# **ARTICULOS ORIGINALES**

# CONSTRUCCION DE UN BANCO DE CLONOS DE cDNA A PARTIR DE mRNA DE *P. falciparum*

MARIA ORFA DE ROJAS\*, MOISES WASSERMAN\*, \*\*

Se aisló mRNA-poli A de parásitos de *P. falciparum* (cepa Colombiana FCB-2) con una edad entre 34-36 horas. Esta fracción de mRNA fue traducida in-vitro utilizando un lisado de reticulocitos de conejo suplementado en algunos casos con tRNA del parásito o tRNA de levadura. Los productos de la traducción in-vitro aparecen en un rango entre 20 y 200 kd mostrando una gran similitud con las proteínas sintetizadas in-vitro en cultivos altamente sincronizados del parásito.

A partir de mRNA-poli A caracterizado en ésta forma se construyó una genoteca de cDNA en el fago  $\lambda$  gtl0. La eficiencia de clonación fue de 4.4 x  $10^6$  recombinantes por microgramo de cDNA.

### INTRODUCCION

Una mejor comprensión de la biología molecular de los parásitos de malaria abre nuevas perspectivas para el control de la enfermedad.

Al igual que otros autores nosotros consideramos que la tecnología de DNA recombinante puede ser una buena vía para entender la organización genética, el proceso molecular que maneja el crecimiento y desarrollo del parásito y los productos de la expresión de genes que puedan tener importancia clínica (1, 2, 3).

Son varios los trabajos que se han reportado sobre aislamiento y caracterización tanto del DNA como del RNA del plasmodium (1, 2, 3, 4, 5) así como sobre la clonación y expresión de genes cuyos productos algunas veces han sido utilizados en estudios de inmunización de ratones o monos (6, 7) o que en general han contribuido al conocimiento molecular de los parásitos de malaria (8, 9, 10).

Como parte de nuestros estudios sobre la biología molecular del parásito se estableció la rata de síntesis de DNA, RNA y proteínas durante el desarrollo asexual del *P. falciparum* (11). Ahora en este trabajo se describe la construcción de un banco de clonos de cDNA a partir de mRNA de parásitos con una edad aproximada de 34 horas (trofozoítos maduros). Esta genoteca se está caracterizando y será utilizada para estudios de expresión genética a través del ciclo y para la investigación de genes que codifiquen para proteínas de interés.

# **MATERIALES Y METODOS**

### Cultivo y sincronización del P. falciparum

Parásitos de la cepa Colombiana FCB-2 se cultivaron en células rojas humanas tal como se describió (11). El cultivo se sincronizó con 5% Sorbitol dejando una población de anillos del 5%, los cuales después de 22 horas de cultivo fueron en su totalidad trofozoítos maduros.

<sup>\*</sup> Grupo de Bioquímica - Instituto Nacional de Salud.

<sup>\*\*</sup>Profesor de Bioquímica - Universidad Nacional.

Las células rojas empacadas de 300 ml de cultivo se trataron 1:1 con 0.15% de saponina en RPMI, por 15 minutos a temperatura ambiente y agitación ocasional; las células se lavaron 3 veces con RPMI a 3000 rpm y el pellet se congeló a -70°C.

# Síntesis de proteínas durante el desarrollo intraeritrocítico del *P. falciparum*

Se utilizaron cultivos supersincrónicos (11), con parasitemias entre 5 y 6% de anillos. El cultivo se incubó por 30 minutos en medio RPMI-1640 libre de metionina pero suplementado con buffer HEPES 25mM, NaHCO<sub>3</sub> 32mM y 82μCi de 35 S-metionina por ml de medio (1245 Ci/mmol - NEN).

Los parásitos se liberaron de la célula roja por tratamiento con 0.15% de saponina y una mezcla de inhibidores de proteasas, consistente en PMSF 1.0mM (Phenyl methyl sulfonyl fluoride), TPCK 0.1mM (L-1 Tosylamide-2 phenyl-methyl-chloromethyl-ketone) TLCK 0.1mM (Na-P-Tosyl-Lysine Clorometyl Ketone), ácido B-amino caproico 2mM, EDTA 5mM, (ácido ethylenediamino tetracetico) y EGTA 5mM (ácido ethylenglycol bis-(B-amino eter) N.N.N.N. tetracético).

Las células, se incubaron a 37°C por 20 minutos y se sedimentaron a 15.000 rpm por 15 minutos. Los parásitos libres de la célula huésped, se lavaron con el mismo medio, se resuspendieron en 100µl de HBS, y se determinó la radioactividad por centelleo líquido.

Para el análisis electroforético de las proteínas, se marcaron 0.5ml de cultivo supersincrónico a las 12, 24 y 40 horas de edad del parásito; la marcación se hizo por períodos de una hora en las condiciones anteriormente descritas. Las muestras, se trataron en la misma forma y los parásitos liberados del eritrocito. se resuspendieron en 20µl de medio RPMI-1640 con inhibidores de proteasas y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento. Posteriormente, se descongelaron, se resuspendieron en 25µl de buffer muestra -SDS (0.075M Tris-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8.3, 2% de B-mercapto-etanol) y se incubaron, por 30 minutos a 45°C y por 10 minutos a 92°C. Sobre 5µl de estas muestras se hizo una nueva determinación de la radioactividad incorporada. Las muestras, se sometieron a electroforesis en geles discontinuos en capa fina de SDS - poliacrilamida al 15%.

