

ANALISIS DE PLASMIDOS RECOMBINANTES CON INSERTOS DE ADN GENOMICO DE *Plasmodium falciparum*

FERNANDO ANGEL S.*, RAMON MANTILLA*, MOISES WASSERMAN*, **

Se describe la preparación de plásmidos pUC18 recombinantes provenientes de la construcción de una biblioteca genómica del parásito *Plasmodium falciparum* usando una modificación del método de lisis alcalina (1). La cantidad de plásmido producido es suficiente para llevar a cabo varios análisis de digestión con enzimas de restricción y electroforesis en geles de agarosa.

INTRODUCCION

Para determinar si una bacteria posee un plásmido en su interior, es necesario aislar el ADN mediante varias etapas sucesivas. El ADN cromosomal y el plasmídico son generalmente extraídos a partir de bacterias que han sido tratadas con lisozima y lisadas con un detergente. Posteriormente el ADN es liberado de ARN y de proteínas mediante tratamientos con ribonucleasa y proteasa. Después de sucesivas extracciones fenólicas, el ADN plasmídico circular es purificado en un gradiente de CsCl en presencia de bromuro de etidio (2).

Varios métodos para la preparación de plásmidos recombinantes a partir de *Escherichia coli* han sido descritos (3-8), siendo el método de la lisis alcalina uno de los más usados por su sencillez y buen rendimiento (9). Sin embargo, este método no es ideal cuando se requiere examinar un gran número de clones de una forma rápida. Con el fin de resolver estos problemas, una modificación del método de lisis alcalina fue establecida (1), permitiendo aislar plásmidos recombinantes a partir de cultivos de poco volumen y facilitando de esta forma el análisis de una gran cantidad de clones en corto tiempo.

En el presente trabajo se describe el análisis por dicho método de varios plásmidos pUC18 recombinados. Los plásmidos recombinantes provienen de una

biblioteca genómica de *Plasmodium falciparum* construida en el plásmido pUC18 (10-12). La cantidad de plásmido producida por el método usado oscila entre 3 y 5 ug, lo que permite llevar a cabo entre 10 y 15 análisis electroforéticos en minigeles de agarosa, de cada plásmido extraído.

MATERIALES Y METODOS

Cultivo Bacteriano

Se utilizó la bacteria *Escherichia coli* JM83 transformada con el plásmido pUC18 recombinado (10-14). Las bacterias de la misma cepa, conteniendo el plásmido pUC18 no recombinado, fueron usadas como control.

A partir de una colonia transformada, se inoculó con un asa estéril, un volumen de 2,5 ml de medio de cultivo TB, suplementado con ampicilina en una concentración de 25 ug/ml (15). El cultivo fue incubado a 37°C durante 15 horas.

Lisis alcalina

Las células bacterianas fueron recuperadas tomando 1,3 ml del cultivo en un tubo de polipropileno de 1,6 ml por centrifugación a 1600xg durante 10 minutos a 4°C en una microcentrífuga Tomy MR 150. El sobrenadante fue desechado y 1,2 ml de cultivo fueron

* Grupo de Bioquímica. Instituto Nacional de Salud.

**Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia.

centrifugados de la misma forma. Una vez eliminado el sobrenadante, el precipitado fue suspendido en 1 ml de tampón STE (10mM Tris HCl pH 8.0 - 100mM NaCl - 1mM EDTA) y precipitado nuevamente por centrifugación a 1600xg durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado por aspiración dejando el precipitado lo más seco posible.

El precipitado fue resuspendido en 0,2 ml de tampón de lisis (50mm glucosa - 10mm EDTA - 25mM Tris-HCl pH 8.0 - lisozima 10 mg/ml), homogenizado y mantenido 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, 0,4 ml de solución alcalina fría (NaOH 0,2N-SDS 1%) preparada en el momento de usar, fueron agregados a la suspensión. La solución fue mezclada por inversión del tubo y mantenida en hielo por 5 minutos. Luego fueron agregados 0,3 ml de una solución de acetato de potasio 3M (pH 4.8) (16), mezclados durante 10 segundos y la mezcla final fue incubada en hielo por 15 minutos; posteriormente fue centrifugada a 6000xg durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, teniendo cuidado de no pasar partículas de precipitado. El volumen correspondiente al sobrenadante recuperado osciló en todos los experimentos entre 0,80 y 0,85 ml.

