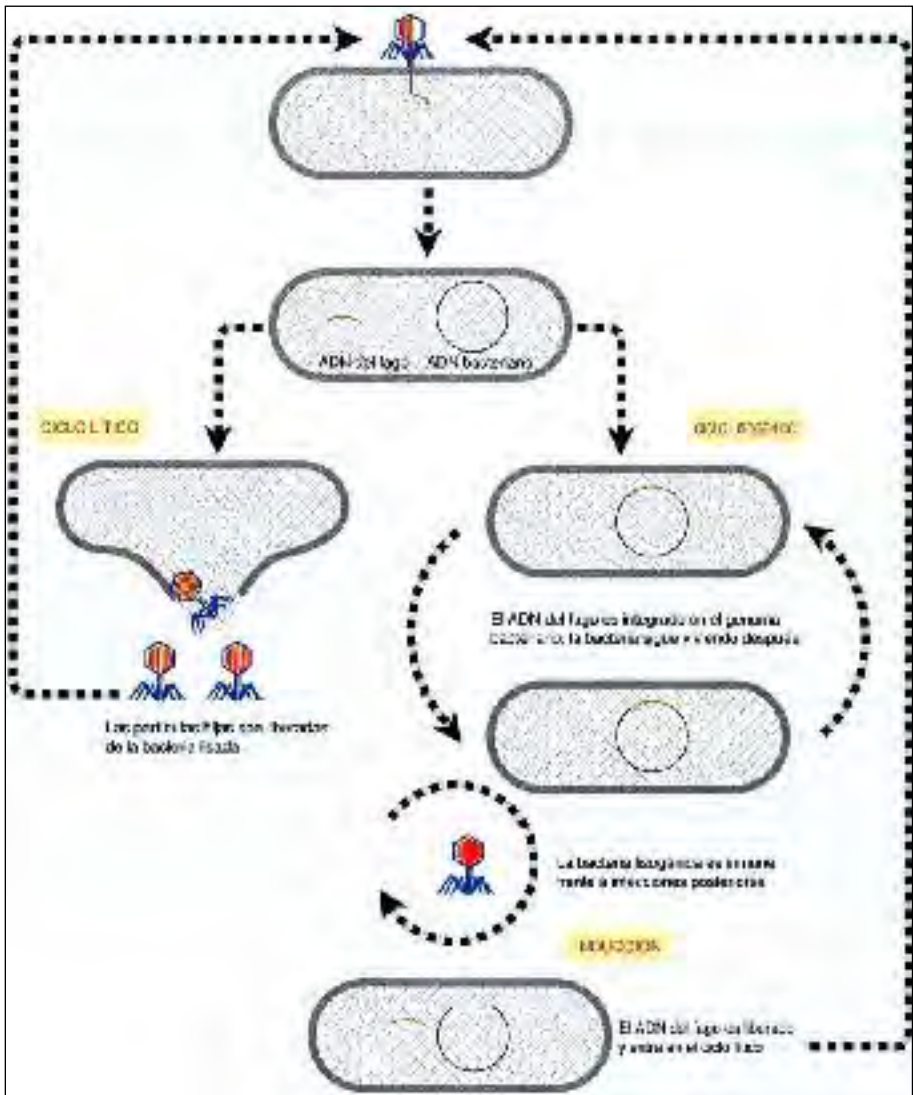


Figura 8. Ciclo lisogénico y ciclo lítico del bacteriófago (Fuente: Lewin, 2001).

El bacteriófago  $\lambda$  ha ocupado un rol central en la clonación molecular. Un gran número de vectores versátiles y sofisticados se encuentran disponibles y su desarrollo fue posible por el vasto y detallado análisis de la genética y fisiología de este bacteriófago. Es un ejemplo típico de fago con cabeza y cola (Figura 9). Su ADN está contenido en la estructura de la cabeza poliedral y la cola le sirve para unir el fago a la superficie bacteriana e inyectar el ADN dentro de la célula. El genoma es una molécula de ADN lineal de doble cadena de aproximadamente 49 kb, con extremos de 12 nucleótidos que forman cadenas simples complementarias denominadas terminales cohesivos *cos*. Dentro de la bacteria, estos extremos se asocian por apareamiento de bases, permitiendo que la molécula se haga circular al unir sus extremos, por la acción de la enzima ADN ligasa del hospedador, para generar una molécula de ADN circular que sirve de molde para la replicación durante la fase temprana de infección (Sambrook y col., 1989; Brown, 1990; Campbell, 2001, Izquierdo, 2001).

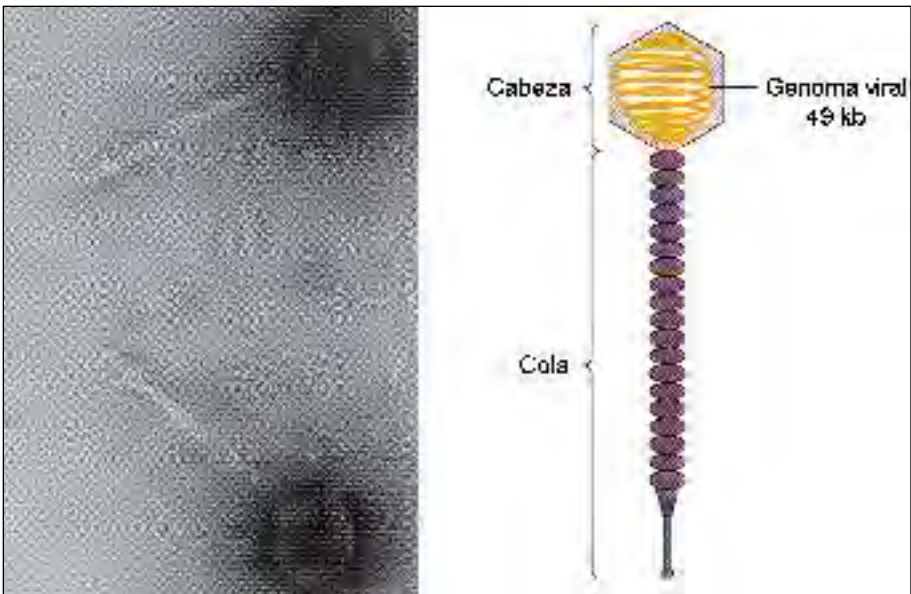


Figura 9. Bacteriofago  $\lambda$  (Fuente: Lodish y col, 1995).

No hay un solo bacteriófago  $\lambda$  adecuado para la clonación de todos los fragmentos de ADN. Es necesario elegir cuidadosamente entre los vectores disponibles. Hay tres consideraciones que influyen en la escogencia: las enzimas de restricción a usar, tamaño del fragmento de ADN foráneo a ser insertado y si el vector será o no usado para expresar secuencias de ADN clonadas.

El desarrollo de vectores conteniendo múltiples sitios de clonación y la disponibilidad de una variedad de enzimas de restricción que cliven el ADN para producir terminales cohesivos, ha simplificado altamente los mecanismos de clonación en vectores bacteriófago  $\lambda$ .

El tamaño del inserto es un factor importante a ser considerado para escoger el vector. Solamente cerca de 60% del genoma viral es necesario para el crecimiento lítico del bacteriófago y el resto del genoma puede ser remplazado por el ADN foráneo. Sin embargo, la viabilidad disminuye dramáticamente cuando el tamaño del genoma es mayor que 105% o menor que 78%. Por esto es importante realizar una combinación tal que el vector y el ADN foráneo alcancen el tamaño en los límites aceptables (Sambrook y col., 1989). El tamaño de diferentes fagos se presenta en el Cuadro 2.

Con el uso de vectores derivados del fago  $\lambda$  se pueden clonar fragmentos de ADN de hasta 25 Kb. Con  $\lambda$ gt10, fragmentos de 6 kb y con  $\lambda$ EMBL, fragmentos de 23 kb (Sambrook y col., 1989; Brown, 1990; Peñafiel y García, 2001).

$\lambda$ Zap es el primero de una nueva generación de vectores que han sido diseñados para suministrar un mayor rango de sitios potenciales para clonación y expresión de ADNc y un método simplificado para la recuperación y subsecuente manipulación del ADNc. Debido a su versatilidad, seguramente este vector reemplazará  $\lambda$ gt10 y  $\lambda$ gt11 como vectores de elección para la construcción de genotecas de ADNc (Sambrook y col., 1989).

**Cuadro 2. Tamaño de diferentes bacteriófagos**

Bacteriófago	Tamaño (kb)	Tamaño del inserto (kb)
$\lambda$ gt10	43	0 - 6
$\lambda$ gt11	44	0 - 7,2
$\lambda$ ORF8	44	0 - 9
$\lambda$ gt18 Agt19	44	0 - 7,7
$\lambda$ gt20 Agt21	44	0 - 8,2
$\lambda$ gt22 Agt23	44	0 - 8,2
$\lambda$ Zap	40	0 - 10
$\lambda$ EMBL	28,7	23

(Fuente: Sambrook y col., 1989)

El fago M13 es un ejemplo de fago filamentosos y su estructura es completamente diferente a la del fago  $\lambda$ . La molécula de ADN es circular, de cadena simple y de 6,4 kb. Una vez dentro de la célula, la molécula de cadena simple actúa como molde para la síntesis de una cadena complementaria y formar una molécula de ADN de cadena doble. Con este fago se pueden clonar fragmentos menores de 3 kb (Brown, 1990.; Izquierdo, 2001).

