



Caracterización genética del gen Rv1258c en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de la familia Beijing

Directores:

José Antonio Aínsa Claver

Liliana Isabel Dias Rodrigues

Daniel Fuentes Martínez

Trabajo fin de grado

2013-2014

Índice

Resumen	1
Introducción	2
<i>Historia de la tuberculosis</i>	<i>2</i>
<i>Transmisión, Tratamiento y Vacuna.....</i>	<i>3</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>4</i>
<i>Resistencias a fármacos y bombas de eflujo en M. tuberculosis.....</i>	<i>4</i>
<i>Diagnóstico e identificación de cepas.....</i>	<i>5</i>
Antecedentes y Justificación	7
Objetivos.....	8
Materiales y Métodos.....	9
<i>Cepas bacterianas, plásmidos, medios, condiciones de cultivo y muestras de DNA.....</i>	<i>9</i>
<i>Vectores utilizados.....</i>	<i>9</i>
<i>Polymerase Chain Reaction (PCR).....</i>	<i>10</i>
<i>Extracción de DNA de M. tuberculosis.....</i>	<i>10</i>
<i>Purificación de los productos de amplificación.....</i>	<i>11</i>
<i>Ligación.....</i>	<i>12</i>
<i>Preparación de células competentes de E.coli para electroporación.....</i>	<i>12</i>
<i>Transformación de células competentes por electroporación.....</i>	<i>12</i>
<i>Extracción de plásmidos (Mini-preparación).....</i>	<i>13</i>
<i>Digestiones de ácidos nucleicos.....</i>	<i>14</i>
Resultados y Discusión.....	15
<i>Optimización MAMA PCR cepas H37Rv y GC1237.....</i>	<i>15</i>
<i>Aplicación del protocolo de MAMA PCR a nuevas muestras.....</i>	<i>20</i>
<i>Clonaje del gen Rv1258c de la cepa GC1237, perteneciente a la familia Beijing de M. tuberculosis, en el vector pGEM-T.....</i>	<i>22</i>
Conclusiones y perspectivas.....	25
Referencias Bibliográficas.....	26

Resumen / Summary

Resumen

Las cepas de la familia Beijing de *Mycobacterium tuberculosis* fueron descritas inicialmente en China y desde entonces se han extendido por muchas regiones del mundo causando frecuentes brotes epidémicos. Tienen la habilidad de propagarse con rapidez y una alta capacidad para infectar fruto de ventajas genéticas y mecanismos de virulencia no identificados todavía. Se estima que un tercio de los casos de tuberculosis son causados por cepas de la familia Beijing, lo que convierte a este linaje en una de las familias con mayor índice de mortalidad. En estudios previos realizados en el laboratorio, se ha identificado un polimorfismo característico de las cepas Beijing, la inserción de un nucleótido de citosina entre las posiciones 580 y 581 del gen Rv1258c que codifica la bomba de eflujo Tap. En este trabajo se ha utilizado la cepa GC1237 del linaje Beijing junto a la cepa de referencia H37Rv, para optimizar un protocolo de detección de las cepas de la familia Beijing. El protocolo está basado en la identificación de este polimorfismo mediante la técnica MAMA PCR (*Mismatch Amplification Mutation Assay Polymerase Chain Reaction*). Se han optimizado diferentes variables de la técnica, como el diseño de cebadores o la temperatura de *annealing*, y se ha intentado aplicar a muestras clínicas de tuberculosis, incluyendo las procedentes de esputos. Por último se ha realizado el clonaje del gen Rv1258c de la cepa GC1237 con vistas a futuros estudios de la expresión y función de la proteína Tap en cepas Beijing.

Summary

The Beijing family of strains of *Mycobacterium tuberculosis* were reported originally in China, and have disseminated to several regions of the world, being responsible of a large number of outbreaks. These strains are considered to have diverse genetic changes and mechanisms of virulence (yet to be identified), which altogether confer them the capability to disseminate and infect quickly and efficiently. Several publications have reported that the Beijing family of strains is responsible of one third of cases of tuberculosis and the largest number of deaths. Previously, in our laboratory, a genetic polymorphism has been identified as characteristic of the Beijing strains. A cytosine nucleotide is inserted between positions 580 and 581 of the Rv1258c gene, which encodes Tap efflux pump. In this work, we have used strain GC1237 (Beijing) and H37Rv (a reference strain) in order to set up a protocol for detecting strains of the Beijing family, based in the identification of such polymorphism by MAMA-PCR (*Mismatch Amplification Mutation Assay Polymerase Chain Reaction*). Primer design and annealing temperature have been optimised, and we have tried to use this protocol in order to analyse clinical specimens, including sputum samples. Finally, we have cloned the Rv1258c gene from GC1237 strain in order to set up the starting point for further studies on the expression and function of Tap protein in Beijing strains.

Introducción

Historia de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por micobacterias, fundamentalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. En función del órgano afectado, proporciona una gran variedad de cuadros clínicos, siendo los mayores afectados los pulmones. La tuberculosis junto con el sida y la malaria siguen siendo las tres enfermedades infecciosas que causan un mayor número de muertes a nivel mundial (*World Health Organization 2014*). Se considera como una de las primeras enfermedades humanas de las que se tiene constancia, y a lo largo de la historia, ha recibido multitud de nombres: mal del rey, peste blanca o tisis, entre otros.

Se admite el hecho de que el organismo que produce la tuberculosis evolucionó a partir de otros microorganismos más primitivos dentro del propio género *Mycobacterium*. A partir de las micobacterias ancestrales fueron derivando las especies actuales, algunas patógenos de humanos (*M. tuberculosis*) y otras patógenos de animales (*M. bovis*, *M. caprae*, etc.).

En 1882, Robert Koch consiguió aislar el bacilo tuberculoso, teñirlo mediante coloración de derivados de anilina y demostrar su patogenicidad haciéndolo saber finalmente en la *Sociedad de Fisiología de Berlín*.

En 1921, Albert Calmette y Camille Guérin fueron los artífices de la primera vacuna contra la tuberculosis, una variante atenuada de *M. bovis* denominada BCG.

En 1944, gracias a los esfuerzos por encontrar un fármaco eficaz contra *M. tuberculosis*, se descubrió la estreptomina. A partir de este momento, surgieron nuevos medicamentos antituberculosos: ácido para-amino salicílico (1949), isoniazida (1952), pirazinamida (1954), etambutol (1962) y rifampicina (1963). Todos estos hallazgos transformaron la tuberculosis en una enfermedad curable, sin embargo, la idea de que esta enfermedad se encontraba controlada se esfumó décadas después con la irrupción de la epidemia del SIDA así como con la aparición de casos de tuberculosis multirresistentes.

Transmisión, Tratamiento y Vacuna

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de dos mil millones de personas se encuentran infectadas de forma latente por tuberculosis, con ocho millones de nuevos casos de tuberculosis activa y dos millones de muertes cada año. Por ello, la OMS declaró en 1993 una situación de emergencia global frente a la tuberculosis y uno de los Objetivos del Milenio que se han planteado es reducir la incidencia y mortalidad producida por la tuberculosis (*World Health Organization 2014*).

Si bien ya se ha cumplido el Objetivo de Desarrollo del Milenio de cambiar el curso de la epidemia de tuberculosis, el descenso del 2% en el número de personas que contraen esta enfermedad cada año sigue siendo todavía insuficiente.

La infección se trasmite por vía aérea mediante la inhalación de bacilos tuberculosos. A lo largo de la vida, las personas infectadas de forma latente presentan un riesgo de desarrollar tuberculosis activa del 10%, probabilidad que se ve incrementada considerablemente si se tiene el sistema inmunitario dañado, como ocurre en casos de infección por el VIH, malnutrición o diabetes.

Cuando la forma activa de la enfermedad se presenta, los síntomas (tos, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, etc.) pueden ser leves durante muchos meses. Como resultado de ello, en ocasiones los pacientes tardan en buscar atención médica y transmiten la bacteria a otras personas.

Afortunadamente, la tuberculosis es una enfermedad curable. El tratamiento requiere de un largo periodo en el cual se administran diversas combinaciones de fármacos de primera línea, que son los que presentan una mayor actividad bactericida. Se inicia con la toma durante dos meses de rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol o estreptomina, seguidos de cuatro meses con rifampicina e isoniazida. Durante este proceso es muy importante tanto la información y supervisión del tratamiento como el apoyo por parte de un agente sanitario, con el objetivo de garantizar la finalización del tratamiento, crucial para evitar el desarrollo de resistencias a fármacos. En el caso de tuberculosis causada por cepas resistentes a los fármacos de primera línea, se utilizan los fármacos de segunda línea (*etionamida, cicloserina, ácido p-amino salicílico, kanamicina, capreomicina, amikacina, fluoroquinolonas y linezolid*), aunque estos fármacos son bacteriostáticos y poseen más contraindicaciones.

Existe además, una vacuna contra la tuberculosis: el bacilo de Calmette-Guerin (BCG). Contiene bacilos tuberculosos de origen bovino (*M. bovis*) atenuados, sin embargo, no ofrece una protección total ya que no previene ni de la infección primaria en adultos ni de la reactivación de la tuberculosis pulmonar latente. No obstante, protege contra las formas diseminadas de la tuberculosis, por lo que es de uso general en aquellos países donde la tuberculosis es común.