Una mezcla fenol-cloroformo en un volumen de 0,6 ml, fue agregada al sobrenadante y la solución resultante fue mezclada por inversión suave varias veces durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 800xg durante 5 minutos, a temperatura ambiente, la fase acuosa superior fue recuperada (0,75 ml), transferida a un nuevo tubo y extraída nuevamente con 0,75 ml de una nueva mezcla fenol-cloroformo. Después de centrifugar como se describió anteriormente, la fase acuosa fue recuperada (0,6 ml) y extraída con un volumen igual de cloroformo. La fase acuosa (0,45 - 0,50 ml) fue transferida a un nuevo tubo y extraída 2 veces con igual volumen de éter etílico saturado en tampón TE (10mM Tris-HCl pH 7.5-1mM EDTA). El éter fue eliminado completamente por calentamiento a 68°C durante 10 minutos. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y 0.6 volúmenes de isopropanol fueron agregados. Después de mezclar suavemente, el ADN fue precipitado a temperatura ambiente durante 5 minutos.

El ADN precipitado fue recuperado por centrifugación a 7000xg por 30 minutos, a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado fue

lavado con 0.5 ml de etanol absoluto y recuperado nuevamente por centrifugación a 12000xg durante 10 minutos, a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado se dejó secar colocando el tubo invertido sobre un papel absorbente. Una vez seco, el precipitado fue disuelto en 50 ul de tampón TE conteniendo ribonucleasa A en una concentración final de 50 ug/ml. La solución fue incubada por 10 minutos a 37°C e inmediatamente después analizada por electroforesis.

Electroforesis y Digestión

Con el fin de determinar la concentración de ADN plasmídico obtenido, una pequeña cantidad del preparado final (2-5ul) fue comparada con ADN plasmídico patrón, de concentración conocida, mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Alternativamente, también se usó la técnica de fluorescencia, emitida por coloración con bromuro de etidio para determinar la concentración de ADN plasmídico obtenido (16).