### Otros vectores

**Los cósmidos:** son plásmidos a los que se les ha insertado la región "cos" del fago lambda. Son particularmente útiles para clonar insertos de gran tamaño, debido a que son muy pequeños (8 kb o menos). La región cos le confiere la facilidad para ser empaquetado *in vitro* por el sistema del fago, siempre que existan de 37 a 52 kb entre cos y cos, lo que implica una selección efectiva para insertos de entre 40-45 kb. Una vez que el fago haya inyectado el ADN en la bacteria, éste se comportará como un plásmido y podrá ser seleccionado por resistencia a ampicilina.

Se utilizan en la elaboración de genotecas de genomas grandes, pero una vez aislado el clon deseado, conviene caracterizarlo y subclonarlo en un plásmido convencional y de fácil manejo. (Brown, 1990; Peñafiel y García, 2001; Izquierdo, 2001).

**Cromosomas de bacterias (CAB):** constituyen unos interesantes vectores con dos características fundamentales: 1) permiten insertos de entre 100 y 300 kb y 2) los insertos permanecen estables sin reordenar o eliminar material interno, debido a la presencia de uno o dos por bacteria. Éstos se usan para elaborar genotecas de genomas de gran tamaño. Pueden ser construidos a partir de los factores de fertilidad F, los cuales son episomas que pueden mantenerse en el citoplasma como plásmidos o integrarse en el cromosoma de la bacteria. En este último caso, puede escindirse, duplicar una de las bandas y movilizarla en forma de hebra sencilla a otra bacteria por conjugación, llevándose parte del cromosoma bacteriano. Ya en célula receptora, el ADN pasa a hebra doble, habiendo dejado una copia de todo el cromosoma en la bacteria donante y creando un diploide parcial en la célula receptora. Éstos también pueden ser escindidos del cromosoma bacteriano y en su proceso de escisión puede tomar alguno de los genes bacterianos vecinos al lugar de la integración. Estos vectores son introducidos en la bacteria por electroporación. La selección de los transformantes se realiza por resistencia a cloranfenicol, y la presencia de insertos se confirma por hibridización.

También pueden ser construidos a partir del fago P1, los cuales se integran al cromosoma de la bacteria (lisogenia), al escindirse de nuevo, transportan genes próximos al lugar de integración; estos genes son transmitidos de una bacteria a otra por el proceso de transducción. Los CAB derivados de P1, mantiene estable insertos de hasta 100 kb. Éste confiere resistencia a kanamicina.

## Vectores de levaduras

Las levaduras son organismos eucariotas unicelulares. Son la alternativa natural en la producción a escala industrial de proteínas con interés farmacológico para terapia humana. Éstas son capaces de llevar a cabo procesos posteriores a la traducción (fosforilan, acetilan y glicosilan proteínas) que no realizan las bacterias y que pueden ser importantes para la expresión de un gen eucariótico en un sistema heterólogo. Además, son fáciles de cultivar y económicas de mantener. Por todo esto, las levaduras podrían actuar como hospedador alternativo para la expresión de proteínas humanas con interés biotecnológico.

Entre los vectores de levaduras que tienen un papel importante en la expresión de proteínas se encuentran:

- **Vectores de integración cromosómica:** son moléculas híbridas que contienen un plásmido procariótico y secuencias de levaduras. La presencia del plásmido facilita el crecimiento y preparación de grandes cantidades del vector en *E. coli*. Las secuencias de levadura permiten una integración en su propio genoma, introduciendo un gen de interés en la levadura. El pFA6-kanMx3 es un ejemplo de este tipo de vector.
- **Vectores de replicación autónoma:** se pueden replicar en forma libre sin necesidad de integración en el genoma del hospedador. Transforman levaduras con una eficiencia alta, pues no requieren una recombinación en el cromosoma para perpetuarse. Tienen las secuencias de replicación autónoma (SRA). Los vectores SRA/CEN son vectores SRA a los que se les ha añadido secuencias centroméricas para aumentar su estabilidad. Éstos a la vez se dividen en:
  - a) **Cromosomas artificiales (CAL):** son vectores SRA/CEN a los que se les han añadido telómeros cromosómicos (SRA/CEN/TEN). Son los vectores que permiten clonar los fragmentos más grandes de ADN (de 100 a 2.000 kb).



Básicamente estos vectores incluyen un plásmido procariótico para su propagación y preparación en *E. coli*. Se emplean preferentemente para elaborar librerías de genomas muy grandes, como el humano, o para mantener un gen completo con muchos intrones en un solo clon. Un ejemplo de este tipo de vectores es el pCAL2.

- b) Vectores basados en el plásmido 2  $\mu$ m: la levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee un plásmido endógeno de 2  $\mu$ m de longitud, que no confiere a la célula ninguna característica especial. Se le denomina simplemente "círculo de 2  $\mu$ m". El número de copias es de 50 a 100 unidades por célula y es estable. Los vectores basados en el círculo de 2  $\mu$ m tienen como finalidad la expresión del inserto, tanto a niveles de explotación farmacéutica de la proteína recombinante, como de sistema modelo en investigación básica o aplicada.
- c) Vectores de expresión de origen mixto: uno de los vectores de expresión más sofisticados es el  $\lambda$ ZAP pEL URA3 (plásmido de expresión de levadura URA3). Este vector es un fago que lleva otro vector procariótico bluescript M13(-), como inserto. El conjunto se denomina  $\lambda$ ZAP y tiene la gran ventaja de que en presencia de un virus auxiliar, F1 o M13, el bluescript puede escindirse *in vivo* de lambda y crecer como plásmido. Dentro del bluescript, se han insertado las secuencias de levaduras que le convierten en un excelente vector de expresión. Este vector de 6,4 kb queda incorporado en el  $\lambda$ ZAP, una vez que tenga el inserto del gen eucariótico (clones de ADNc en la mayoría de los casos). Una vez en la bacteria, se puede escindir con ayuda de un fago "auxiliar" y reproducirse, circularizado, como plásmido.

Todos estos vectores ofrecen la posibilidad de amplificar el vector en procariontes antes de ser introducidos en la levadura. El sistema de levaduras se utiliza fundamentalmente con la finali-

dad de expresar el gen clonado en un sistema eucariótico, con excepción de los YAC, donde la posibilidad de grandes insertos supera el interés tradicional (Izquierdo, 2001).

**d) Selección de bacterias que contienen el ADN recombinante, cuando se usan plásmidos como vector.**

En la mayoría de los casos, las células hospedadoras son bacterias seleccionadas por presentar las mejores propiedades de captación, selección y multiplicación de ADN recombinante. Entre los hospedadores eucariotas, como se mencionó anteriormente, las levaduras ocupan un lugar importante por ser organismos unicelulares, y fáciles de manejar y multiplicar a gran escala en el laboratorio. También se realizan clonaciones en células vegetales, pero las células animales son las de mayor interés en ciencias biomédicas. No obstante, la introducción de ADN en células eucariotas es más delicada y su cultivo es más complejo. Además, la replicación del vector con independencia de los cromosomas de la célula hospedadora es problemática, por lo que suele ser necesario utilizar vectores que permitan la integración estable del ADN foráneo en los cromosomas del hospedador. A pesar de ello, la introducción y expresión de genes en células eucariotas es cada vez más frecuente (Peñañiel y García, 2001).

Antes de seleccionar el gen de interés, la colección de fragmentos unidos al vector correspondiente debe introducirse en células hospedadoras adecuadas, como lo son las bacterias. El organismo hospedador amplifica los fragmentos recombinantes, facilitando su identificación. Como la transformación del hospedador, por introducción de moléculas recombinantes, se realiza en condiciones de gran exceso de células hospedadoras y de eficiencia limitada, se necesitan mecanismos sencillos para poder distinguir las bacterias que han captado ADN de las que no lo han hecho (Figura 10). La selección de las bacterias transformadas es sencilla cuando las moléculas recombinantes les confieren una nueva característica fácilmente identificable.