Como patrones de peso molecular se usaron: miosina, P.M. 205.000; B-galactosidasa, P.M. 116.000; fosforilasa B, P.M. 97.400; albúmina sérica bovina, P.M. 66.000; ovalbúmina, P.M. 45.000, y anhidrasa carbónica, P.M. 29.000. Los péptidos detectados mediante la autorradiografía, se leyeron en un densitómetro (Unicam SP 1700 Ultraviolet Spectrophotometer con Scanning Densitometer Accessory).

# Aislamiento de RNA total y selección del poli A - mRNA

El pellet de parásitos liberados con saponina se trató con 3 volúmenes de solución de lisis compuesta de 100mM NaAc pH = 5.0, 10mM EDTA, 1% SDS  $100~\mu$ g/ml de heparina y 0.1M 2-mercaptoetanol a 4°C. Se hicieron 3 extracciones con fenol-cloroformo, agitando la mezcla de extracción por 5 minutos a 60°C antes de centrifugar (2000xg, 5 min).

Los ácidos nucléicos se precipitaron con 2.5V de 100% Etanol sin posterior incremento de la fuerza iónica por 2 horas a -70°C y se recuperaron por centrifugación a 20.000xg, 30 minutos a 0°C. El precipitado se disolvió en 1 ml de 10mM de hepes pH = 7.5, se mezcló con un volumen igual de 4M LiCl y se dejó 14 horas a 4°C.

El RNA total se recuperó por centrifugación a 20.000xg, 30 min. a 0°C, se disolvió en 1 ml de 2% de acetato de potasio, se precipitó con etanol y se cuantificó espectrofométricamente a 260nm. A partir del RNA total se seleccionó el poli A-mRNA utilizando oligo dT-celulosa (tipo 77F Pharmacia). La preparación de la oligo dT-celulosa y la recolección del poli A se hizo según los protocolos usuales (12, 13) pero debido a las características de la oligo dT-celulosa disponible, la muestra se absorvió sobre el material y luego se separó por centrifugación a 1600xg por 5 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación se hizo espectrofotométricamente o por titulación con bromuro de etidio (12).

## Recuperación de tRNA

La fracción soluble en LiCl se precipitó con etanol y se pasó a través de Sephadex G-100 (10mM Tris pH = 7.8, 1mM EDTA). El material recuperado por una segunda precipitación etanólica se guardó a -20°C.

### Traducción in-vitro del poli A - mRNA

Se utilizó un sistema compuesto en un 50% por lisado de reticulocitos de conejo (150 Amersham) y un Coctel de traducción que contenía creatina fosfato 8mM, cratina kinasa 0.2mg/ml, ATP 1mM, DTT 2mM, espermidina 0.5mM y una mezcla de aminoácidos 30µM. Se estandarizaron las concentraciones óptimas de Mg++, K+y mRNA en el sistema utilizando tRNA de levadura (0.05 - 0.2µg/µl) como estimulador de la síntesis de las proteínas del parásito y 1μCi de una mezcla de aminoácidos marcados con <sup>14</sup>C (A.S. 113-523mCi/mmol). En las condiciones óptimas estandarizadas pero en presencia de 98µCi de <sup>35</sup>S-Metionina (1000Ci/mmol) se efectuó el ensayo de traducción in-vitro con 8µg de RNA total, 1µg de poli A-mRNA, 10µg de poli A- suplementado en algunos casos con 0.2µg/µl de tRNA de levadura o del parásito. Como control se usó el lisado de reticulocitos suplementado con 0.2µg/µl de tRNA de levaduras.

Los productos de la traducción se analizaron por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (10% T, 2.7% C) utilizando el volumen total de muestra y una mezcla preteñida de marcadores de alto peso molecular de BRL (rango 14 a 200 Kd). Se hizo una fluorografía del gel (Amplify - Amersham) y se expuso contra Hyperfilm - Bmax (Amersham) por 48 horas. La película se reveló con D19 por 5 minutos a 20°C.

# Síntesis de cDNA

Básicamente se utilizó el método de Gubler y Hoffman (14) con las siguientes modificaciones:  $10\mu g$  de poli A-mRNA aislados de parásitos con 34 horas de edad se incubaron a  $42^{\circ}C$  por 40 minutos con 30mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DDT, 50 mM tris pH = 8.3, 2mM dNTP,  $100\mu g$ /ml de oligo dT 12 - 18, 10  $\mu$ Ci  $\propto 35$ SdATP (1000Ci/mmol) y 20 U de transcriptasa reversa (AMV, FPLC pure de Amersham) por  $\mu g$  de mRNA en un volumen de  $40\mu$ l. La reacción se paró por adición de 25mM de EDTA; el producto fue extraido con fenol: cloroformo y precipitado con etanol en presencia de 2M de acetato de amonio. La cuantificación de la síntesis de la primera cadena se hizo midiendo la radioactividad insoluble en TCA.