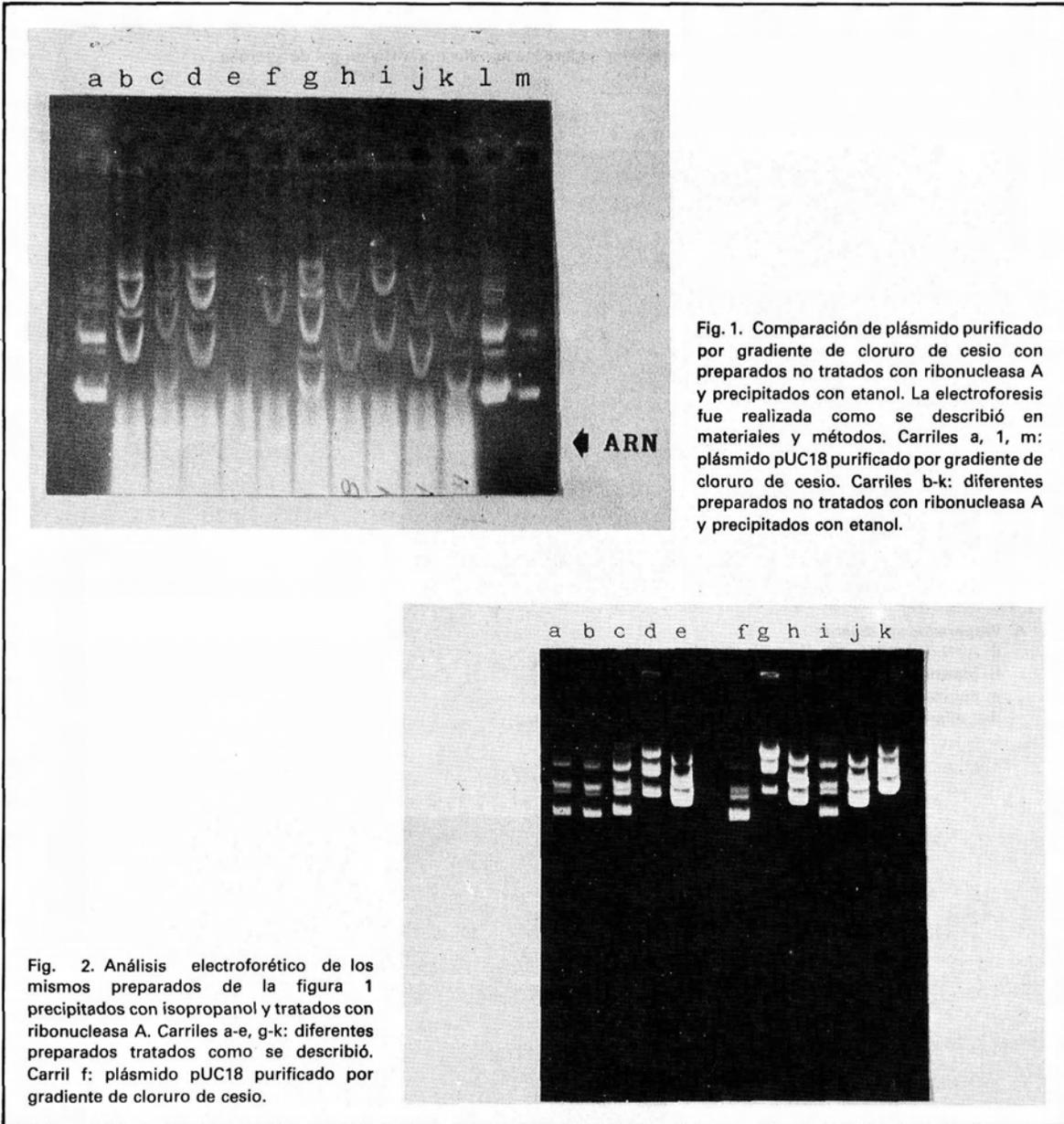
Una vez establecida la concentración de ADN plasmídico, se digirieron con la enzima de restricción apropiada entre 100 y 300 nanogramos del plásmido a 37°C; los fragmentos generados por la digestión fueron separados por electroforesis.

RESULTADOS

Para determinar la presencia de plásmidos recombinantes a partir de varios clones provenientes de una Genoteca de ADN de *Plasmodium falciparum*, se usó el método de minipreparación por lisis alcalina (1).

Inicialmente se hicieron ensayos omitiendo la digestión del preparado final con ribonucleasa A y precipitando el ADN plasmídico con etanol absoluto, en lugar de isopropanol. En la Figura 1 se muestra claramente la cantidad de ARN presente en los minipreparados (carriles b-k) comparados con plásmido purificado en gradiente de cloruro de cesio usado como control (carriles a, 1' m).

Con el fin de eliminar el ARN, los preparados fueron incubados con ribonucleasa A, como se describió en materiales y métodos. Bajo estas condiciones el ARN fue eliminado en gran parte pero no totalmente (resultados no mostrados). La precipitación con isopropanol, además de la digestión con ribonucleasa A, permitieron eliminar el ARN eficientemente como se observa en la Figura 2.