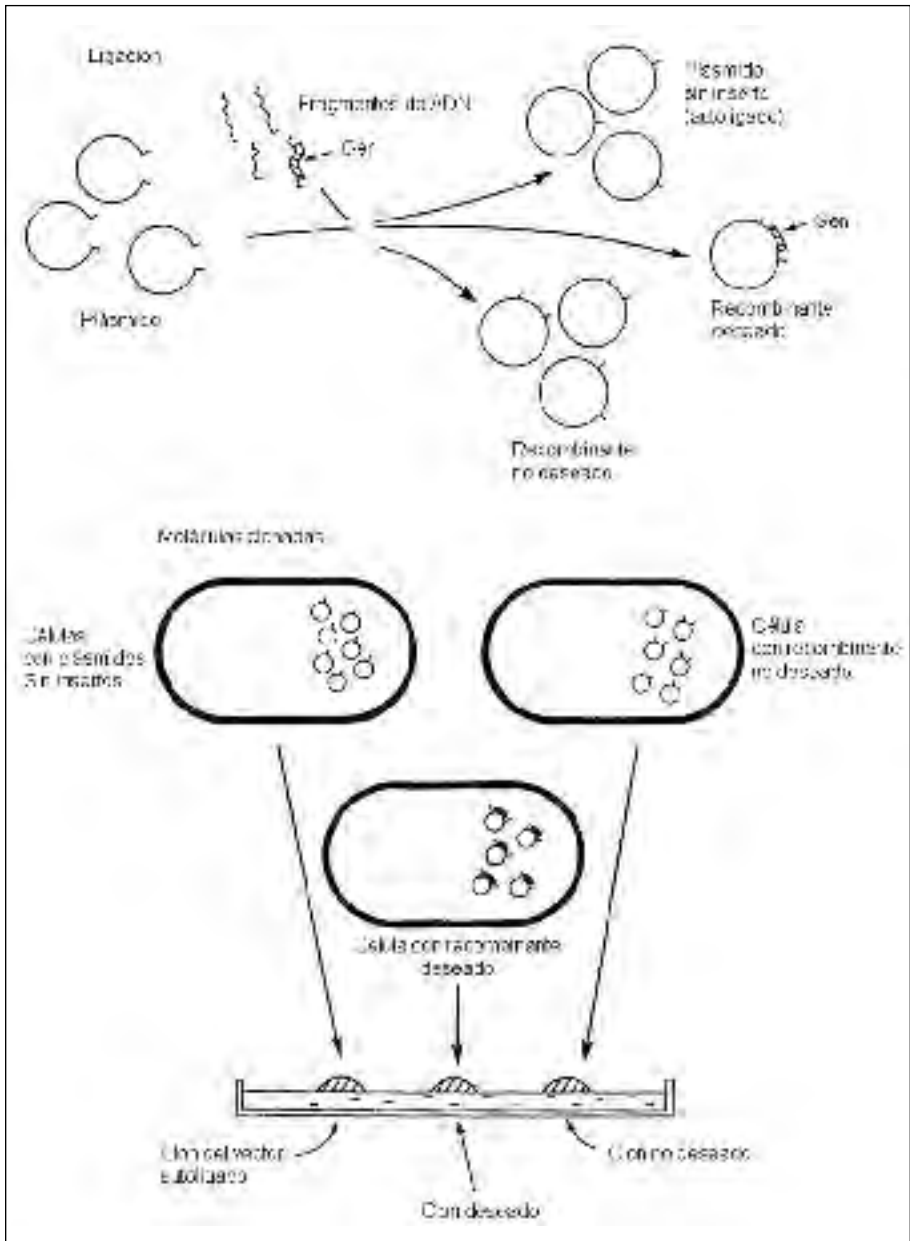


Figura 10. Clonación de un gen deseado utilizando plásmidos como vector (Fuente: Brown. 1990).

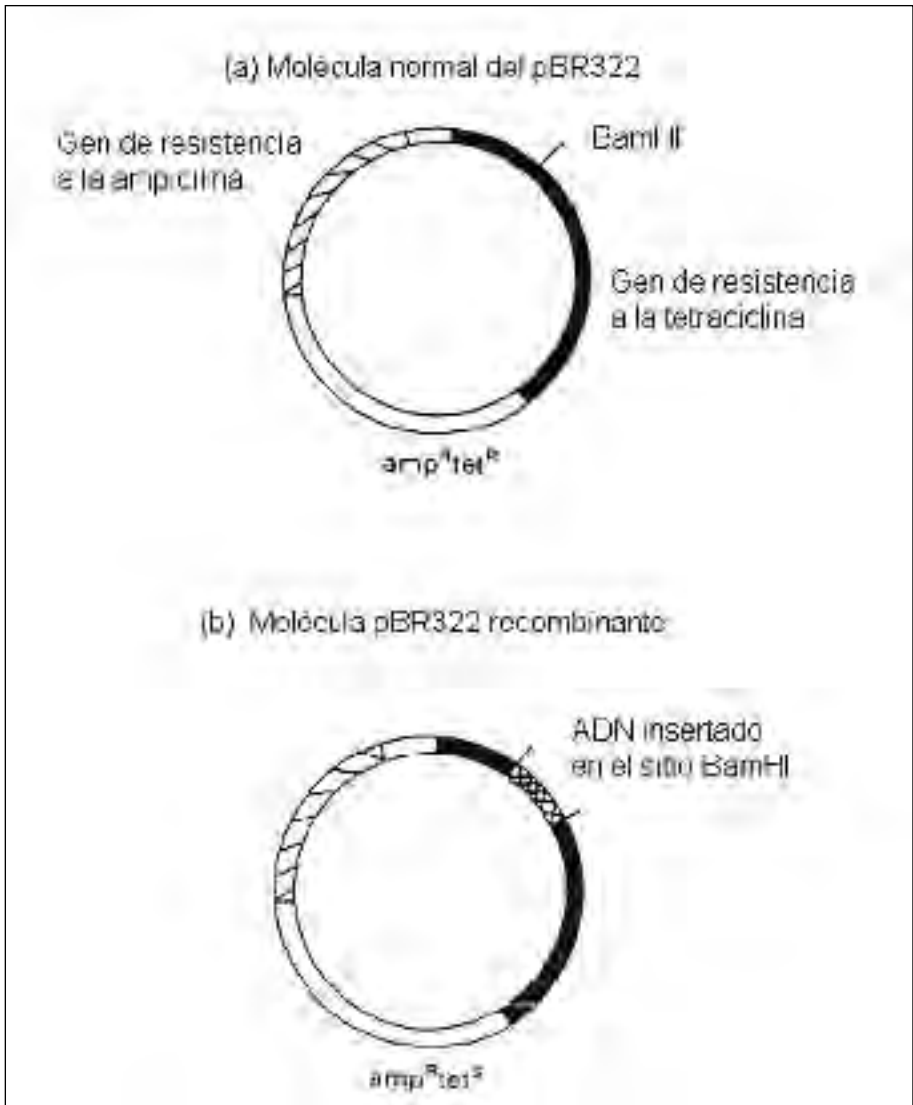
## Selección por inactivación de un marcador

La mayoría de los vectores de clonación son diseñados de manera tal que la inserción de un fragmento de ADN dentro del plásmido destruye la integridad de uno de los genes presentes en la molécula. En este caso, al insertarse en un gen que codifica un marcador de selección, éste se inactiva y de esa forma se seleccionan las células transformadas que albergan el vector ligado al ADN recombinante de aquellas células transformadas que contienen plásmidos normales (sin ADN recombinante).

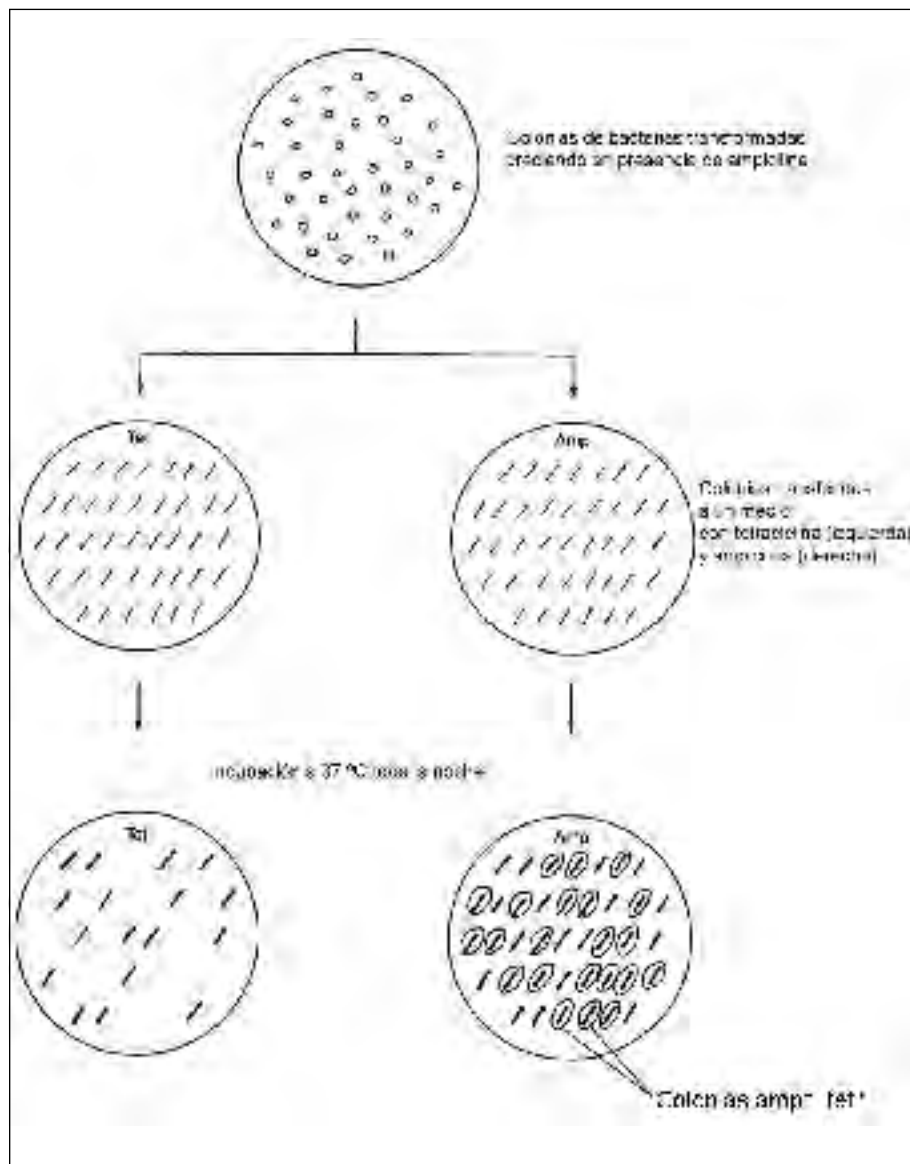
Los marcadores comúnmente usados son genes que confieren resistencia a antibióticos como ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol y kanamicina. Prácticamente todos los plásmidos contienen uno o más genes de resistencia a antibióticos (Sambrook y col., 1989).