El producto total de la reacción anterior (885ng) se procesó en 100  $\mu$ l de 20mM tris. HCl pH = 7.5,

5mM Mgcl<sub>2</sub>, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 100mM KCl, 0.15mM B-NAD, 50μg/ml BSA, 40μM dNTP, 8.5u/ml E. coli RNase H, 230u/ml DNA polimerasa I y 10u/ml E. coli DNA ligasa. Se hicieron dos incubaciones sucesivas por 60 minutos a 12°C y por 60 minutos a 22°C. La extracción, precipitación y cuantificación de la segunda cadena se hizo en la forma descrita para la primera síntesis.

### Construcción de la Genoteca

Inicialmente 1µg de DNA control y 885ng de cDNA de P. falciparum marcados radioactivamente con <sup>35</sup>S
αdATP, se metilaron para proteger los sitios EcoRI.

Luego se adicionaron acopladores EcoRI, sobre los cuales mediante una digestión con la enzima se generaron extremos cohesivos. El exceso de acopladores se separó utilizando una columna de biogel A - 50m.

Las fracciones se analizaron por centelleo líquido y se escogieron aquellas que eluyeron con el más alto conteo, teniendo en cuenta de no recoger las fracciones finales para evitar la contaminación con los adaptadores.

Las fracciones escogidas se precipitaron con etanol en presencia de 0.3M de acetato de sodio. El DNA recuperado se suspendió en buffer STE (100mM NaCl, 10mM tris pH = 7.5, 1mM EDTA). Los fragmentos de cDNA unidos a acopladores EcoRI se clonaron en el vector \(\lambda\)gt10 siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes del sistema (15). 50, 100 y 150 ng de cDNA se ligaron con 1µg de brazos de \( \lambda gt10 \) en 10µl de buffer de ligación y 2.5u de T4 DNA ligasa a 15°C por 14 horas. La mezcla total de ligación fue empaquetada in-vitro utilizando los extractos de brazos y cabezas del vector y la selección de clonos recombinantes se hizo en E. coli (cepas NM 514 y L 87). El DNA control fue un DNA proveniente de M13 mp8 digerido con Hae III compuesto de fragmentos con extremos romos en un rango de tamaño entre 69 y 2527 pb. La mezcla de empaquetamiento con el mejor título se sembró totalmente en alícuotas de 50µl sobre E. coli NM 514 (aprox. 10<sup>4</sup> placas/caja de 150mm de diámetro). Todas las placas fueron recogidas por tratamiento con buffer SM (0.14M NaCl, 10mM Mg  $SO_4$ .  $7H_2O$ , 5mm Tris pH = 7.5, 0.01% gelatina) por 16 horas a 4°C. Este extracto se trató con 5% de cloroformo, se contrifugó a 6000xg, 5 minutos a 4°C y se guardó en presencia de 0.3% de cloroformo a 4°C.

### RESULTADOS

# Polipéptidos sintetizados por los parásitos en sus diferentes estadios

La Figura 1, muestra las autorradiografías y densitogramas de un gel en el que se separaron los polipéptidos sintetizados por anillos de 12 horas, trofozoítos de 24 horas y esquizontes de 40 horas. Se detectaron alrededor de 20 bandas en anillos y cerca de 35 en trofozoítos y esquizontes.

No se detectó ningún péptido sintetizado exclusivamente por anillos; sin embargo, hay algunos que aunque se encuentran en todo o parte del ciclo, parecen ser preferencialmente sintetizados durante dicho estadio. Los más notables tienen pesos moleculares alrededor de 75.000, 65.000, 54.000 y 53.000.

En trofozoitos y esquizontes a pesar de existir muchas bandas comunes se ven polipéptidos que se sintetizan en forma exclusiva en uno de los estadios.

Los polipéptidos más notables sintetizados por trofozoítos y no por esquizontes, forman un patrón complejo con más de 8 bandas localizadas en una región de bajo peso molecular entre 20.000 y 34.000.

Los polipéptidos sintetizados por esquizontes exclusivamente tienen pesos moleculares de 105.000, 47.000, 41.000 y 39.000.

En la región de altos pesos moleculares parece ocurrir síntesis prefencial en el estadio de esquizontes de bandas correspondientes a 205.000, 180.000, 150.000, 135.000, 125.000 y 118.000, aunque dentro del mismo rango existe síntesis de polipéptidos con pesos moleculares similares en los estadios de trofozoítos y anillos. Polipéptidos con pesos moleculares superiores a 205.000 parecen sintetizarse de manera bastante uniforme durante todo el ciclo.