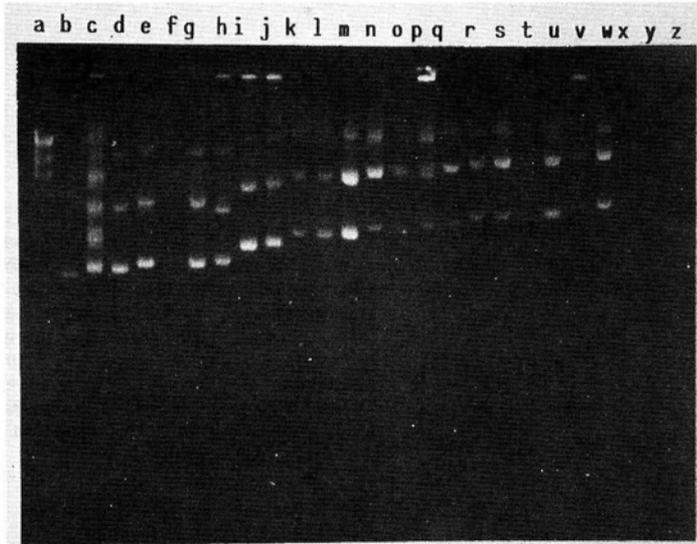


Los preparados ya libres de ARN fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa, antes y después de digestión. Los preparados sin digerir muestran los diferentes grados de enrollamiento que presentan las moléculas de ADN circulares (Figura 3A).

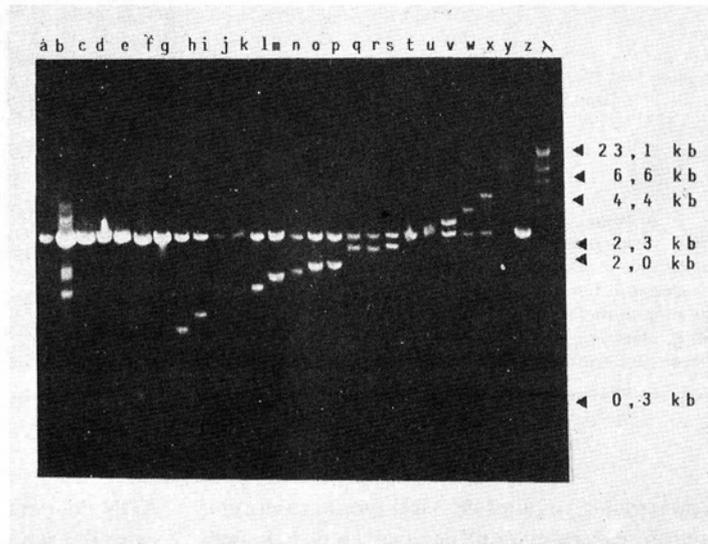
Los preparados digeridos con la enzima EcoRI mostraron que el tamaño de los fragmentos clonados de

ADN del parásito y analizados en este trabajo, oscila entre 0,3 Kb y 10 Kb. Además mostraron claramente que éstos están libres de contaminación por ADN bacteriano y por ARN. La eliminación total del ARN es muy importante ya que la presencia de éste enmarcaría fácilmente fragmentos de bajo peso molecular como es el caso de 4 de los fragmentos analizados (Figura 3B, carriles d, e, f, g).

Fig.3. 25 diferentes preparados separados por electroforesis en gel de agarosa.



- A. Preparados sin digerir
a: ADN de lambda digerido con Hind III
b: plásmido pUC18
c: mezcla de plásmidos recombinados
d-z: diferentes preparados sin digerir.



- B. Los mismos preparados presentes en A después de digestión con la enzima Eco RI
a: plásmido pUC18
b: mezcla de plásmidos recombinados
c-z: diferentes preparados digeridos
 λ : ADN de lambda digerido con Hind III
Los pesos moleculares son expresados en kilobases (kb).

DISCUSION

La preparación rápida y el análisis de plásmidos a partir de pequeños cultivos, es esencial en estudios de biología molecular y de resistencia de bacterias a diferentes antibióticos. Varios métodos para la preparación rápida de plásmidos, que permiten el análisis de muchas muestras en poco tiempo a partir de pequeños cultivos, han sido descritos (7-9, 17, 18), siendo el método de la lisis alcalina uno de los más usados por su sencillez y buen rendimiento (1).