Por ejemplo, el plásmido pBR322, el cual confiere a la célula receptora resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina ( $\text{amp}^R \text{tet}^R$ ), tiene varios sitios de restricción que pueden ser usados para abrir el vector antes de la inserción del nuevo fragmento de ADN. BamHI es uno de ellos y corta al plásmido en un punto dentro del conjunto de genes que codifican para resistencia a la tetraciclina. La molécula recombinante de pBR322, una vez que incorpora un fragmento de ADN extra en el sitio BamHI, pierde la resistencia a la tetraciclina, ya que los genes necesarios para ello son interrumpidos por el ADN insertado (Figura 11).

Las células que contengan este plásmido recombinante serán todavía resistentes a la ampicilina pero sensibles a la tetraciclina; por lo tanto, las colonias de bacterias que crecen en una placa con ampicilina y no crecen en la placa con tetraciclina serán células que tienen el recombinante ( $\text{amp}^R \text{tet}^S$ ) (Figura 12) (Sambrook y col., 1989; Brown, 1990).



**Figura 11. a) Vector de clonación pBR322. Molécula normal. (b) Molécula recombinante conteniendo un fragmento de ADN en el sitio BamHI (Fuente: Brown. 1990).**

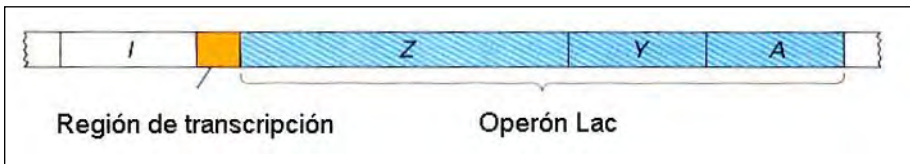


**Figura 12. Selección por inactivación por inserción de un ADN foráneo en un gen de resistencia a antibiótico de un plásmido (Fuente: Sambrook y col., 1989).**

## Selección por inactivación del gen Lac Z'

Para abordar el próximo ejemplo es importante explicar el operón Lac presente en la bacteria *E. coli*, analizado por primera vez por los científicos Francois Jacob y Jaques Monod, en 1960, y por el cual ganaron el premio Nobel en 1965 junto al investigador Andre Lwoff.

Este operón posee tres genes: Z, Y y A. El Lac Y codifica la enzima lactosa permeasa, responsable de la entrada de la lactosa a la célula. El gen Lac Z codifica la  $\beta$ -galactosidasa, la cual hidroliza a la lactosa en glucosa y galactosa. El gen Lac A codifica la tiogalactósido transacetilasa de función fisiológica no bien conocida (Figura 13).



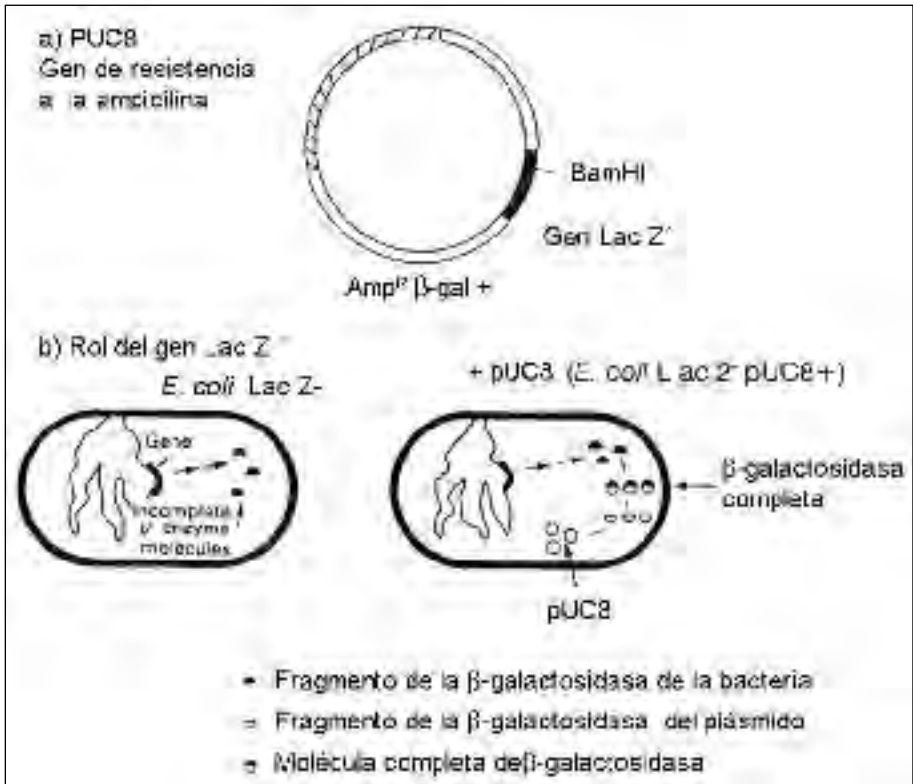
**Figura 13. Operón Lac (Fuente: Lodish y col., 1995).**

La síntesis de  $\beta$ -galactosidasa y lactosa permeasa es inhibida cuando el medio en el que crecen las bacterias tiene glucosa como única fuente de carbón y energía, e incrementada cuando estas células crecen en medio con lactosa. Algunas moléculas similares en estructura a la lactosa pueden inducir la expresión de los genes del operón Lac; aun cuando ellas no pueden ser hidrolizadas por la  $\beta$ -galactosidasa, estas moléculas son llamadas inductores. Una de ellas es el Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido, abreviado IPTG. Es particularmente útil en los estudios genéticos del operón Lac debido a que él puede entrar a la célula y como no es metabolizado, su concentración permanece constante a través del ensayo. Cuando las bacterias *E. coli* son colocadas

en placas con IPTG y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido (X-gal), compuesto incoloro que también es hidrolizado por  $\beta$ -galactosidasa produciendo un compuesto insoluble de color azul, todas las colonias que crecen son azules. Cuando son colocadas en placas con X-gal sin IPTG, las colonias resultantes serán blancas, en este caso no hay suficiente  $\beta$ -galactosidasa en la célula para hidrolizar el X-gal y producir la coloración azul. A la izquierda del gen Lac Z hay una región llamada gen Lac I, el cual codifica para una proteína que normalmente reprime la expresión del operón Lac en la ausencia de lactosa, de ahí que los investigadores la denominaron represor Lac y propusieron que su unión al sitio del genoma de *E. coli* donde se inicia la transcripción del operón Lac, lo bloqueaba. Más adelante, propusieron la hipótesis que cuando la lactosa está presente en la célula, ésta se une a la proteína represor Lac, disminuyendo su afinidad por el sitio de unión del represor en el ADN. Como resultado, el represor falla y la transcripción del operón Lac se inicia, conduciendo a la síntesis de  $\beta$  galactosidasa, lactosa permeasa y tiogalactósido transacetilasa (Lodish y col., 1995).

Un ejemplo de esta selección es el plásmido pUC8, el cual contiene el gen para la resistencia a la ampicilina y un segmento de ADN derivado del operón Lac de *E. coli*, llamado gen Lac Z', que codifica para la porción amino terminal de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, cuya síntesis también es inducida por IPTG. Vectores de este tipo son usados con cepas de *E. coli* que tienen el gen Lac Z modificado (Lac-), faltándoles el segmento conocido como Lac Z'. Estas bacterias pueden sintetizar sólo la porción carboxi- terminal de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, por lo que la célula hospedadora y el plásmido se asocian para formar la proteína enzimáticamente activa. Las células que transportan el plásmido normal pUC8 serán ampicilina resistentes y capaces de sintetizar ambos fragmentos de la enzima, formando colonias azules cuando el medio contiene X-gal (Figura 14).