# Aislamiento de RNA total y selección del poli A-mRNA

Se partió de 300 ml de cultivo de FCB - 2 incubados por 22 horas después de la sincronización con sorbitol, lo cual permitió trabajar con una población de 4.8x10<sup>9</sup> parásitos como trofozoítos maduros. Mediante este protocolo se logró obtener 1mg de RNA total. La relación A260/A280 para esta preparación fue de 2.3.

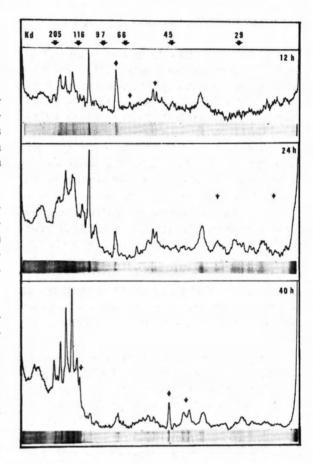


Fig. 1. Patrones electroforéticos de proteínas sintetizadas durante el ciclo eritrocítico asexual del *Plasmodium falciparum*. La figura muestra la autorradiografía producida por un gel S.D.S. poliacrilamida en el que se llevó a cabo la electroforesis de proteínas del parásito marcadas con <sup>35</sup>S-metionina a las 12, 24 y 40 horas de desarrollo. Para facilitar el análisis de las bandas obtenidas se hizo un densitograma sobre las autorradiografías. En la parte superior se indican los PM de los patrones utilizados.

A partir del RNA total y utilizando oligo dT celulosa se seleccionaron  $32\mu g$  de poli A-mRNA lo cual representa un rendimiento del 61% si se tiene en cuenta que 5% del RNA total es mensajero.

### Recuperación de tRNA

La fracción soluble en cloruro de litio (mezcla DNA y tRNA) después de la precipitación con etanol mostró un espectro con absorción a 260nm característico de ácidos nucleicos. El paso por sephadex G-100 pretendió separar las dos moléculas, sin embargo, en las fracciones 2, 4, 5 y 6 de la columna se observó absor-

ción a 260nm. La escogencia de la fracción que contenía el tRNA del parásito se hizo con base en los resultados de la cromatografía de tRNA de levadura en las mismas condiciones; la fracción escogida fue la número dos en la cual se detectaron 78µg de material precipitable con etanol.

# Traducción in-vitro del poli A-mRNA

En los experimentos previos se fijaron como concentraciones óptimas 1mM de  $Mg^{++}$  y 100mM de  $K^+$ . Con estas condiciones se ensayaron diferentes cantidades de mRNA (0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 µg) encontrándose la mayor incorporación con 1.0µg. Con la concentración más alta ensayada se presentó un descenso del 30% en la incorporación con respecto al punto máximo.

La traducción del RNA total fue similar en presencia o ausencia de tRNA exógeno (carriles 1, 2 y 3, figura 2). La comparación con el carril 3 es difícil en la autorradiografía porque se sembró menos cantidad de muestra pero la incorporación en las tres muestras fue en todas del orden de 106 cpm. El poli A- mostró principalmente como producto de traducción una banda cercana a los 13 Kd. Tanto el RNA total como el poli A-mRNA tradujeron proteínas de alto peso molecular entre 97 y 200 Kd. Se presentó traducción también en regiones entre 25 y 27 Kd y entre 14 y 25 Kd. En todos los experimentos el control presentó una incorporación entre el 65 y 75% de la incorporación en las muestras y en la autorradiografía se ven varias bandas en regiones de bajo, mediano y alto peso molecular.

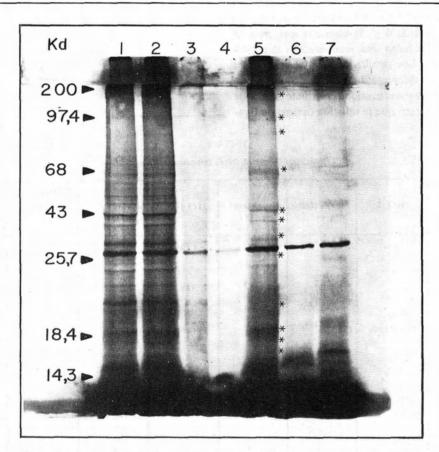


Fig. 2. Productos de la traducción in-vitro de mRNA de Plasmodium falciparum

- 1. RNA total
- 2. RNA total + tRNA de levadura
- 3. RNA total + tRNA de P. falciparum
- 4. RNA total + tRNA de P. falciparum
- 5. mRNA-poli A de P. falciparum+ tRNA de P. falciparum
- 6. RNA poli A (-)
- 7. Lisado de reticulocitos + tRNA levadura

Tiempo de exposición 48 horas.

### síntesis de cDNA

Para la síntesis de la primera cadena (ss cDNA) se partió de 10µg de poli A mRNA; se obtuvieron 672ng, lo cual significa un rendimiento del 7% con respecto al material inicial.

A partir de este material se sintetizaron 885ng de cDNA de doble cadena, es decir el rendimiento fue del 66% con respecto a la cantidad teórica esperada.