Nosotros analizamos 25 plásmidos recombinantes provenientes de una genoteca de ADN de *Plasmodium falciparum* construida en el plásmido pUC18 (10-12). Las preparaciones obtenidas mostraron un alto grado de pureza, ya que se eliminó eficientemente el ARN y el ADN bacteriano, como fue verificado por electroforesis (Figura 2). La eliminación de ARN es esencial, ya que la presencia de éste hubiera imposibilitado la visualización de fragmentos de bajo peso molecular (Figura 3B, carriles d, e, f, g).

La cantidad de plásmido producido a partir de 2,5 ml de cultivo fue de 3 a 5 ug, cantidad que permite llevar a cabo de 10 a 15 electroforesis en agarosa. En el caso de producir plásmido pUC18, el rendimiento es cerca de cinco veces mayor, cuando se usa el medio TB que cuando se usa el medio LB corrientemente utilizado; este resultado ha sido recientemente informado (15) y ha sido verificado por nosotros tanto en pequeños como en grandes preparaciones de dicho plásmido.

El método de minipreparación por lisis alcalina nos permitió hacer un análisis de 25 muestras en un solo día, lo cual es una ventaja cuando se quieren analizar clones recombinantes provenientes de la construcción de una biblioteca genómica.

Los fragmentos analizados aquí deberán ser estudiados en más detalle, debido a que son elementos muy útiles para el diagnóstico de la malaria por hibridación molecular y para llevar a cabo estudios sobre la biología del parásito.

SUMMARY

We describe here the growth and preparation of pUC18 recombinant plasmids from a *Plasmodium falciparum* genomic DNA library. The protocol used is

a modification of alkaline lysis method (1). This method yields a quantity of plasmid DNA that is sufficient for subsequent analysis by restriction digestion and agarose electrophoresis.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con la ayuda de JICA, Japan International Cooperation Agency y el Fondo de Investigaciones Francisco José de Caldas "Colciencias".

BIBLIOGRAFIA

1. Isch-Horowicz D, Burke JF. Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* 1981; 9: 2989.
2. Radloff R, Bauer W, Vinograd J. A dye-buoyant density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: The closed DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1967; 57: 1514.
3. Meyers JA, Sánchez D. Simple gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol.* 1976; 127: 1529.
4. Barnes WM. Plasmid detection and sizing in single colony lysates. *Science* 1977; 195: 393.
5. Michel S, Arena V, Bauer W. Physical properties and gel electrophoresis behavior of R12-derived plasmid DNAs. *Nucleic Acids Res.* 1977; 4: 1465.
6. Telford J, Boseley P. Novel screening procedure for recombinant plasmids. *Science* 1977; 195: 391.
7. Eckhardt T. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1978; 1: 584.
8. Klein RD, Selsing E, Wells RD. A rapid microscale technique for isolation of recombinant plasmid DNA for restriction enzyme analysis. *Plasmid* 1980; 3: 68.
9. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979; 7: 1513.
10. Angel F, Mantilla R, Wasserman M. Clonaje molecular del DNA de *Plasmodium falciparum* (FCB-1). II Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical, Mayo 25-29, 1987. Bogotá (Colombia).
11. Mantilla R. Construcción de una biblioteca genómica de *Plasmodium falciparum* e identificación de clones por hibridación. Tesis Ms.Sc., Facultad de Química, Universidad Nacional de Colombia, 1988.

12. López E, Acosta H. Caracterización de fragmentos genómicos de ADN de *Plasmodium falciparum* generados con la enzima EcoRI y clonados en el plásmido pUC18. Tesis de Grado, Facultad de Química, Universidad Nacional de Colombia, 1988.
13. Viera J, Messing J. The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 1982; 19: 259.
14. Ruther U. Construction and properties of a new cloning vehicle, allowing direct screening for recombinant plasmids. *Molec Gen Genet.* 1980; 178: 475.
15. Tartof KD, Hobbs CA. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Focus*, BRL 1987; 9(2): 12.
16. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory; Cold Spring Harbor 1982.
17. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol.* 1981; 141: 1365.
18. Gibson TJ, Sulston JC. Preparation of large numbers of plasmid DNA samples in microtiter plates by the alkalyne lysis method. *Gene Anal Techn.* 1987; 4: 41.