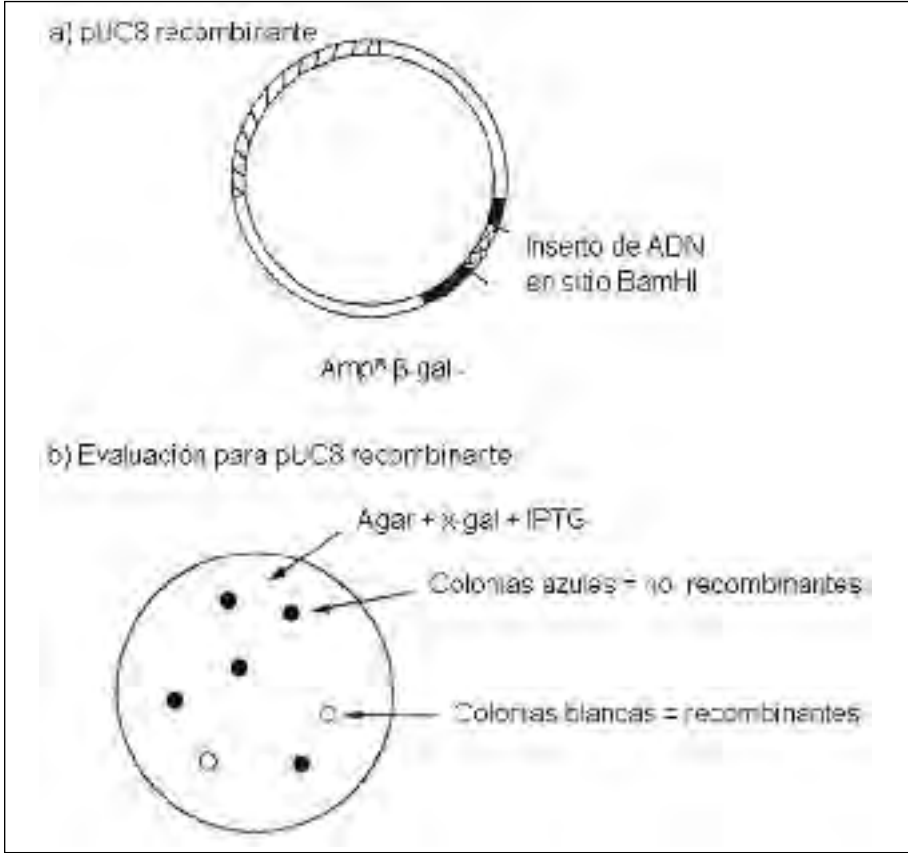


**Figura 14. Selección por inactivación por inserción de un ADN foráneo en el gen Lac Z' del plásmido pUC8. a) Molécula normal. b) Producción de la molécula completa de la enzima β-galactosidasa (Fuente: Brown, 1990).**

La clonación con pUC8, que incluye la inactivación por inserción en el gen Lac Z' de un fragmento de ADN foráneo, produce colonias ampicilina resistentes pero incapaces de sintetizar la enzima, ya que la inserción del ADN foráneo en el sitio de policlonaje del plásmido, inactiva el fragmento amino terminal de la enzima β-galactosidasa (Figura 15).

Para la selección, en el agar con X-gal más el inductor de la enzima como es el IPTG en conjunto con ampicilina, las colonias no-

recombinantes serán azul oscuro, mientras las que tienen el gen Lac Z' recombinante son incapaces de sintetizar la enzima y por lo tanto serán blancas (Sambrook y col., 1989; Brown, 1990).



**Figura 15. a) pUC8 recombinante con inserto de AND en el sitio bamHI. b) Selección de las recombinantes en agar conteniendo x-gal más IPTG (Fuente: Brown. 1990).**

**e) Selección de fagos recombinantes**

El estado final de un ciclo de infección de un fago es la lisis celular. Si las células infectadas son esparcidas sobre un medio

sólido de agar, inmediatamente después de haberse incubado con los fagos, la lisis celular puede ser visualizada como placas o espacios abiertos sin bacterias. Cada placa es una zona clara producida por la lisis de los fagos sobre las bacterias, los cuales infectan nuevas células vecinas provocando su lisis. El resultado final de un experimento de clonación de genes usando fagos como vectores es una placa de agar cubierta de placas de fagos. Cada placa es el resultado de una célula infectada y por lo tanto contiene partículas de fagos idénticas. Ellas pueden contener vectores recombinantes y no recombinantes. Entre las diferentes formas para lograr la selección de los fagos recombinantes (Figura 16), se encuentran las siguientes:

- Inactivación por inserción del gen Lac Z' transportado por el fago: la inserción de un nuevo ADN dentro del gen Lac Z' inactiva la síntesis de  $\beta$ -galactosidasa, y al igual como sucede con el plásmido pUC8, los fagos recombinantes son distinguidos cuando se usan hospedadores Lac- en presencia de un sustrato cromógeno X-gal, por su habilidad de formar placas claras y las de los fagos no recombinantes serán azules.
- Selección usando el fenotipo SPI: el fago  $\lambda$  normalmente no puede infectar células de *E. coli* que posean un profago conocido como P2. A estos fagos se les llama Spi+ (sensibles a la inhibición del profago P2). Algunos fagos  $\lambda$  son escogidos de tal manera que la inserción de un nuevo ADN causa un cambio de Spi+ a Spi-, (carecen de dos genes involucrados en la recombinación, genes *red* y *gam*) por lo que el recombinante puede infectar células que transportan el profago P2. Tales células son usadas como receptoras para experimentos de clonación con estos vectores, solamente las recombinantes Spi- producirán placas (Sambrook y col., 1989; Brown, 1990).
- Selección sobre la base del tamaño del genoma  $\lambda$ : el sistema de ensamblaje  $\lambda$ , que ensambla partículas de fagos

maduras, puede insertar sólo moléculas de ADN entre 37 y 52 Kb dentro de la cabeza del fago. Cualquier molécula inferior o menor a 37 Kb no podrá ser ensamblada. Muchos vectores han sido construidos cortando segmentos largos de la molécula de ADN  $\lambda$  para ser menores de 37 Kb de largo. Así, el fago será ensamblado solamente después que el ADN extra se haya insertado, dándole al genoma un tamaño por encima de los 37 Kb. Por lo tanto los fagos recombinantes serán los capaces de replicarse y lisar las células (Brown, 1990).

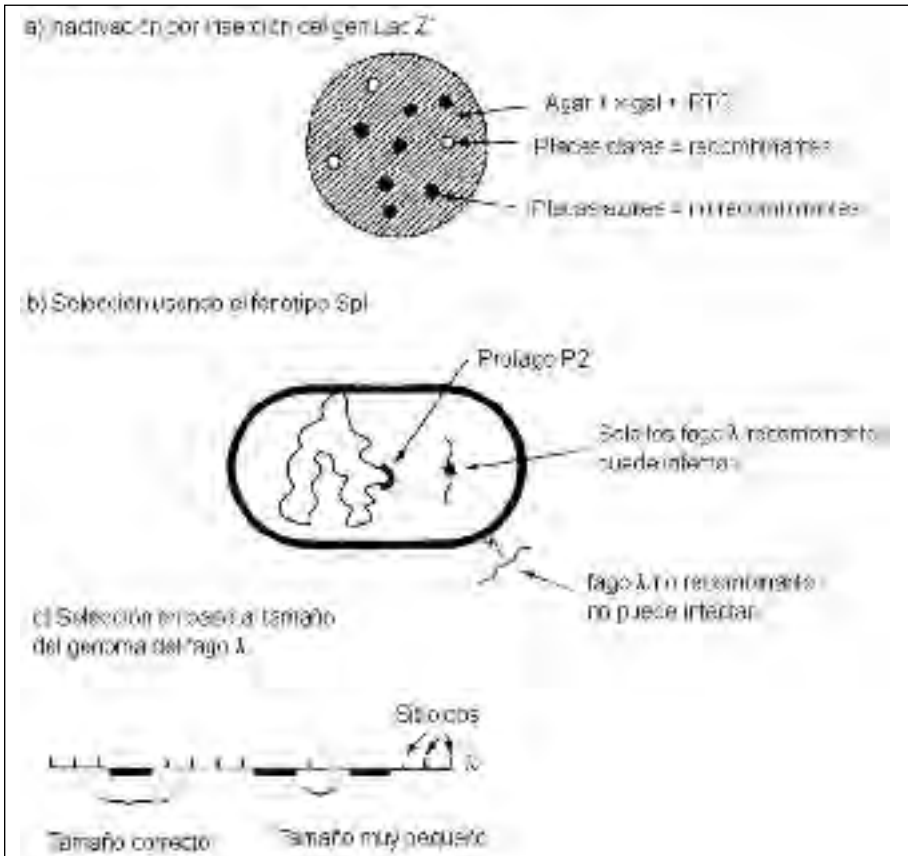


Figura 16. Estrategias para seleccionar fagos recombinantes (Fuente: Brown, 1990).

## f) Métodos para evaluar las genotecas

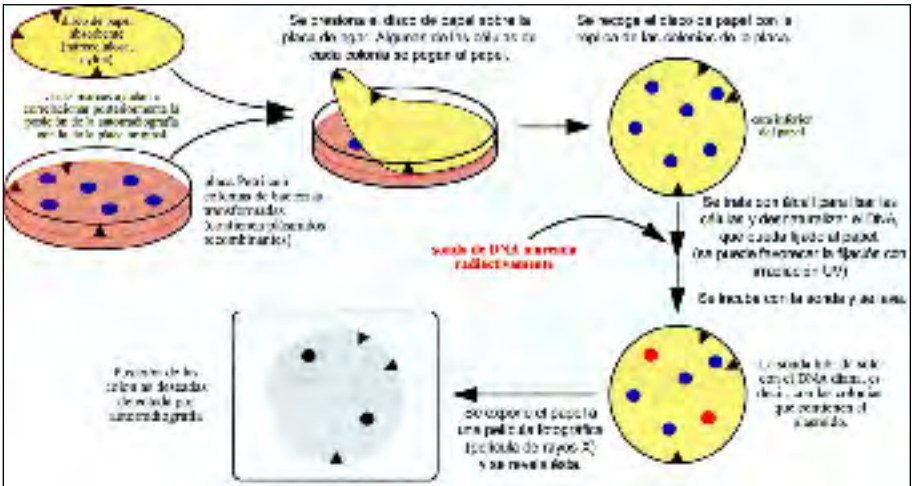
La identificación de las células transformadas por un ADN recombinante concreto, que ha incorporado un inserto específico entre los muchos posibles, requiere la posesión de un método de detección del gen o producto del gen, de forma que se puede aislar el clon recombinante, entre las diferentes colonias de bacterias o fagos (Peñañiel y García, 2001). Entre los métodos que existen para evaluar las genotecas están: hibridización con sondas de ácido nucleico radiomarcadas y detección inmunológica de antígenos específicos.