Mycobacterium tuberculosis

M. tuberculosis pertenece al dominio Bacteria, dentro de la clase *Actinobacteria*, del orden *Actinomycetales*, del suborden *Corynebacterineae* y de la familia *Mycobacterium* agrupándose finalmente en el complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (Whitman 2012). Aunque filogenéticamente pertenece al grupo de bacterias Gram positivas, el alto carácter hidrofóbico de su pared celular, le confiere un carácter ácido-alcohol resistente y por esto solamente adquiere una leve coloración en la tinción de Gram. Por este motivo, las micobacterias suelen teñirse mediante la tinción de Ziehl-Neelsen.

Es un bacilo delgado, recto o ligeramente curvado con bordes redondeados y cuyo tamaño suele oscilar entre 2-5 µm de longitud y 0,2-0,5 µm de anchura. Se caracteriza por ser un microorganismo aerobio estricto, inmóvil (no posee flagelos), no formador de esporas, con bastantes gránulos citoplasmáticos. Posee una velocidad de crecimiento muy lenta y actividades catalasa y nitrato reductasa.

En 1998 se publicó la secuenciación del primer genoma de *M. tuberculosis*, concretamente de la cepa H37Rv (Cole, Brosch et al. 1998) y desde ese momento, la información genómica ha facilitado los estudios de patogenicidad, virulencia, fisiología, genética y resistencia a fármacos.

Resistencia a fármacos y bombas de eflujo en M. tuberculosis

La aparición de cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes (MDR-TB, resistentes a los fármacos de primera línea isoniazida y rifampicina) y extremadamente farmacorresistentes (XDR-TB, cepas MDR-TB con resistencia adicional a las fluoroquinolonas y a uno de los tres medicamentos inyectables de segunda línea kanamicina, amikacina o capreomicina) ha complicado de forma dramática el control de esta enfermedad, debido a que en estos casos, las opciones terapéuticas disponibles quedan severamente limitadas.

En todos estos casos, se trata de fenómenos de resistencia adquirida, porque las cepas resistentes presentan mutaciones en los genes que codifican las dianas de los fármacos o bien en las enzimas que activan algunos de los pro-fármacos. Por ejemplo, en el caso de la isoniazida, las cepas de *M. tuberculosis* presentan mutaciones en el gen que codifica la diana InhA o en el que codifica la enzima catalasa-peroxidasa KatG, que es la encargada de activar la isoniazida.

Junto a estos fenómenos de resistencia adquirida, *M. tuberculosis* también presenta mecanismos de resistencia natural o intrínseca. En las bacterias en general, la resistencia intrínseca se debe a la ausencia de la diana, a la falta de permeabilidad de su pared celular, y a la expresión constitutiva o inducible de los sistemas de eflujo. Estos últimos se encargan de

expulsar los fármacos, facilitando así la adquisición de las mutaciones relevantes que conferirán altos niveles de resistencia. (Li, Livermore et al. 1994; Nikaido 2001; Ryan, Dougherty et al. 2001; Piddock 2006). (McMurry, Petrucci et al. 1980) fueron los primeros en demostrar que estas resistencias podían estar causadas por un eflujo activo. Desde entonces, este mecanismo ha sido reconocido como uno de los principales causantes de dicha resistencia (Nikaido 1994).

Existe una gran cantidad de bombas de eflujo que se pueden clasificar en cinco familias; ATP-Binding Cassette Superfamily (ABC), Major Facilitator Superfamily (MFS), Resistance Nodulation-Cell Division Superfamily (RND), Small Multidrug Resistance family (SMR) y Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE).

En el caso de las familias MFS, SMR, RND y MATE se trata de transportadores secundarios, normalmente impulsados por gradientes de protones (antiporters), mientras que los miembros de la familia ABC son considerados transportadores primarios porque utilizan la hidrólisis de ATP como fuente de energía. Destacar que en micobacterias la mayoría de las bombas de eflujo caracterizadas pertenece a la familia MFS (De Rossi, Arrigo et al. 2002).

En concreto, este trabajo se ha hecho con la bomba de eflujo de *M. tuberculosis* Rv1258c (Tap), la cual pertenece a la familia MFS y se encuentra involucrada en resistencia a fármacos como la tetraciclina, estreptomicina, gentamicina y otros aminoglicósidos, además de otros procesos fisiológicos como son la respuesta frente al estrés oxidativo o cinética de crecimiento. La presencia de motivos conservados en su secuencia proteica ubicuos dentro de la familia MFS, el transporte de compuestos estructuralmente diferentes y su implicación en distintos procesos fisiológicos, sugieren que esta bomba tiene un papel vital en *M. tuberculosis* (Paulsen, Brown et al. 1996; Ainsa, Blokpoel et al. 1998; Silva, Bigi et al. 2001; Ramon-Garcia, Martin et al. 2006; Ramon-Garcia, Martin et al. 2009; Ramon-Garcia, Mick et al. 2012).

Diagnóstico e identificación de cepas

La limitada capacidad de diagnóstico ha sido un obstáculo crucial para controlar la tuberculosis en general, y en particular, los casos asociados al VIH y los causados por tuberculosis farmacorresistente. Por tanto, la ampliación de la capacidad para diagnosticar la tuberculosis, y en especial en los casos más graves, es una prioridad mundial para el control de esta infección (World Health Organization 2014).

En los últimos años, gracias a los avances en el campo de la genómica de *M. tuberculosis*, la investigación sobre nuevos medios de diagnóstico de la tuberculosis se ha acelerado, y como resultado de ello el número de pruebas de diagnóstico en desarrollo ha ido creciendo rápidamente. Además, se han logrado caracterizar genéticamente diversos linajes o familias

genéticas de *M. tuberculosis* (Beijing, LAM, Haarlem, etc.), lo que ha permitido inferir su evolución y su predominio en las distintas regiones del mundo. El genotipo de *M. tuberculosis* ha sido esencial para la identificación de contaminaciones cruzadas, una tarea casi imposible antes del comienzo de las técnicas de biología molecular.

Por su relevancia en este trabajo, se detallan las características más relevantes de la cepa H37Rv y de las cepas del linaje Beijing.

La cepa H37 fue aislada originalmente en 1905 y llamó la atención por su gran virulencia en el conejillo de indias (una característica distintiva usada en la clasificación de la tuberculosis humana al comienzo del siglo XX). En 1934, se comenzó a distinguir entre H37 virulenta (Rv) y H37 avirulenta (Ra). Por lo que la cepa original aislada en 1905 quedó obsoleta, y las cepas H37Rv y H37Ra aisladas, han sido mantenidas desde entonces en la colección de micobacterias de Trudeau (TMC) y en la colección americana de cultivos tipo (ATCC). En ellas existen 18 variantes disponibles, 15 de H37Rv y 3 de H37Ra (*Bifani, Moghazeh et al. 2000*) que se usan mayoritariamente como cepas control o de referencia.

Por otra parte, la capacidad de infección y la habilidad de las cepas de *M. tuberculosis* de la familia Beijing para propagarse con rapidez, muy probablemente es fruto de ventajas genéticas y mecanismos de virulencia no identificados todavía. Entre los mecanismos propuestos se encuentran, las reorganizaciones genéticas (inserciones IS6110 o deleciones) y la capacidad diferencial para modular la respuesta específica del hospedador.

Las cepas del genotipo Beijing fueron descritas inicialmente en China y países vecinos en 1995, y desde entonces se han extendido por muchas regiones del mundo causando frecuentemente brotes epidémicos. Diferentes estudios han indicado que un tercio de los casos de tuberculosis son causados por cepas de la familia Beijing, lo que convierte a este linaje en una de las familias con mayor índice de mortalidad. Algunos estudios relacionan la hipervirulencia de estas cepas con una mayor producción de glicolípidos fenólicos, un factor de virulencia que atenúa el sistema inmune innato del huésped, a lo que se suma su ya conocida propensión a adquirir multirresistencia a antibióticos.

La cepa clínica que se ha utilizado en este trabajo es *M. tuberculosis* GC1237, pertenece a la familia Beijing y ha sido responsable de brotes epidémicos en la isla de Gran Canaria desde 1993. Hoy en día esta cepa continúa siendo predominante en este área debido a su rápida y exitosa diseminación dentro de la comunidad (*Alonso, Aguilo et al.*)

Antecedentes y Justificación

En el grupo de investigación previamente se ha identificado la presencia de un polimorfismo en el gen Rv1258c de *Mycobacterium tuberculosis*, la inserción de un nucleótido entre las posiciones 580 y 581 de su marco de lectura, dando lugar así a una secuencia nucleotídica CTCGCAG entre las posiciones 577 y 582 de dicho gen, donde la C subrayada representa el nucleótido adicional de citosina. Llamativamente esta inserción es exclusiva de las cepas de la familia Beijing (Villellas, Aristimuño et al. 2013).