#### Construcción de la Genoteca

El cDNA paralelamente con un DNA control fueron preparados para unirlos a los brazos del vector mediante acopladores EcoRI. Para evitar unión del vector con el acoplador mismo, se separó el exceso mediante filtración en biogel A50m. Para el cDNA del parásito se logró recuperar el 91% del material aplicado a la columna(fracciones 3, 4 y 5) mientras que para el DNA control sólo hubo una recuperación del 29% (fracciones 3, 4). Los resultados se muestran en la tabla 1. Utilizando diferentes cantidades de cDNA con extremos cohesivos y una cantidad constante de brazos del vector, se encontró que la relación óptima de liga-

ción entre los extremos del cDNA a los brazos del vector fue de 50ng de cDNA por 1µg de brazos con la cual se encontró una eficiencia de clonación de 4.4x10<sup>6</sup> recombinantes/µg de cDNA.

Los datos para los controles y las diferentes relaciones usadas aparecen en la tabla 2.

TABLA 1
SEPARACION DEL cDNA DEL EXCESO DE ACOPLADORES EcoRI

MUESTRA	FRACCION No.	CPM	RECUPERACION ng DNA
7.	1	74	
	2	65	
	3	143	
DNA	4	259	290
CONTROL	5	90	
	6	69	
	7	210	
	8	296	
	9	139	
	10	84	
	1	76	
	2	79	
	3	4214	
	4	4727	
cDNA	5	2012	885
	6	787	
	7	362	
	8	190	
	9	140	
	10	80	

TABLA 2 CLONACION DE cDNA DE *P. falciparum* EN  $\lambda$  gt<sup>-10</sup>,

) DHA	IMSERTO	ufp/pg BRAZOS L 87	utp/µg BRAZOS MM 514	L87/NN 514	BACKE NOUND A JUSTADO	RECOMB. TOTALES ufp/ml	EFICIENCIA CLONACION RECONB/pgcDNA
λgt 10	_	2. 8 X 10 <sup>8</sup>	7.0 X 10 <sup>5</sup>	400	<del>-</del> -	1-	_
Agt 10			5				
BRAZOS EcoRI	-	2.5 X 10 <sup>7</sup>	6.5 X 10 4	384	-	-	_
λe+ 10	25 ng						
BRAZOS EcoRI	DNA CONTROL	2.6 X 10 <sup>9</sup>	2.2 X 10 <sup>7</sup>	118	6.8 X 10 6	1.5 X 10 7	3 X 10 8
λgt 10	50 ng	1000					
BRAZOS EcoRI	c D N A	2.7 X 10 7	2.9 X 10 <sup>5</sup>	93	7 X 10 4	2.2 X 10 5	4.4 X 10 <sup>6</sup>
λg+ 10	100 ng						
BRAZOS EcoRI	c D N A	6.4 XIO 6	6.8 X 10 <sup>4</sup>	94	1.7 X10 <sup>4</sup>	5.1 X-10 4	5.1 X 10 <sup>5</sup>
λg: 10	150 ng				and we are		
BRAZOS EcoRI	o D N A	4.4 X10	3.4 X 10	129	1.1 X 104	2.3 X 10 4	1.5 X 10 <sup>5</sup>

BACKGNOUND AJUSTADO - <u>L 87</u>
(L87/NN 514) BRAZOS \(\lambda\_gt10

EFICIENCIA CLONACION - Mª RECOMBINANTES X 1000

ufp = UNIDADES FORMADORAS DE PLACAS

#### DISCUSION

El principal objetivo de este trabajo fue obtener un mRNA lo más intacto y puro posible para ser utilizado en estudios de traducción in-vitro y en síntesis de cDNA para propósitos de clonación. Para preservar la calidad del mRNA se tuvieron en cuenta varias cosas:

- a) La separación de células blancas del cultivo del parásito mediante el lavado de la sangre con ficollpaque, disminuyendo la contaminación con DNA humano en las preparaciones posteriores.
- b) El protocolo de extracción. Se escogió el método del fenol caliente puesto que mediante su aplicación se han obtenido mensajeros intactos a juzgar por el tamaño de los productos de la traducción in-vitro (2, 3). Por otro lado además de ser un método que da buena reproducibilidad al aplicarlo al P. falciparum permite remover la mayoría del DNA gracias a la alta temperatura de utilización del fenol (3).
- La inhibición de RNAsas durante el proceso mismo de extracción utilizando heparina, 2-mercaptoetanol y EDTA.
- d) La inhibición de RNAasas provenientes tanto del material como de las soluciones, los cuales fueron tratados con DPC (dietil pirocarbonato). Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores se obtuvieron 0.2pg RNA/parásito. Wallach obtiene 0.1pg/parásito (2) y Zolg 0.04pg/parásito (3), otros autores no reportan estos datos; esta discrepancia puede encerrar varias causas una de ellas la sincronía y edad de los parásitos y otra la limpieza del cultivo en lo que a células blancas se refiere.