En 1975, Grunstein y Hogness describieron un método para la lisis *in situ* de colonias bacterianas en filtro de nitrocelulosa y unión no covalente del ADN liberado a el filtro. Entonces, el ADN puede ser hibridizado por sondas apropiadas de ácido nucleico radiomarcado.  $2 \times 10^4$  colonias por filtro de 138 mm o  $10^4$  colonias por filtro de 82 mm pueden ser evaluadas usando esta técnica (Sambrook y col., 1989).

Para detectar cuál de las colonias recombinantes que crece en la placa de agar posee un inserto determinado (Figura 17), se presiona suavemente un filtro de nitrocelulosa sobre la placa de agar, de modo que algunas células de cada colonia se peguen al filtro, formando una réplica de la placa. La réplica se trata con álcali para romper las células y desnaturalizar el ADN, que queda unido al filtro, y se incuba después con la sonda radiactiva (casi siempre marcada con  $^{32}\text{p}$ ). Por autorradiografía, se obtiene una imagen que permite detectar la posición en la placa de agar de la colonia o colonias de interés (Luque y Herráez, 2001; Peñañiel y García, 2001; Izquierdo, 2001).

Otro método es el análisis de ADN plasmídico sometido a digestión con enzimas de restricción. Para esto, un número de colonias bacterianas transformadas son tomadas y colocadas a crecer en cultivo a pequeña escala. El ADN de los plásmidos es aislado de cada cultivo y analizado por digestión con enzimas de

restricción y electroforesis en gel. Este procedimiento, aunque laborioso, es el método de elección cuando hay una alta probabilidad de encontrar el recombinante deseado dentro de un pequeño número de colonias transformadas escogidas al azar (Sambrook y col., 1989).



**Figura 17. Selección de la colonia de bacterias con el recombinante deseado por medio del método de hibridación (Fuente: Luque y Herráez, 2001)**

En el caso de los bacteriófagos, es similar. Después que una colección de fagos ha sido preparada, es necesario identificar y aislar el recombinante deseado de la población. El método comúnmente usado involucra una evaluación de las placas de los bacteriófagos por hibridación con sondas de ADN marcadas con <sup>32</sup>p (Benton y Davis, 1977) (Figura 18). Los bacteriófagos son sembrados en una densidad adecuada y para imprimir una copia del patrón de las placas, se coloca un filtro de nitrocelulosa sobre la superficie del top agar. Las partículas del bacteriófago y el ADN son transferidas al filtro por capilaridad y así se obtiene un patrón exacto de las placas. Luego de una desnaturalización con álcali, el ADN se une irreversiblemente al filtro y puede ser

hibridado con la sonda marcada con  $^{32}\text{p}$ . El exceso de la sonda se elimina por lavados y los filtros son expuestos a una película o placa autorradiográfica. Las placas hibridadas son identificadas por alineación de la película con la placa de agar original y recolectadas para su análisis. Este método es valioso para identificar un pequeño número de bacteriofagos recombinantes que porten secuencias de interés en genotecas genómicas o de ADNc (Sim y col., 1979). En placas de Petri de 90 mm se pueden evaluar un máximo de 15.000 placas y en una placa de Petri de 150 mm se puede evaluar 50.000 placas. (Sambrook y col., 1989).



**Figura 18.** Identificación de un clon específico de fagos recombinantes por el método de hibridación (Fuente: Lodish y col., 1995).

Se han desarrollado bacteriófagos  $\lambda$  no sólo para permitir la propagación de secuencias foráneas, sino también para permitir su expresión en la célula bacteriana. El vector de este tipo más comúnmente usado, es  $\lambda$ gt11 (Huynh y col., 1985). Éste porta una porción del gen de la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*, incluyendo los elementos que son esenciales para su expresión. Las genotecas de ADNc construidas con  $\lambda$ gt11 y  $\lambda$ gt18-23 pueden ser evaluadas inmunológicamente por la expresión de antígenos específicos en *E. coli* (Figura 19). Esto ha permitido el aislamiento de muchos genes que codifican para proteínas, utilizando anticuerpos específicos. El  $\lambda$ ORF8 es otro vector de expresión usado con éxito.

Las genotecas con plásmidos son más difíciles de almacenar, replicar y evaluar que aquellas construidas con bacteriófagos  $\lambda$ . Por esta razón, la evaluación inmunológica de genotecas de ADNc es usualmente llevada a cabo en genotecas construidas en bacteriófago  $\lambda$  de expresión como  $\lambda$ gt11 y sus derivados,  $\lambda$ ORF8 y  $\lambda$ Zap.

Cuando hay la disponibilidad de los dos métodos, la hibridización con sondas de ácido nucleico radiomarcado es el preferido, debido a que se puede usar bajo diferentes grados de astringencia. Las sondas de ácidos nucleicos detectan todos los clones que contienen secuencias de ADNc, mientras los anticuerpos sólo reaccionan con un subconjunto de estos clones (en algunos casos uno de seis) en los cuales el ADNc ha sido insertado en el vector, en el correcto marco de lectura y orientación. Las genotecas de ADNc que son evaluadas con anticuerpos necesitan ser más grandes (por un factor por lo menos de seis) que aquellas que son evaluadas por sondas de ácidos nucleicos. La evaluación por hibridización con ácido nucleico no requiere que el ADNc clonado esté completo y no requiere que el producto sintetizado en la célula hospedadora sea funcional y mantenga sus propiedades antigénicas (Sanbrook y col., 1989).



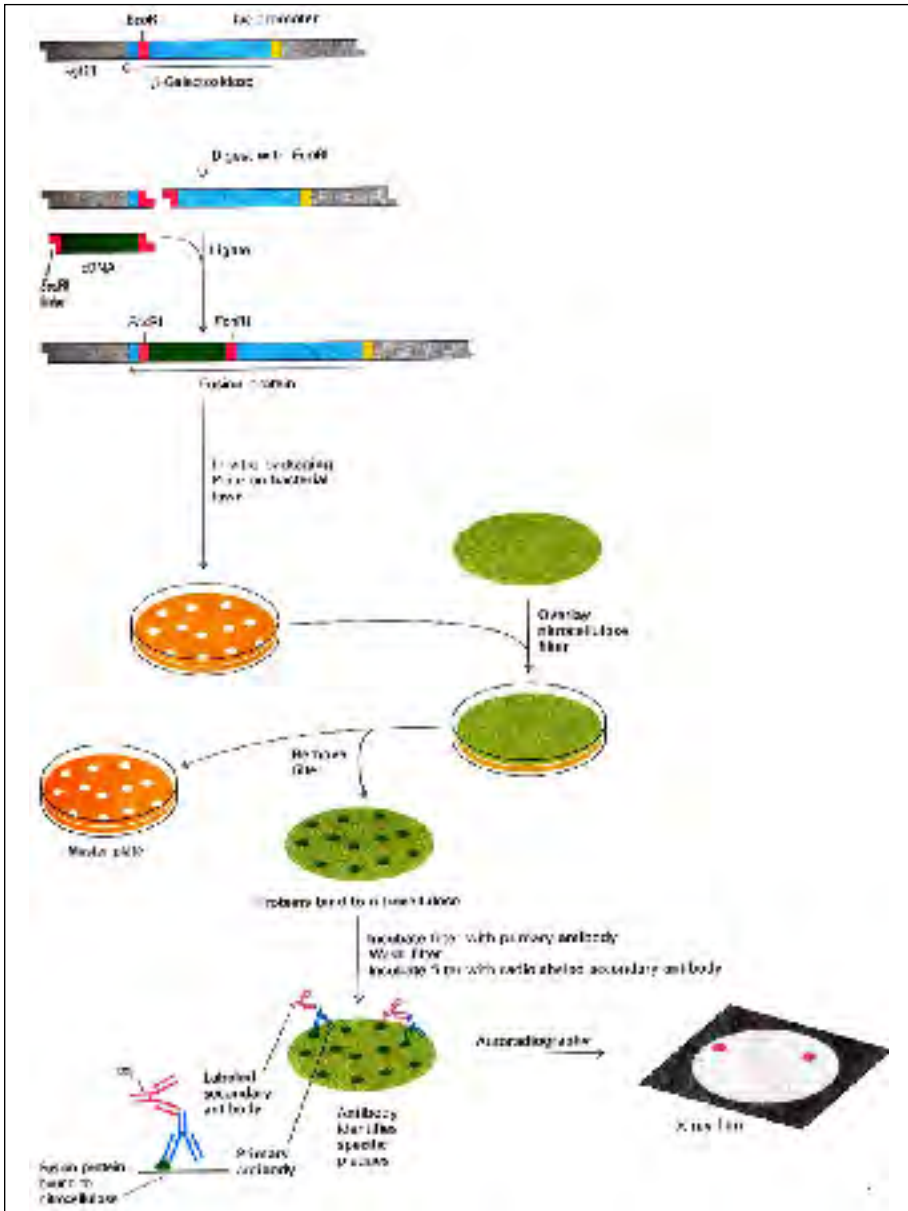


Figura 19. Evaluación inmunológica de una genoteca, debido a la expresión de proteínas, utilizando anticuerpos radiomarcados (Fuente: Lodish y col.,1995).