Este polimorfismo puede posibilitar un método rápido y sencillo para detectar cepas de la familia Beijing y discriminarlas de otras cepas que no pertenecen a la misma familia, basándose en la identificación de esa citosina adicional (Ainsa, Villellas et al. 2013). Los métodos propuestos hasta ahora se basan en amplificar un fragmento del gen Rv1258c que comprenda la posición 581, e identificar la presencia de dicha citosina mediante secuenciación, hibridación con sondas inmovilizadas, o mediante el uso de la enzima de restricción XhoI que reconoce y corta la secuencia CTCGAG que poseen las cepas de *M. tuberculosis* de otras familias distintas a Beijing, sin embargo no corta la secuencia CTCGCAG de las cepas de la familia Beijing.

Con este trabajo, se pretende desarrollar y optimizar un método más rápido y sencillo a los anteriores, basándose en una técnica llamada MAMA PCR, "Mismatch Amplification Mutation Assay PCR" (Cha, Zarbl et al. 1992.) que permite amplificar específicamente secuencias que difieren tan sólo en un nucleótido, gracias al diseño de cebadores con desapareamientos específicos en la región 3'. Se pretende lograr un protocolo que amplifique selectivamente la secuencia del gen Rv1258c de la familia Beijing y que no amplifique la secuencia del mismo gen Rv1258c de otras familias de *M. tuberculosis*. El desarrollar un método más rápido y sencillo para detectar las cepas Beijing puede facilitar su implantación posterior en la práctica clínica.

Por otra parte, se pretende clonar el gen Rv1258c de la cepa GC1237 de la familia Beijing, para poder iniciar estudios sobre la función de esta proteína en las cepas de esta familia. En trabajos anteriores (Ainsa, Blokpoel et al. 1998) se llevó a cabo el clonaje y caracterización del producto de expresión del gen Rv1258c de la cepa H37Rv en *M. smegmatis*, pero no se ha estudiado todavía si este gen, en las cepas Beijing, se expresa y da lugar a una proteína y en este caso, cuál sería el impacto de este polimorfismo en la función de la proteína resultante.

Objetivos

- 1) Desarrollar un protocolo basado en la técnica de MAMA-PCR para detectar el polimorfismo del gen Rv1258c en cepas de la familia Beijing de *M. tuberculosis*, y para esto:
 - a. Diseñar unos oligonucleótidos específicos para amplificar únicamente las muestras que contengan DNA de cepas de la familia Beijing.
 - b. Optimizar la temperatura más adecuada para llevar a cabo la amplificación.
- 2) Clonar el gen Rv1258c a partir del DNA genómico de la cepa de *M. tuberculosis* GC1237.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas, medios, condiciones de cultivo y muestras de DNA

En este trabajo se ha utilizado la cepa de *Escherichia coli* DH5 α , que permite utilizar la propiedad de la alfa complementación para diferenciar las colonias que contengan plásmidos con o sin inserto en determinados clonajes. Esta cepa se ha cultivado en medio líquido LB o en sólido LB-agar, a 37°C. Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml, X-Gal a 80 μ g/ml y el inductor IPTG a 20 mg/ml.

Las cepas de *M. tuberculosis* que se han utilizado para optimizar el protocolo de MAMA-PCR han sido H37Rv, cepa de referencia en los laboratorios para el estudio de la tuberculosis, y GC1237 perteneciente a la familia Beijing.

Para probar el protocolo de MAMA-PCR desarrollado en este trabajo, se han utilizado dos tipos de muestras: muestras de DNA procedentes de cultivos de cepas clínicas de *M. tuberculosis* y muestras de esputos procedentes de los hospitales Miguel Servet y Clínico Lozano Blesa de Zaragoza, y del Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

Vectores utilizados

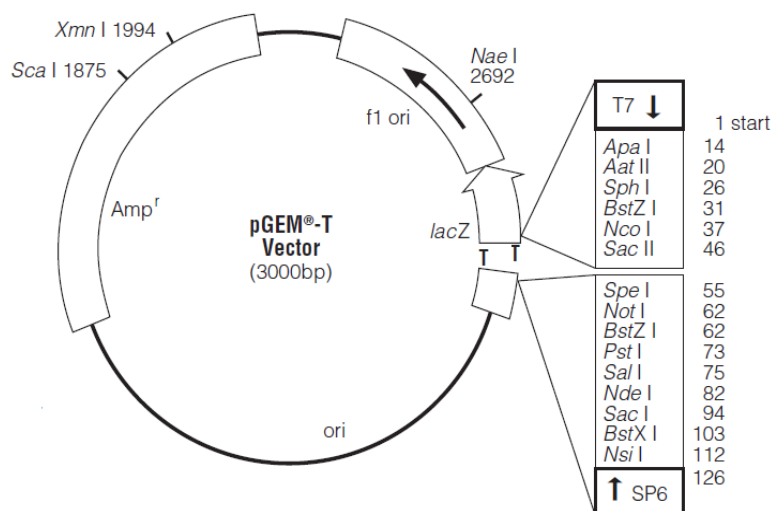


Figura 1. Vector pGEM®-T (Promega), optimizado para el clonaje general de productos de amplificación.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar diversos fragmentos de DNA en la optimización del método MAMA-PCR y en el clonaje del gen Rv1258c.

Mezcla:

- H₂O: 16,75 µl
- 5x MyTaq buffer (Bioline): 5 µl
- Cebador directo (25 µM): 0,5 µl
- Cebador inverso (25 µM): 0,5 µl
- MyTaq DNA polimerasa 5 U/µl (Bioline): 0,25 µl

El volumen final por pocillo es de 23 µl, a los cuales han de añadirse 2 µl del DNA de un rango de concentraciones entre 10 ng/µl y 20 ng/µl que se desee amplificar.

Programa PCR:

- Fase inicial de desnaturalización: 1min a 95°C
- 35 ciclos compuestos por tres fases:
 - Desnaturalización: 30s a 95°C
 - Annealing: 30s a la temperatura que se determine para cada reacción
 - Elongación: 1min a 72°C
- Fase final de elongación: 10min a 72°C
- Almacenamiento: ∞ 4°C

Para verificar las PCR realizadas, se realizan geles de agarosa al 1% con SybrGreen. Como marcador de pesos moleculares se usa el 100pb DNA Ladder (Thermo Scientific), el cual proporciona el siguiente patrón de bandas: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000 y 3000 pb; las bandas de 500 y 1000 pb presentan una mayor intensidad. Finalmente, se conecta el dispositivo a la corriente durante 40min a 120V. Una vez terminada la electroforesis, los fragmentos de DNA se visualizan en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografía.

Extracción de DNA de *M. tuberculosis***Reactivos:**

- Lisozima 10 mg/ml
- Solución compuesta por 97% SDS 10% (w/v)
- + 3% Proteinasa K (20 mg/ml)
- CTAB (0,27 M)/NaCl (0,7 M)
- NaCl 5M
- Cloroformo:Isoamílico (24:1)
- Isopropanol
- EtOH 70% (-20°C)
- Buffer TE

Procedimiento:

En este trabajo, se ha partido de muestras de cultivos de *M. tuberculosis* previamente inactivadas en el laboratorio de nivel de seguridad P3. Para esto, el cultivo en medio líquido había sido centrifugado, las bacterias se habían resuspendido en 400 µl de TE, y se habían inactivado durante 10 min a 95°C en un bloque por calor. Finalmente se había añadido lisozima y se había incubado al menos 1h a 37°C. En estas condiciones, las muestras ya no contienen bacterias vivas por lo que el protocolo puede continuarse fuera del laboratorio de seguridad.

- Se añaden 75 µl de una mezcla de SDS-proteinasa K y se incuba a 65°C durante 10 min.
- Se añaden 100 µl de NaCl 5M, 100 µl de CTAB/NaCl y se mezcla hasta que adquiera un aspecto lechoso. Se incuba a 65°C durante 10 min.
- Se añaden 150 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcla con un vortex durante 10 seg y se centrifuga a temperatura ambiente, 5 min a 13800 g. Se debe observar una interfase blanca tras la centrifugación.
- Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y se añaden 420 µl (0,6 volúmenes) de isopropanol, incubándose a -20°C durante al menos 30 min.
- Se centrifuga a temperatura ambiente, 5 min a 13800 g y se elimina el isopropanol descartando el sobrenadante.
- Se añade 1ml de etanol 70% a 4°C y se invierte el tubo varias veces. Se centrifuga a temperatura ambiente 5min a 13800 g.
- Se elimina el sobrenadante y se deja secar al aire libre.
- Se resuspende el DNA en 20 µl de H₂O destilada estéril.
- Finalmente, se cuantifica el DNA extraído mediante medida de la absorbancia a 260nm en el nanodrop y se almacena a -20°C.

Purificación de los productos de amplificación

Para la purificación de los productos obtenidos tras la PCR, se utilizó el kit “*High Pure PCR Product Purification*” (Roche) que contiene columnas *High pure spin filter tube* y los tampones Binding buffer, Wash buffer y Elution buffer.