Los datos obtenidos en nuestro laboratorio están afectados por la contaminación con células blancas ya que de 10.000 clonos hibridizados con DNA total del parásito y con DNA humano, el 50% de los que dieron señal positiva corresponden a DNA humano (datos no mostrados).

Esto indica que el procedimiento de separación de células blancas con Ficoll-Paque no es muy efectivo, pero los clonos contaminantes (RNA de leucocitos) se pueden descartar muy fácilmente en una búsqueda preliminar al hibridizar la genoteca contra DNA humano. Por otro lado este trabajo fue hecho utilizando una población de parásitos muy sincrónicos y en un estado de desarrollo (34h) en que hay máxima síntesis de RNA (11). Wallach, utilizó una mezcla de trofozoítos y esquizontes y Zolg habla de predominio de trofozoítos. Vale la pena recordar que en esquizontes la síntesis de RNA disminuye notoriamente (11).

La relación A260/A280 fue de 2.3 lo cual puede ser un indicativo de un buen grado de pureza en cuanto a contaminación con DNA se refiere. No se hicieron otras comprobaciones puesto que en la selección del mensajero con Oligo-dT celulosa se espera que a pesar de que el DNA del parásito es muy rico en AT (81%) no sea seleccionado por ser un DNA de doble cadena. A pesar de estas consideraciones han encontrado que la hidrólisis con NaOH de poli A-mRNA seleccionado en ésta forma deja un residuo no hidrolizable; además se ha mostrado la contaminación de poli A-RNA con secuencias de DNA, hibridizado con <sup>3</sup>H-poli U antes y después de la hidrólisis con NaOH, encontrándose que un 15% del material es resistente al alkali en condiciones en que un control de Poli A puro es completamente degradado. Los autores sugieren que la extracción fenólica descubre en el DNA regiones de simple cadena ricas en AT que pasan a la fase acuosa y pueden ser captadas por poli dT celulosa (3).

En nuestro caso la separación del RNA y el DNA se hizo con fenol caliente con el cual se remueve la mayoría del DNA y después se hizo una precipitación selectiva con LiCl, con el fin de eliminar no sólo el DNA restante sino RNAas pequeños como el tRNA. En los experimentos de traducción in-vitro no se obtuvieron diferencias al adicionar tRNA exógeno, bien del mismo parásito o de levadura (fig. 2 carriles 2, 3 y 4). La literatura informa sobre la necesidad de suplementar el sistema para estimular la traducción del mRNA del parásito, aduciendo que el tRNA disponible en el lisado de reticulocitos no cumple con los requerimientos del mRNA plasmodial por estar adaptado preliminarmente a la síntesis de globina (3, 16). En nuestro caso el tRNA recuperado de la fracción precipitable en cloruro de litio estaba mezclado con DNA del parásito ya que al pasarlo por Sephadex G-100 sale muy rápidamente (fracción 2) en otras palabras no se separa del DNA contaminante. Inicialmente se creyó que ésto no presentaría interferencias en el experimento de traducción, pero ahora es posible pensar que la pureza del tRNA es importante y que quizás es necesario separarlo mejor mediante otro tipo de Sephadex (G-200 por ejemplo).

En cuanto a los tRNA heterólogos utilizados se mencionan los provenientes de otras especies de Plamodium o de germen de trigo o de hígado de ternera pero no sobre tRNA de levadura. El que se utilizó era puro, sin embargo, no mejoró la traducción, quizás por no ajustarse a las exigencias del mensajero del parásito.

De todas maneras como lo muestra la figura 1 carril 6, fue posible visualizar productos de traducción de bajo, medio y alto peso molecular; quizás el hecho más importante es que muestran una gran similitud con las proteínas sintetizadas in-vivo en cultivos altamente sincronizados del parásito. La comparación de las figuras 1 y 2 muestra que tanto en la síntesis in-vivo en parásitos sincronizados con 24 horas de edad, como en la traducción in-vitro hay bandas comunes alrededor de 20, 30, 45, 66, 97, 100 y 205Kd. Se puede afirmar que por el hecho de obtener proteínas en todo el rango de peso molecular esperado, la calidad del mensajero aislado es buena. Quizás se puedan obtener señales más intensas estimulando la síntesis con tRNA puro del parásito.

En el carril 7 se muestra la traducción de la fracción correspondiente al poli A y aparece marcadamente una banda alrededor del 14Kd. Este hecho sugiere la posibilidad de que en el P. falciparum haya síntesis de polipéptidos dirigida por Poli A En P. yoelii se había encontrado que poli A dirigía la síntesis de proteínas aún con pesos moleculares superiores a 150 Kd, sin embargo, como los autores mismos lo anotan no se puede descartar la posibilidad de que estos mRNA aislados como poli A tengan algún pedazo muy corto de poli A en el extremo 3' o que por algún fenómeno poco usual la estructura secundaria de ese mensajero haya prevenido la accesibilidad de las secuencias poli A a la oligo dT (18).

En el carril 8 se muestran los productos de la traducción del lisado mismo suplementado con tRNA de levadura. Como se puede apreciar a pesar de haber escogido un lisado comercial, desprovisto de aminoácidos endógenos la síntesis fue muy alta comparada con la de las muestras. (70% en el control y 30% en las muestras).