Actualmente también se usan otros sistemas de marcaje incorporados a la sonda o al anticuerpo. Entre estos marcajes se encuentran: el sistema biotina-avidina, en el cual la proteína avidina lleva acoplado un marcador fluorescente y la detección se hace por fluorescencia. Otro es el uso de enzimas que actúan sobre sustratos que dan un producto coloreado o quimioluminiscente, el cual se detecta por autoradiografía. Un ejemplo de este último es el uso de la enzima peroxidasa que degrada el luminol con la emisión de quimioluminiscencia (Brown, 1990; Luque y Herráez, 2001).

### **g) Ejemplos de genotecas.**

Se han elaborado genotecas tanto de ADNc como genómicas de variados agentes patógenos (Cuadro 3), lo que ha permitido un conocimiento de las bases moleculares de muchas enfermedades.

**Cuadro 3. Algunos agentes patógenos para los cuales se han elaborado genotecas**

<b>Agente patógeno</b>	<b>Tipo de genoteca</b>	<b>Referencia</b>
<i>Anaplasma marginale</i>	ANDg	Aboytes y Buening, 1990
<i>Babesia bigemina</i>	ANDc	Valencia, 2002
<i>Babesia bovis</i>	ADNc	Gill y col., 1987; Ruef y col., 2000 Allred y Al-Khedery, 2004
<i>Babesia bovis</i>	ANDg	Petchpoo y col., 1992
<i>Babesia divergens</i>	ADNc	DelbecQ y col., 2002
<i>Babesia equi</i>	ADNc	Schelp y col., 1995
<i>Babesia gibsoni</i>	ADNc	Fukumoto y col., 2001 Fukumoto y col., 2003
<i>Babesia microti</i>	ADNg	Homer y col., 2000 Homer y col., 2003; Lodes y col., 2000
<i>Brugia pahangi</i>	ADNc	Hunter y col., 1999
<i>Cryptosporidium parvum</i>	ADNc	Petry y col., 1998
<i>Dictyocaulus viviparus</i>	ANDc	Britton y col., 1995
<i>Echinococcus granulosus</i>	ADNc	Margutti y col., 1999
<i>Eimeria tenella</i>	ADNc	Ouarzane y col., 1998; Refega y col., 2003
<i>Leishmania major</i>	ANDc	Piedrafita y col., 1999; Stober, 2004
<i>Necator americanus</i>	ANDc	Zhan y col., 2000
<i>Neospora caninum</i>	ANDc	Hemphill y col., 1997
<i>Plasmodium berghei</i>	ANDc	Shibui y col., 2001
<i>Plasmodium falciparum</i>	ANDc	Watanabe y col., 2001
<i>Plasmodium vivax</i>	ANDc	Qui y Tong, 1994
<i>Psoroptes ovis</i>	ANDc	Lee y col., 1999
<i>Sarcoptes scabiei</i>	ANDc	Harumal y col., 2003
<i>Schistosoma mansoni</i>	ANDc	Zouain y col., 1998
<i>Taenia saginata</i>	ANDc	Ferrer y col., 2003
<i>Taenia solium</i>	ANDc	Jiménez y col., 2000
<i>Toxoplasma gondii</i>	ANDc	Striepen y col., 2002
<i>Trichomona vaginalis</i>	ANDc	Arroyo y col., 1995
<i>Wuchereria bancrofti</i>	ANDg	Raghavan y col., 1991

## h) Importancia de la elaboración de una genoteca

Una vez que el ADN ha sido clonado, se pueden multiplicar los clones individuales en cualquier momento y obtener un fragmento de ADN recombinante en cantidad suficiente, a partir de lo cual se abren diversas posibilidades, tanto en el ámbito de la investigación pura (estudio de la estructura y la función de un gen) y aplicada (obtención de plantas o animales transgénicos), como en la esfera médica (diagnóstico y tratamiento de enfermedades).

Hay muy pocas áreas de la investigación biológica que no han sido afectadas por la clonación de genes. En la industria, por ejemplo, la clonación de genes ha permitido alcanzar enormes avances en biotecnología. Por muchos años han sido utilizados bacterias y hongos como fábricas vivientes las cuales producen componentes muy útiles como los antibióticos, por ejemplo la penicilina, la cual es sintetizada por un hongo *Penicillium* y la estreptomycinina, producida por una bacteria *Streptomyces griseus*. La clonación ha revolucionado la biotecnología de una forma notable, proporcionando una vía en la cual, proteínas de mamíferos puedan ser producidas dentro de células bacterianas. Los genes que controlan la síntesis de importantes principios activos farmacéuticos, tales como drogas, hormonas, pueden ser tomadas de los organismos donde están presentes naturalmente, pero que su obtención a partir de los organismos naturales puede ser costosa y difícil, y al colocarlos en una bacteria, el producto puede ser recuperado fácilmente y en mayores cantidades. Un ejemplo es la insulina recombinante (Peñafiel y García, 2001).

De ahí la importancia de las genotecas, como herramienta para la obtención de conocimiento más preciso de las bases moleculares de muchas enfermedades y de nuevas posibilidades terapéuticas.

### III Bibliografía consultada

- Aboytes-Torres, R. y Buening, G.M. 1990. Development of a recombinant *Anaplasma marginale* DNA probe. *Vet. Microbiol.* 24(3-4):391-408.
- Allred, D. R. y Al-Khedery, B. 2004. Antigenic variation and cytoadhesion in *Babesia bovis* and *Plasmodium falciparum*, different logics achieve the same goal. *Mol Biochem parasitol.* 134 (1):27-35.
- Arroyo, R.; Engbring, J.; Nguyen, J.; Musatovova, O.; Lopez, O.; Lauriano, C. y Alderete, J.F. 1995. Characterization of cDNAs encoding adhesin proteins involved in *trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Arch. Med. Res.* 26(4):361-9.
- Balbás, P.; Soberón, X.; Merino, E.; Zurita, M.; Lomeli, H.; valle, F.; Flores, N. y Bolívar, F. 1986. Plasmid vector pbr322 and its special-purpose derivatives. *Gene* 50:3.
- Benton, W.D. y Davis, R.W. 1977. Screening  $\lambda$ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196:180.
- Bolívar, F.; Rodríguez, M.C.; Betlach, M.C. y Boyer, H. W. 1977a. Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of the plasmid pMB9. *Gene.* 2: 75
- Bolívar, F.; Rodríguez, M.C.; Greene, P.J.; Betlach, M.C.; Heyneker, H.L.; Boyer, H. W.; Crosa, J.H. y Falkow, S. 1977b. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95
- Britton, C.; Moore, J.; Gilleard, J.S. y Kennedy, M.W. 1995. Extensive diversity in repeat unit sequences of the cDNA encoding the polyprotein antigen/allergen from the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 72(1-2):77-88.
- Brown, T. A. 1990. *Gene Cloning*. Segunda edición. Chapman and May. 286 p
- Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y.; Boyer, H.W. y Helling, R.B. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3240

- Campbell, A. M. (2001). Bacteriophages. En: Fields Virology. Knipe, D.M. and Howley, P.M. Editors in chief and associate editors. Vol 1. 659 - 682
- Covey, C.; Richardson, D. y Carbon, J. 1976. A method for the deletion of restriction sites in bacterial plasmid deoxyribonucleic acid. Mol. Gen. Genet. 145: 155
- De Robertis, E.M.F.; Hib, J. y Ponzio R. 1998. Métodos de estudio en biología celular. En; Biología Celular y Molecular de Eduardo D.P. De Robertis. Editorial El Ateneo.45 –80
- Delbecq, S.; Precigout, E.; Vallet, A.; Carcy, B.; Schetters, T.P.M. y Gorenflot, A. 2002. *Babesia divergens*: cloning and biochemical characterization of Bd37. Parasitology. 125: 305-312.
- Ferrer, E.; Moyano, E.; Benitez, L.; Gonzalez, L.M.; Bryce, D.; Foster-Cuevas, M.; Davila, I.; Cortez, M.M.; Harrison, L.J.; Parkhouse, R.M. y Garate, T. 2003. Cloning and characterization of *Taenia saginata* paramyosin cDNA. Parasitol. Res. 91(1):60-7.
- Fukumoto, S.; Xuan, X.; Nishikawa, Y.; Inoue, N.; Igarashi, I.; Nagasawa, H.; Fujisaki, K. y Mikami, T. 2001. Identification and expression of a 50-kilodalton surface antigen of *Babesia gibsoni* and evaluation of its diagnostic potential in an enzyme-linked immunosorbent assay. J. Clin. Microbiol. 39(7):2603-9.
- Fukumoto, S.; Xuan, X.; Inoue, N.; Igarashi, I.; Sugimoto, C.; Fujisaki, K.; Nagasawa, H.; Mikami, T. y Suzuki, H. 2003. Molecular characterization of a gene encoding a 29-kDa cytoplasmic protein of *Babesia gibsoni* and evaluation of its diagnostic potentiality. Mol. Biochem. Parasitol. 131(2):129-36
- GIBCO™ BRL. 1999. TRIzol<sup>®</sup> Reagent. Total RNA isolation Reagent. Instruction Manual.
- Gill, A.; Timms, P. y Kemp, D.J. 1987. cDNA clone encoding a high molecular weight antigen of *Babesia bovis*. Mol. Biochem. Parasitol. 22(2-3):195-202. Grunstein, M. y Hogness, D. S. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gen. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 396.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557.