Procedimiento:

- Tras las PCR, se juntan 100 µl en un eppendorf al cual se le añaden 500 µl Binding buffer.
- Se transfiere a una columna *High pure spin filter tube* y se centrifuga 1 min a velocidad máxima.
- Se descarta el contenido de la columna y se añaden 500 µl Wash buffer. Se centrifuga y se descarta el contenido de la columna.
- Se añaden 200 µl Wash buffer, se centrifuga y se descarta el contenido de la columna.

- Se traspasa la columna a un eppendorf de 1,5ml, se añaden 50 μ l de Elution buffer y se centrifuga 1 min a velocidad máxima. De esta manera se consigue que el producto purificado eluya al eppendorf.
- Se cuantifica el producto purificado mediante medida de la absorbancia a 260nm en el nanodrop y se almacena a -20°C .

Ligación

Para cada clonaje se preparan al menos tres mezclas de ligación, tal como se indica en la tabla 1. Agitar con vórtex el 2X Rapid Ligation Buffer vigorosamente antes de cada uso.

Reactivos	Ligación	Control positivo	Control negativo
2X Rapid Ligation Buffer (Promega)	5 μ l	5 μ l	5 μ l
Vector pGEM-T (50 ng/μl)	1 μ l	1 μ l	1 μ l
Inserto (150 ng/ μl)	X μ l*	-	-
DNA control inserto (8 ng/μl)	-	2 μ l	-
T4 DNA Ligasa (3 U/μl)	1 μ l	1 μ l	1 μ l

Tabla 1. Reactivos y volúmenes requeridos para llevar a cabo la ligación. (X μ l *) el volumen del inserto tiene que ajustarse en función de su concentración para mantener las proporciones indicadas.

Se añade agua hasta completar el volumen a 10 μ l, se mezclan los reactivos por pipeteo y se incuba la reacción toda la noche a 4°C para obtener el mayor rendimiento posible.

Preparación de células competentes de E. coli para electroporación:

- Se cultiva *E. coli* en 5ml de medio LB hasta que alcance una DO_{600} de 0,6 y se detiene el crecimiento en hielo durante 10min.
- Se centrifugan las células 5min a velocidad máxima y se lavan con 1 ml, dos veces con H_2O estéril y una vez con glicerol al 10% (w/v).
- Se vuelve a centrifugar, se reparte el contenido en alícuotas de 50 μ l y se electroporan inmediatamente o se almacenan a -80°C .

Transformación de células competentes por electroporación:

- Se mezclan las células competentes con un máximo de 100 ng de la muestra de DNA que corresponda (plásmido o mezclas de ligación) en cubetas de 0,2cm (Bio-Rad) preenfriadas a 4°C y se les da un pulso eléctrico (2,5kV, 25 μ F, 200 Ω) en un GenePulser XcellTM (Bio-Rad). Las células se recogen en 1 ml de LB y se incuban durante 1h a 37°C .
- Se plaquean 100 μ l de los controles (cuando proceda) y de las diluciones: 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} del experimento de transformación en presencia de los antibióticos necesarios y se mantienen durante toda la noche en la estufa a 37°C .

Extracción de plásmidos (Mini-preparación)**Reactivos:**

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> - Solución I (50 ml): - 1 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 - 1,25 ml TRIS 1 M pH 8,0 - 5 ml Glucosa 0,5 M - 42,75 ml H₂O - Solución II (10 ml): - 7 ml H₂O - 1 ml SDS 10% (w/v) - 2 ml NaOH 1 M | <ul style="list-style-type: none"> - Solución III (100 ml): - 60 ml KAc 5 M - 11,5 ml HAc glaciar - 28,5 ml H₂O - NaAc 3 M - EtOH absoluto frío (-20°C) - RNasa (1 µg/ml) - H₂O estéril |
|---|---|

Procedimiento:

- Se centrifugan 1,4 ml de cultivo, crecido previamente en medio LB, a 9600 g durante 3min. Se decanta el sobrenadante, se resuspende el pellet en 100 µl de Solución I y se deja incubar durante 5min a temperatura ambiente.
- Se añaden 200 µl de Solución II, se mezcla suavemente invirtiendo el tubo hasta que el contenido tenga un aspecto viscoso y se incuba en hielo 5min.
- Se añaden 150 µl de Solución III fría y se deja incubar en hielo 5min. Se centrifuga a 13800 g durante 10min y se transfiere el sobrenadante a un eppendorf nuevo.
- Se añaden 0,1 volúmenes de NaAc y 2 volúmenes de EtOH, se invierte el tubo y se incuba 30 min a -20°C. Se centrifuga a 13800 g durante 5min y se elimina el EtOH.
- Se deja secar el precipitado, se resuspende el pellet en 50 µl de H₂O estéril y se añade 1µl de RNasa para incubarlo a 37°C durante 15min.
- Finalmente, se cuantifica el plásmido extraído mediante medida de la absorbancia a 260nm en el nanodrop y se almacena a -20°C.

Cuando se necesitan mayores cantidades de DNA, se utiliza este mismo protocolo pero multiplicando los volúmenes de cultivo y de reactivos por 100.

Digestiones de ácidos nucleicos.

Las digestiones de ácidos nucleicos se realizaron en un volumen final de 40 μ L. Este contenía 3 μ L de la enzima de restricción, 4 μ L del tampón 10x correspondiente y una cantidad variable de DNA dependiendo de la concentración de este. La digestión se mantuvo a 37°C durante 1h. Cuando fue necesario, las digestiones se llevaron a cabo en volúmenes diferentes, ajustando de modo proporcional la cantidad de los distintos componentes.

Reactivos	Ligación
DNA	20 μ l
10X Buffer	4 μ l
Enzima de restricción	3 μ l
H ₂ O	13 μ l

Tabla 2. *Reactivos y volúmenes requeridos para llevar a cabo la digestión.*

Resultados y Discusión

Optimización MAMA PCR cepas H37Rv y GC1237

La reacción en cadena de la polimerasa o Polimerase Chain Reaction (PCR) consiste en la amplificación de fragmentos de DNA comprendidos entre dos zonas determinadas del genoma cuya secuencia es conocida. La técnica de la MAMA PCR (*Mismatch Amplification Mutation Assay PCR*) consiste en una PCR estándar con las 3 etapas características por ciclo de desnaturalización, annealing y elongación, pero posibilitando la amplificación específica de secuencias que difieren tan sólo en un nucleótido. Para ello utiliza cebadores con desapareamientos específicos en la región 3' que permiten la amplificación mayoritaria de un tipo de alelo frente a otro. Por tanto puede constituir una herramienta de gran utilidad en la detección de mutaciones concretas y poco frecuentes (Cha, Zarbl et al. 1992).

Esta técnica es rápida, simple y puede aplicarse fácilmente para analizar cantidades de DNA genómico del orden de nanogramos (Saiki, Gelfand et al. 1988; Sarkar, Cassady et al. 1990). Sin embargo, uno de sus inconvenientes es que en ocasiones puede presentar baja sensibilidad, debido a que los cebadores con desapareamientos en la región 3' son todavía capaces de amplificar inespecíficamente las secuencias carentes de la mutación, bajo la mayor parte de las condiciones de PCR (Cha, Zarbl et al. 1992).

(Kwok, Kellogg et al. 1990) estimaron la eficacia por ciclo de un cebador con un único nucleótido desapareado entre el 15% y el 50%, dependiendo de la naturaleza de la mutación. En un ensayo en el que se utilizó un alelo transformado del gen c-H-ras de rata (sustitución G-A, en el codon 12) se demostró que la MAMA PCR es suficientemente sensible para detectar 30 copias del alelo transformado presentes entre 3×10^6 copias del alelo wild-type (Cha, Zarbl et al. 1992).

En este trabajo se ha propuesto el desarrollo de un protocolo basado en la técnica MAMA-PCR para la detección del polimorfismo del gen Rv1258c característico de las cepas de la familia Beijing de *M. tuberculosis*. Esto implica explorar 2 variables principales: (1) el diseño de los cebadores con los desapareamientos específicos en función de la secuencia a amplificar, (2) la optimización de la temperatura de annealing. Otras variables que puede ser necesario considerar son (3) el tiempo de elongación del cebador, (4) la optimización del número de ciclos de PCR, (5) la concentración de glicerol.

Diseño de los cebadores

Para llevar a cabo esta técnica se necesita diseñar 4 cebadores. Dos de estos cebadores son externos a la zona en la que se encuentra el polimorfismo genético, se denominaron Tap-1-Fw y Tap-2-Rv, y se situaban upstream y downstream respectivamente del polimorfismo. Se diseñaron siguiendo las recomendaciones habituales para el diseño de cebadores para reacciones de PCR estándar.

En el diseño de los otros dos cebadores específicos de la zona en la que se encuentra el polimorfismo, MAMATap1_Rv y MAMATap2_Fw, se siguieron las pautas marcadas por (Cha, Zarbl et al. 1992). Generaban dos desapareamientos en su extremo 3' cuando se unían a la secuencia del gen Rv1258c de la cepa de referencia H37Rv, mientras que al unirse a la secuencia del gen Rv1258c de las cepas de la familia Beijing (que se diferencia por la inserción de una citosina entre las posiciones 580 y 581) daban lugar a un único desapareamiento.