Este fue el principal criterio tenido en cuenta para juzgar la calidad del mRNA y una vez comprobada se pasó a sintetizar el cDNA para poderlo clonar. El método de síntesis se escogió cuidadosamente pensando en obtener copias completas de la plantilla utilizada. El método de Gubler y Hoffman combina la síntesis clásica de la primera cadena (12) con la síntesis novedosa de la segunda cadena introducida por Okayama (7), utilizando RNAsa H y DNA polimerasa I. La ventaja de este método es que suprime el clivaje con nucleasa S1 del gancho que aparece en la síntesis de la primera cadena el cual puede remover parte del CAP. del mensajero, y además no utiliza el sistema tan elaborado del vector iniciador de la síntesis propuesto por Okayama; por otro lado sí ha permitido obtener genotecas de cDNA preparadas con este protocolo con una alta eficiencia de clonación (106 clonos/ μg de cDNA).

Los experimentos mostraron rendimientos en la síntesis de las dos cadenas dentro de lo esperado teóricamente (7% para la primera y 66% para la segunda). Como vector de clonación de usó el fago \(\lambda\gamma\text{t10}\), básicamente porque tiene una alta eficiencia de empaquetamiento in-vitro, lo cual es importante cuando la disponibilidad del material a clonar depende de la disponibilidad del parásito. Además este vector puede aceptar insertos hasta de 7.6 Kb, rango de tamaño aceptable para los mensajeros del parásito.

El cDNA fue necesario prepararlo para ser ligado o los brazos EcoRI del vector escogido. En este procedimiento el único hecho notorio fue la baja recuperación del DNA control en la separación del exceso de adaptadores. El DNA control contenía fragmentos muy pequeños (69, 98, 100, 102, 117, 158, 169, 214, 236, 309, 311, 341, 849 pb) que al salir en las últimas fracciones podrían seguir mezclados con los acopladores, por lo tanto sólo se trabajó con las primeras fracciones que se supone estaban separadas del contaminante.

Después del empaquetamiento in-vitro se pasó a seleccionar los clonos recombinantes. El sistema de selección biológica está basado en el hecho de que el\[alpha\text{t10}\] contiene un solo sitio EcoRI en el gen represor

cI dentro del cual se inserta el cDNA. La función del gen cI en el ciclo de vida normal del fago es escoger entre la vía lítica v la lisogénica; la célula bacterial sobrevive la infección lisogénica y no produce partículas de fago. Un fago parental favorece la vía lisogénica puesto que su gen cI está activo y produce placas turbias en una cepa de E. coli silvestre como la L87. Sobre una mutante de E. coli con una alta frecuencia de lisogenia tal como la NM514, el fago es forzado a entrar en la vía lisogénica y no produce lisis celular ni partículas de fago. Cuando se inserta un cDNA en el sitio EcoRI el gen cI se inactiva, el fago recombinante favorece la vía lítica y se producen placas claras; esto hace distinguir visualmente con mucha claridad entre el fago recombinante y el parental. Cuando la cepa lleva la mutación de alta lisogenia (NM514) y es infectada por fago parental es represado tan eficientemente que la formación de placas se suprime. Si en esta cepa se siembra el fago recombinante hay formación de placas en una forma normal y muy eficiente. Es decir al sembrar la genoteca en este tipo de mutante se eliminan eficientemente los fagos parentales.

Para analizar los resultados del experimento de clonación se hicieron varios controles (tabla 2). Se sembró λgt10-DNA en la cepa L87 con lo cual se perseguía conocer la eficiencia de la reacción de empaquetamiento in-vitro; teóricamente debe ser mayor de 2x108 ufp/μg (15). La relación de este título en L87 (huésped no selectivo) y NM514 (huesped selectivo) da una indicación del grado de selección biológica. Esta relación debe ser mayor de 100, generalmente muy cercana a 1000 (15). Experimentalmente se obtuvo una relación igual a 400, lo cual nos indica que la selección no fue tan extricta y posiblemente muchos de los clonos no poseen inserto.

Un segundo control fue \(\lambda\)gt10-brazos EcoRI: su título en L87 confirma que los brazos y la T4-DNA ligasa trabajaron eficientemente; el título obtenido fue de 2.5x10<sup>7</sup> ufp/\(\mu\)g de brazos indicando que la ligación fue buena pues se esperaba un título de 10<sup>7</sup> ufp/\(\mu\)g de brazos (15). Un último control se llevó a cabo con el DNA de M13mp 8 ligado a los brazos del vector con el fin de verificar el funcionamiento del sistema completo de clonación. Si en este caso la clonación es efectiva se asegura que el sistema empleado es correcto y si hay fallas al trabajar con el cDNA posiblemente el problema podría estar en él; sin embargo,

la eficiencia de clonación con el cDNA fue de  $4.4x10^6$  recombinantes/µg de cDNA. Con sólo 50ng de cDNA se obtuvieron  $1.1x10^5$  recombinantes, cantidad que representa suficientemente la población de mensajeros del parásito.