- Hanahan, D. y Meselson, M. 1983. plasmid screening at high colony density. *Gene* 10:63.
- Harumal, P.; Morgan, M.; Walton, S.F.; Holt, D.C.; Rode, J.; Arlian, L.G.; Currie, B.J. y Kemp, D.J. 2003. Identification of a homologue of a house dust mite allergen in a cDNA library from *Sarcoptes scabiei* var *hominis* and evaluation of its vaccine potential in a rabbit/*S. scabiei* var. *canis* model. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68(1):54-60.
- Hemphill, A.; Felleisen, R.; Connolly, B.; Gottstein, B.; Hentrich, B. y Muller, N. 1997. Characterization of a cDNA-clone encoding Nc-p43, a major *Neospora caninum* tachyzoite surface protein. *Parasitology.* 1997 Dec;115 (Pt 6):581-90
- Hershfield, V.; Boyer, H.W.; Yanofsky, C.; Lovett, M.A. y Helinski, D.R. 1974. Plasmid ColE1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71: 3455
- Homer, M.J.; Lodes, M.J.; Reynolds, L.D.; Zhang, Y.; Douglass, J.F.; McNeill, P.D.; Houghton, R.L. y Persing, D.H. 2003. Identification and characterization of putative secreted antigens from *Babesia microti*. *J. Clin. Microbiol.* 41(2):723-9.
- Homer, M.J.; Bruinsma, E.S.; Lodes, M.J.; Moro, M.H.; Telford S 3<sup>rd</sup>; Krause, P.J.; Reynolds, L.D.; Mohamath, R.; Benson, D.R.; Houghton, R.L.; Reed, S.G. y Persing, D.H. 2000. A polymorphic multigene family encoding an immunodominant protein from *Babesia microti*. *J. Clin. Microbiol.* 38(1):362-8.
- Hunter, S.J.; Martin, S.A.; Thompson, F.J.; Tetley, L. y Devaney, E. 1999. The isolation of differentially expressed cDNA clones from the filarial nematode *Brugia pahangi*. *Parasitology.* 119 (Pt 2):189-98.
- Huynh, T.V.; Young, R.A. y Davis, R.W. 1985. Constructing and screening cDNA libraries in  $\lambda$ gt10 and  $\lambda$ gt11. In *DNA cloning: A practical approach* (ed. D.M. Glover), vol. 1, p. 49. IRL Press, Oxford.
- Izquierdo, M. 2001. *Ingeniería Genética y Transferencia Génica*. Editorial Pirámide. 341 p
- Jiménez, L.; Vibanco-Perez, N.; Navarro, L. y Landa, A. 2000. Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *Int. J. Parasitol.* 30(9):1007-12

- Lee, A.J.; Isaac, R.E. y Coates, D. 1999. The construction of a cDNA expression library for the sheep scab mite *Psoroptes ovis*. *Vet. Parasitol.* 83(3-4):241-52.
- Lewin, B. 2001. *Genes VII*. Marbán. 990p
- Lodes, M.J.; Houghton, R.L.; Bruinsma, E.S.; Mohamath, R.; Reynolds, L.D.; Benson, D.R.; Krause, P.J.; Reed, S.G. y Persing, D.H. 2000. Serological expression cloning of novel immunoreactive antigens of *Babesia microti*. *Infect.Immun.* 68(5): 2783-90.
- Lodish, H.; Baltimore, D.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaria, P. y Darnell, J. 1995. *Molecular Cell Biology*. Third edition. Scientific American Books. 1344 p
- Luque, L. y Herráez, A. 2001. *Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. Ediciones Harcourt. 469p.
- Margutti, P.; Ortona, E.; Vaccari, S.; Barca, S.; Rigano, R.; Teggi, A.; Muhschlegel, F.; Frosch, M. y Siracusano, A. 1999. Cloning and expression of a cDNA encoding an elongation factor 1beta/delta protein from *Echinococcus granulosus* with immunogenic activity. *Parasite Immunol.* 21(9):485-92.
- Ouarzane, M.; Labbe, M y Pery, P. 1998. *Eimeria tenella*: cloning and characterization of cDNA encoding a S3a ribosomal protein. *Gene*, 225(1-2): 125-30.
- Peñafiel, R. y García-Borrón, J.C. 2001. *Análisis Molecular del Genoma, Técnicas y Aplicaciones*. En: *Bioquímica y Biología Molecular para Ciencias de la Salud*. Ed: Lozano, J.A.; Galindo, J.D.; García-Borrón, J.C.; Martínez-Liarte, J.H.; Peñafiel, R. y Solano, F. 2da Edición. McGraw-Hill Interamericana. 226 p
- Petchpoo, W.; Tan-ariya, P.; Boonsaeng, V.; Brockelman, C.R.; Wilairat, P. y Panyim, S. 1992. A specific DNA probe which identifies *Babesia bovis* in whole blood. *Vet. Parasitol.* 42(3-4):189-98.
- Petry, F.; Shirley, M.W.; Miles, M.A. y McDonald, V. 1998. Characterisation of a *Cryptosporidium parvum*-specific cDNA clone and detection of parasite DNA in mucosal scrapings of infected mice. *Mol. Biochem. Parasitol.* 95(1):21-31.



- Piedrafita, D.; Xu, D.; Hunter, D.; Harrison, R.A. y Liew, F.Y. 1999. Protective immune responses induced by vaccination with an expression genomic library of *Leishmania major*. J. Immunol. 163(3):1467-72.
- Qui, C. y Tong, X. 1994. Construction of a cDNA library of the erythrocytic stage of *Plasmodium vivax*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 12(2):104-6.
- Raghavan, N.; McReynolds, L.A.; Maina, C.V.; Feinstone, S.M.; Jayaraman, K.; Ottesen, E. A. y Nutman, T.B. 1991. A recombinant clone of *Wuchereria bancrofti* with DNA specificity for human lymphatic filarial parasites. Mol. Biochem. Parasitol. 47(1):63-71.
- Refega, S.; Girard-Misguich, F.; Bourdieu, C.; Pery, P. y Labbe, M. 2003. Gene discovery in *Eimeria tenella* by immunoscreening cDNA expression libraries of sporozoites and schizonts with chicken intestinal antibodies. Vet. Parasitol. 113(1):19-33.
- Ruef, B.J.; Dowling S.C.; Conley, P.G.; Perryman, L.E.; Brown, W.C. y Jasmer, D.P. 2000. A unique *Babesia bovis* spherical body protein is conserved among geographic isolates and localizes to the infected erythrocyte membrane. Mol. Biochem. Parasitol. 105(1):1-12.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Schelp, C.; Bose, R.; Micha, A. y Hentrich, B. 1995. Cloning and expression of two genes from *Babesia equi* merozoites and evaluation of their diagnostic potential. Appl. Parasitol. 36(1):1-10.
- Shibui, A.; Ohmori, Y.; Suzuki, Y.; Sasaki, M.; Nogami, S.; Sugano, S. y Watanabe, J. 2001. Effects of DNA vaccine in murine malaria using a full-length cDNA library. Mol. Pathol. Pharmacol. 109(3-4):147-57.
- Sim, G. K.; Kafatos, F.C.; Jones, C.W.; Koehler, M.D.; Efstratiadis, A. y Maniatis, T. 1979. Use of cDNA library for studies on evolution

- and developmental expression of the chorion multigene families. Cell 18. 1303.
- Soberón, X.; Covarrubias, L. y Bolívar, F. 1980. Construction and characterization of new cloning vehicles. IV. Deletion derivatives of pBR322 and pBR325. Gene 9: 287.
- Stober C.B. 2004. From genomes to vaccines for leishmaniasis. Methods Mol. Biol. 270:423-38.
- Stratagene. 2000. Zap-cDNA Synthesis kit. Instruction Manual.
- Striepen, B.; White, M.W.; Li, C.; Guerini, M.N.; Malik, S.B.; Logsdon, J.M. Jr ; Liu, C. y Abrahamsen, M.S. 2002. Genetic complementation in apicomplexan parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 99(9):6304-9.
- Twigg, A.J. y Sherratt, D. 1980. trans-complementable copy-number mutants of plasmid ColE1. Nature 283:216
- Valencia, M. 2002. Caracterización Bioquímica y molecular de proteasas de *Babesia bigemina* y *Babesia divergens*. Tesis Doctoral, Universidad Simón Bolívar.
- Watanabe, J.; Sasaki, M.; Suzuki, Y. y Sugano, S. 2001. FULL-malaria: a database for a full-length enriched cDNA library from human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. Nucleic. Acids. Res. 29(1):70-1.
- Zhan, B.; Hawdon, J.; Shan, Q.; Ren, H.; Qiang, H.; Xiao, S.H.; Li, T.H.; Feng, Z. y Hotez, P. 2000. Construction and analysis of cDNA library of *Necator americanus* third stage larvae. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi. 18(1):26-8.
- Zouain, C.S.; Azevedo, V.A.; Franco. G.R.; Pena, S.D. y Goes, A.M. 1998. Identification of genes encoding *Schistosoma mansoni* antigens using an antigenic sequence tag strategy. J. Parasitol. 84(6):1307-10.



ISBN: 978-980-318-259-5



9 789803 118259 5



Gobierno **Bolivariano**  
de Venezuela

Ministerio del Poder Popular  
para la **Agricultura y Tierras**

Instituto Nacional  
de Investigaciones Agrícolas