Oligonucleótidos	Secuencia	Nº pb	Tm
Tap 1_Fw	5' AGGCTGGTCGTTGGACCGCAT 3'	21	74°C
Tap 2_Rv	5' TTGCTGGTGGTCGGTGAAGT 3'	20	68°C
MAMATap1_Rv	5' TGC GGCTGCCGGCACCCAG 3'	20	81°C
MAMATap2_Fw	5' ATTGCCGCCCTGCAACTCAC 3'	20	71,7°C

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la técnica de MAMA PCR (Cha, Zarbl et al. 1992). Señalar que Tap1_Fw y MAMATap2_Fw son cebadores directos, mientras que Tap2_Rv y MAMATap1_Rv son cebadores reversos tal y como indica su nombre.

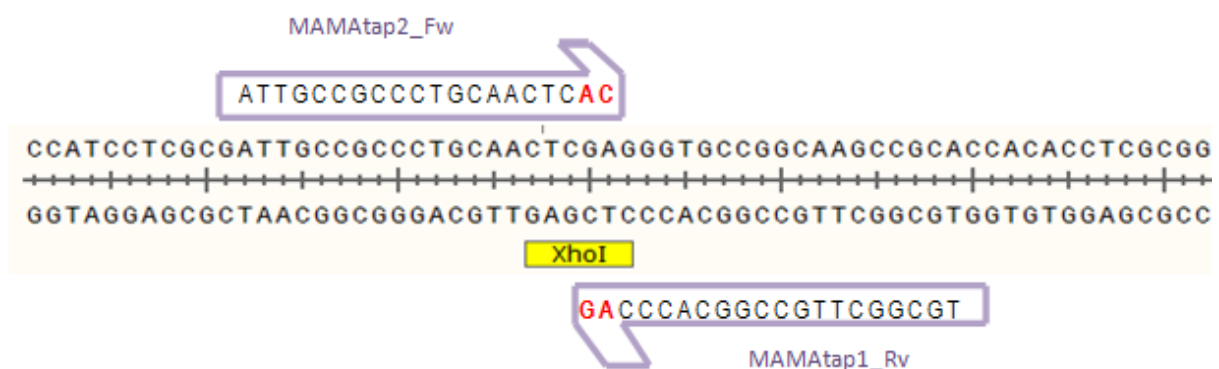


Figura 2. Representación de la secuencia de la cepa H37Rv con los oligonucleótidos MAMAtap2_Fw y MAMAtap1_Rv. Se puede apreciar como hibridan, generando dos desapareamientos en el extremo 3' que se muestran en rojo. La secuencia diana de la enzima XhoI, CTCGAG, se señala en amarillo.

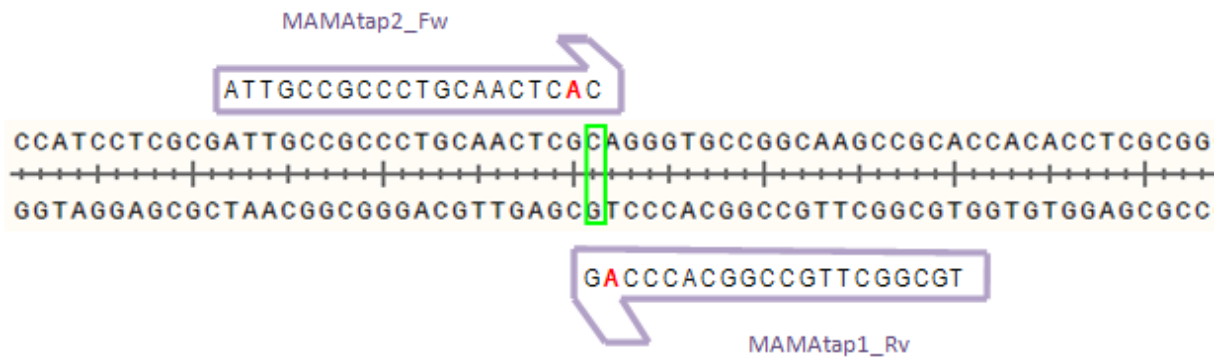


Figura 3. Representación de la secuencia de la cepa GC1237, como modelo de la familia Beijing con los oligonucleótidos MAMAtap2_Fw y MAMAtap1_Rv. Se puede apreciar como hibridan, generando un único desapareamiento en el extremo 3' que se muestra en rojo en la imagen. Por otro lado, el rectángulo en verde señala la inserción de citosina en la posición 581 característica de las cepas Beijing, que altera la secuencia diana de la enzima de restricción XhoI.

Los cebadores se combinaron de forma apropiada para lograr la amplificación de los fragmentos de interés del gen Rv1258c o bien del gen completo:

- Tap1_Fw – MAMAtap1_Rv (MIX 1)
- MAMAtap2_Fw – Tap2_Rv (MIX 2)
- Tap1_Fw – Tap2_Rv (MIX 3)

El uso de la MIX 1 posibilitaría la amplificación de un fragmento del gen Rv1258c, que incluiría la región 5' de dicho gen hasta la región donde puede encontrarse el polimorfismo. El fragmento amplificado tendría un tamaño de 196 pb, se obtendrá únicamente a partir de muestras de las cepas Beijing, y comprendería desde las bases 405 a 600.

El uso de la MIX 2 posibilitaría la amplificación de un fragmento desde la región donde puede encontrarse el polimorfismo hasta la región 3' del gen. El fragmento amplificado se obtendrá únicamente a partir de muestras de las cepas Beijing, tendría un tamaño de 208 pb y comprendería desde las bases 562 a 769.

Por último con la MIX 3 se trataría de llevar a cabo un control interno de la técnica de PCR, es decir, corroborar que el proceso de amplificación se ha llevado a cabo correctamente y poder excluir falsos negativos causados por problemas de amplificación. Amplificaría un fragmento mayor que los anteriores, incluyendo la región en la que puede encontrarse la inserción de citosina en su región central. Tendría un tamaño de 365 pb en el caso de las cepas Beijing y de 364 pb en el caso del resto de muestras, comprendería desde las bases 405 a 769/768 y se obtendrá a partir de cualquier muestra de DNA de *M. tuberculosis*.

Optimización de la temperatura de annealing

Teniendo en cuenta las diferentes T_m de los cebadores y el criterio aproximado de que la temperatura de annealing tiene que ser 5°C menor que la del cebador con menor T_m , se ensayaron las siguientes temperaturas: 63 , 66 y 69°C . Puesto que a valores excesivamente mayores que la T_m de los cebadores, el proceso de amplificación es altamente restrictivo y es posible que no se lleve a cabo o bien tener un rendimiento muy bajo. Del mismo modo, la amplificación tampoco transcurre correctamente si se emplean temperaturas de annealing mucho menores que la T_m de los cebadores, ya que entonces el proceso es altamente inespecífico, obteniéndose productos de amplificación indeseados.

Otros parámetros a considerar

Se seleccionó un tiempo de elongación de 1 minuto, en función del tamaño de los productos que se esperaba obtener. En cuanto al número de ciclos de PCR, se optó desde el primer momento por 35 ciclos de PCR. Finalmente, en relación a la concentración de glicerol, se optó por no añadir glicerol más allá del presente en los propios tampones de los reactivos para la PCR (kit "MyTaqTM DNA Polymerase").

Una vez seleccionadas las condiciones de la MAMA PCR, se ensayaron frente a dos muestras de DNA de *M. tuberculosis*, procedentes de dos cepas de referencia, GC1237 como representante de la familia Beijing y H37Rv como ejemplo de cepa no perteneciente a dicha familia y que al mismo tiempo constituye la cepa modelo para el estudio de la tuberculosis en los laboratorios. Se utilizó el protocolo general de amplificación de productos por PCR que se menciona en el apartado Materiales y Métodos. El resultado de amplificación se muestra en las figuras 4,5 y 6.

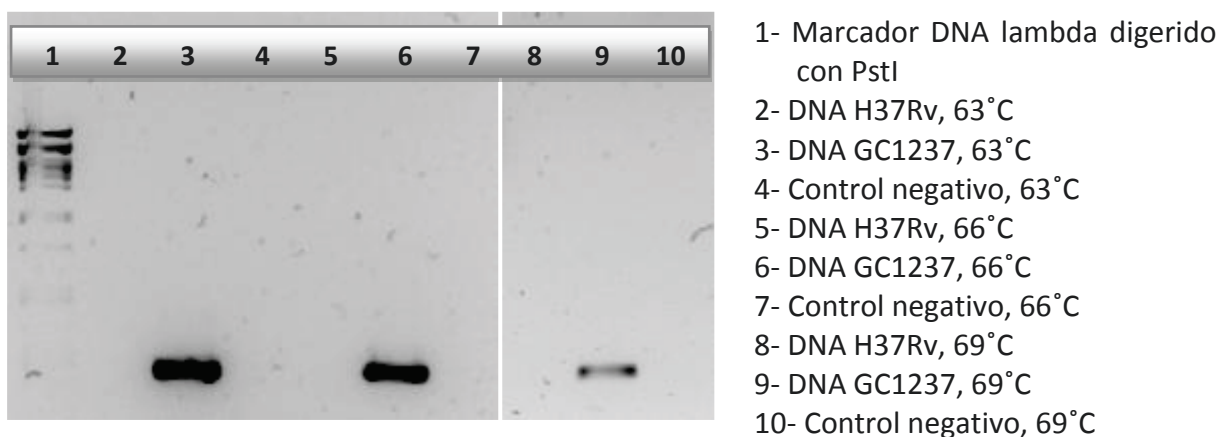


Figura 4. Electroforesis donde se aprecian los resultados de la amplificación del DNA de las cepas H37Rv y GC1237, con la combinación de cebadores **MIX1**. Se analizaron las temperaturas de annealing de 63°C , 66°C y 69°C . La banda que se observa tiene un tamaño de 196 pb.