Como conclusión se puede afirmar que el protocolo utilizado para extracción de RNA de *P. falciparum* permitió obtener mensajeros de buena calidad; este hecho facilitó la obtención del cDNA cuyo tamaño será evaluado mediante el análisis de algunos clonos positivos para *P. falciparum*.

Además el sistema de clonación de Amersham permitió obtener los resultados previstos por los fabricantes.

Esta genoteca se está caracterizando actualmente y será utilizada en estudios de expresión de genes y de análisis de frecuencia de aparición de genes.

#### **SUMMARY**

Poly A mRNA was isolated from *P. falciparum* (Colombian strain FCB-2). The parasites were 34-36 hours old trophozoites. The messenger RNA was translated in a rabbit reticulocyte cell-free system and <sup>35</sup>S-methionine labelled proteins were analized with S. D. S. PAGE.

The translation products range were betwen 20 and 200 Kd and correlate closely with the in-vivo labelled protein, using stringent synchronous cultures.

A cDNA library has been constructed in phage  $\lambda gt10$  from poly A mRNA. Cloning efficency was  $4.4x10^6$  recombinant per  $\mu g$  cDNA.

### **AGRADECIMIENTOS**

A Colciencias. Este trabajo forma parte del proyecto No. 2104 - 05 - 005 - 85 financiado por el Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos Especiales "Francisco José de Caldas" - COL-CIENCIAS.

Al señor Jaime Vega por el trabajo fotográfico.

# **BIBLIOGRAFIA**

- Hyde JE, Zolg JW, Scaife DG. Isolation and characterization of ribosomal RNA from the human Malaria parasite P. falciparum. Mol Biochem Parasitol. 1981; 4: 283
- Wallach M. Efficient extraction and translation of P. falciparum messenger RNA. Mol Biochem Parasitol. 1981; 6: 335.
- Hyde JE, Goman M, Hall Roger, Osland Arve, Hope IA, Langsley G, Zolg JM, Scife JG. Characterization and translation studies of messenger RNA from the human malaria Plasmodium falciparum and construction of a cDNA library. Mol Biochem Parasitol. 1984; 10: 269.
- Hough BR, Evans, Howard J. Genome size and DNA complexity of P. falciparum. Bioch, Bioph. Acta. 1982; 698: 56.
- Langsley G, Hyde J, Goman M, Scaife JG. Cloning and characterization of the rRNA genes from human malaria parasite P. falciparum Nucl Ac Res 1983; 11: 8703.
- Lustigman S, Crewther PE, Murray L, Andres RF, R. 1. Coppel GV, Brown. Synthesis, fate and post translational processing of *P. falciparum* antigens. 3rd international conference on malaria and Babesiosis. Sept. 1987 ANNENCY -FRANCE pag. 217.
- Hap A, Delplace P, Dubremets SF, Weber S, Camus D. P. falciparum: inmunization of mice with a recombinant protein from P 126. 3rd international conference on malaria and Babesiosis. Sept. 1987 ANNENCY - FRANCE pag. 211.
- Dame JB, Williams JL, Cutchan TF, Weber JL, Wirtz RA, et al. Structure of the gene encoding the inmunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite P. falciparum. Science, 1984; 225: 593.

- Ellis EV, Zabala JF, Arnot DE, Asavanich A, Masuda A, Quakyi I, Nussenzweig RS. DNA cloning of P. falciparum circunsporozoite gene: amino acid sequence of repetitive epitope. Science, 1984; 225: 628.
- Eichnges DJ, Arnot DE, Nussenweig V, Enez V. Circunsporozoite proteins of *P. verghei* gene cloning and identification of the inmunodominant epitopes. Mol Cell Biol, 1986; 6: 3965.
- De Rojas M Orfa, Wasserman M. Supersincronización del crecimiento in-vitro del P. falciparum. Biomédica 1987; 7: 75.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory 1987; pag. 197.
- Davis LG, Dibner MD, Battey JF. Basic methods in molecular biology. Elsevier Science Publishing Co Inc 1986; pag. 139.
- Gubler U, Hoffman BJ. A simple and very efficent method for generating cDNA libraries. GENE 1983; 25: 263.
- Amersham. cDNA cloning system -λgt10. Amersham. International plc 1986.
- Wallach M, Kilejian A. The importance of tRNA for the in-vitro cell free tanslation of messenger RNA isolated from the malaria parasite *Plasmodium lomphurae*. Mol and Bioch Parasitol. 1982; 5: 245.
- Okayama H, Berg P. High efficiency cloning of full length cDNA. Mol Cell Biol 1982; 2: 161.
- Vaidya AB, Schleif WA, Masarian WR, Daly TM, Taylor DW, Long CA. Analysis of mRNA coding for blood stage antigens of a rodent malaria parasite, *P. yoelii*: mRNA coding for a possible protective antigen purify as poly A<sup>-</sup>. J Inmunol 1984; 132: 3126.