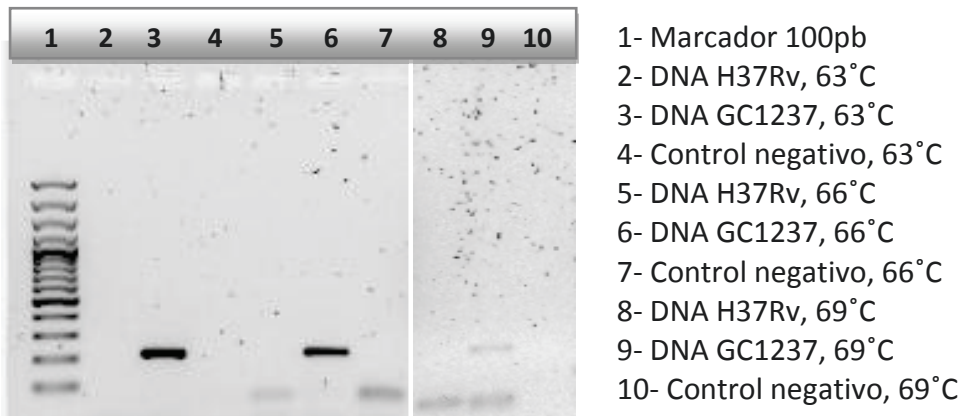


Figura 5. Electroforesis donde se aprecian los resultados de la amplificación del DNA de las cepas H37Rv y GC1237, con la combinación de cebadores **MIX2**. Se analizaron las temperaturas de annealing de 63°C, 66°C y 69°C. La banda que se observa tiene un tamaño de 208 pb.

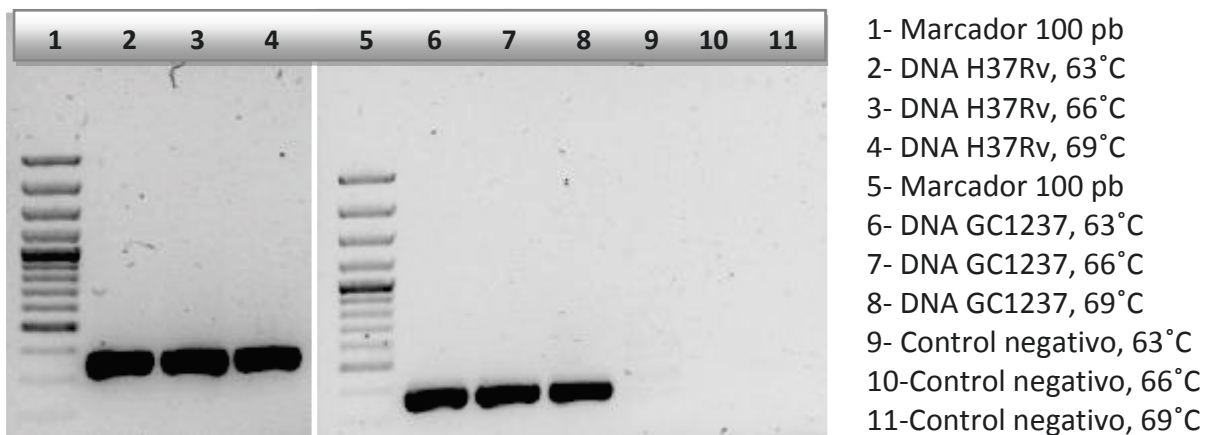


Figura 6. Electroforesis donde se aprecian los resultados de la amplificación del DNA de las cepas H37Rv y GC1237, con la combinación de cebadores **MIX3** que **sirve como control interno de que la PCR funciona e indica que la muestra contiene DNA**. Se analizaron las temperaturas de annealing de 63°C, 66°C y 69°C. La banda que se observa tiene un tamaño de 364 pb en el caso de H37Rv y de 365 pb en el caso de GC1237. Señalar que las banda de 100 pb del marcador no se muestra en el pocillo 1, así como las bandas de 100 y 200 pb del marcador en el pocillo 5.

Como se puede apreciar en las figuras 4,5 y 6, las amplificaciones funcionaron bien con las tres temperaturas y se seleccionó la temperatura de 63°C porque producía las bandas de mayor intensidad en MIX1, MIX2 y MIX3. Con esto, se llegó a la conclusión de que, en las condiciones de ensayo, tanto la MIX1 como la MIX2 son capaces de diferenciar las dos cepas de referencia y por lo tanto, este método tiene utilidad para diagnosticar la presencia de cepas de *M.tuberculosis* de la familia Beijing.

Aplicación del protocolo de MAMA PCR a nuevas muestras

Una vez optimizado el protocolo con las cepas de referencia, se probó con DNA aislado de cuatro cultivos de cepas clínicas de *M. tuberculosis* pertenecientes a la colección de muestras de DNA del laboratorio y que incluía cepas tanto de la familia Beijing como de otros linajes.

En tres de estas muestras se pudo determinar con este protocolo si las muestras correspondían con cepas de la familia Beijing (muestra B1) o con cepas no-Beijing (muestras A1 y A2), tal como se aprecia en la siguiente figura. La muestra B2 que había sido tipada por otros métodos como “Beijing-like” sin embargo, no dio el resultado esperable para las cepas de la familia Beijing. Esto indica que este tipo de cepas, cuya pertenencia al linaje Beijing no termina de estar claro, y de las que se desconoce si presentan este polimorfismo o no, en principio se identifican por este método como si no pertenecieran al linaje Beijing.

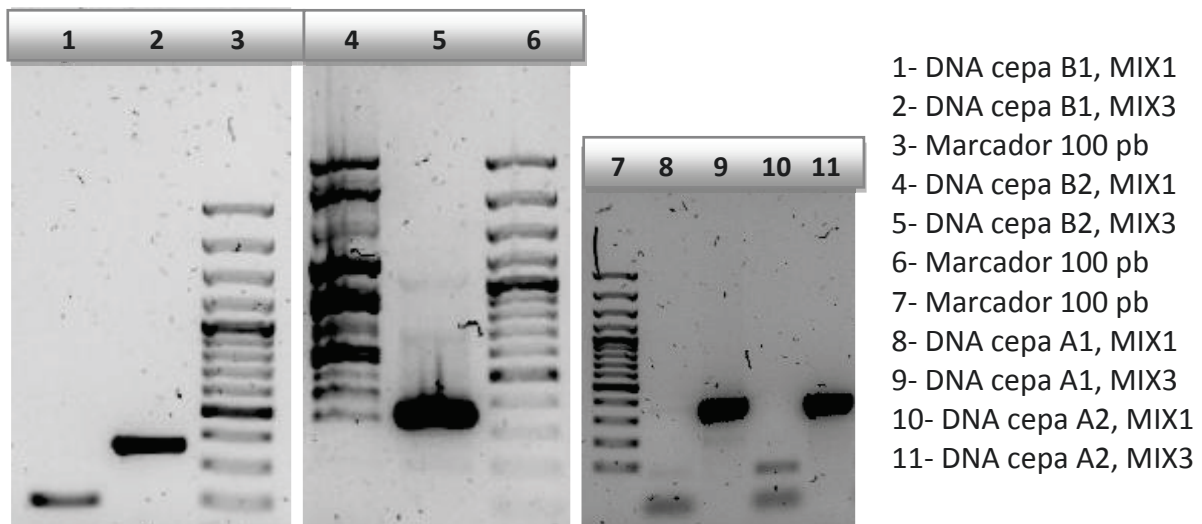
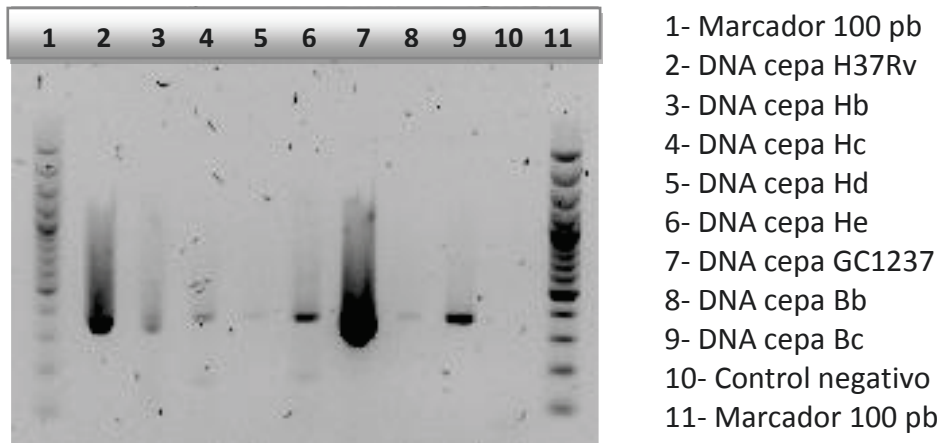


Figura 7. Resultados de la amplificación del DNA de cuatro muestras de DNA procedentes de cultivos celulares, utilizando el protocolo de MAMA PCR con una temperatura de annealing de 63°C y con la combinación de oligonuclótidos MIX1 y MIX3: una cepa Beijing (B1), una cepa Beijing-like (B2) y dos cepas no Beijing (A1 y A2).

Finalmente, el protocolo se probó frente a muestras de esputos. Por tratarse de muestras que “a priori” pueden tener un bajo contenido en DNA de *M. tuberculosis*, y que además pueden contener inhibidores de la reacción de polimerización. En primer lugar se llevo a cabo la reacción con la MIX3, que al tratarse del control positivo debe amplificar en todo tipo de cepas. Como se aprecia en la siguiente figura, en todas las muestras ensayadas el rendimiento de la reacción de amplificación fue notablemente menor al de las muestras control (DNA de las cepas H37Rv y GC1237), obteniéndose en el caso de la muestra Bc el mayor rendimiento.

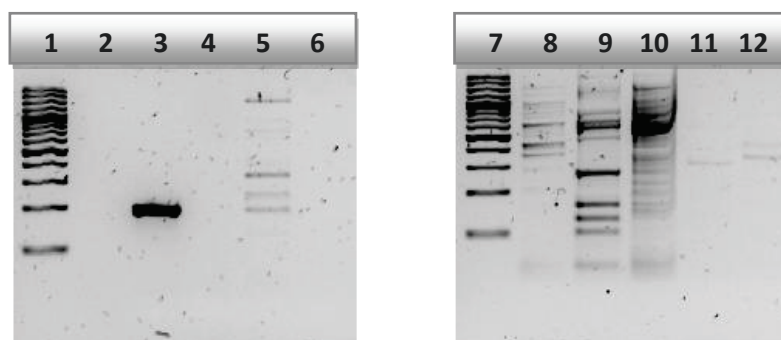


- 1- Marcador 100 pb
- 2- DNA cepa H37Rv
- 3- DNA cepa Hb
- 4- DNA cepa Hc
- 5- DNA cepa Hd
- 6- DNA cepa He
- 7- DNA cepa GC1237
- 8- DNA cepa Bb
- 9- DNA cepa Bc
- 10- Control negativo
- 11- Marcador 100 pb

Figura 8. Resultados de la amplificación del DNA de las dos muestras de referencia (H37Rv y GC1237) y 6 muestras de DNA procedentes de esputos, utilizando el protocolo de MAMA PCR con una temperatura de annealing de 63°C y con la combinación de oligonucleótidos **MIX3**: las cepas Hb, Hc, Hd y He son no Beijing, mientras que las cepas Bb y Bc son cepas Beijing.

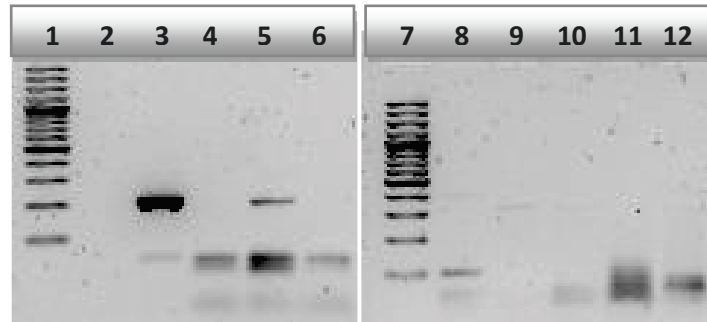
Al llevar a cabo las reacciones con las mezclas MIX1 y MIX2, únicamente apareció una débil amplificación en el caso de la muestra Bc en la reacción con la mezcla MIX2, lo que permitía identificarla como cepa Beijing.

En el caso de las muestras que contenían cepas no-Beijing, utilizando la reacción con MIX1 se observó la amplificación de diversas bandas de DNA, sin embargo o bien su tamaño no corresponde con el que se obtiene a partir del DNA de las cepas Beijing, o bien su intensidad es muy débil en comparación con los controles. En principio la falta de amplificación de una banda del tamaño esperable o en cantidad detectable permite identificar las cepas como no pertenecientes a la familia Beijing, aunque esta conclusión sería más sólida si la amplificación con la reacción MIX3 hubiera dado lugar a un producto más abundante.



- | | | | |
|--------------------|---------------------|--------------------|-----------------|
| 1- Marcador 100 pb | 4- DNA cepa Bb | 7- Marcador 100 pb | 10- DNA cepa Hc |
| 2- Pocillo vacío | 5- DNA cepa Bc | 8- DNA H37Rv | 11- DNA cepa Hd |
| 3- DNA GC1237 | 6- Control negativo | 9- DNA cepa Hb | 12- DNA cepa He |

Figura 9. Resultados de la amplificación del DNA de las dos muestras de referencia (H37Rv y GC1237) y 6 muestras de DNA procedentes de esputos, utilizando el protocolo de MAMA PCR con una temperatura de annealing de 63°C y con la combinación de oligonucleótidos **MIX1**: las cepas Hb, Hc, Hd y He son no Beijing, mientras que las cepas Bb y Bc son cepas Beijing.



1- Marcador 100 pb	4- DNA cepa Bb	7- Marcador 100 pb	10- DNA cepa Hc
2- Pocillo en blanco	5- DNA cepa Bc	8- DNA H37Rv	11- DNA cepa Hd
3- DNA GC1237	6- Control negativo	9- DNA cepa Hb	12- DNA cepa He

Figura 10. Resultados de la amplificación del DNA de las dos muestras de referencia (H37Rv y GC1237) y 6 muestras de DNA procedentes de esputos, utilizando el protocolo de MAMA PCR con una temperatura de annealing de 63°C y con la combinación de oligonucleótidos **MIX2**: las cepas Hb, Hc, Hd y He son no Beijing, mientras que las cepas Bb y Bc son cepas Beijing.

Clonaje del gen Rv1258c de la cepa GC1237, perteneciente a la familia Beijing de *M. tuberculosis*, en el vector pGEM-T

En trabajos anteriores (Ainsa, Blokpoel et al. 1998) se ha clonado el gen Rv1258c de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* en el vector pSUM36, para después introducirlo en *M. smegmatis*. Esto permitió estudiar los niveles de resistencia a antibióticos que confiere esta bomba de eflujo en *M. smegmatis* una especie de micobacteria de crecimiento rápido y no patógena, que se utiliza como modelo de estudio de la función de proteínas de *M. tuberculosis*. Sin embargo, puesto que no se ha estudiado la función de la proteína Rv1258c de las cepas de la familia Beijing, otro objetivo de este trabajo ha sido clonar este gen, en condiciones similares al clonaje realizado previamente a partir de la cepa H37Rv.

En primer lugar, se llevo a cabo la amplificación del gen Rv1258c a partir de DNA de la cepa GC1237 de *M. tuberculosis* con los oligonucleótidos Tap4 (directo, 5' ATGCTGCAGATCTCGAACGACGA 3') y Tap5 (reverso, 5'CGCCTGCAGCCAGGGTGAGCATGTCA 3') utilizando el protocolo general de amplificación de DNA por PCR descrito en la sección de Materiales y Métodos con una temperatura de annealing de 63°C. Estos oligonucleótidos habían sido diseñados previamente (Silva 2001) a partir de la secuencia de este gen en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y dan lugar a un producto de amplificación de 2,3 kb, que incluye 634 pb delante del codón de iniciación y 415 pb detrás del codón de parada del gen Rv1258c.

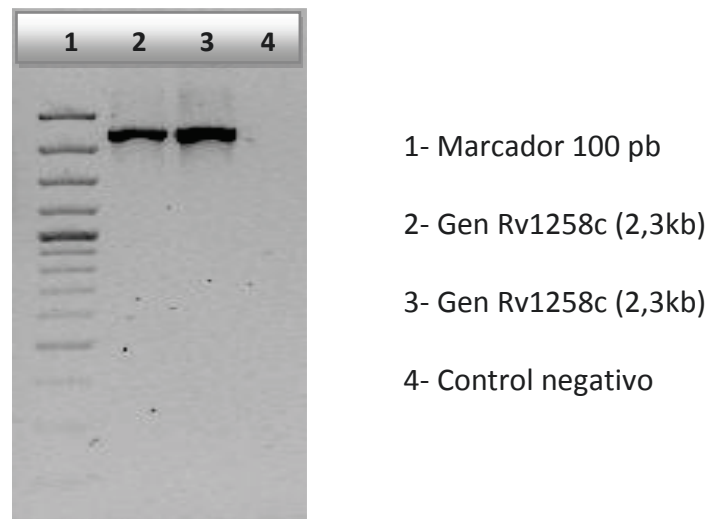


Figura 11. Electroforesis donde se muestra la banda de DNA correspondiente a la amplificación del gen Rv1258c con el protocolo de PCR realizado con los oligonucleótidos tap4 y tap5 a partir de DNA de la cepa GC1237. Así se comprobó que la amplificación se desarrolló correctamente.

Este producto de amplificación de 2,3 kb se clonó en el vector pGEM[®]-T (Promega), que posee extremos cohesivos constituidos por timidinas terminales, utilizando la proporción molar 3:1 entre inserto y vector.

Después de la electroporación de células competentes de *E. coli* DH5-alfa, se obtuvieron colonias de color blanco en placas de LB con ampicilina, Xgal e IPTG, lo que sugería que podían contener el plásmido recombinante.

Estas colonias candidatas a tener el plásmido recombinante se cultivaron en 5 ml de LB y se extrajeron los plásmidos mediante minipreparación. Mediante digestión con la enzima PstI (que está presente en los dos cebadores Tap4 y Tap5 utilizados en la amplificación, además de en el polilinker del vector) se verificó si los plásmidos extraídos de las bacterias eran o no el plásmido recombinante. En el plásmido extraído de una de estas colonias se obtuvieron dos fragmentos de DNA, uno de peso molecular aproximado de 3 Kb, que correspondería con el cuerpo del vector pGEM-T, y el segundo, de 2.3 Kb que correspondería con el fragmento clonado, como se observa en la figura 12.



Figura 12. Electroforesis donde se muestran dos bandas correspondientes a la digestión del plásmido recombinante extraído de la colonia seleccionada por alfa complementación. La banda superior de 3kb corresponde al cuerpo del vector pGEM-T y la banda inferior de 2,3kb corresponde al fragmento de DNA clonado.

Esto indicaba que se trataba del plásmido recombinante, que se denominó pDFM1. Finalmente, por medio de secuenciación (Servicio Científico-Técnico de Genómica del CIBA), se corroboró que la construcción era correcta, y que la polimerasa utilizada (MyTaq DNA polimerasa, Bioneer) no había introducido ninguna mutación en la secuencia del gen Rv1258c, a pesar de no tratarse de una DNA polimerasa de alta fidelidad.

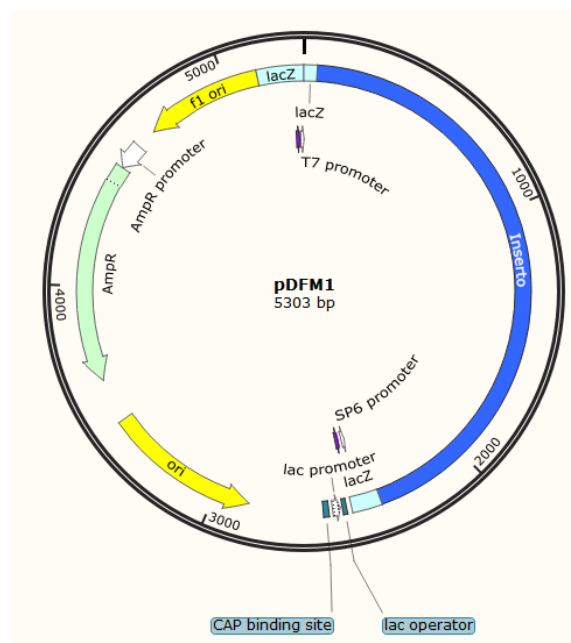


Figura 13. Plásmido recombinante pDFM1 constituido por el cuerpo del vector pGEM-T y el inserto de 2,3 kb que incluye el gen Rv1258c. Como se aprecia en la imagen el inserto interrumpe el marco de lectura del gen lacZ, permitiendo la identificación de las colonias portadoras de este plásmido recombinante por medio de la alfa complementación.

Conclusiones y perspectivas

Conclusiones

- El método MAMA-PCR permite diferenciar las cepas de *M. tuberculosis* según pertenezcan o no a la familia Beijing.
- En su formulación actual, el protocolo MAMA-PCR aplicado a muestras clínicas no produce resultados completamente satisfactorios.
- El plásmido recombinante pDFM1 contiene el gen Rv1258c de la cepa *M. tuberculosis* GC1237 clonado.

Conclusions

- A method based on MAMA-PCR can differentiate whether strains of *M. tuberculosis* belong to Beijing lineage or not.
- In its present stage, MAMA-PCR protocol applied to clinical samples does not give fully conclusive results.
- Recombinant plasmid pDFM1 contains Rv1258c gene from *M. tuberculosis* GC1237 strain.

Perspectivas

Es necesario refinar los parámetros del método MAMA-PCR para que pueda aplicarse con éxito directamente en muestras clínicas. Las variables que se podrían modificar serían: longitud y secuencia de los oligonucleótidos, número de ciclos de la amplificación, contenido en glicerol, temperatura de annealing, etc. A largo plazo, esta técnica se podría incluir en un kit comercial con fines diagnósticos.

Será necesario clonar el gen Rv1258c desde el plásmido pDFM1 a un vector que sea funcional en micobacterias, como por ejemplo, el vector pSUM36. De esta forma, al introducirlo en *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG se podrá estudiar la función de esta proteína y comparar el fenotipo que produce el gen Rv1258c de la cepa GC1237 frente al que produce el mismo gen clonado a partir de la cepa H37Rv.

Referencias Bibliográficas

- Ainsa, J. A., M. C. Blokpoel, et al. (1998). "Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*." *J Bacteriol* 180(22): 5836-5843.
- Ainsa, J. A., C. Villellas, et al. (2013). Método de identificación de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* de la familia Beijing. 2013. OEPM. España, Universidad de Zaragoza. ES1510.106.
- Alonso, H., J. I. Aguilo, et al. "Deciphering the role of IS6110 in a highly transmissible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain, GC1237." *Tuberculosis* 91(2): 117-126.
- Bifani, P., S. Moghazeh, et al. (2000). "Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra Variants: Distinguishing the Mycobacterial Laboratory Strain." *J Clin Microbiol* 38(9): 3200-3204.
- Cole, S. T., R. Brosch, et al. (1998). "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." *Nature* 393(6685): 537-544.
- Cha, R. S., H. Zarbl, et al. (1992). "Mismatch amplification mutation assay (MAMA): application to the c-H-ras gene." *Genome Research* 2(1): 14-20.
- De Rossi, E., P. Arrigo, et al. (2002). "The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*." *Mol Med* 8(11): 714-724.
- Kwok, S., D. E. Kellogg, et al. (1990). "Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies." *Nucleic Acids Research* 18(4): 999-1005.
- Li, X. Z., D. M. Livermore, et al. (1994). "Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin." *Antimicrob Agents Chemother* 38(8): 1732-1741.
- McMurry, L., R. E. Petrucci, Jr., et al. (1980). "Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(7): 3974-3977.
- Nikaido, H. (1994). "Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux." *Science* 264(5157): 382-388.
- Nikaido, H. (2001). "Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria." *Semin Cell Dev Biol* 12(3): 215-223.
- Paulsen, I. T., M. H. Brown, et al. (1996). "Proton-dependent multidrug efflux systems." *Microbiological Reviews* 60(4): 575-608.
- Piddock, L. J. (2006). "Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria." *Clin Microbiol Rev* 19(2): 382-402.
- Ramon-Garcia, S., C. Martin, et al. (2006). "Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from *Mycobacterium fortuitum*." *J Antimicrob Chemother* 57(2): 252-259.
- Ramon-Garcia, S., C. Martin, et al. (2009). "Role of the *Mycobacterium tuberculosis* P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth." *Antimicrob Agents Chemother* 53(9): 3675-3682.
- Ramon-Garcia, S., V. Mick, et al. (2012). "Functional and genetic characterization of the tap efflux pump in *Mycobacterium bovis* BCG." *Antimicrob Agents Chemother* 56(4): 2074-2083.
- Ryan, B. M., T. J. Dougherty, et al. (2001). "Efflux in bacteria: what do we really know about it?" *Expert Opin Investig Drugs* 10(8): 1409-1422.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-491.

- Sarkar, G., J. Cassady, et al. (1990). "Characterization of polymerase chain reaction amplification of specific alleles." Anal Biochem 186(1): 64-68.
- Silva, P. E. (2001). Eflujo, un posible mecanismo de resistencia en *Mycobacterium tuberculosis*, Universidad de Zaragoza.
- Silva, P. E., F. Bigi, et al. (2001). "Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*." Antimicrob Agents Chemother 45(3): 800-804.
- Villellas, C., L. Aristimuño, et al. (2013). "Analysis of mutations in streptomycin resistant strains reveals a simple and reliable genetic marker for identification of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype." J Clin Microbiol.
- Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Ludwig, W., Suzuki, K.-i., Parte, A. (Eds.) (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd ed. Volume 5: The Actinobacteria.
- World Health Organization, W. (2014). "Global tuberculosis report 2013. ."